

**Allgemeine und funktionelle Untersuchungen
zur großen Untereinheit des humanen Replikationsfaktors C (*RFC1*),
sowie initiale Untersuchungen zur Regulation der Expression
von *RFC1* durch das BCR-ABL^{p210}-Onkogen**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Frank Breitenbücher
aus Mannheim

Marburg/Lahn 2005

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 11.05.05
angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker
Zweitgutachter: PD. Dr. Thomas Fischer

Tag der mündlichen Prüfung am 03.06.05

Irrtümer haben ihren Wert
jedoch nur hie und da.
Nicht jeder, der nach Indien fährt,
entdeckt Amerika.

Erich Kästner

Für meine Lieben:
Sandra, Emilie und Alina

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der humane Replikationsfaktor C	1
1.2	Die große Untereinheit des humanen Replikationsfaktors C (<i>RFC1</i>)	5
1.3	Die Chronische myeloische Leukämie (CML)	8
1.3.1	BCR-ABL als Onkogen	11
1.4	Ziele der Arbeit	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Geräte und Zubehör	16
2.1.2	Chemikalien	17
2.1.3	Puffer und Lösungen	17
2.1.4	Nährmedien	24
2.1.5	Enzyme	24
2.1.6	Größenstandards	24
2.1.7	Nukleinsäuren und Nukleotide	25
2.1.8	Plasmide	25
2.1.9	Rekombinante Plasmide	26
2.1.10	Bakterienstämme	28
2.1.11	Fertigsysteme zur Aufreinigung von DNA und RNA	28
2.1.12	Sonstige Fertigsysteme	28
2.1.13	Zellkulturmedien, Zusätze und Materialien	28
2.1.14	Zelllinien	30
2.1.15	Antikörper und Seren	32
2.1.16	Datenbanken	33
2.1.17	Software	34
2.1.18	Auftragsarbeiten	34
2.2	Methoden	35
2.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA durch Alkalische Lyse	35
2.2.1.1	Plasmid-Minipräparation	35
2.2.1.2	Plasmid-Maxipräparation	36
2.2.2	Photometrische Bestimmung von DNA/RNA-Konzentrationen	36
2.2.3	Spaltung von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen	37
2.2.4	Dephosphorylierung von Vektoren	37
2.2.5	Ligation	38

2.2.6	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	38
2.2.7	Agarosegelelektrophorese	39
2.2.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	40
2.2.9	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	40
2.2.10	Transfer von DNA Fragmenten auf eine Nylonmembran („Southern-Blot“)	41
2.2.10.1	Transfer der DNA	41
2.2.10.2	Hybridisierungsanalyse der DNA	42
2.2.10.3	Dehybridisierung der Membran	42
2.2.11	Generierung von Replika-Filtern zur Kolonie-Hybridisierung	42
2.2.11.1	Hybridisierungsanalyse von Replika-Filtern	43
2.2.12	Polymerasekettenreaktion	44
2.2.13	Arbeiten mit RNA	45
2.2.13.1	Gewinnung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen	46
2.2.13.2	Gewinnung angereicherter poly-A ⁺ -RNA aus eukaryontischen Zellen	46
2.2.13.3	Herstellung von cDNA (Erststrangsynthese)	46
2.2.13.4	Determinierung des 5´-Endes einer genspezifischen mRNA mittels 5´-RACE (<u>R</u> apid <u>a</u> mplification of <u>c</u> DNA <u>e</u> nds)	46
2.2.13.5	Transfer von RNA-Fragmenten auf eine Nylonmembran („Northern-Blot“)	47
2.2.13.5.1	Fraktionierung von RNA mittels denaturierender Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese	47
2.2.13.5.2	Transfer der RNA	48
2.2.13.5.3	Hybridisierungsanalyse der RNA	48
2.2.13.5.4	Dehybridisierung der Membran	49
2.2.14	Arbeiten mit Proteinen	50
2.2.14.1	Gewinnung von Gesamtzellextrakten	50
2.2.14.2	Extraktion angereicherter Kernproteinextrakte	51
2.2.14.3	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	51
2.2.14.4	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	52
2.2.14.4.1	Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membranen („Western Blot“)	53
2.2.14.4.2	Immundetektion immobilisierter Proteine	54
2.2.14.4.3	Dehybridisierung der Membran	54
2.2.15	Zellbiologische Methoden	55
2.2.15.1	Auftauen von Zellen	55
2.2.15.2	Passagieren von Zellen	55

2.2.15.3	Langfristige Lagerung von Zellen	56
2.2.15.4	Transfektion eukaryontischer Zellen mittels Elektroporation	56
2.2.15.5	Generierung stabil transfizierter Zelllinien	57
2.2.16	Durchflußzytometrie	58
2.2.16.1	Durchflußzytometrische Bestimmung des zellulären DNA-Gehalts mittels Propidiumiodid-Inkorporation	58
2.2.16.2	Durchflußzytometrische Messung der zellulären DNA-Synthese	59
2.2.17	UV-Bestrahlung von Zelllinien	60
2.2.18	Behandlung von Zelllinien mit Zytostatika	60
2.2.19	Alkalische Einzelzell-Gelelektrophorese ("Comet-assay")	60
3	Ergebnisse	63
3.1	Untersuchung der mRNA-Expression von <i>RFC1</i> in verschiedenen adulten humanen Geweben mittels Northern-Hybridisierung	63
3.2	Identifikation und Sequenzanalyse der potentiellen Promotorregion von <i>RFC1</i>	64
3.2.1	Isolierung genomischer Klone, die den 5'-Bereich von <i>RFC1</i> repräsentieren	65
3.3	Determinierung der Transkriptionsstartstelle von <i>RFC1</i> mittels 5'-RACE	71
3.4	Sequenzanalyse und Identifikation potentieller cis-regulatorischer Elemente in der proximalen genomischen 5'-Region von <i>RFC1</i>	75
3.5	Untersuchungen zur Expression von <i>RFC1</i> und <i>mRFC1</i> in Abhängigkeit von BCR-ABL ^{p210} in verschiedenen zellulären Systemen	77
3.5.1	Proteinexpression von <i>mRFC1</i> in murinen, hämatopoetischen Zelllinien	77
3.5.2	Proteinexpression von <i>RFC1</i> in humanen, hämatopoetischen Zelllinien	78
3.5.3	Proteinexpression von <i>RFC1</i> in primären humanen, hämatopoetischen Vorläuferzellen (Progenitorzellen)	79
3.5.4	Analyse zu Auswirkungen einer Blockade der Kinase-Aktivität von BCR-ABL ^{p210} auf die Proteinexpression von <i>RFC1</i>	82
3.5.5	Analyse der mRNA-Expression von <i>RFC1</i> und <i>mRFC1</i> in humanen und murinen, hämatopoetischen Zelllinien	84
3.5.5.1	Nachweis der mRNA-Expression von <i>RFC1</i> durch semiquantitative PCR in humanen, hämatopoetischen Zelllinien	84
3.5.5.2	Analyse der mRNA-Expression von <i>mRFC1</i> in murinen, hämatopoetischen Zelllinien mittels semiquantitativer PCR und Northern-Hybridisierung	86

3.5.6	Untersuchungen zur Proteinstabilität von <i>RFC1</i> in humanen, hämatopoetischen Zelllinien	88
3.6	Analyse der Sensitivität der humanen, hämatopoetischen Zelllinien Mo7e und Mo7e BCR-ABL ^{p210} gegenüber Zytostatika und UV-Bestrahlung	91
3.7	Stabile Transfektion humaner Zelllinien zur ektopischen Expression von <i>RFC1</i>	94
3.8	Analyse der Sensitivität humaner Zelllinien, die eine ektopische Expression von <i>RFC1</i> aufweisen, gegenüber UV-Bestrahlung	96
3.9	Reversion des UV-hypersensitiven Phänotyps <i>RFC1</i> -transfizierter Zelllinien durch Blockade der Caspasen-Aktivierung	98
3.10	Analyse der Sensitivität humaner, <i>RFC1</i> -transfizierter Zelllinien, gegenüber einer Behandlung mit verschiedenen Zytostatika	100
3.11	Nachweis von NER-(Nukleotid-Exzisionsreparatur) induzierten DNA-Strangbrüchen nach UV-Bestrahlung mittels alkalischer Einzelzell-Gelelektrophorese („Comet assay“) in <i>RFC1</i> -transfizierten, humanen Zelllinien	102
3.12	Analyse der DNA-Synthese <i>RFC1</i> -transfizierter, humaner Zelllinien nach UV-Bestrahlung mittels durchflußzytometrischer Messung der BrdU-Inkorporation	104
4	Diskussion	106
4.1	Klonierung und Sequenzanalyse der putativen Promotorregion, sowie des Transkriptionsstarts von <i>RFC1</i> zur Identifikation potentieller cis-regulatorischer Sequenzelemente	106
4.1.1	Die Transkriptionsstartstelle von <i>RFC1</i>	108
4.1.2	Isolierung genomischer Subklone und Sequenzanalyse des putativen Promotorbereichs von <i>RFC1</i>	109
4.2	Exemplarische Untersuchungen zum Einfluß von BCR-ABL ^{p210} auf die Expression von <i>RFC1</i>	111
4.3	Beeinflußt eine durch BCR-ABL ^{p210} erhöhte Expression von <i>RFC1</i> das Überleben von Zellen nach DNA-Schädigung ?	117
4.4	Eine stabile, ektopische Expression von <i>RFC1</i> in humanen Zellen führt zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber UV-Bestrahlung und DNA-schädigenden Zytostatika	119
4.5	Ausblick	124
5	Zusammenfassung	127

6	Literaturverzeichnis	131
7	Anhang: Oligonukleotide und Sequenzen	149
8	Abkürzungsverzeichnis	156
9	Lebenslauf und Publikationen	160
10	Danksagung	162

1 Einleitung

1.1 Der humane Replikationsfaktor C

Der humane Replikationsfaktor C (RFC) wurde erstmals aus HEK293 und kurze Zeit später aus HeLa-Zellen isoliert und erwies sich als essentieller Proteinkomplex für die Replikation von Simian-virus-40-(SV-40)-DNA *in vitro* (Tsurimoto und Stillman, 1989; Lee et al., 1991). Der RFC-Komplex setzt sich aus fünf Untereinheiten zusammen (RFC1-RFC5). Die für die einzelnen Untereinheiten des Heteropentamers kodierenden Gene wurden kloniert und sequenziert (Chen et al., 1992a; Chen et al., 1992b; Burbelo et al., 1993; Bunz et al., 1993). Die Untereinheiten besitzen molekulare Massen, abgeleitet aus deren Aminosäuresequenz, von 128,3; 39; 40,5; 39,6; und 38,5kDa und weisen nach elektrophoretischer Auftrennung mittels SDS-PAGE eine Molekularmasse von 140; 40; 38; 37 und 36kDa auf. Ein funktionell homologer Proteinkomplex, der in seiner Zusammensetzung aus einer großen und vier kleinen Untereinheiten dem humanen RFC sehr ähnlich ist, wurde ebenfalls in Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) identifiziert und charakterisiert. Deletionsanalysen haben gezeigt, daß alle Untereinheiten für die Funktionalität des gesamten Komplexes essentiell sind (Yoder et al., 1991; Burgers 1991; Li und Burgers, 1994a; Li und Burgers, 1994b; Noskov et al., 1994; Gary und Burgers, 1995; Cullmann et al., 1995). Eine Funktion des RFC-Komplexes besteht in der ATP-abhängigen Beladung der DNA mit dem ringförmigen, homotrimeren Prozessivitätsfaktor PCNA (Proliferating cell nuclear-antigen) während der DNA-Replikation. Nach der Positionierung durch RFC an den 3'-OH Enden der von Polymerase α /Primase synthetisierten Oligonukleotide („Primer/Template“-Strukturen) rekrutiert PCNA die an der replikativen DNA-Synthese beteiligten DNA-Polymerasen δ und ϵ . Durch Interaktion mit PCNA wird eine hochprozessive DNA-Synthese der Polymerasen während der Replikation gewährleistet (Mossi und Hübscher, 1998). Aus der Zusammenfassung verschiedener *in vitro*-Untersuchungen mit rekombinanten Proteinen humanen Ursprungs, als auch aus *Saccharomyces cerevisiae*, läßt sich ein mögliches theoretisches Modell zum Mechanismus des Beladungsprozesses von PCNA durch den RFC-Komplex ableiten. Demnach könnte der heteropentamere RFC-Komplex zunächst in Anwesenheit von ATP an PCNA binden. Eine Konformationsänderung des RFC/PCNA-Komplexes, möglicherweise bedingt durch schrittweise Bindung weiterer

ATP-Moleküle an RFC, ermöglicht zum einen die Öffnung der homotrimeren PCNA-Ringklemme und zum anderen eine Erhöhung der Präferenz von RFC für die Bindung an „Primer/Template“-Strukturen. Die korrekte Bindung an diese Übergänge von doppelsträngiger zu Einzelstrang-DNA führt durch Hydrolyse von ATP zu einer weiteren Konformationsänderung, die schließlich in der Positionierung von PCNA am 3'-OH-Ende der Übergangsstruktur, sowie der Dissoziation des RFC-Komplexes resultiert. PCNA rekrutiert im Anschluß an die Positionierung die replikativen DNA-Polymerasen δ/ϵ (Podust et al., 1998; Gomes und Burgers, 2001; Gomes et al., 2001; Gary Schmidt et al., 2001; Hingorani und Coman, 2002). In Abbildung 1.1 ist der Ablauf der Beladung von PCNA durch RFC gemäß dieses hypothetischen Modells schematisch dargestellt.

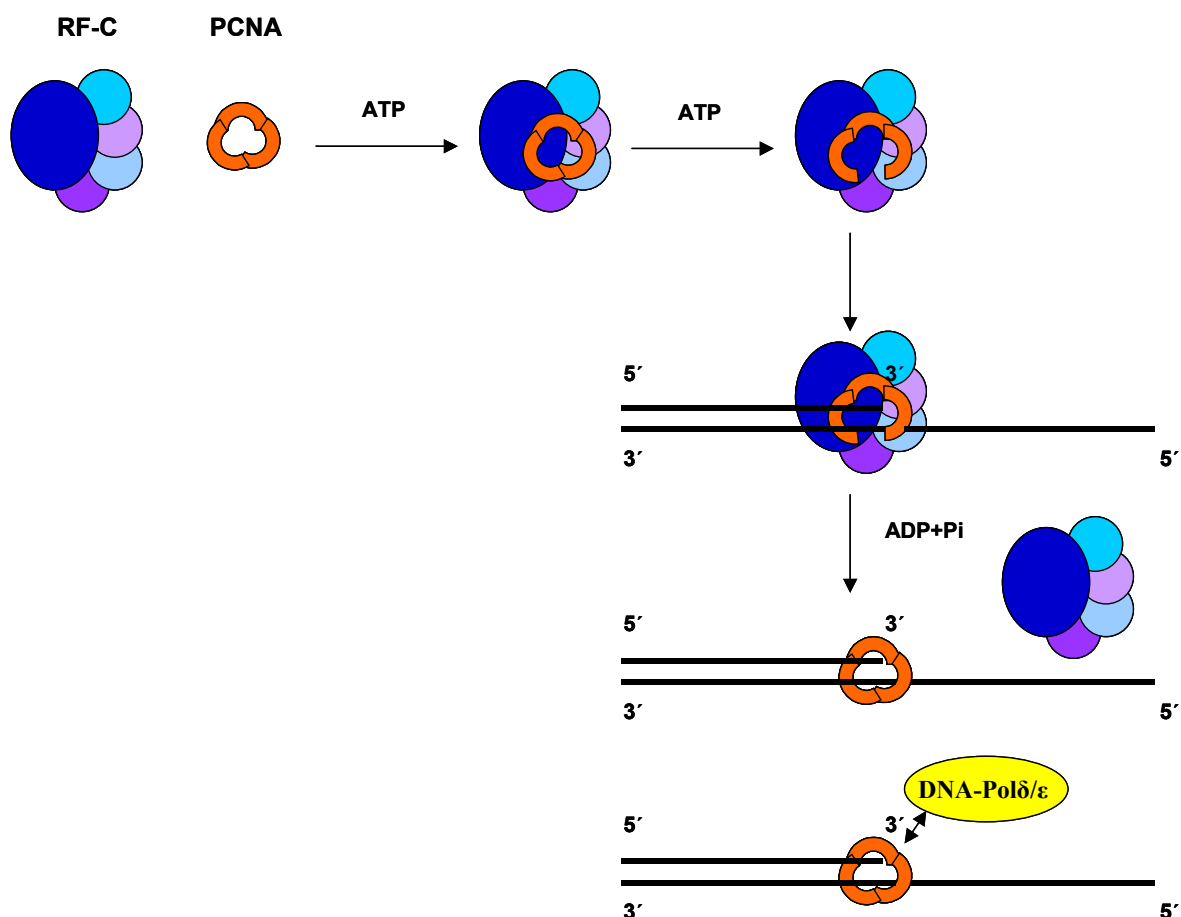


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines Modells der Positionierung von PCNA durch RFC an den 3'-Enden von „Primer/Template“-Strukturen bei der DNA-Replikation (Details siehe Text).

Die konservierte Funktion des RFC-Komplexes als essentieller Faktor bei der DNA-Replikation wird durch die Tatsache verdeutlicht, daß in einer Reihe pro- und eukaryontischer Organismen verwandte Komplexe existieren, die sich in ihrer individuellen Zusammensetzung jedoch leicht voneinander unterscheiden. Ein Beispiel stellt der γ -Komplex in *E.coli* dar, dessen Aufgabe ebenfalls in der ATP-abhängigen Beladung der DNA mit dem homodimeren β -Protein bei der Replikation besteht (Jeruzalmi et al., 2002).

Durch Vergleiche der Aminosäuresequenzen der Untereinheiten von RFC sowohl untereinander, als auch mit den entsprechenden Untereinheiten pro- und eukaryontischer Komplexe, die zu RFC funktionell homolog sind, konnten acht konservierte Regionen identifiziert werden („RFC Box“ I-VIII) (Cullmann et al., 1995). Allen Untereinheiten des humanen und des entsprechenden Komplexes aus *S. cerevisiae* gemeinsam sind RFC Box II-VIII, während die jeweils große Untereinheit zusätzlich eine Region im N-terminalen Bereich besitzt (RFC Box I), die Homologien zu prokaryontischen DNA-Ligasen aufweist (Bunz et al., 1993; Cullmann et al., 1995). Mittels Deletionsanalysen der Untereinheiten des humanen RFC-Komplexes konnten verschiedene Regionen der einzelnen Untereinheiten identifiziert werden, die an der DNA-Bindung, der Interaktion mit PCNA und der Interaktion der Untereinheiten bei der Bildung des heteropentameren RFC-Komplexes beteiligt sind (Fotedar et al., 1996; Uhlmann et al., 1997a; Uhlmann et al., 1997b; Mossi und Hübscher, 1998).

Abbildung 1.2 zeigt eine Übersicht der Untereinheiten des humanen RFC-Komplexes in Bezug auf die Lokalisation konservierter Bereiche („RFC-Box“ I-VIII), sowie funktioneller Regionen der Untereinheiten des Komplexes.

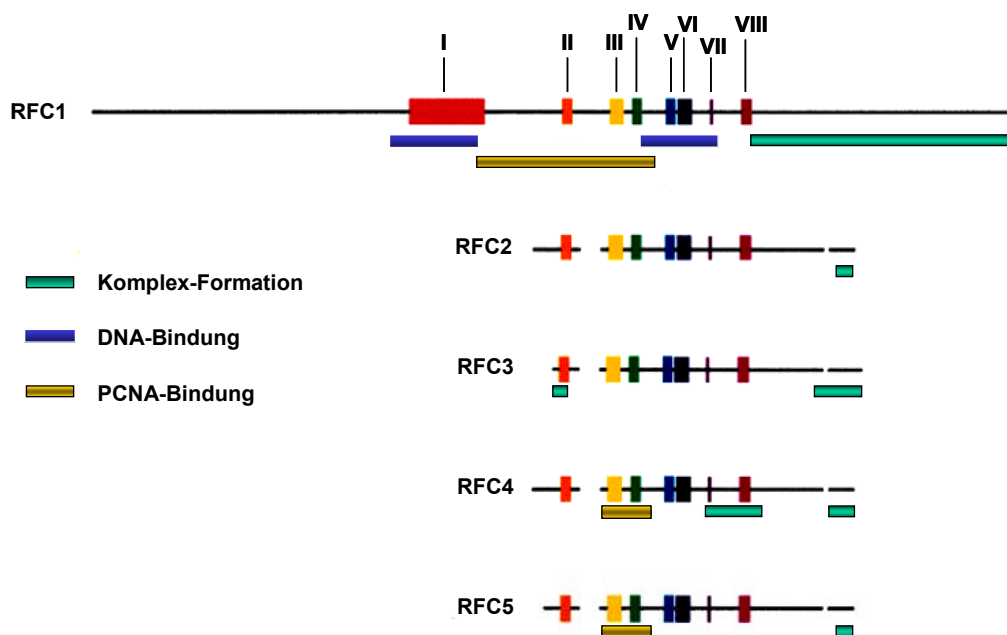


Abb. 1.2: Schematische Darstellung konservierter Bereiche, sowie funktioneller Regionen der Untereinheiten des humanen RFC (modifiziert nach: Mossi and Hübscher, 1998).

Konservierte Regionen („RFC Boxen“ I-VIII) sind farblich markiert und nummeriert. Die Bereiche II-VIII sind allen Untereinheiten gemein, während RFC Box I exklusiv in der großen Untereinheit (RFC1) vorhanden ist. Funktionelle Regionen der Untereinheiten des RFC-Komplexes sind durch farbige Kästchen unterhalb der jeweiligen RFC-Proteine gekennzeichnet.

Durch eine Reihe von *in vitro*-Untersuchungen mit rekombinanten humanen Proteinen konnte gezeigt werden, daß der RFC-Komplex, ergänzend zur Funktion bei der DNA-Replikation, ebenfalls im Zusammenspiel mit PCNA und den DNA-Polymerasen δ bzw. ϵ , essentiell für die DNA-Reparatursynthese im Rahmen der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER), sowie einem alternativen Mechanismus der Basen-Exzisionsreparatur (BER; „Long-patch base excision repair“) ist (Shivji et al., 1995; Pascucci et al., 1999; Matsumoto et al., 1999; Araujo et al., 2000). Schließlich ergeben sich, durch genetische Studien temperatur-sensitiver Mutanten der homologen Proteine von PCNA (pol30) und RFC1 (cdc44) in *S. cerevisiae*, ebenfalls Hinweise für eine essentielle Funktion von RFC und PCNA bei der Rekombinationsreparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB-Reparatur) (Holmes und Haber, 1999). Zusammenfassend

scheint demzufolge eine ATP-abhängige Beladung von PCNA durch den RFC-Komplex essentiell für die Reparatur von DNA-Schäden zu sein, in deren Verlauf eine, durch PCNA-vermittelte DNA-Synthese erforderlich ist.

Abbildung 1.3 zeigt schematisch den Ablauf der Nukleotid-Exzisionsreparatur unter Beteiligung von RFC, PCNA und der DNA-Polymerasen δ bzw. ϵ .

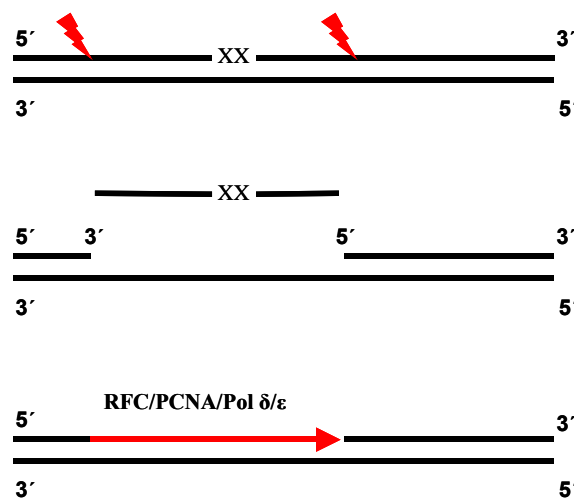


Abbildung 1.3: Vereinfachte schematische Darstellung der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) unter Beteiligung von RFC, PCNA und den DNA-Polymerasen δ bzw. ϵ (modifiziert nach Wood and Shivji, 1997). DNA-Schäden sind durch „XX“ gekennzeichnet und endonukleolytische Inzisionen beiderseits der Schadensstelle werden symbolisch durch Blitze angedeutet. Weitere, am Reparaturprozess beteiligte Faktoren sind nicht eingezeichnet.

1.2 Die große Untereinheit des humanen Replikationsfaktors C (RFC1)

Die große Untereinheit des humanen Replikationsfaktors C, RFC1, wurde von Bunz und Mitarbeitern (1993) aufgrund der Eigenschaft des Proteins an DNA zu binden, isoliert. Das humane *RFC1*-Gen wurde mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) auf Chromosom 4 (4p14-p13) lokalisiert (Luckow et al., 1994). Der offene Leserahmen des *RFC1*-Gens mit einer Größe von 3444bp kodiert für ein Protein mit 1148 bzw. 1147

Aminosäuren (Acc-No.: P35251) und ein Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigt Übereinstimmungen zu den homologen Proteinen von *Mus musculus* (83%) und *Saccharomyces cerevisiae* (35,8%) (Bunz et al., 1993; Cullmann et al., 1995). Zusätzlich zu den, allen Untereinheiten des heteropentameren RFC-Komplexes eigenen konservierten Bereichen (RFC-Boxen II-VIII), besitzt RFC1 im N-terminalen Bereich eine Region, die Homologien zu prokaryontischen DNA-Ligasen zeigt (RFC-Box I) (Bunz et al., 1993; Cullmann et al., 1995). Neben einer weiteren, zentral gelegenen Domäne, besitzt dieser Bereich DNA-Bindungseigenschaften (Fotedar et al., 1996). Jedoch ist diese Region, wie Untersuchungen mit N-terminal deletierten RFC1-Proteinen aus *S. cerevisiae* und humanen Proteinen zeigten, für die funktionelle Aktivität des gesamten RFC-Komplexes bei der Beladung von PCNA *in vitro* und *in vivo* entbehrlich (Uhlmann et al., 1997a, Gomes et al., 2000). Die funktionelle Bedeutung dieser Domäne von RFC1 ist daher bisher unklar. Regionen, die an der Interaktion mit PCNA und den kleinen Untereinheiten beteiligt sind, sind zentral bzw. C-terminal lokalisiert (Fotedar et al., 1996; Uhlmann et al., 1997a; Uhlmann et al., 1997b) (siehe Abbildung 1.3).

Neben seiner Eigenschaft als Untereinheit des replikativen RFC-Komplexes scheint RFC1 an weiteren zellulären Prozessen beteiligt zu sein. So wurde beispielsweise berichtet, daß RFC1 als transkriptioneller Cofaktor sowohl reprimierend, als auch aktivierend auf die Expression bestimmter Gene wirken kann (Anderson und Perkins, 2002; Anderson und Perkins, 2003). Desweiteren scheint eine direkte Interaktion von RFC1 mit dem Retinoblastoma-Protein (Rb) ein Überleben von Zellen nach DNA-Schädigung über einen bisher nicht näher charakterisierten Mechanismus zu begünstigen (Pennaneach et al., 2001). Für RFC1 wurde weiterhin eine Assoziation mit Telomersequenzen, sowie eine inhibitorische Wirkung auf die Telomerase-Aktivität gezeigt und in diesem Zusammenhang über eine Rolle von RFC1 bei der Aufrechterhaltung bzw. Verkürzung von Telomeren spekuliert (Uchiumi et al., 1999).

Eine weitere Besonderheit der großen Untereinheit des humanen RFC-Komplexes im Gegensatz zu den kleinen Untereinheiten stellt das Vorhandensein von Erkennungssequenzen für Caspase-3 dar. So wurde beispielsweise gezeigt, daß RFC1 im Verlauf der Apoptose durch aktivierte Caspase-3 proteolytisch gespalten und hierdurch inaktiviert wird (Rheume et al., 1997; Ubeda und Habener, 1997). Desweiteren ist aus verschiedenen Untersuchungen ersichtlich, daß speziell RFC1 eine

besondere Bedeutung bei der Bildung, funktionellen Regulation und Stabilität des gesamten RFC-Komplexes zukommt. So zeigten *in vitro*-Rekonstitutionsversuche mit rekombinanten humanen Proteinen, daß die Bildung des RFC-Komplexes sequentiell erfolgt und durch die Ausbildung eines „Core“-Komplexes, bestehend aus den kleinen RFC-Untereinheiten, eingeleitet wird. Ein funktioneller RFC-Komplex entsteht jedoch erst durch Bindung von RFC1 an den zuvor gebildeten „Core“-Komplex der kleinen Untereinheiten (Uhlmann et al., 1996; Ellison und Stillman, 1998).

Bereits die Tatsache, daß RFC1 mit einer kalkulierten molekularen Masse von ca. 128kDa nach gelelektrophoretischer Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE) eine Molekularmasse von ca. 140kDa aufweist legt die Vermutung nahe, daß es sich bei RFC1 um ein posttranslational modifiziertes Protein handelt. Die Aktivität einer Vielzahl zellulärer Proteine wird durch posttranslationale Modifikationen, wie beispielsweise der selektiven Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren reguliert. Hinweise auf mögliche posttranslationale Modifikationen durch Phosphorylierung von RFC1 ergeben sich aus Copräzipitations-Experimenten, wie auch der biochemischen Isolation hochmolekularer Proteinkomplexe in verschiedenen Zellzyklusphasen synchronisierter Zellen, in welchen eine Assoziation von RFC1 mit unterschiedlichen CDK/Cyclin-Komplexen nachgewiesen wurde (van der Kuip, 1997; van der Kuip et al., 1999; Frouin et al., 2002). Bisher sind jedoch nur wenige, detaillierte Untersuchungen zu funktionellen Konsequenzen einer Phosphorylierung von RFC1 bekannt. Diese weisen jedoch wiederum auf eine übergeordnete Bedeutung von RFC1, im Vergleich zu den kleinen Untereinheiten, für die Funktion, wie auch die Integrität des gesamten RFC-Komplexes hin. In einer frühen Untersuchung durch Maga und Mitarbeiter (1997) führte die Phosphorylierung der PCNA-Bindungsdomäne von RFC1 durch eine Serin/Threonin-Kinase (Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase II; CaMKII) zu einer reduzierten Interaktion mit PCNA, sowie einer Inhibition der DNA-Synthese *in vitro*. Durch Salles-Passador und Mitarbeiter (2003) konnte in einer neueren Untersuchung spezifisch die Phosphorylierung einer Aminosäure in der PCNA-Bindungsdomäne von RFC1 (T506) durch CDK/Cyclin-Komplexe *in vitro* wie auch *in vivo* nachgewiesen werden. Die *in vitro*-Phosphorylierung dieser Aminosäure durch CDK/Cyclin-Kinasen führte wiederum zu einer verminderten Interaktion der PCNA-Bindungsdomäne von RFC1 mit PCNA. Schließlich konnte durch Munshi und Mitarbeiter (2003) in synchronisierten Zellen eine

zunehmende Phosphorylierung von RFC1 *in vivo* nachgewiesen werden, die in der G2/M-Phase des Zellzyklus maximal war und zu einer Dissoziation von RFC1 aus dem RFC-Komplex führte. In dieser Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß diese Phosphorylierung durch Cyclin-abhängige Kinasen erfolgt und exklusiv RFC1, jedoch nicht die kleinen Untereinheiten des RFC-Komplexes (RFC2-5), betrifft. Diesen Ergebnissen zufolge könnte die Funktionalität und Stabilität des gesamten RFC-Komplexes von der Verfügbarkeit wie auch der posttranslationalen Modifikation von RFC1 abhängig sein,.

Eine Untersuchung zur Regulation der Expression von *RFC1* in humanen Zellen zeigte eine konstante Proteinexpression der großen Untereinheit des RFC in proliferierenden Zellen in allen Zellzyklusphasen, während Zellen, die sich in einem Ruhestadium (G0) befanden, eine verminderte Expression von RFC1 aufwiesen (van der Kuip, 1997). In dieser Untersuchung zeigte sich ebenfalls, daß die Expression von *RFC1* primär transkriptionell reguliert zu sein scheint, da die mRNA-Expression des Gens in Zellen, die nicht proliferierten, vermindert war und mit dem Eintritt in den Zellzyklus, parallel zur Proteinexpression, zunahm (van der Kuip, 1997). In einer weiteren Untersuchung führte eine ektoische Expression des murinen *mRFC1* in der murinen Fibroblastenzelllinie NIH3T3 zu einer erhöhten Proliferation dieser Zellen. Als mögliche Ursache für die beobachtete Proliferationssteigerung wurde darüber spekuliert, ob die große Untereinheit des RFC möglicherweise das limitierende Protein bei der Formation des heteropentameren Komplexes darstellt (Haque et al., 1996).

1.3 Die Chronisch myeloische Leukämie (CML)

Die Chronisch myeloische Leukämie (CML) ist eine klonale Erkrankung der humanen hämatopoetischen Stammzelle und gehört zu den wahrscheinlich am ausführlichsten untersuchten malignen Erkrankungen. Bei etwa 15% aller diagnostizierten Leukämien handelt es sich um eine CML (Cartwright et al., 1991). Das klinische Erscheinungsbild der CML zeichnet sich durch einen bi- bzw. triphasischen Verlauf aus. Man unterscheidet eine chronische Phase, eine Akzelerationsphase und eine terminale Blastenphase (Blastenkrise), wobei ein direkter Übergang des chronischen Stadiums in die terminale Blastenkrise möglich ist. Die initiale, chronische Phase der Erkrankung ist durch unspezifische Symptome und eine erhöhte Leukozytenzahl gekennzeichnet.

Neben ausdifferenzierten Leukozyten finden sich bei CML-Patienten vermehrt hämatopoetische Vorläuferzellen unterschiedlicher Reifungsgrade der myeloischen Reihe im peripheren Blut (sog. pathologische Linksverschiebung). Diese periphere Ausschwemmung der, bei gesunden Personen ausschließlich im Knochenmark angesiedelten, hämatopoetischen Vorläuferzellen ist die Folge einer starken Expansion myeloischer Zellen im Knochenmark. Die chronische Phase der Erkrankung dauert im Mittel ca. 4-5 Jahre an (Hehlmann et al., 1994) und ist therapeutisch gut zu kontrollieren. Im Anschluß an die chronische Phase kann die CML in die sogenannte akzelerierte Phase übergehen. Hier kommt es, trotz zytostatischer Therapie, zu einem signifikanten Anstieg der Leukozytenzahlen im peripheren Blut. Damit einhergehend sind häufig Symptome wie Anämie, Abfall der Thrombozytenzahlen, Vergößerung der Milz und Fieber zu beobachten. Der Übergang der CML in die finale Phase der Erkrankung, die terminale Blastenphase (Blastenkrise) kann im Anschluß an die akzelerierte Phase oder direkt und plötzlich im Verlauf der chronischen Phase erfolgen. In der Blastenkrise treten stark vermehrt unreife hämatopoetische Vorläuferzellen im peripheren Blut auf und die normale Hämatopoese wird massiv gestört. Die Dauer der terminalen Blastenphase beträgt unter chemotherapeutischer Behandlung im Mittel ca. 3-6 Monate (Sacchi et al., 1999) und endet bedingt durch Infektionen, Blutungen oder multiples Organversagen tödlich. Die einzige kurative therapeutische Option stellt die allogene Knochenmarktransplantation dar.

Das klinische Krankheitsbild der CML wurde erstmals im Jahre 1845 beschrieben (Virchow, 1845; Bennett, 1845). Erst lange Zeit später erfolgte der Nachweis eines spezifischen aberanten Chromosoms in leukämischen Zellen von CML-Patienten, das nach dem Ort seiner Entdeckung „Philadelphia-Chromosom“ benannt wurde (Nowell und Hungerford, 1960). Dieses abnormale Chromosom ist das Resultat einer reziproken Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22 (t(9;22)(q34;q11)) (Rowley, 1973). Hierbei wird das Protoonkogen *c-Ab1* (Abelson murine leukemia virus), welches auf dem langen Arm von Chromosom 9 lokalisiert ist, in die Region des *Bcr*-(Breakpoint cluster region) Gens auf Chromosom 22 transloziert (de Klein et al., 1982; Bartram et al., 1983; Groffen et al., 1984). Abbildung 1.4 zeigt schematisch die reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22, die zur

Entstehung des *BCR-ABL* Fusionsgens auf Chromosom 22 (Philadelphia-Chromosom) führt.

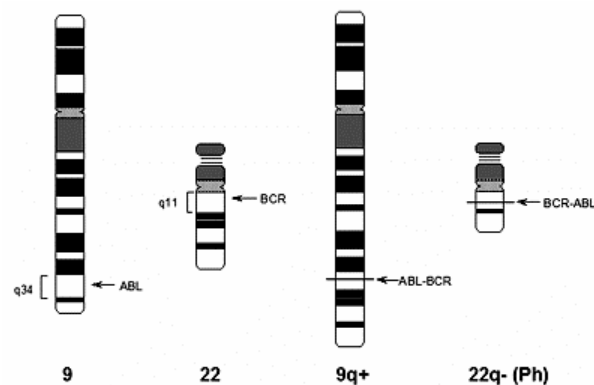


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der reziproken Translokation 9;22, die zur Entstehung des *BCR-ABL* Fusionsgens auf Chromosom 22 (Philadelphia-Chromosom) führt.

Durch die Fusion der Gene *Bcr* und *c-Abl* auf Chromosom 22 entsteht das chimäre *Bcr-Abl*-Gen, das für ein Protein, $\text{BCR-ABL}^{\text{p}210}$, mit einem Molekulargewicht von 210kDa kodiert (Ben Neriah et al., 1986) und in etwa 95% der CML-Patienten nachgewiesen werden kann (Bennett et al., 1994). Neben dem für die chronisch myeloische Leukämie typischen Fusionsprotein $\text{BCR-ABL}^{\text{p}210}$ kann es bei der reversen Translokation abhängig von der Lage des Bruchpunktes im *Bcr*-Gen zur Bildung alternativer Fusionen zwischen *Bcr* und *c-Abl* kommen. So läßt sich in etwa zwei Drittel der Patienten mit Akuter lymphatischer Leukämie (ALL) und in seltenen Fällen auch bei CML-Patienten das $\text{BCR-ABL}^{\text{p}190}$ Fusionsprotein nachweisen (Melo et al., 1994; Ravandi et al., 1999), während in einigen Patienten mit Chronischer neutrophiler Leukämie (CNL) ein $\text{BCR-ABL}^{\text{p}230}$ Fusionsprotein, $\text{BCR-ABL}^{\text{p}230}$, mit einem Molekulargewicht von 230kDa detektiert werden konnte (Pane et al., 1996).

Die onkogene Wirkung der drei Fusionsproteine $\text{BCR-ABL}^{\text{p}190}$, $\text{BCR-ABL}^{\text{p}210}$ und $\text{BCR-ABL}^{\text{p}230}$ konnte ebenfalls *in vivo* bestätigt werden und führte zum Ausbruch einer chronischen myeloproliferativen Erkrankung im Mausmodell, wobei die phänotypische Ausprägung, wie bereits bei Leukämie-Patienten beobachtet, abhängig von dem *BCR*-Anteil des Fusionsproteins war (Li et al., 1999, Voncken et al., 1995).

1.3.1 BCR-ABL als Onkogen

Das *c-Abl* Gen kodiert für eine ubiquitär exprimierte „Non-receptor“-Tyrosinkinase mit einer molekularen Masse von 145kDa und ist das humane Homolog des *v-abl* Onkogens des Abelson murine leukemia virus (Abelson et al., 1970). Das c-ABL-Protein ist sowohl im Nukleus, als auch im Zytoplasma lokalisiert und die Regulation der Kinaseaktivität des Proteins unterliegt strikten Kontrollmechanismen durch Protein-Protein Interaktionen und posttranslationalen Modifikationen. Ein komplexes Bild der zellulären Funktionen von c-ABL ergibt sich durch die Beschreibungen einer Beteiligung des Proteins an der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose, der zellulären Reaktion auf DNA-Schäden und der Vermittlung von extrazellulären Signalen. Die Mehrzahl der Ergebnisse zur Funktion von c-ABL resultieren jedoch aus Untersuchungen die *in vitro* durchgeführt wurden und kontrovers diskutiert werden (Sawyers et al., 1994; Yuan et al., 1999; Lewis et al., 1998; van Etten, 1999). Das *Bcr*-Gen kodiert für ein 160kDa-Protein, das ebenfalls ubiquitär exprimiert ist, jedoch im Gegensatz zu c-ABL, eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation zeigt. Das BCR-Protein ist ein Multidomänen-Protein mit vielfältigen Funktionen, deren biologische Relevanz jedoch bisher nur unvollständig verstanden ist. Im N-terminalen Bereich des Proteins findet sich eine „coiled-coil“ Oligomerisierungsdomäne, die eine Oligomerisierung des Proteins ermöglicht, wie auch eine Domäne mit Serin/Threonin-Kinaseaktivität, deren einzige bisher beschriebene Funktion in der Phosphorylierung von Proteinen der „14-3-3“-Familie besteht. Desweiteren konnten zentral und C-terminal gelegene Domänen mit GEF-(guanin-nucleotide exchange factor) und GAP-(GTPase activating protein) Aktivität für die GTPasen Rho und Rac identifiziert werden (Reuther et al., 1994; McWhirter et al., 1993; Denhardt, 1996; Diekmann et al., 1991; Laurent et al., 2001).

Das BCR-ABL^{p210} Fusionsprotein ist ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert und weist eine konstitutive Tyrosinkinaseaktivität auf, die gleichzeitig zu einer Autophosphorylierung multipler Aminosäurereste des Proteins, wie auch einer Vielzahl zellulärer Proteinsubstrate führt. Diese Veränderungen ermöglichen es BCR-ABL^{p210} mit verschiedensten Proteinen intrazellulärer Signalkaskaden zu interagieren und deren Aktivität zu beeinflussen (Konopka et al., 1984; McWhirter et al., 1991). Die daraus resultierenden komplexen Interaktionen, sowie deren Konsequenzen sind teilweise bis heute, fast zwei Jahrzehnte nach der erstmaligen Beschreibung des Fusionsproteins,

nicht vollständig verstanden. Sie führen in ihrer Gesamtheit in hämatopoetischen Zellen zu einer Veränderung des Wachstumsverhaltens, der Differenzierung, der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, der Apoptose, der Reparaturprozesse nach DNA-Schädigung und letztlich, *in vivo*, zur Leukämogenese (Warmuth et al., 1999; Deininger et al., 2000a). Die Aktivierung mitogener Signalwege, sowie die Induktion von Wachstumsfaktor-unabhängiger Proliferation hämatopoetischer Zellen ist ein zentraler Mechanismus der zellulären Transformation durch BCR-ABL^{p210}. So konnte beispielsweise in primären hämatopoetischen Stammzellen von CML-Patienten nach Entzug von Wachstumsfaktoren eine deutlich gesteigerte DNA-Synthese im Vergleich zu BCR-ABL-negativen Kontrollzellen nachgewiesen werden (Schwab et al., 1995; Jonuleit et al., 1998). Dies kann, unter anderem, durch Liganden-unabhängige Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren oder eine direkte Aktivierung von Janus-Kinasen (JAKs) und Signal-transducers-and activators of transcription (STATs) durch das BCR-ABL^{p210}-Onkogen erfolgen (Wilson-Rawls et al., 1996; Ilaria und van Etten, 1996; Chai et al., 1997; de Groot et al., 1999). Ein weiterer Eingriff von BCR-ABL^{p210} in Regulationsmechanismen des Zellzyklus konnte durch die veränderte Expression von zellzyklusregulatorischen Proteinen, wie beispielsweise Cyclin D2 und p27, gezeigt werden. Sowohl für eine erhöhte Expression von Cyclin D2, als auch eine reduzierte Expression des CDK-(Cyclin-dependent kinase) Inhibitors p27 konnte ein direkter Zusammenhang mit der Kinaseaktivität von BCR-ABL^{p210} und einer hierdurch bedingten Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) nachgewiesen werden (Gesbert et al., 2000a; Jonuleit et al., 2000; Deininger et al., 2001; Jena et al., 2002). Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung mitogener Signalwege stellt die Autophosphorylierung des BCR-ABL^{p210}-Proteins an Position 177 (Y177) dar. Diese ermöglicht die Bindung des Adaptermoleküls Grb-2 (Growth-factor receptor bound 2) über dessen SH2 (Src-Homology)-Domäne, welches wiederum eine Interaktion von Sos (son-of-sevenless) mit Ras und damit die Aktivierung des Ras-Proteins sowie nachfolgender MAP-Kinase (Mitogen-activated protein kinase) Signalkaskaden zur Folge hat (Pendergast et al., 1993; Puil et al., 1994).

Verschiedene Untersuchungen deuten desweiteren darauf hin, daß die Expression von BCR-ABL^{p210} in hämatopoetischen Zellen, komplementär zum Einfluß des Onkogens auf die zelluläre Proliferation, Auswirkungen auf die Induktion des programmierten Zelltodes

(Apoptose) hat. Einige klinische Beobachtungen, wie auch *in vitro* durchgeführte Untersuchungen beschreiben eine verstärkte Sensitivität von Zellen, die das BCR-ABL^{p210}-Onkogen exprimieren, gegenüber zytostatischen Therapien und ionisierender Strahlung (Santucci et al., 1993; Albrecht et al., 1996). Allerdings scheint die überwiegende Mehrzahl von Ergebnissen auf eine erhöhte Resistenz BCR-ABL^{p210}-positiver Zellen gegenüber apoptotischen Stimuli, wie beispielweise dem Entzug von Wachstumsfaktoren, UV-Bestrahlung, ionisierender Strahlung und Zytostatika hinzudeuten (Daley et al., 1992; Sirard et al., 1994; Bedi et al., 1994; Bedi et al., 1995). Diese Annahme wird ebenfalls durch klinische Erfahrungen gestützt, daß eine chemotherapeutische Behandlung der BCR-ABL^{p210}-positiven CML zwar kurzfristig zur transienten Reduktion der Anzahl leukämischer Zellen führt, jedoch langfristig als alleinige Therapie keine kurative Option darstellt.

Die Vermittlung anti-apoptotischer Effekte durch BCR-ABL^{p210} erfolgt offensichtlich, ähnlich den Einflüssen auf die Proliferation, durch die Aktivierung von Ras, der PI3K/AKT-Signalkaskade, sowie von STAT5. So konnte gezeigt werden, daß BCR-ABL eine Freisetzung von Cytochrom-c aus Mitochondrien verhindert und damit eine Aktivierung von Caspasen und die Initiierung der Apoptose blockiert (Dubrez et al., 1998; Amarante-Mendes et al., 1998). In murinen, hämatopoetischen 32D- und BaF3-Zellen geht eine Erhöhung der Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 mit einer Aktivierung der PI3-Kinase und Ras durch BCR-ABL einher (Garcia und Zanca, 1997; Skorski et al., 1997). Schließlich stellt die transkriptionelle Aktivierung von *bcl-xL*, eines Apoptose-Antagonisten der bcl-2-Familie, durch den konstitutiv phosphorylierten Transkriptionsfaktor STAT-5 eine weitere Facette der anti-apoptotischen Wirkung von BCR-ABL dar (Horita et al., 2000; Sillaber et al., 2000).

Die Chronisch myeloische Leukämie geht nach einer gewissen Latenzzeit von der chronischen, in die aggressivere akzelerierte Phase bzw. eine terminale Blastenphase über. Dieser Eintritt in das Endstadium der Erkrankung ist häufig mit genetischer Instabilität und einer Akkumulation sekundärer Mutationen bzw. chromosomaler Anomalien verbunden. Bei etwa 30% der CML-Patienten lassen sich beispielsweise Mutationen des Tumorsuppressor-Gens *p53*, die zu dessen Funktionsverlust führen, nachweisen (Ahuja et al., 1989).

Die Erforschung der Ursachen der genetischen Instabilität im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung rückte in den letzten Jahren die Frage nach dem Einfluß von BCR-ABL^{p210} auf DNA-Reparaturmechanismen in den Mittelpunkt. So führte beispielweise die Behandlung einiger BCR-ABL^{p210}-positiver Zellen mit DNA-schädigenden Zytostatika zu einem Arrest der Zellen in der G2/M-Übergangsphase des Zellzyklus und dies war mit einer erhöhten Resistenz gegenüber diesen Chemotherapeutika assoziiert (Bedi et al., 1995; Nishii et al., 1996). Einer gängigen Theorie zufolge könnte eine Verlängerung der G2/M-Phase in BCR-ABL^{p210}-positiven Zellen die Reparatur von DNA-Schäden vor Eintritt in die Mitose ermöglichen und damit der Initiierung von Apoptose entgegenwirken. Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, daß BCR-ABL^{p210}-transformierte Zellen nach Behandlung mit Cisplatin und Mitomycin C tendentiell mehr DNA-Schäden akkumulieren als BCR-ABL^{p210}-negative Kontrollzellen (Slupianek et al., 2002). Die Tatsache, daß diese Zellen dennoch eine erhöhte Überlebensrate nach DNA-Schädigung aufweisen, wird auf das Zusammenspiel mehrerer, von BCR-ABL^{p210} beeinflusster Mechanismen zurückgeführt. Zum einen die erwähnten anti-apoptischen Effekte von BCR-ABL^{p210} durch Aktivierung von STAT5 verbunden mit einer erhöhten Expression des bcl-xL-Proteins. Zum anderen, ebenfalls vermittelt durch den konstitutiv aktivierten Transkriptionsfaktor STAT5, eine vermehrte Expression und Aktivität von RAD51, einem Homolog des RecA-Proteins aus *E.coli* (Slupianek et al., 2001). In dieser Untersuchung wurde als ein Mechanismus, der zu einer erhöhten Resistenz gegenüber DNA-Schäden von BCR-ABL^{p210}-transformierten Zellen führt, eine verbesserte bzw. beschleunigte Reparatur durch homologe Rekombination, unter anderem vermittelt durch RAD51, postuliert (Slupianek et al., 2001; Slupianek et al., 2002). Eine gesteigerte Expression von RAD51 führte jedoch in anderen Untersuchungen gleichsam zu einer deregulierten Rekombination und, damit einhergehend, zu genomischer Instabilität in Form von strukturellen chromosomalen Aberrationen oder Aneuploidie (Arnaudeau et al., 2001; Richardson et al., 2004). Neben RAD51 wurde in Abhängigkeit von BCR-ABL^{p210} eine deregulierte Expression weiterer, an verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen beteiligter Proteine gefunden, deren Beitrag zu genomischer Instabilität bzw. einer erhöhten Resistenz gegenüber DNA-Schäden ebenfalls diskutiert wird (Canitrot et al., 1999; Deutsch et al., 2001; Deutsch et al., 2003).

1.4 Ziele der Arbeit

Basierend auf den in der Arbeitsgruppe gewonnenen Erkenntnissen bezüglich der Expressionregulation von *RFC1* auf Transkriptionsebene, sollte in der vorliegenden Arbeit der Transkriptionsstart des *RFC1*-Gens bestimmt werden. Weiterhin war geplant, genomische Klone stromaufwärts des kodierenden Bereiches von *RFC1* zu isolieren und diese einer Sequenzanalyse zu unterziehen, um eine Identifikation potentieller Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in der proximalen 5'-Region der Transkriptionsstartstelle von *RFC1* zu ermöglichen. Diese initialen Analysen sollten als Grundlage für weitergehende, funktionelle Untersuchungen des potentiellen Promotorbereichs von *RFC1* dienen.

Das BCR-ABL^{p210}-Onkogen führt, bedingt durch die konstitutive Tyrosinkinaseaktivität des Fusionsproteins, unter anderem zu einer veränderten Expression bzw. Aktivität von Genen, die an der zellulären Proliferation, sowie verschiedenen DNA-Reparaturprozessen beteiligt sind. Vor diesem Hintergrund und aufgrund der Tatsache, daß *RFC1* in seiner Funktion als Untereinheit des RFC-Komplexes, nicht nur essentielle Bedeutung im Rahmen der DNA-Replikation, sondern auch der PCNA-vermittelten Reparatursynthese zukommt, sollte die *RFC1*-Expression in Abhängigkeit von BCR-ABL^{p210} in verschiedenen zellulären Systemen untersucht werden.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Untersuchungen, die eine erhöhte Proteinexpression von *RFC1* in BCR-ABL^{p210}-positiven Zellen zeigen konnten, bisher jedoch keine Daten zu möglichen funktionellen Konsequenzen einer stabilen, ektopisch erhöhten Expression von *RFC1* in humanen Zellen vorliegen, sollte schließlich eine humane Zelllinie stabil mit *RFC1* transfiziert, und die Eigenschaften der generierten Zellen im Hinblick auf deren Sensitivität bezüglich verschiedener zytotoxischer Stimuli (Zytostatika, UV-Strahlung) charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Zubehör

Autoklav „Varioklav“	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Binokular Wilovert ^R	Hund, Wetzlar
Brutschrank (eukaryont. Kulturen) CB150	Binder, Tuttlingen
Brutschrank (prokaryont. Kulturen) Typ 6200	Heraeus, Langenselbold
Durchflußzytometer Epics XL-MCL	Beckman Coulter, Krefeld
Elektrophoreseapparaturen:	
Agarosegele	Jordan Scientific, USA
Protean Ixi XL Electrophoresis Cells	BioRad, München
Mini-Protean 3 Electrophoresis System	BioRad, München
Elektroporationsgerät Gene Pulser ^R II	BioRad, München
Fluoreszenzmikroskop, IX70	Olympus, Japan
Geldokumentationssystem „Gene Genius“	Syngene, Langenfeld
Geiger-Müller-Zählrohr, Typ LB1210B	Berthold, Bad Wildbach
Hybridisierungsofen „Etuvea“	Appligene, Frankreich
Inkubationseinheit (Bakterien) Certomat H	B. Braun, Melsungen
Membranen	
Hybond TM -N Nylon	Amersham Pharmacia, Freiburg
Hybond TM -ECL Nitrocellulose	Amersham Pharmacia, Freiburg
Mikroskop Modell CHT	Olympus, Japan
PCR-Maschine „i-cycler“	BioRad, München
pH-Meter „HI9321“	Hanna Instruments, Kehl a. Rh.
Pipetten	Gilson, USA
Proteintransfer-Module	
Transblot cell	BioRad, München
Mini-Transblot cell	BioRad, München

Röntgenfilme Agfa Cronex 10T	Agfa, Belgien
Röntgenfilmentwicklungskassetten	Amersham Pharmacia, Freiburg
Schwenktisch „3019“	GFL, Burgwedel
Spectrophotometer	
GeneQuantII (DNA/RNA)	Amersham Pharmacia, Freiburg
GeneQuant Pro (Protein)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Sterilarbeitsbänke	
Herasafe KS18	Kendro, Langenselbold
CleanAir, Typ DLF/BSS4	Woerden, Niederlande
UV-Crosslinker Stratagene 1800	Stratagene, Heidelberg
UV-Transilluminator „TL312A“	Spectroline, USA
Waagen:	
Feinwaage „AC120S“	Sartorius, Göttingen
Waagen „LC420“, „U4100“	Sartorius, Göttingen
Wasserbäder	
Typ „1012“	GFL, Burgwedel
Schüttelwasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Zentrifugen:	
Biofuge „Fresco“	Heraeus, Langenselbold
Omnifuge 2.0 RS	Heraeus, Langenselbold
Kühlzentrifuge Sorvall „RC-5B“	DuPont Instruments, USA
Vacuumzentrifuge Speedvac „SC100“	Savant, Farmingdale, USA

2.1.2 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders aufgeführt, von den Firmen Difco (USA), Calbiochem (Schwalbach), Invitrogen (Niederlande), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt) und BioRad (München) bezogen.

2.1.3 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit A. dest. angesetzt und bei Bedarf autoklaviert oder sterilfiltriert.

Ammoniumpersulfat-Stammlösung	10% (w/v) Ammoniumpersulfat
Antibiotika-Stammlösungen:	
Ampicillin	50mg/ml Ampicillin
Kanamycin	25mg/ml Kanamycin
„Blocking“-Lösung (Western)	1% (v/v) Western Blocking Reagent (Roche) in PBS
Cycloheximid-Stammlösung	100mg/ml Cycloheximid in Ethanol absolut
Zytostatika-Stammlösungen: (Apotheke Universitätsklinikum, Mainz)	
Doxorubicin	1mM Doxorubicin in DMSO
Etoposid	25mM Etoposid in DMSO
Staurosporin	250 µM Staurosporin in DMSO
Taxol	5mM Taxol in DMSO
DEPC (Diethylpyrocarbonat)-H ₂ O	0,2% (v/v) DEPC
Dehybridisierungslösung („Western-Blot“)	62,5mM Tris-HCl (pH 6,7) 2% (w/v) SDS 100mM β-Mercaptoethanol
Dehybridisierungslösung (“Southern-Blot”, “Northern-Blot”)	1% (w/v) SDS 0,01M EDTA
Denaturierungslösung	1,5M NaCl 0,5M NaOH

Denhardts-Reagenz (100x)	2% (w/v) BSA 2% (w/v) Ficoll 400 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon
Dextransulfat-Lösung	50% (w/v) Dextransulfat
Elektrophoresepuffer (alkalische Einzelzell-Gelelektrophorese)	300mM NaOH 1mM EDTA, pH 13
Ethidiumbromid-Stammlösung	10mg/ml Ethidiumbromid
Hybridisierungslösung	Prähybridisierungslösung 10% (w/v) Dextransulfat
Lösungen zur Plasmidpräparation (alkalische Lyse):	
Lösung I	50mM Glucose 25mM Tris-HCl (pH 8,0) 10mM EDTA (pH 8,0) 5mg/ml (w/v) Lysozym
Lösung II	0,2N NaOH 1% (w/v) SDS
Lösung III (3M Kaliumacetat-Puffer)	3M Kaliumacetat 11,5ml Eisessig ad 100ml A. dest. (pH 5,0)

Lysepuffer:

Alkalische Einzelzell-Gelelektrophorese	2,5M NaCl 100mM EDTA 10mM Tris 10% (v/v) DMSO 1% (v/v) Triton X-100 1% (w/v) Natrium-Laurylsarcosinat
NP-40 Lysepuffer	150mM NaCl 50mM Tris-HCl (pH 8,0) 1% (v/v) NP-40 40µl/ml Proteasen- Inhibitoren-Cocktail (25x)
RIPA-Lysepuffer	150mM NaCl 50mM Tris-HCl (pH 8,0) 1% (v/v) NP-40 0,5% (w/v) Natriumdeoxycholat 0,1% (w/v) SDS 40µl/ml Proteasen- Inhibitoren-Cocktail (25x)
Puffer A	10mM HEPES (pH 7,9) 10mM KCl 1,5mM MgCl ₂ 40µl/ml Proteasen- Inhibitoren-Cocktail (25x)

Puffer C	420mM NaCl 25% (v/v) Glycerin 20mM HEPES (pH 7,9) 1,5mM MgCl ₂ 0,2mM EDTA 40µl/ml Proteasen- Inhibitoren-Cocktail (25x)
Methylenblau-Färbelösung	0,02% (w/v) Methylenblau 0,3M Natriumacetat
MOPS (3-[N-Morpholino] propane sulfonic acid)-Puffer (10x)	0,4M MOPS (pH 7,0) 0,1M Natriumacetat 10mM EDTA (in DEPC-H ₂ O)
Natriumphosphatpuffer (NaP) 1M	100ml Na ₂ HPO ₄ 1M 32ml NaH ₂ PO ₄ 1M pH 7,0
Neutralisierungslösung	0,5M Tris-HCl 3M NaCl pH 7,0
PBS/Tween	PBS 0,1% (v/v) Tween-20
Prähybridisierungslösung	50% (v/v) Formamid, deionisiert 5x Denhardts-Lösung 50mM Natriumphosphatpuffer 5x SSC 100µg/ml Lachssperma-DNA

Propidiumiodid-Färbelösung	3,4mM Natriumcitrat 0,1% (v/v) Triton X-100 0,005% (w/v) Propidiumiodid
Probenpuffer (6x), Agarosegele	0,25%(w/v) Bromphenolblau 0,25%(w/v) Xylencyanol 30% (v/v) Glycerin
Proteasen-Inhibitoren-Cocktail (25x)	1 Tablette Complete™ Proteasen- Inhibitoren-Cocktail (Roche, Mannheim) in 2ml H ₂ O
SDS-Laufpuffer	25mM Tris 250mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer (2x)	125mM Tris-HCl (pH 6,8) 40% (v/v) Glycerin 4% (w/v) SDS 10% (v/v) β-Mercaptoethanol 0,2% (w/v) Bromphenolblau
SSC (20x)	3M NaCl 0,3M Natriumcitrat pH 7,0
STI-571 (Signal-transduction-inhibitor-571)	1mM STI-571 (Novartis Pharma GmbH, Nürnberg) in DMSO

TBE-Puffer (5x)	0,5M Tris 0,5M Borsäure 10mM EDTA
TE-Puffer	10mM Tris-HCl 1mM EDTA
Transfer-Lösung („Western-Blot“)	25mM Tris 192mM Glycin 20% (v/v) Methanol 0,1% (w/v) SDS
Waschlösung I	2x SSC 0,1% (w/v) SDS
Waschlösung II	1x SSC 0,1% (w/v) SDS
Waschlösung III	0,5x SSC 0,1% (w/v) SDS
Waschlösung IV	0,1x SSC 0,1% (w/v) SDS
Z-VAD-FMK (N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp- fluoromethyl-ke-ton)	10mM Z-VAD-FMK in DMSO

2.1.4 Nährmedien

Alle Nährmedien wurden mit A. dest. angesetzt und anschließend autoklaviert.

LB-Medium	10g/l Bacto-Trypton 5,0g/l Bacto-Yeast Extract 5,0g/l NaCl
LB-Agar	LB-Medium mit 15g/l Bacto-Agar

2.1.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Restriktionsendonucleasen	Roche, Mannheim
Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
Polymerase-Mix	
RNAse A	Roche, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim

2.1.6 Größenstandards

DNA-Größenstandards:

100bp DNA Ladder	Invitrogen, Niederlande
1kb DNA Ladder	Invitrogen, Niederlande

RNA-Größenstandard:

0,24-9,5kb RNA Ladder	Invitrogen, Niederlande
-----------------------	-------------------------

Protein-Größenstandard:

Rainbow TM coloured protein molecular weight markers	Amersham Pharmacia, Freiburg
---	------------------------------

2.1.7 Nukleinsäuren und Nukleotide

Synthetische Oligonukleotide	MWG-Biotech, Ebersberg
Desoxyribonukleotid-Mix (dNTP-Mix)	Roche, Mannheim
α - ³² P-dATP (370MBq/ml)	Amersham, Braunschweig
α - ³² P-dCTP (370MBq/ml)	Amersham, Braunschweig
Lachssperma-DNA (salmon-sperm DNA)	Sigma, Deisenhofen
Human Multiple-Tissue-Northern (MTN TM) Blot	Clontech, Heidelberg

Die folgenden humanen cDNA- und genomischen Klone wurden vom Deutschen Ressourcenzentrum mit Primärdatenbank (RZPD, Heidelberg) bezogen. Die Bezeichnungen der Klone entsprechen denen des RZPD.

cDNA:

IMAGp950D0348	RZPD, Heidelberg
---------------	------------------

Genomische Klone:

RPCIP704A191141Q2	RZPD, Heidelberg
RPCIP704A10643Q2	RZPD, Heidelberg
RPCIP704D22744Q2	RZPD, Heidelberg
RPCIP704E09532Q2	RZPD, Heidelberg
RPCIP704L01550Q2	RZPD, Heidelberg

2.1.8 Plasmide

pBluescriptIIKS(+)	Stratagene, Heidelberg
pCR 2.1	Invitrogen, Niederlande
pCR4-TOPO	Invitrogen, Niederlande
pIRES-Neo3	Clontech, Heidelberg

2.1.9 Rekombinante Plasmide

In der folgenden Tabelle sind in dieser Arbeit hergestellte, rekombinante Plasmide aufgeführt.

Tabelle 2-1: Rekombinante Plasmide

Plasmidbezeichnung	Beschreibung	Bemerkungen
RACE 8	5´- Bereich der mRNA von <i>RFC1</i> , mittels 5´-RACE amplifiziert* und in pCR4-TOPO Vektor kloniert	Acc.-No: AJ564999
pIRES-Neo3-RFC1	Kodierender Bereich von <i>RFC1</i> mittels PCR amplifiziert* ; in <i>NotI</i> Klonierungsstelle der MCS des pIRES-Neo3 Vektors kloniert	Expressionsplasmid
pIRES-Neo3-FLAGRFC1	Kodierender Bereich von <i>RFC1</i> , N-terminal fusioniert mit Sequenz des FLAG-Epitops, mittels PCR amplifiziert* ; in <i>NotI</i> Klonierungsstelle der MCS des pIRES-Neo3 Vektors kloniert	Expressionsplasmid
A106EcoRI 1.1	<i>EcoRI</i> -Fragment (15,89kb) des genomischen Klon RPCIP704A10643Q2 in pBluescriptIIKS+ Vektor kloniert	Enthält Sequenzbereiche [#] der genomischen 5´-Region von <i>RFC1</i>

<i>EcoRI-HindIII</i> 1.3	<i>EcoRI-HindIII</i> -Fragment (2,31kb) aus A106 <i>EcoRI</i> 1.1 in pBluescriptIIKS+ Vektor kloniert	Enthält Sequenzbereiche [#] der genomischen 5'-Region von <i>RFC1</i>
<i>HindIII</i> 4.4	<i>HindIII</i> -Fragment (4,06kb) aus A106 <i>EcoRI</i> 1.1 in pBluescriptIIKS+ Vektor kloniert	Enthält Sequenzbereiche [#] der genomischen 5'-Region von <i>RFC1</i>
<i>HindIII</i> 4.5	<i>HindIII</i> -Fragment (0,54kb) aus A106 <i>EcoRI</i> 1.1 in pBluescriptIIKS+ Vektor kloniert	Enthält Sequenzbereiche [#] der genomischen 5'-Region von <i>RFC1</i>
<i>HindIII</i> 2	<i>HindIII</i> -Fragment (0,89kb) aus A106 <i>EcoRI</i> 1.1 in pBluescriptIIKS+ Vektor kloniert	Enthält Sequenzbereiche [#] der genomischen 5'-Region von <i>RFC1</i>
<i>HindIII</i> 3.4	<i>HindIII</i> -Fragment (1,17kb) aus A106 <i>EcoRI</i> 1.1 in pBluescriptIIKS+ Vektor kloniert	Enthält Sequenzbereiche [#] der genomischen Region von <i>RFC1</i> inclusive des Start-codons, sowie angrenzender 5'- und 3'-Sequenzen
<i>HindIII</i> 3.3	<i>HindIII</i> -Fragment (0,90kb) aus A106 <i>EcoRI</i> 1.1 in pBluescriptIIKS+ Vektor kloniert	Enthält Sequenzbereiche [#] der genomischen Region 3' des Startcodons von <i>RFC1</i>
<i>HindIII</i> 3.2	<i>HindIII</i> -Fragment (0,24kb) aus A106 <i>EcoRI</i> 1.1 in pBlue-scriptIIKS+ Vektor kloniert	Enthält Sequenzbereiche [#] der genomischen Region 3' des Startcodons von <i>RFC1</i>

*: Oligonukleotide, die zur Amplifikation verwendet wurden, sind im Anhang aufgeführt.

#: In dieser Arbeit generierte Sequenzen sind im Anhang aufgeführt.

2.1.10 Bakterienstämme

E.coli DH5 α (subcloning efficiency)	Invitrogen, Niederlande
TOP10	Invitrogen, Niederlande

2.1.11 Fertigsysteme zur Aufreinigung von DNA und RNA

QIAfilter Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick PCR-Purification Kit	QIAGEN, Hilden
QIAshredder	QIAGEN, Hilden
RNeasy TM Mini Kit	QIAGEN, Hilden
Oligotex TM Direct mRNA Kit	QIAGEN, Hilden
Sephadex G-50 Nick TM Columns	Amersham Pharmacia, Freiburg

2.1.12 Sonstige Fertigsysteme

SuperScript TM First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen, Niederlande
HexaLabel Plus TM DNA Labelling Kit	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
ExpressHyb TM Hybridization Solution	Clontech, Heidelberg
TA Cloning ^R Kit	Invitrogen, Niederlande
TOPO TA Cloning ^R Kit for Sequencing	Invitrogen, Niederlande
GeneRacer TM Kit	Invitrogen, Niederlande
ECL TM Western Blotting Detection Reagents	Amersham Pharmacia, Freiburg
Western Blocking Reagent	Amersham Pharmacia, Freiburg

2.1.13 Zellkulturmedien, Zusätze und Materialien

RPMI1640 Medium (ohne Glutamin)	PAA, Pasching, Österreich
Fetal calf serum (Fötales Kälberserum, FCS)	PAN-Biotech, Aidenbach
Non-essential amino acids (100x)	Biochrom, Berlin
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% / 0,02%)	Biochrom, Berlin

L-Glutamin 200mM	Biochrom, Berlin
Natriumpyruvat MEM 100mM	Invitrogen, Niederlande
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000U/ml / 10000µg/ml)	Cambrex, Belgien
HEPES-Puffer	1M HEPES, pH 7,2, steril filtriert
Phosphat-buffered saline (PBS)	Cambrex, Belgien
PBS/β-Mercaptoethanol	PBS 0,035% (v/v) β-Mercaptoethanol
RPMI1640 (10% FCS)	420ml RPMI1640 50ml FCS 29ml Additive (20x)
Additive (20x)	100ml Penicillin/ Streptomycin-Lösung 100ml HEPES-Puffer 100ml Natriumpyruvat 100mM 100ml PBS/β-Mercaptoethanol 100ml L-Glutamin 200mM 60ml Non-essential amino acids (100x) 20ml Asparagin 10mg/ml steril filtriert
Einfriermedium	90% (v/v) FCS 10% (v/v) DMSO

GM-CSF (Granulocyte-Macrophage colony stimulating factor)	Immunex, Seattle, USA
IL-3 (Interleukin-3)	Calbiochem, Schwalbach
OPTIMEM-Medium	Invitrogen, Niederlande
GenePulser ^R Cuvette, 0,4cm electrode gap	BioRad, München

Zellkulturflaschen, Sechs-Loch Platten, Einmalpipetten, Zentrifugenröhrchen, sowie Meßröhrchen wurden von den Firmen Nunc (Roskilde, Dänemark), Corning (NY, USA) und Greiner (Frickenhausen) bezogen.

2.1.14 Zelllinien

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien aufgeführt.

Tabelle 2-2: Charakteristika und Herkunft verwendeter Zelllinien

Zelllinie	Gewebe	Organismus	Bemerkungen	Wachstumsmedium	Bezugsquelle
Mo7e	Hämatopoese, akute megakaryoblastische Leukämiezelllinie	<i>Homo sapiens</i>	-	RPMI1640 (10% FCS) 250U/ml GM-CSF	AG Duyster, München
Mo7e BCR-ABL ^{p210}	Hämatopoese, akute megakaryoblastische Leukämiezelllinie	<i>Homo sapiens</i>	transfiziert mit <i>BCR-ABL</i> ^{p210}	RPMI1640 (10% FCS)	AG Duyster, München
32D	Hämatopoese, murine Stammzelllinie	<i>Mus musculus</i>	-	RPMI1640 (10% FCS) 10ng/ml IL-3	AG Skorski, Philadelphia, USA

32D BCR-ABL ^{p210}	Hämatopoese, murine Stammzelllinie	<i>Mus musculus</i>	transfiziert mit BCR-ABL ^{p210}	RPMI1640 (10% FCS)	AG Skorski, Philadelphia, USA
HEK293	Nierenzellkarzinom, embryonal	<i>Homo sapiens</i>	-	RPMI1640 (10% FCS)	AG Schuler, Mainz
K562	Hämatopoese, Chronische myeloische Blastenzelllinie	<i>Homo sapiens</i>	Expression von BCR-ABL ^{p210}	RPMI1640 (10% FCS)	American Type Culture Collection (ATCC)
HEK293 pIRES-Neo3	Nierenzellkarzinom, embryonal	<i>Homo sapiens</i>	Stabil transfiziert mit dem Expressionsplasmid pIRES-Neo3	RPMI1640 (10% FCS) 0,5mg/ml G418	In der vorliegenden Arbeit generiert
HEK293 pIRES-Neo3-RFC1	Nierenzellkarzinom, embryonal	<i>Homo sapiens</i>	Stabil transfiziert mit dem Expressionsplasmid pIRES-Neo3-RFC1	RPMI1640 (10% FCS) 0,5mg/ml G418	In der vorliegenden Arbeit generiert
HEK293 pIRES-Neo3-FLAGRFC1	Nierenzellkarzinom, embryonal	<i>Homo sapiens</i>	Stabil transfiziert mit dem Expressionsplasmid pIRES-Neo3-FLAGRFC1	RPMI1640 (10% FCS) 0,5mg/ml G418	In der vorliegenden Arbeit generiert

2.1.15 Antikörper und Antiseren

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper und Antiseren aufgeführt.

Tabelle 2-3: Spezifitäten und Herkunft der Antikörper und Antiseren

Antikörper/Serum	Herkunftsorganismus	Verdünnung in „Blocking“-Lösung zur Immundetektion	Bezugsquelle
Anti-RFC1, polyklonales Serum	Kaninchen	1:800	AG Fischer, Mainz
Anti-mRFC1, polyklonales Serum	Kaninchen	1:1000	AG Williams, Cleveland, USA
Anti-β-actin, monoklonal (Klon C-4)	Maus	1:2000	ICN, Costa Mesa, USA
Anti-p53, monoklonal (Klon DO-7)	Maus	1:1000	BD Biosciences, San Diego, USA
Anti-c-ABL, monoklonal (Klon 24-21)	Maus	1:1000	Oncogene, Manhasset, USA
Anti-STAT-1, polyklonal	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-STAT-5, polyklonal	Kaninchen	1 :1000	Santa Cruz, Heidelberg
Ziege-anti-Kaninchen, monoklonal, HRP-konjugiert	Ziege	1:2000	Santa Cruz, Heidelberg
Ziege-anti-Maus, monoklonal, HRP-konjugiert	Ziege	1:2000	Santa Cruz, Heidelberg

Anti-BrdU, monoklonal, FITC- konjugiert (Klon B44)	Maus	-	BD Biosciences, San Diego, USA
Anti-FLAG, monoklonal (Klon M2)	Maus	1 :1000	Sigma, Deisenhofen

2.1.16 Datenbanken

Mit Hilfe der in der folgenden Tabelle aufgelisteten Datenbanken bzw. Anwendungsprogramme wurden Sequenzvergleiche auf DNA- und Aminosäureebene durchgeführt, sowie funktionelle Regionen untersucht und Oligonukleotide generiert. Lediglich die Namen, sowie die Internetadresse, über die man zu den einzelnen Programmen gelangen kann sind aufgeführt.

Tabelle: 2-4: Datenbanken und deren Internetadressen

Datenbank	Internetadresse
National Center of Biotechnology Information (NCBI)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Primer 3	http://www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
Ressourcenzentrum mit Primärdatenbank (RZPD)	http://www.rzpd.de
European Molecular Biology Laboratory	http://www.embl-heidelberg.de
Weizmann Institut	http://www.bioinformatics.weizmann.ac.il/index.html
ExpASY Proteomics	http://www.expasy.org

Human Genome Mapping Project Ressource Center (HGMP)	http://www.hgmp.mrc.ac.uk
Whitehead Institute	http://www.genome.wi.mit.edu
Gene-Regulation	http://www.gene-regulation.com

2.1.17 Software

Zur allgemeinen Datenverarbeitung wurden Programme des Microsoft Office-Paket, sowie Grafikprogramme der Adobe-Reihe benutzt. DNA-Sequenzdaten wurden mit den Programmen „Chromas“ und dem Programmpaket „DNA-Star“ (Lasergene, USA) ausgewertet und bearbeitet. Für gerätebezogene Datenaquisition und Auswertungen wurden jeweils die von den Geräteherstellern mitgelieferten Software-Programme verwendet.

2.1.18 Auftragsarbeiten

Sequenzierungen wurden von den Firmen GATC-Biotech (Konstanz) und Medigenomix (Martinsried) durchgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA durch Alkalische Lyse (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979)

Diese Methode macht sich zu Nutze, daß zirkulär geschlossene, bakterielle Plasmid-DNA bei alkalischen pH-Werten doppelsträngig bleibt, während genomische DNA in basischem Milieu denaturiert. Nach Neutralisation des pH-Wertes renaturiert genomische DNA und bildet, zusammen mit anderen Bestandteilen der Bakterienzelle, eine unlösliche Struktur, die durch Zentrifugation sedimentiert werden kann. Plasmid-DNA hingegen kann nach der Zentrifugation aus dem Überstand gewonnen werden. Um reine Plasmid-DNA in großen Mengen aus Bakterien zu erhalten, wurden transformierte Bakterien auf LB-Agar-Platten, die ein selektives Antibiotikum enthielten, ausgestrichen und 16h bei 37°C inkubiert. Die Plasmide, die es zu isolieren galt, trugen ihrerseits ein Resistenzgen gegen dieses Antibiotikum, so daß nur solche Bakterien auf den antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten wachsen konnten, die auch das Plasmid mit dem entsprechenden Resistenzgen aufgenommen hatten. Nach der Inkubation wurde eine Einzelkolonie in LB-Flüssigmedium, welches dasselbe Antibiotikum enthielt, transferiert und unter Schütteln bei 37°C für 16h inkubiert. Die Menge des Flüssigmediums richtete sich nach der benötigten DNA-Menge und betrug generell für „Minipräparationen“ 5ml und für „Maxipräparationen“ 200ml.

2.2.1.1 Plasmid-Minipräparation

Eine bakterielle Einzelkolonie wurde in 5ml LB-Flüssigmedium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und 16h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Es schloß sich eine Zentrifugation der Bakterienkultur für 20min bei 3500rpm an, wodurch die Bakterien sedimentiert wurden. Der flüssige Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet resuspendierte man in 200µl Lösung I, überführte die Flüssigkeit in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß und inkubierte den Ansatz für 5min bei Raumtemperatur (RT). Anschließend wurden 200µl Lösung II zugegeben und nach vorsichtigem Mischen für weitere 5min bei RT inkubiert. Dieser Schritt führt durch Erhöhung des pH-Wertes zur Denaturierung genomischer DNA und Bakterienproteine werden durch enthaltenes SDS (Natriumdodecylsulfat) zerstört. Durch Zugabe von 200µl Lösung III wird die Suspension

neutralisiert, was zur Renaturierung der genomischen DNA führt, die zusammen mit den zellulären Proteinen bei der Inkubation von 10min ausfällt. Es erfolgte anschließend eine Zentrifugation bei 14.000rpm für 10min und der Überstand wurde in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Durch Zusatz von 1/10Volumenteilen (VT) 3M Natriumacetat (pH 5,2) und 2VT Ethanol absolut präzipitierte man die Plasmid-DNA bei -20°C für 15min. Im Anschluß daran erfolgte eine Zentrifugation bei 14.000rpm für 10min. Das so entstandene Pellet wurde getrocknet und in 100µl TE-Puffer resuspendiert. Es wurden 5µl RNase A (10 mg/ml) zur Lösung gegeben und der Ansatz für 1h bei 37°C inkubiert, um vorhandene RNA zu zerstören. Restliche, noch in der Lösung befindliche Proteinverunreinigungen, wurden mittels Phenol/Chloroform-Extraktion entfernt. Hierzu wurde der Ansatz mit 1VT Phenol/Chloroform (1:1, v/v) versetzt, gründlich vermischt und für 10min bei 14.000rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die anschließende Fällung der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 1/2VT 7,5M Ammoniumacetat und 2,5VT Ethanol absolut und einer Inkubation bei -20°C für 1h. Nach Zentrifugation für 10min bei 14.000rpm und einmaligem Waschen mit Ethanol (70%), wurden die Proben getrocknet und in 50µl A. dest. bzw. TE-Puffer resuspendiert.

Zur langfristigen Lagerung von Bakterienstämmen versetzte man Aliquots der Flüssigkulturen mit Glycerin in einer Endkonzentration von 20% (v/v) und lagerte diese bei -80°C. Bei Reaktivierung der Bakterien konnte man mit Hilfe einer sterilen Impföse ein wenig der gefrorenen Kultur abnehmen und auf Nährboden ausstreichen.

2.2.1.2 Plasmid-Maxipräparation

Zur Gewinnung größerer Plasmid-DNA Mengen höheren Reinheitsgrades wurden QIAfilter Plasmid Maxi Kits (QIAGEN, Hilden) nach Anleitung des Herstellers verwendet.

2.2.2 Photometrische Bestimmung von DNA/RNA-Konzentrationen

Nukleinsäuren besitzen die Eigenschaft, ultraviolettes Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260nm und zur Konzentrationsbestimmung von DNA- bzw. RNA-Lösungen wurde die Optische Dichte (OD) der Nukleinsäurelösungen mit bekannten Verdünnungsgraden bei 260nm mit Hilfe eines Spektralphotometers gemessen.

Eine OD_{260} von 1 entspricht dabei folgenden Konzentrationen:

- | | |
|-----------------------------------|-------------------------|
| I. Doppelsträngige DNA: | ca. 50 $\mu\text{g/ml}$ |
| II. Einzelsträngige DNA oder RNA: | ca. 40 $\mu\text{g/ml}$ |

Im Gegensatz zu Nucleinsäuren besitzen Proteine ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280nm. Um eine eventuelle Proteinverunreinigung der Probe zu bestimmen, wurde zusätzlich die Absorption der Probe bei 280nm gemessen.

Das Verhältnis von OD_{260}/OD_{280} erlaubt eine Abschätzung des Reinheitsgrades der Nucleinsäurelösung und Werte über 1,8 zeigen hinreichend reine Proben an.

2.2.3 Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen ist es möglich, doppelsträngige DNA sequenzspezifisch zu spalten. In dieser Arbeit kamen Restriktionsendonukleasen des Typs II zur Anwendung, bei denen Erkennungssequenzen und Schnittstellen identisch sind. Diese Enzyme erkennen vorwiegend Tetra-, Penta-, oder Hexanukleotidsequenzen in doppelsträngiger DNA, wobei es sich überwiegend um sogenannte Palindrome; d.h. Sequenzen mit zweifacher Rotationssymmetrie handelt. Die Sequenzspezifität der Restriktionsendonukleasen hängt entscheidend von der Ionenkonzentration in der Reaktionslösung und der Inkubationstemperatur ab. Daher erfolgte die Spaltung der DNA stets bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur, sowie unter Verwendung des entsprechenden Reaktionspuffers für 3-5h. Die Menge des Enzyms wurde der Menge der eingesetzten DNA angeglichen, wobei 1Unit (U) eines Enzyms $1\mu\text{g}$ λ -DNA in einer Stunde bei 37°C vollständig schneidet. Bei gleichzeitiger Verwendung zweier verschiedener Enzyme, wurde der für beide Enzyme möglichst optimale Reaktionspuffer verwendet.

2.2.4 Dephosphorylierung von Vektoren

Um die Religation der Vektor-DNA bei einer Ligations-Reaktion zu verhindern, wurden dem Vektor nach erfolgter Restriktionsspaltung die 5'-Phosphatgruppen mittels alkalischer Phosphatase (Calf intestine phosphatase, CIP) entfernt.

Die Dephosphorylierung fand direkt im Anschluß an die Restriktionsspaltung des Vektors nach folgendem Protokoll statt:

Ansatz:	Restriktionsreaktion	20 µl
	10x Puffer	10 µl
	CIP (1U/µl)	2 µl
	A. dest.	ad 100 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 1h bei 37°C inkubiert. Um Proteinverunreinigungen aus der Lösung zu entfernen, wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Hierzu wurde der Ansatz mit 1VT Phenol/Chloroform (1:1, v/v) versetzt, gründlich vermischt und für 10min bei 14.000rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend fällte man den Ansatz durch Zugabe von 1/2VT 3M Natriumacetat und 2VT Ethanol absolut für 30min bei -20°C und zentrifugierte ihn 15min bei 14.000rpm. Schließlich wurde das entstandene Pellet einmal mit Ethanol (70%) gewaschen und schließlich in 20µl A. dest. gelöst.

2.2.5 Ligation

Mit Hilfe der T4-DNA-Ligase, die die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer 3'-Hydroxylgruppe unter Verbrauch von ATP katalysiert, können DNA-Moleküle verknüpft werden. Zur Aufnahme von DNA in einen Vektor wurden aufgereinigte DNA-Fragmente und linearisierte und dephosphorylierte Vektor-DNA mit Ligationspuffer und 1µl T4-DNA-Ligase (1U/µl) gemischt und mit sterilem A. dest. auf ein Gesamtvolumen von 10µl aufgefüllt. Das molare Verhältnis von Vektor-, zu Insert-DNA lag üblicherweise bei 1:3 und die Ligationsreaktion erfolgte für 14-16h bei einer konstanten Temperatur von 16°C.

2.2.6 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Um Plasmid-DNA in Bakterienzellen zu vermehren, wurden kompetente Bakterien transformiert. Bei einer Transformation nehmen kompetente Bakterienzellen Fremd-DNA auf. Verleiht aufgenommene DNA dem Bakterium einen Selektionsvorteil, wie z.B.

eine Antibiotikaresistenz, so verbleibt die Fremd-DNA unter Selektionsdruck stabil in der Zelle. Nach erfolgter Transformation können Bakterien auf antibiotikahaltigen Nährboden ausgebracht und damit Zellen mit aufgenommener Fremd-DNA selektioniert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten kompetenten Bakterienzellen (DH5 α , TOP10) wurden entsprechend den Angaben des Herstellers (Invitrogen, Niederlande) transformiert.

2.2.7 Agarosegelelektrophorese (Sambrook und Russell, 2001)

Aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatreste bei neutralem pH-Wert können DNA-Moleküle durch ein elektrisches Feld aufgetrennt werden. Die Mobilität der DNA hängt dabei im wesentlichen von der Größe und der Konformation der DNA, der Höhe der angelegten Spannung, sowie der Konzentration des Gels und des Elektrophoresepuffers ab. Eine Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 70bp bis zu 60kb lässt sich in Agarosegelen unterschiedlicher Konzentration durch Anlegen eines homogenen elektrischen Feldes erreichen. Zur Trennung von Fragmenten von 200bp bis 800bp wurde eine 2%ige Agarose-Konzentration gewählt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer angelegten Spannung von 8-10V/cm. DNA-Fragmente mit einer Größe bis zu 15kb wurden in 0,8%igen Agarosegelen und bei einer Spannung von 2-6V/cm aufgetrennt. Die jeweils angelegte Spannung und die Laufzeiten der Elektrophoresen variierten, je nach Verwendungszweck, zwischen 2-10V/cm und 1-8h. Als Laufpuffer wurde üblicherweise 1x TBE verwendet. Die Proben wurden zum Einfüllen in die Geltaschen mit Gelladepuffer versetzt. Das in diesem Puffer enthaltene Ficoll stellt ein Absinken der Proben in die Geltaschen sicher während Bromphenolblau eine optische Abschätzung der Wanderungstrecke der DNA-Moleküle während der Elektrophorese ermöglicht. Die Agarosegele enthielten zur späteren Detektion der DNA unter UV-Licht 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid das sich interkalierend in doppelsträngige DNA einlagert. Da Ethidiumbromid die Fähigkeit zur Fluoreszenz besitzt (Absorption von UV-Licht und Emission von sichtbarem Licht) und die Intensität des emittierten Lichts proportional zur Menge der an die DNA gebundenen Moleküle ist, kann man sowohl DNA-Banden im Gel sichtbar machen, als auch deren Konzentration durch Vergleich zu Banden bekannter Konzentration abschätzen. Zur Größen-, bzw. Konzentrationsabschätzung von DNA-Fragmenten dienen im Gel aufgetrennte

Größenstandards bekannter Konzentration. Die Photodokumentation der Agarosegele bei UV-Licht (302nm) erfolgte durch das Geldokumentationssystem der Firma Syngene.

2.2.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA-Moleküle nach deren Separation durch Agarosegelelektrophorese zur weiteren Verwendung zu gewinnen, mußten diese präparativ aus den Agarosegelen isoliert werden. Hierzu wurden die DNA-Banden unter UV-Licht (302nm) sichtbar gemacht und der Bereich, der das gewünschte Fragment enthielt, vorsichtig mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA, wie im folgenden beschrieben, isoliert. Ein 0,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde mit Hilfe einer feinen Kanüle am Boden perforiert, ein kleines Stück Whatmanpapier über die Öffnung gelegt und in ein 1,5ml Gefäß gesteckt. Das ausgeschnittene Gelblöckchen gab man in das 0,5ml Reaktionsgefäß und die Isolierung der DNA erfolgte durch Zentrifugation bei 14.000rpm für 10s. Die DNA wurde mit der im Gel enthaltenen Flüssigkeit durch das Whatmanpapier getrieben und im 1,5ml Eppendorfgefäß gesammelt und konnte einer weiteren Verwendung zugeführt werden, wohingegen die Agarose durch das Papier zurückgehalten wurde.

2.2.9 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten (Feinberg und Vogelstein, 1983)

Bei diesem Verfahren werden kurze Oligonukleotide (Hexanukleotid-Primer) unterschiedlicher Sequenz eingesetzt, die aufgrund ihrer kurzen Basenfolge komplementär zu vielen Stellen der eingesetzten Proben-DNA sind und als Startpunkte zur Synthese komplementärer DNA dienen. Die Bindung dieser Oligonukleotide an die Matrizen-DNA erfolgt nach dem Zufallsprinzip. Gibt man der Reaktion neben den natürlichen Desoxyribonukleotiden noch radioaktiv modifizierte Nukleotide zu, so werden diese ebenfalls in den neusynthetisierten DNA-Strang eingebaut und dieser somit radioaktiv markiert. Zur Markierung von DNA-Fragmenten mit den radioaktiven Nukleotiden $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP bzw. $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP wurden in dieser Arbeit 100ng Proben-DNA eingesetzt und das Fertigsystem "HexaLabel PlusTM DNA Labelling Kit" (Fermentas, St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers verwendet. Nicht eingebaute Nukleotide wurden nach der Markierungsreaktion säulenchromatographisch mittels G50-Sephadex Säulen (Amersham Pharmacia, Freiburg) abgetrennt.

2.2.10 Transfer von DNA Fragmenten auf eine Nylonmembran („Southern-Blot“)(Southern, 1975)

Durch diese Methode können in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran transferiert und auf dieser immobilisiert werden. Durch eine Hybridisierung der so generierten Membran mit spezifischen Sonden ist es möglich, DNA-Fragmente zu identifizieren, die zur verwendeten Sonde komplementäre Sequenzabschnitte besitzen. Zum Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran wurde in dieser Arbeit die Kapillartransfer-Methode verwendet.

2.2.10.1 Transfer der DNA

Das Agarosegel mit zuvor elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmenten wurde vor dem eigentlichen Transfer für 15min in 0,25M HCl-Lösung inkubiert. Diese Säurebehandlung führt zu DNA-Strangbrüchen („acid nicking“), wodurch verbesserter Transfer der DNA ermöglicht wird. Durch die anschließende Inkubation des Gels für 30min in Denaturierungslösung wird die DNA denaturiert und liegt schließlich einzelsträngig vor. Nach weiteren 30min Inkubation in Neutralisierungslösung kann die DNA aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran transferiert werden. Hierzu wurde eine Plastikschaale mit 10xSSC als Transferlösung gefüllt und in die Schaale ein Gelschlitten umgekehrt als Brücke gestellt. Auf diese Brücke wurden zwei mit 10xSSC getränkte 3MM-Whatman Papiere gelegt und hierauf wiederum das Agarosegel und die Membran. Die Membran wurde mit zwei weiteren Lagen 3MM-Whatman Papier bedeckt und schließlich wurden die Kanten des Gels mit Plastikstreifen abgedichtet, so daß kein Kapillartransfer am Gel vorbei möglich war. Eine etwa 15cm hohe Schicht Zellstoff wurde auf den Aufbau gelegt und mit einer etwa 500g schweren Platte beschwert. Der Kapillartransfer der DNA auf die Membran fand über Nacht statt. Anschließend wurden zur Orientierung die Geltaschen mit Bleistift auf der Membran markiert, die Membran kurz angetrocknet und die DNA schließlich durch UV-Bestrahlung (254nm) im Stratalinker (Stratagene) kovalent an die Membran gebunden. Die so hergestellte Membran konnte einer Hybridisierung zugeführt oder, in Folie verpackt, bei 4°C gelagert werden.

2.2.10.2 Hybridisierungsanalyse der DNA

Zur Vorbereitung auf die Hybridisierung wurde die Membran bei 65°C in 25ml „ExpressHyb™ Hybridization Solution“ (Clontech, Heidelberg) für 1h vorinkubiert. Zur Hybridisierung wurde die Lösung erneuert und schließlich die radioaktiv markierte, zuvor für 10min bei 100°C denaturierte, Sonden-DNA zugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Membran bei 65°C über Nacht unter leichtem Schütteln im Hybridisierungssofen. Die Entfernung überschüssiger, sowie unspezifisch gebundener Sonden-DNA erfolgte durch Waschen der Membran gemäß folgendem Schema:

Waschlösung I: 15min RT
Waschlösung II: 15min RT
Waschlösung III: 15min 65°C

Zwischen den Waschsritten erfolgte jeweils eine Kontrolle der auf dem Filter verbliebenen Strahlungsintensität. Zur autoradiographischen Dokumentation wurde die Membran schließlich in Folie eingeschlagen und in einer Filmkassette zusammen mit einem Röntgenfilm für 24h bis zu einer Woche inkubiert.

2.2.10.3 Dehybridisierung der Membran

Zur Entfernung der gebundenen, radioaktiven Sonde-DNA wurde die Membran für 30min bei 80°C in Dehybridisierungslösung unter ständigem Schütteln inkubiert, anschließend kurz luftgetrocknet, in Folie verpackt und bei 4°C gelagert.

2.2.11 Generierung von Replika-Filtern zur Kolonie-Hybridisierung (Sambrook und Russell, 2001)

Dieses Verfahren ermöglicht die Durchmusterung von transformierten bakteriellen Kolonien auf Agarplatten im Hinblick darauf welche Bakterienklone eine bestimmte gesuchte DNA-Sequenz besitzen. Auf Agarplatten mit Bakterienkolonien wird eine Nylonmembran aufgelegt und vorsichtig wieder abgezogen. Auf diese Weise haften einige Kolonien auf der Membran und ihre lokale Anordnung entspricht der auf der Agarplatte. Durch Lyse mittels SDS werden die Bakterien auf der Membran zerstört und deren DNA freigesetzt, die wiederum am Ort ihrer Freisetzung denaturiert und auf der

Membran fixiert wird. Der so hergestellte „Replika-Filter“ kann nun mit einer radioaktiv markierten Sonde, die komplementär zur gesuchten DNA-Sequenz ist, hybridisiert werden. Durch einen Abgleich der Anordnung der Hybridisierungssignale des Filters mit den bakteriellen Kolonien der originalen Agarplatte ist es nun möglich, die Klone zu identifizieren, die den gesuchten DNA-Sequenzabschnitt beinhalten. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Nylonmembran auf die Größe der Agarplatte zugeschnitten und autoklaviert. Die Membran wurde auf die mit Bakterienkolonien bewachsene Agarplatte luftblasenfrei aufgelegt, durch Einstiche mit einer Kanüle wurde die Position der Membran auf der Platte asymmetrisch markiert und danach wieder vorsichtig abgehoben. Die Agarplatte wurde zur Regeneration der Bakterien für 4h bei 37°C inkubiert. Die Membran wurde, ohne die anhaftenden Bakterienklonen direkt zu benetzen, nach folgendem Schema inkubiert:

10% SDS	3min
1,5M NaCl / 0,5M NaOH	5min
1,5M NaCl / 0,5M Tris-HCl, pH 7,4	5min
2xSSC	5min

Abschließend wurde die Membran für 30min getrocknet und für 1h bei 80°C gebacken und stand dann für eine Hybridisierungsanalyse zur Verfügung oder konnte bei 4°C gelagert werden.

2.2.11.1 Hybridisierungsanalyse von Replika-Filtern

Die Hybridisierung und Auswertung der hergestellten Replika-Filter mit radioaktiv markierter Sonden-DNA erfolgte gemäß der Beschreibung für die Hybridisierungsanalyse von DNA (siehe 2.2.10.2).

2.2.12 Polymerasekettenreaktion (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR: Polymerase chain reaction) ist es möglich, DNA-Abschnitte, die zwischen zwei Regionen bekannter Sequenz liegen, spezifisch *in vitro* zu amplifizieren. Aus der Sequenz bekannter DNA-Bereiche lassen sich komplementäre Oligonukleotide (Primer) ableiten, deren 3'-Enden während der PCR der

DNA-Polymerase als Startpunkte zur Synthese der komplementären Nukleotidstränge dienen. Das Grundprinzip der PCR teilt sich in drei Reaktionsschritte, die zyklisch 25-35 mal durchlaufen werden. Ein anfänglicher Denaturierungsschritt bei 95°C lässt aus der DNA-Doppelhelix Einzelstränge entstehen, die als Matrize für die Synthese komplementärer Stränge dienen. Zur Anlagerung (annealing) der Primer an die Einzelstränge wird die Temperatur erniedrigt, wobei diese Temperatur von der Länge und Basenzusammensetzung der eingesetzten Primer abhängig ist und üblicherweise zwischen 50°C und 65°C liegt. Nach dem Annealing erfolgt die Synthese der komplementären DNA-Stränge (Extension) bei 72°C, da die üblicherweise eingesetzte *Taq*-DNA-Polymerase (DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*) bei dieser Temperatur ihr Aktivitätsoptimum besitzt. Nach jedem Zyklus der Denaturierung - Primeranlagerung - DNA-Synthese dienen die neu synthetisierten DNA-Abschnitte wiederum als Matrize und somit wird eine exponentielle Amplifikation der gewünschten DNA-Abschnitte möglich. Die optimalen PCR-Bedingungen wurden im allgemeinen unter folgenden Bedingungen bestimmt:

Reaktionsansatz:

10x PCR-Puffer	5,0 µl
dNTPs (20mM/dNTP)	0,5 µl
Primer 1 (100 ng/µl)	0,5 µl
Primer 2 (100 ng/µl)	0,5 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5U/µl)	0,2 µl
DNA (100 ng/µl)	1,0 µl
A. bidest.	ad 50 µl

Folgendes PCR-Programm wurde standardmäßig verwendet:

95°C	5 min	
95°C	1 min	┌ └ 25-35x
50-65°C	30 s	
72°C	x min	└
72°C	3 min	
4°C	∞	

Die Extensionszeit „x“ richtete sich nach der Länge der zu generierenden PCR-Produkte und es wurde für je 1kb des zu amplifizierenden DNA-Fragments 1min Extensionszeit angesetzt. Nach Bedarf wurde zur Amplifikation eine Mischung verschiedener Taq-DNA Polymerasen mit „Proofreading“-Aktivität eingesetzt (Expand High Fidelity™ PCR System Polymerase-Mix, Roche). Zur Kontrolle der PCR wurden Aliquots der Reaktion in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Spezifische PCR-Produkte, die nach abgeschlossener Amplifikation einer weiteren Verwendung zugeführt werden sollten, wurden mittels „QIAquick PCR Purification Kit,, (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt und dadurch von Rückständen der PCR-Reaktion befreit, die eine folgende Modifikation beeinträchtigen könnten.

2.2.13 Arbeiten mit RNA

Bei allen Experimenten mit RNA wurde auf RNase-freie Bedingungen geachtet. Es kam nur Wasser zur Anwendung, welches zuvor durch Zusatz von DEPC behandelt und anschließend autoklaviert wurde. Bei DEPC handelt es sich um eine Substanz, die die Aktivität von RNasen inhibiert und somit einem Abbau von RNA entgegenwirkt. Alle Glaswaren wurden zuvor bei 180°C für 3h sterilisiert. Elektrophoresekammern reinigte man zunächst mit SDS, trocknete sie mit Ethanol absolut und inkubierte die Kammern für 10min mit 3%iger H₂O₂-Lösung. Schließlich wurde die Apparatur mit DEPC-H₂O ausgespült. Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und der Arbeitsplatz blieben für RNA-Arbeiten reserviert und während der Experimente mit RNA wurden grundsätzlich Latex-Handschuhe getragen.

2.2.13.1 Gewinnung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zelllinien erfolgte mit Hilfe der Fertigsysteme "QIAshredder" und "RNeasy™ Mini Kit" der Firma QIAGEN nach Anleitung des Herstellers.

2.2.13.2 Gewinnung angereicherter poly-A⁺-RNA aus eukaryontischen Zellen

Zur direkten Isolierung angereicherter poly-A⁺-RNA aus eukaryontischen Zelllinien wurde das Fertigsystem „Oligotex™ Direct mRNA Kit“ der Firma QIAGEN nach Anleitung des Herstellers verwendet.

2.2.13.3 Herstellung von cDNA (Erststrangsynthese)

Um aus isolierter RNA komplementäre DNA-Moleküle (cDNA) herzustellen, wurde das „SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ (Invitrogen, Niederlande) verwendet. Mit Hilfe dieses Fertigsystems war es möglich, zu poly-A⁺-RNA komplementäre, einzelsträngige DNA herzustellen, die in weiteren Verfahren eingesetzt werden konnte.

Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers und es wurden 2-5µg isolierter Gesamt-RNA für die Reaktion eingesetzt.

2.2.13.4 Determinierung des 5'-Endes einer genspezifischen mRNA mittels 5'-RACE (Rapid amplification of cDNA ends)

Diese Methode ermöglicht die Identifizierung des vollständigen 5'-Endes einer genspezifischen mRNA bzw. cDNA. Die Kenntnis von Sequenzdaten im 5'-Bereich des Zielgens ermöglicht die Generierung eines genspezifischen Primers (GSP), welcher sich in reverser Orientierung zum offenen Leserahmen des Gens befindet. Durch eine Ligation von Oligonukleotiden bekannter Sequenz (Adapter) an die 5'-Enden isolierter mRNA und die anschließende Generierung von komplementärer DNA (cDNA) kann daraufhin die Amplifikation der gesuchten 5'-Sequenz des Zielgens mittels PCR unter Verwendung des GSP, sowie eines Oligonukleotides, welches spezifisch an die Adapter-Sequenz bindet, erfolgen. Eine anschließende Sequenzierung des Amplifikates liefert schließlich Informationen über den 5'-Bereich des Zielgens, welcher sich zwischen den beiden bekannten Oligonukleotidsequenzen befindet.

Das in dieser Arbeit verwendete System (GeneRacer™ Kit, Invitrogen, Niederlande) wurde nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden 5µg Gesamt-RNA einer humanen Zelllinie (Mo7e) eingesetzt und die generierten Amplifikate der Ligation und Sequenzierung im pCR4-TOPO Vektorsystem (Invitrogen, Niederlande) zugeführt.

2.2.13.5 Transfer von RNA-Fragmenten auf eine Nylonmembran („Northern-Blot“)(Sambrook und Russell, 2001)

Bei einem Northern-Blot handelt es sich um RNA-Moleküle, die nach elektrophoretischer Auftrennung in einem denaturierenden Gel auf einer Nylon-, oder Nitrocellulosemembran immobilisiert sind (Alwine et al., 1977; Bresser und Gillespie 1983). Mit Hilfe von radioaktiv markierten RNA-, oder DNA-Fragmenten als Sonden dient die Northern-Analyse zum Nachweis von, zur Sonde komplementärer RNA, die spezifisch mit dem markierten Molekül hybridisiert und somit einen Nachweis der Genexpression im untersuchten Zell-, bzw. Gewebematerial liefert.

2.2.13.5.1 Fraktionierung von RNA mittels denaturierender Formaldehyd-agarosegelelektrophorese

Da RNA-Moleküle üblicherweise einzelsträngig vorliegen und Sekundärstrukturen ausbilden können, wurde zu deren elektrophoretischer Auftrennung ein denaturierendes Formaldehyd-Agarosegel verwendet. Somit wurde die Bildung von Sekundärstrukturen verhindert und ein gleichmäßiges Wanderungsverhalten der Proben erreicht. Die Gewinnung angereicherter poly-A⁺-RNA verschiedener Zelllinien erfolgte mit Hilfe des "Oligotex™ Direct mRNA Kit" (QIAGEN). Anschließend wurden jeweils 5µg poly-A⁺-RNA mit DEPC-H₂O auf 50µl Gesamtvolumen aufgefüllt und durch Zugabe von 1/10VT 3M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5VT Ethanol absolut bei -80°C über Nacht gefällt. Das so hergestellte RNA-Pellet wurde nach dem Trocknen in 3,3µl DEPC-H₂O aufgenommen und mit 7,5µl deionisiertem Formamid (Endkonzentration 50%), 1,5µl 10x MOPS-Puffer und 2,7µl Formaldehyd (Endkonzentration 2,2 M) versetzt, 15min bei 55°C denaturiert und bis zum Beginn der Elektrophorese auf Eis gelagert. Der RNA-Größenstandard (Invitrogen, Niederlande) wurde analog den RNA-Proben vorbereitet. Für das Gel wurden 1,8g Agarose in 144ml DEPC-H₂O gelöst. Nach Abkühlung auf 60°C wurden unter dem Abzug 10ml 10x MOPS-Puffer und 36ml Formaldehyd (37%) zugegeben. Die

Flüssigkeit wurde gemischt, in den vorbereiteten Gelschlitten gegossen und nach der Polymerisation des Gels wurde die Elektrophoresekammer so mit 1x MOPS-Laufpuffer gefüllt, daß das Gel gerade bedeckt war. Zum Einfüllen in die Geltaschen wurden die RNA-Proben und der Marker mit Gelladepuffer versetzt. Die Elektrophorese startete bei einer Spannung von 70-80V bis die Proben etwa 0,5cm in das Gel eingewandert waren. Danach wurde soviel Laufpuffer abgenommen, daß das Gel nicht mehr bedeckt war, um eine Diffusion von Formaldehyd in den Laufpuffer zu verhindern. Anschließend wurde mit 3MM-Whatmanpapier am vorderen und hinteren Pufferreservoir eine Verbindung zwischen Laufpuffer und Gel hergestellt ("Pufferbrücke"), so daß der Stromfluß gewährleistet blieb. Schließlich deckte man die Geloberfläche mit Folie ab und die weitere Elektrophorese erfolgte mit einer Spannung von 70V für 16 h.

2.2.13.5.2 Transfer der RNA auf eine Nylonmembran

Nach der Elektrophorese wurden die Spuren, in denen der RNA-Größenstandard aufgetrennt und die zum zuverlässigen Größenvergleich mit Ethidiumbromidlösung gefärbt werden sollten, abgetrennt und in einer 0,5M Ammoniumacetat-Lösung für 2x20min gewaschen. Anschließend färbte man diese Gelabschnitte in einer 0,5M Ammoniumacetatlösung mit 1µg/ml Ethidiumbromid über Nacht. Die Photodokumentation erfolgte mit dem Geldokumentationssystem der Firma Syngene. Um das restliche Gel auf den Transfer der RNA vorzubereiten, wurde es mehrmals mit Wasser abgespült um Verunreinigungen und Formaldehyd zu entfernen. Eine Erhöhung der Transporteffizienz der RNA von dem Gel auf die Nylonmembran wurde durch Inkubation des Gels in 20x SSC für 30min erreicht. Der Transfer der RNA erfolgte durch Kapillarkräfte, indem ein Schwamm und 3MM-Whatmanpapiere mit 10x SSC getränkt, darauf das Gel und eine Nylonmembran entsprechender Größe platziert wurden. Schließlich legte man trockene Whatmanpapiere und Zellstofflagen auf. Der gesamte Aufbau wurde beschwert und der Transfer der RNA-Moleküle aus dem Gel auf die Nylonmembran erfolgte durch Kapillarkräfte innerhalb von 16h.

2.2.13.5.3 Hybridisierungsanalyse der RNA

Um die Nylonmembran für die Hybridisierung vorzubereiten, wurde sie nach dem RNA-Transfer mit 2x SSC abgespült, für 30min bei 80°C getrocknet und einer

Kreuzvernetzung der RNA mit der Membran mittels UV-Licht im Stratalinker (Stratagene) zugeführt. Abschließend erfolgte eine weitere Inkubation der Nylonmembran für 3h bei 80°C. Zur Kontrolle des RNA-Transfers durch Anfärbung der auf der Filtermembran gebundenen RNA, wurde die Membran 10min in Methylblau-Färbelösung inkubiert und in A. dest. entfärbt. Die Photodokumentation erfolgte mit dem Dokumentationssystem der Firma Syngene. Eine Prähybridisierung der Membran erfolgte in 10ml Prähybridisierungslösung bei 42°C für mindestens 15min. Hierzu wurde die Nylonmembran mit der Lösung luftblasenfrei in eine Plastiktüte gegeben und diese verschweißt. Zur Hybridisierung wurde die Prähybridisierungslösung gegen 2ml/100cm² Membranfläche Hybridisierungslösung ausgetauscht, im Plastikbeutel gut gemischt, die zuvor denaturierte, radioaktiv markierte DNA-Sonde hinzupipettiert und der Beutel schließlich wieder luftblasenfrei verschweißt. Die Hybridisierungsreaktion erfolgte bei 42°C unter leichtem Schütteln für 16h im Hybridisierungsöfen. Um unspezifisch gebundene Sonden-DNA zu entfernen, mußte die Membran nach abgeschlossener Hybridisierung in mehreren Lösungen mit abnehmender Salzkonzentration gewaschen werden.

Hierzu wurden generell fünf Waschschrirte wie folgt durchgeführt:

Waschlösung I	1min RT
Waschlösung I	5min 42°C
Waschlösung II	20min von 42°C bis 65°C
Waschlösung III	15min 65°C
Waschlösung IV	10min 65°C

Zur Autoradiographie wurde die Membran getrocknet, in Klarsichtfolie verpackt und anschließend erfolgte eine Exposition mittels Röntgenfilm für 16h bis zu einer Woche bei -80°C.

2.2.13.5.4 Dehybridisierung der Membran

Um einen mehrmaligen Einsatz der Membran zu ermöglichen, mußte nach Abschluß jeder Hybridisierung die gebundene Sonden-DNA entfernt werden. Hierzu wurde die

Nylonmembran mit Dehybridisierungslösung bei 80°C für eine Stunde unter leichtem Schütteln inkubiert, danach getrocknet und in Folie verpackt.

2.2.14 Arbeiten mit Proteinen

In dieser Arbeit wurden sowohl Proteine untersucht, die ausschließlich nukleär lokalisiert sind, als auch solche, die sich vornehmlich im Zytoplasma von Zellen befinden. Aus diesem Grund kamen sowohl Proteinextraktionsverfahren zum Einsatz, die eine präferentielle Anreicherung von Kernproteinen ermöglichten, als auch Methoden, die zur gesamten Freisetzung von nukleären und zytoplasmatischen Proteinen führen. Um eine proteolytische Degradation der Proteine zu vermeiden, wurden die Präparationen bei 4°C und mit vorgekühlten Reagenzien durchgeführt, sowie den Lysepuffern Protease-Inhibitoren zugesetzt.

2.2.14.1 Gewinnung von Gesamtzellextrakten

Die Gewinnung von Gesamtzellsätzen erfolgte in dieser Arbeit durch Inkubation von Zellen sowohl mit RIPA-, als auch mit NP-40-Lysispuffer. Beide Methoden basieren auf der Zerstörung der Zellmembran und Freisetzung zellulärer Proteine durch mechanische Scherkräfte und der Wirkung von Detergenzien. Bezüglich der hier untersuchten Proteine waren beide Puffersysteme vergleichbar im Hinblick auf die Freisetzung der Proteine aus den verwendeten Zellen. Zellen wurden bei 1400rpm für 10min pelletiert und danach mit 1ml PBS gewaschen. Nach Resuspension des Zellpellets in 1ml eiskaltem PBS wurde die Zellsuspension in 2ml Reaktionsgefäße überführt und mit 2000rpm für 5min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde durch mehrmaliges Pipettieren in 1VT RIPA-, bzw. NP40-Lysepuffer wieder in Lösung gebracht und für 30min auf Eis inkubiert. Mehrmaliges heftiges Durchmischen der Suspension erfolgte alle 5min während der Inkubationszeit. Es schloß sich eine Zentrifugation für 10min mit 14000rpm bei 4°C an nach deren Ende sich die freigesetzten zellulären Proteine getrennt von pelletierten, ungelösten Zelltrümmern im Überstand befanden. Die Gesamtzellextrakte konnten entweder direkt weiterverwendet, oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert werden.

2.2.14.2 Extraktion angereicherter Kernproteine

Die Präparation von angereicherten, nukleären Proteinen wurde modifiziert nach der Methode von Dignam und Mitarbeitern (1983) durchgeführt. Die Methode beruht auf einem Schwellen und Platzen der Zellen durch Inkubation in hypotoner Pufferlösung, sowie heftiger mechanischer Durchmischung. Anschließend erfolgt die Extraktion von Kernproteinen durch einen Hochsalzpuffer. Die verwendeten Zellen wurden in ein Zentrifugationsgefäß überführt, bei 1400rpm für 10min pelletiert und daran anschließend mit 1ml PBS gewaschen. Nach Resuspension der Zellen in 1ml eiskaltem PBS überführte man die Zellsuspension in 2ml Reaktionsgefäße und es schloß sich eine Zentrifugation mit 2000rpm für 5min bei 4°C an. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Zellpellet wurde in 2VT Puffer A resuspendiert, für 10min auf Eis inkubiert und anschließend 10s bei 14000rpm zentrifugiert. Der Überstand nach Zentrifugation wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und das Pellet wiederum in 2VT Puffer A aufgenommen, 10min auf Eis inkubiert und die Suspension nochmals für 10s bei 14000rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, resuspendierte man das Pellet in 1VT Puffer C. Einer Inkubation von 15min auf Eis schloß sich schließlich eine Zentrifugation mit 14000rpm für 15min an. Der gewonnene Überstand enthielt nun die angereicherten Kernextrakte, die entweder direkt weiteren Applikationen zugeführt oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert wurden.

2.2.14.3 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Diese Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen beruht auf der Eigenschaft des Farbstoffes Coomassie-Brilliantblau G250 in saurem Milieu unspezifisch an Proteine zu binden. Hierdurch findet eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465nm zu 595nm statt. Nach vorheriger Generierung einer Eichkurve durch Absorptionsmessungen von BSA-Lösungen (bovines Serumalbumin) definierter Konzentrationen war eine Konzentrationsbestimmung der experimentellen Proteinextrakte möglich.

Es wurden 2µl des jeweiligen Extraktes mit 200µl Bradford-Konzentrat (Bio-Rad Protein Assay, BioRad, München), sowie 800µl H₂O in einer Meßküvette gemischt. Nach 10min Inkubation, die eine möglichst vollständige Bindung des Farbstoffes an Proteine

ermöglichen sollte, erfolgte die Absorptionsmessung der Probe bei 595nm. Durch Abgleich mit der zuvor erstellten Eichkurve ließen sich die Proteinkonzentrationen der Extrakte ableiten.

2.2.14.4 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ermöglicht in Anwesenheit des anionischen Detergenz SDS eine Auftrennung von Proteinen gemäß ihrem Molekulargewicht. Die Polypeptide werden hierbei durch SDS, β -Mercaptoethanol und Erhitzung denaturiert, wobei die Anlagerung von SDS zu einer negativen Nettoladung der Proteine proportional zur ihrer Masseneinheit führt. Die Proteine bewegen sich daher in Abhängigkeit ihres Molekulargewichts zur Anode und eine Größenbestimmung kann durch den Vergleich mit der Laufstrecke bekannter Markerproteine vorgenommen werden. Das hier verwendete Laemmli-System besteht aus einem Trenngel (8-12%), dessen Acrylamidkonzentration, und damit der Vernetzungsgrad des Gels, vom gewünschten Auftrennungsbereich abhängt. Nachdem das Trenngel durch Überschichtung mit Isopropanol unter Luftabschluß auspolymerisiert war, wurde es mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet. In das Sammelgel wurde ein Probenkamm eingesteckt, um Aussparungen für die aufzutragenden Proteinproben sowie den Marker zu generieren. Das so hergestellte Polyacrylamid-Gel wurde in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt und die Pufferreservoirs mit SDS-Laufpuffer befüllt. Proteinproben und Marker wurden vor dem Gelauftrag mit 1VT SDS-Probenpuffer versetzt und für 5min bei 95°C denaturiert. Die anschließende Elektrophorese erfolgte bei 100V für 2-4h bzw. bis der gewünschte Auftrennungsgrad erreicht war und damit ein Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgen konnte.

Die Zusammensetzung der Sammel-, bzw. Trenngele ist in der folgenden Tabelle aufgeführt. Die angegebenen Volumina beziehen sich auf Minigele (Mini-Protean 3, BioRad) und wurden für größere Polyacrylamid-Gele (Protean Ixi XL, BioRad) entsprechend angepaßt.

	Sammelgel (4%)	Trenngel (8%)	Trenngel (10%)	Trenngel (12%)
Acrylamid/Bis	0,66ml	2,7ml	3,3ml	4,0ml
1M Tris-HCl, pH 6,8	0,63ml	-	-	-
1,5M Tris-HCl, pH 8,8	-	2,5ml	2,5ml	2,5ml
H ₂ O	3,6ml	4,6ml	4,0ml	3,3ml
SDS (10%)	0,05ml	0,1ml	0,1ml	0,1ml
APS (10%)	0,05ml	0,1ml	0,1ml	0,1ml
TEMED	0,005ml	0,006ml	0,004ml	0,004ml

2.2.14.4.1 Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membranen („Western Blot“)(Towbin et al., 1979; Bittner et al., 1980)

Der elektrophoretische Transfer von zuvor mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen aus der Polyacrylamid-Matrix auf Nitrocellulose-Membranen erfolgte in einer vertikalen Naßtransfer-Kammer (Mini-Transblot/Transblot, BioRad) durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld. Die lokale Auflösung der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine bleibt hierbei erhalten. Nach Beendigung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde das Sammelgel mit einem Skalpell von dem Trenngel abgetrennt und entsorgt. Zur Vorbereitung des Transfers wurden das Trenngel, die Nitrocellulose-Membran, sowie zwei 3MM-Whatman Filterpapiere in Transfer-Lösung äquilibriert und anschließend das Gel und die Membran luftblasenfrei zwischen die Filterpapiere gelegt und in eine Gitterkassette eingespannt. Die gepackte Gitterkassette wurde in das Transfer-Modul eingelegt, welches mit Transfer-Lösung gefüllt wurde und anschließend erfolgte der elektrophoretische Transfer der Proteine auf die Membran bei einer konstanten Spannung von 50V für mindestens 2h. Um ein übermäßiges Erhitzen der Transferlösung zu verhindern fand der Transfervorgang bei 4°C in einer Kühlkammer statt. Nach Abschluß des Transfers wurde die Membran für 10min in PBS/Tween gewaschen, um anhaftende Gelreste zu entfernen und stand anschließend entweder direkt für eine Immundetektion zur Verfügung oder konnte, in Folie luftdicht eingeschlagen, bei 4°C gelagert werden.

2.2.14.4.2 Immundetektion immobilisierter Proteine

Mit Hilfe spezifischer Antikörper ist es möglich, elektrophoretisch aufgetrennte und auf einer Membran immobilisierte Proteine zu detektieren. Eingeleitet wird die Detektion durch die spezifische Bindung eines sogenannten „primären“ Antikörpers an bestimmte Epitope des gesuchten Antigens. Nach Zugabe eines zweiten, „sekundären“ Antikörpers, der den Fc-Anteil des ersten Antikörpers erkennt und daran bindet, führt ein an den sekundären Antikörper gekoppeltes Enzym zur Oxidation eines Substrates. An die in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper war das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Dieses Enzym katalysiert in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid die Oxidation des Substrates Luminol zu einem aktiviertem Zwischenprodukt, das bei Rückkehr in seinen Ausgangszustand Licht emittiert (Chemilumineszenz), welches über Schwärzung eines Röntgenfilmes nachgewiesen werden kann. Die nach Auftrennung und Transfer der Proteine generierte Nitrocellulosemembran wurde zunächst für mindestens 1h bei RT in „Blocking“-Lösung inkubiert um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu verhindern. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit Primärantikörper für 2h bei RT bzw. über Nacht bei 4°C unter ständiger Bewegung. Die Membran wurde daraufhin zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper 3x10min mit reichlich PBS/Tween gewaschen und dann für 1h bei RT mit Sekundärantikörper inkubiert. Die Eliminierung von überschüssigen Sekundärantikörpern erfolgte wiederum durch Waschen mit PBS/Tween für 3x10min. Die so behandelte Membran stand nun für eine Detektion der spezifischen Antikörperbindung mittels Chemilumineszenzreaktion zur Verfügung. Hierzu wurde das ECL-System von Amersham nach Angaben des Herstellers verwendet. Nach Inkubation in Chemilumineszenz-Substratlösung für 2min wurde die Membran luftblasenfrei in Folie eingeschlagen und die Chemilumineszenz-Detektion erfolgte mittels Röntgenfilmen in einer Röntgenkassette für 10s bis zu 10min.

2.2.14.4.3 Dehybridisierung der Membran

Um eine erneute Hybridisierung einer Membran zu ermöglichen, mußten zuvor gebundene Antikörperkomplexe entfernt werden. Hierzu wurde die Membran in 100ml Dehybridisierungslösung für 30min bei 50°C in einem Wasserbad unter ständigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3x15min in PBS/Tween

gewaschen und schließlich entweder einer erneuten Immundetektion zugeführt oder in Folie luftdicht eingeschlagen und bei 4°C gelagert.

2.2.15 Zellbiologische Methoden

In dieser Arbeit wurden humane und murine Zelllinien, unter definierten Bedingungen in Kultur zur Proliferation gebracht, in flüssigem Stickstoff zur langfristigen Lagerung tiefgefroren und bei Bedarf durch Auftauen wieder in Kultur gebracht. Die Inkubation der Zellen erfolgte stets unter definierten Kulturbedingungen in einem Brutschrank bei 37°C, 5%CO₂ und 80% Luftfeuchtigkeit.

2.2.15.1 Auftauen von Zellen

Da Zellen zur langfristigen Lagerung in flüssigem Stickstoff mit Einfriermedium, welches Dimethylsulfoxid (DMSO) enthält, versetzt waren, mußten sie nach der Entnahme aus dem Stickstofftank so schnell wie möglich aufgetaut und mit frischem Wachstumsmedium versorgt werden, um zu vermeiden, daß die Zellen größeren Schaden erleiden.

Die Einfriergefäße, in denen die Zellen im Stickstofftank lagerten, wurden entnommen und sofort in ein vorbereitetes Becherglas mit 37°C warmen Wasser gegeben. Nachdem Abschluß des Auftauvorgangs, überführte man die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen das vorgewärmtes Wachstumsmedium enthielt und eine Zentrifugation von 5min bei 1400rpm schloß sich an. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in Wachstumsmedium resuspendiert und die Zellsuspension in eine Kulturflasche zur Inkubation im Brutschrank überführt. Am darauffolgenden Tag wurde ein Austausch des Mediums vorgenommen und das Zellwachstum kontrolliert.

2.2.15.2 Passagieren von Zellen

Durch die Proliferation von Zellen in Kultur mußte in regelmäßigen Abständen sowohl das verbrauchte Wachstumsmedium ausgewechselt, als auch die Zellzahl durch Aufteilung auf mehrere Kulturflaschen verringert werden. Je nach Wachstumsrate war ein Teilen (Passagieren) der verschiedenen Zelllinien ein bis zweimal wöchentlich notwendig. Die Teilungsraten betragen zwischen 1:2 bis 1:6. Das Passagieren wurde durch vollständiges Überführen der Zellen, einschließlich des Wachstumsmediums, in

ein Zentrifugationsgefäß eingeleitet. Das Ablösen adhärenter Zellen vom Boden der Kulturflasche erreichte man durch die Zugabe von je 2-5ml Trypsin/EDTA-Lösung pro Zellkulturflasche, der sich eine Inkubation für 5min bei 37°C anschloß. Nach diesem Schritt konnten die Zellen durch leichtes Klopfen der Kulturflasche vollständig abgelöst, und ebenfalls in Zentrifugationsgefäße überführt werden. Nach einer Zentrifugation mit 1400rpm für 5min wurde das Zellpellet in Medium resuspendiert und in Kulturflaschen überführt, in die, entsprechend der gewünschten Teilungsraten, Medium vorgelegt worden war. Am darauffolgenden Tag erfolgte eine optische Wachstumskontrolle.

2.2.15.3 Langfristige Lagerung von Zellen

Zur langfristige Lagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff wurden diese in Einfriermedium überführt. Hierzu wurden die Zellen, wie oben beschrieben, geerntet und für 5min bei 1400rpm sedimentiert. Das resultierende Zellpellet wurde in Einfriermedium resuspendiert und anschließend in Einfrierröhrchen überführt. Die Röhrchen wurden über Nacht bei -80°C inkubiert, bevor sie in flüssigen Stickstoff zur langfristigen Lagerung überführt werden konnten.

2.2.15.4 Transfektion eukaryontischer Zellen mittels Elektroporation (Wong und Neumann, 1982; Sambrook und Russell, 2001)

Neben einer Reihe anderer Methoden zur Transfektion eukaryontischer Zellen besticht die Elektroporation durch ihre einfache Durchführbarkeit. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich selbst Zellen transfizieren, deren Transfektion mit alternativen Verfahren sehr schwer zu erreichen ist. Obwohl der genaue Mechanismus der Transfektion mittels Elektroporation noch nicht vollständig aufgeklärt ist, geht man mittlerweile davon aus, daß sich die zelluläre Membran durch das Anlegen eines Spannungsfeldes kurzzeitig dahingehend verändert, daß sie durchlässig für Nukleinsäuren wird und dadurch Fremd-DNA in die Zellen eingebracht werden kann. Zur Determinierung der optimalen Transfektionseffizienz müssen in Vorversuchen bestimmte Parameter, wie DNA-, und Zellkonzentration, Überleben der Zellen nach Elektroporation, angelegte Spannung und Kapazität, für die zu transformierenden Zellen getestet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Zielzelllinie HEK293 das beste Ergebnis hinsichtlich der Transfektionseffizienz mit der im folgenden beschriebenen Vorgehensweise erreicht.

Zellen, die zu 50-70% konfluent gewachsen waren wurden in einem Zentrifugationsgefäß für 5min bei 1400rpm sedimentiert und danach einmal mit PBS gewaschen. Die Gesamtzellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/200 μ l mit OPTIMEM-Medium eingestellt. In eine Elektroporationsküvette (GenePulser^R, BioRad, München) wurden 200 μ l Zellsuspension eingefüllt und die Zellen mit 300V und 300 μ F in Anwesenheit von 20 μ g Plasmid-DNA elektroporiert. Danach wurden die Zellen in 5ml Wachstumsmedium überführt, mit 1400rpm für 5min zentrifugiert und zur Regeneration in 10ml Medium im Brutschrank inkubiert.

2.2.15.5 Generierung stabil transfizierter Zelllinien

Zur Untersuchung von Zellen, die die große Untereinheit des humanen Replikationsfaktors C (RFC1) konstitutiv überexprimieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die humane Nierenzellkarzinom Zelllinie HEK293 mit rekombinanten Expressionsplasmiden (pIRES-Neo3, Clontech, Heidelberg), welche die cDNA von *RFC1* enthielten, transfiziert. Die Transformation der Zellen erfolgte mittels Elektroporation (siehe 2.2.15.4). Die konstitutive Expression sowohl der großen Untereinheit des humanen Replikationsfaktors C, als auch des *Neomycin*-Resistenzgens unterlag in den Expressionsplasmiden der Kontrolle eines CMV-Promotors. Somit konnte durch eine dauerhafte Selektion der Transfektanden mit dem Antibiotikum G418, welches die Proteinbiosynthese von Pro-, und Eukaryonten hemmt und durch das Genprodukt des *Neomycin*-Gens inaktiviert wird, eine Integration des Expressionsplasmids in das Genom der Zielzellen, sowie eine konstitutive, ektopische Expression von RFC1 gewährleistet werden. Die Sensitivität der HEK293-Zellen gegenüber dem Antibiotikum G418 war bereits bekannt und lag bei bei einer Konzentration von 0,5mg/ml G418. Dies wurde bestätigt durch die Selektion von HEK293-Zellen, die parallel, ohne Zugabe des resistenzvermittelnden Expressionsplasmids, transfiziert wurden. Diese Zellen starben nach Zugabe von 0,5mg/ml G418 innerhalb von 10 Tagen. Nach erfolgter Transfektion der HEK293-Zellen mit den Expressionsplasmiden wurden die Transfektanden zur Regeneration für 48h in Wachstumsmedium inkubiert und anschließend zur dauerhaften Selektion in Medium überführt, das 0,5mg/ml G418 enthielt.

2.2.16 Durchflußzytometrie

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie ist es möglich, molekulare und physikalische Eigenschaften von Zellen auf Einzelzellebene zu analysieren. Durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten, spezifischen Antikörpern können mit dieser Methode sowohl Oberflächenmoleküle von Zellen, als auch deren intrazelluläre Bestandteile untersucht werden. So ermöglicht der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen, die an bestimmte Zielstrukturen binden (z.B. DNA-Farbstoffe) die direkte Analyse dieser Moleküle. Zur Untersuchung werden die Zellen im Durchflußzytometer nacheinander an einem gebündelten Laserstrahl, dessen Wellenlänge zur Anregung der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe geeignet ist, vorbeigeleitet. Bei der Rückkehr der durch den Laser angeregten Fluoreszenzfarbstoffe in ihren Ausgangszustand emittierte Photonen werden durch Photodetektoren registriert und quantifiziert, wobei sich die Photonenkonzentration proportional zur Menge an gebundenem Farbstoff verhält. Durch Detektion von Lichtbeugung und Lichtstreuung im sogenannten Forward-, und Sidewardscatter (FSC/SSC) können zusätzliche Informationen zur Zellgröße und Granularität gewonnen werden. Die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlichen Emissionsspektren ermöglicht die gleichzeitige Untersuchung verschiedener zellulärer Eigenschaften. In der vorliegenden Arbeit kamen der DNA-Farbstoff Propidiumiodid (PI, Emissionsmaximum 650nm) als auch ein Fluoreszeinisothiocyanat (FITC, Emissionsmaximum 519nm)-gekoppelter Antikörper zum Einsatz. Die Messung erfolgte in einem Durchflußzytometer (Epics XL-MCL, Beckman Coulter, Krefeld), welches zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe mit einem Argonlaser (488nm) ausgestattet ist.

2.2.16.1 Durchflußzytometrische Bestimmung des zellulären DNA-Gehalts mittels Propidiumiodid-Inkorporation

Die verschiedenen Zellzyklusphasen, die eine Zelle durchläuft zeichnen sich u.a. durch unterschiedliche Mengen an genetischem Material in der Zelle aus. Während Säugerzellen, die sich in der G₀/G₁-Phase des Zellzyklus befinden einen diploiden Chromosomensatz (2n) aufweisen, findet während der S-Phase eine Verdopplung der DNA statt, so daß Zellen in dieser Phase des Zyklus einen DNA-Gehalt von 2n-4n besitzen. Nach Abschluß der DNA-Synthesephase und vor Einleitung der Zellteilung, in

der G2/M-Phase, liegt ein vierfacher Chromosomensatz ($4n$) in der Zelle vor. Diesen Zusammenhang, zwischen dem DNA-Gehalt einer Zelle und der entsprechenden Zellzyklusphase, macht man sich bei der hier beschriebenen Methode zu Nutze. Durch Färbung der Zellen mit Propidiumiodid, einem Farbstoff, der interkalierend und proportional zur Menge an genetischem Material an DNA bindet, konnte der DNA-Gehalt und damit die Verteilung auf verschiedene Zellzyklusphasen einer Zellpopulation bestimmt werden. Da zelluläre DNA im Verlauf des programmierten Zelltodes (Apoptose) durch freigesetzte bzw. aktivierte Nukleasen fragmentiert wird, weisen tote bzw. apoptotische Zellen einen DNA-Gehalt $<2n$ auf. Somit konnte mit dieser Methode auch der Anteil toter bzw. apoptotischer Zellen der Population determiniert werden.

Die Auswertung der Messung erfolgte über ein Histogramm, auf dessen x-Achse die Fluoreszenzintensität der Zellen und damit deren DNA-Gehalt und der y-Achse die Anzahl der Zellen dargestellt wurde. Die Zellen wurden zur Vorbereitung auf die durchflußzytometrische Messung für 5min bei 1400rpm zentrifugiert und zur gleichzeitigen Permeabilisierung und Färbung in 500 μ l Propidiumiodid-Färbelösung aufgenommen. Nach Inkubation für 30min bei 4°C im Dunkeln wurde die Verteilung des DNA-Gehalts der Zellen am Durchflußzytometer bestimmt.

2.2.16.2 Durchflußzytometrische Messung der zellulären DNA-Synthese

Zur Bestimmung der DNA-Synthese von Zellen mittels Durchflußzytomtrie wurde die Inkorporation von 5'-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) in die zelluläre DNA determiniert. Bei BrdU handelt es sich um ein Basenanalogen, das anstelle des „natürlichen“ Nukleotids Thymin in die DNA aufgenommen wird. Die Inkorporation von BrdU in die zelluläre DNA wurde durch die Bindung eines spezifischen, FITC-gekoppelten Antikörpers an BrdU im Durchflußzytometer gemessen. Hierzu wurden die Zellen 24h vor Zugabe von BrdU mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt und jeweils 5×10^4 Zellen in einer Sechs-Loch-Platte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von BrdU (10 μ M) gefolgt von einer Inkubation für 30min im Brutschrank bei 37°C. Danach wurden die Zellen bei 1400rpm für 5min zentrifugiert und unter kräftigem Schütteln in 100 μ l eiskaltem EtOH (70%) resuspendiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte bei RT für 20min. Danach wurde der Ansatz mit 1ml PBS/0,5% BSA gewaschen und das Pellet in 100 μ l 2M HCl-Lösung für 20min bei RT inkubiert. Es schloß sich ein weiterer Waschschrift mit 1ml PBS/0,5%

BSA an und die Zellen wurden anschließend in 0,5ml 0,1M Natriumborat zur Neutralisierung für 2min aufgenommen. Nachdem wiederum mit PBS/0,5% BSA gewaschen wurde erfolgte die Inkubation mit 20µl FITC-gekoppeltem Anti-BrdU Antikörper für 20min bei RT. Einem letzten Waschschrift mit 1ml PBS/0,5% BSA folgte die Resuspension des Zellpellets in 500µl Propidiumiodid-Färbelösung. Der Ansatz wurde für 30min bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt und danach am Durchflußzytometer gemessen.

2.2.17 UV-Bestrahlung von Zelllinien

Zur Untersuchung der Auswirkungen von DNA-Schäden durch UV-Bestrahlung auf verschiedene Zellen wurden diese in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und jeweils 5×10^4 Zellen 24h vor Bestrahlung in einer Sechs-Loch-Platte ausgesät. Die Bestrahlung mit unterschiedlichen Energien (10-200mJ) erfolgte mittels Stratalinker (Stratagene) und mit einer Wellenlänge von 254nm. Der Bestrahlung folgte ein Mediumwechsel, sowie eine anschließende Inkubation über 8h bzw. 24h nach deren Abschluß die Zellen der durchflußzytometrischen Zellklusanalyse zugeführt wurden.

2.2.18 Behandlung von Zelllinien mit Zytostatika

Um den Einfluß unterschiedlicher zytotoxischer Substanzen auf Zellen zu testen, kamen verschiedene Zytostatika zum Einsatz, die auch klinische Verwendung finden. Die Gesamtzellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt und jeweils 5×10^4 Zellen wurden 24h vor Behandlung in einer Sechs-Loch-Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Zugabe der Zytostatika und eine Inkubation der Zellen für 24h bzw. 48h schloß sich an. Die Auswertung erfolgte mittels Zellzyklusmessungen am Durchflußzytometer.

2.2.19 Alkalische Einzelzell-Gelelektrophorese (“Comet-assay“) (Singh et al., 1988)

Die alkalische Einzelzell-Gelelektrophorese (engl.: single-cell gel electrophoresis, SCGE) dient dem Nachweis von DNA-Strangbrüchen in eukaryontischen Zellen und wird u.a. sowohl zum Test des Einflusses genotoxischer Substanzen auf die DNA, als auch zum Nachweis von DNA-Diskontinuitäten, die als Intermediärstrukturen im Verlauf

der DNA-Reparatur auftreten können, verwendet (Collins et al., 1997; Übersicht in: Collins, 2004). Die Methode macht sich zunutze, daß ungeschädigte, genomische DNA eukaryontischer Zellen in hochmolekularen Organisationsstrukturen superspiralisiert vorliegt und durch Kontaktpunkte mit der Kern-Matrix nicht frei drehbar ist. Einzel- und Doppelstrangbrüche führen zu einer Verminderung der Superspiralisierung und diese Auflockerung der Struktur kann durch denaturierende Agenzien weiter verstärkt werden. Diese, durch DNA-Strangbrüche veränderte Struktur führt während einer Elektrophorese unter alkalischen Bedingungen zu einer erhöhten Mobilität geschädigter DNA und dem Austritt langer DNA-Schleifen aus dem Nukleus, während ungeschädigte DNA im Kern verhaftet bleibt. Das Bild, das sich bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung hierdurch ergibt, hat der Methode den Beinamen „Comet-assay“ verschafft, wobei der „Schweif“ des Kometen die aus dem Nukleus ausgetretenen DNA-Fragmente repräsentiert und der „Kometenkopf“ die im Kern zurückgebliebene DNA darstellt. Die DNA-Mobilität („Schweif“-DNA) korreliert bei dieser Methode mit dem Ausmaß der DNA-Strangbrüche und läßt somit durch den Vergleich von „Kopf“- zu „Schweif“ Rückschlüsse auf den Grad der DNA-Schädigung bzw. der Strangbrüche zu. In der vorliegenden Arbeit wurde der „Comet-assay“ zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen eingesetzt, die nach UV-Bestrahlung im Verlauf der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) bei der Beseitigung von DNA-Schäden wie Pyrimidin-Dimeren entstehen. Hierzu wurde, mittels Neubauer-Zählkammer, die Gesamtzellzahl bestimmt und jeweils 5×10^4 Zellen 24h vor UV-Bestrahlung in Sechs-Loch-Platten ausgesät. Der UV-Bestrahlung der Zellen mit einer Energie von 200mJ schloß sich eine Inkubation von 4h bei 37°C an. Anschließend wurden die Zellen in 100µl PBS resuspendiert, je 50µl der Zellsuspension mit 120µl Low-Melting-Point Agarose (LMP-Agarose, 0,5%, 37°C) vermischt und auf einen mit 1,5%iger Agarose beschichteten und vorgekühlten Objektträger aufgetragen. Nach Abkühlung der LMP-Agarose erfolgte eine Inkubation der eingebetteten Zellen für 1h bei 4°C in Lysepuffer. Anschließend wurden die Präparate in die Elektrophorese-Apparatur überführt und für 25min in alkalischem Elektrophoresepuffer (pH13) bei 4°C inkubiert. Die direkt daran anschließende Gelelektrophorese wurde bei 4°C für 25min und mit 25V durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Präparate drei mal 5min in Neutralisierungslösung (0,4M Tris-HCl, pH 7,5) inkubiert und abschließend für 5min in Ethanol absolut fixiert und getrocknet. Die Färbung der zellulären DNA mit

Ethidiumbromid-Färbelösung (20µg/ml EtBr) erfolgte unmittelbar vor der Auswertung mittels Fluoreszenz-Mikroskop (Olympus IX70, Anregungswellenlänge 510-560nm, Emissionsfilter 580-590nm).

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung der mRNA-Expression von *RFC1* in verschiedenen adulten humanen Geweben mittels Northern-Hybridisierung

Zur Detektion der *RFC1* mRNA-Expression in verschiedenen humanen Geweben wurde in der vorliegenden Arbeit ein kommerzieller „Multiple-Tissue Northern Blot“ (MTNTM Blot, Clontech, Heidelberg) mit einem radioaktiv markierten, *RFC1*-spezifischen cDNA-Fragment als Sonde hybridisiert. Zur Hybridisierung wurde ein cDNA-Klon des Ressourcenzentrums mit Primärdatenbank (RZPD, Heidelberg) eingesetzt, welcher Teile des 3'-kodierenden Bereichs, sowie Sequenzen der 3'-untranslatierten Region von *RFC1* enthielt („IMAGp950D0348“, *EcoRI*-*NotI* cDNA-Fragment in Vektor „pT7T3D“, RZPD, Heidelberg). Das cDNA-Fragment (743bp) des Klons wurde zur Hybridisierung des MTN-Blots durch Restriktionsspaltung mit *EcoRI* und *NotI* freigesetzt, nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus einem Agarosegel isoliert und radioaktiv markiert.

Das Ergebnis der Hybridisierung ist in Abbildung 3-1 dargestellt. Es wurde eine variable Expression der beiden mRNA-Transkripte von *RFC1* in verschiedenen adulten, humanen Gewebeproben nachgewiesen. Hier zeigte sich die stärkste mRNA-Expression von *RFC1* in Leber- und Nierengewebe, während in anderen Gewebeproben (Gehirn, Thymus, Darm und Milz) nur eine sehr schwache bzw. keine mRNA-Expression des Gens nachweisbar war. Die Expression zweier *RFC1* mRNA-Transkripte unterschiedlicher Größe (ca. 4,5 und 5,3kb) wurde bereits beschrieben und ist bedingt durch zwei alternative Polyadenylierungsstellen im 3'-Bereich von *RFC1* (Lu und Riegel, 1994).

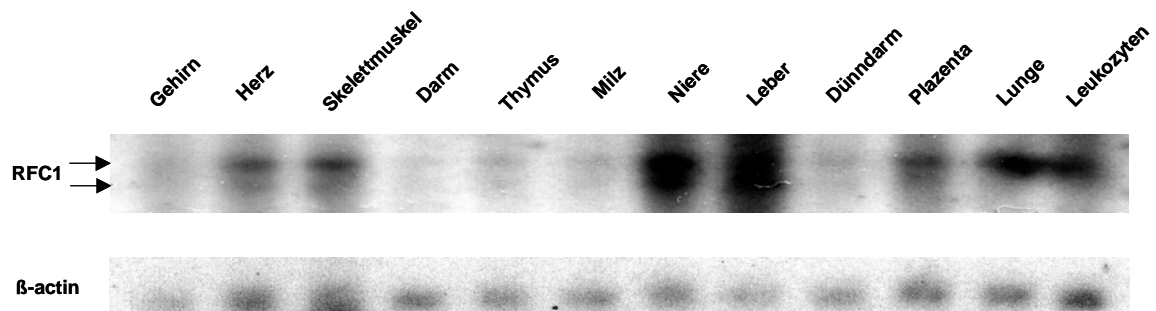


Abbildung 3-1: Detektion der mRNA-Expression von *RFC1* mittels Northern-Hybridisierung in verschiedenen adulten humanen Geweben. Zur Hybridisierung eines kommerziellen Multiple-Tissue Northern Blots (MTN™ Blot, Clontech; je 1 µg polyA⁺ mRNA) wurde das Insert-Fragment eines cDNA-Klons (IMAGp950D0348, RZPD, Heidelberg) eingesetzt, das spezifisch für den 3'-Bereich der mRNA von *RFC1* ist. Die Sonden-DNA wurde durch Restriktionsspaltung des Klons mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *NotI* freigesetzt, nach gelelektrophoretischer Auftrennung isoliert und zur Hybridisierung der Membran radioaktiv markiert. In den verschiedenen humanen Geweben konnte eine variierende Expression der zwei mRNA-Transkripte von *RFC1* detektiert werden. Eine Beladungskontrolle durch Hybridisierung der Membran mit einer spezifischen *β-actin* Sonden-DNA wurde freundlicherweise von einem Mitglied der Arbeitsgruppe (B. Carius) zur Verfügung gestellt.

3.2 Identifikation und Sequenzanalyse der potentiellen Promotorregion von *RFC1*

Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit keine Sequenzinformationen des genomischen 5'-Bereiches, sowie potentieller cis-regulatorischer Sequenzelemente in der 5'-Region von *RFC1* vorlagen, sollten humane genomische Klone isoliert werden, die den proximalen, 5'-genomischen Bereich des Gens repräsentieren und damit eine Identifizierung potentieller cis-regulatorischer Regionen auf DNA-Sequenzebene ermöglichen. Da im Verlauf der vorliegenden Arbeit Sequenzdaten des Humanen Genom Projektes in der Datenbank des National Center of Biotechnology Information (NCBI) zunehmend verfügbar wurden, konnten die in dieser Arbeit generierten Sequenzen durch Datenbankanalyse einem Sequenzabgleich und einer Plausibilitätskontrolle unterzogen werden.

3.2.1 Isolierung genomischer Klone, die den 5'-Bereich von *RFC1* repräsentieren

Zur Isolierung eines humanen genomischen DNA-Klons, welcher das *RFC1*-Gen, sowie den angrenzenden 5'-Bereich enthält, wurde eine humane genomische Bibliothek (RPC11, 3-5 Human PAC, No.: 704) des Ressourcenzentrums mit Primärdatenbank (RZPD, Heidelberg) mittels Hybridisierungsanalyse mit Hilfe eines genspezifischen cDNA-Fragments als Sonde durchsucht. Die Durchmusterung der genomischen Bibliothek erfolgte als Serviceleistung des RZPD mit dem DNA Insert-Fragment eines cDNA-Klons (IMAGp950D0348, RZPD, Heidelberg), der Teile des kodierenden 3'-Bereiches, sowie der 3'-untranslatierten Region der mRNA von *RFC1* repräsentiert. Es wurden fünf genomische Klone identifiziert, die in der Analyse unterschiedlich starke Hybridisierungssignale zeigten (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: Aufstellung der durch Hybridisierung mit einer *RFC1*-spezifischen cDNA-Sonde identifizierten DNA-Klone der humanen genomischen Bibliothek RPC1 1, 3-5, No.: 704 des RZPD

Klonbezeichnung	RZPD-Bezeichnung	Vektor	Bemerkungen
A1911	RPCIP704A191141Q2	pCypac2	schwach positiv
A106	RPCIP704A10643Q2	pCypac2	stark positiv
D227	RPCIP704D22744Q2	pCypac2	schwach positiv
E095	RPCIP704E09532Q2	pCypac2	schwach positiv
L015	RPCIP704L01550Q2	pCypac2	schwach positiv

Die Plasmid-DNA des genomischen Klons, der in der Hybridisierungsanalyse des RZPD ein starkes Signal zeigte (A106), wurde einer Restriktionsspaltung mit *EcoRI* unterzogen, gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Zur Identifikation von DNA-Fragmenten, die den Bereich stromaufwärts des Startcodons beinhalten, wurde ein PCR-Amplifikat der Oligonukleotide „hRFC-5'-1f“ und „hRFC-5'-1r“ aus cDNA der Zelllinie K562 radioaktiv markiert und als Sonde zur

Hybridisierung eingesetzt. Die eingesetzte Sonden-DNA repräsentierte ein 82bp-Fragment, das 42bp stromaufwärts des Startcodons von *RFC1* in der 5'-untranslatierten Region lokalisiert ist. Als Ergebnis dieser Hybridisierung konnte ein positives Signal mit einer Größe von >12kb detektiert werden (Abbildung 3-2).

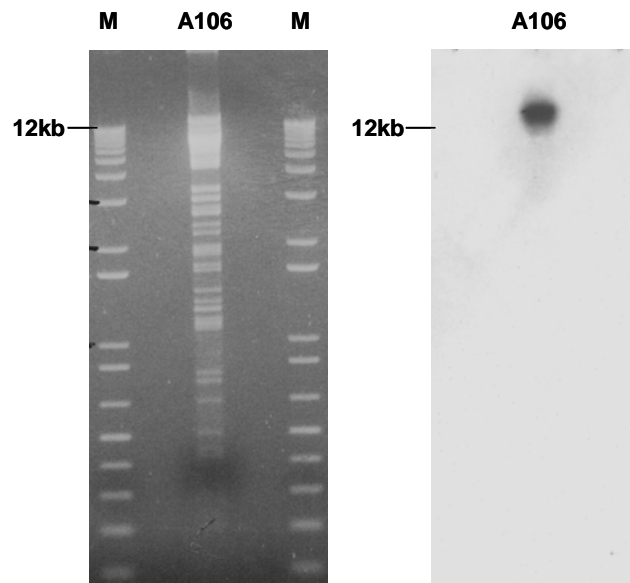


Abbildung 3-2: Southern-Blot Analyse zur Detektion von DNA-Fragmenten des genomischen Klon „A106“, die spezifisch für den genomischen 5'-Bereich von *RFC1* sind. Eine gelelektrophoretische Bestimmung der DNA-Konzentration des genomischen Klon „A106“ wurde durch Vergleich mit einem Größenstandard bekannter Konzentration vorgenommen und anschließend wurden ca. 2µg DNA einer Restriktionsspaltung mit *EcoRI* unterzogen und in einem Agarosegel aufgetrennt (linke Seite). Ein 1kb DNA-Marker (Invitrogen) wurde zur Größenkontrolle mitgeführt (M). Die gelelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente wurden auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion von Fragmenten, die spezifisch für den 5'-genomischen Bereich von *RFC1* sind, erfolgte durch Hybridisierung der Membran mit einem radioaktiv markierten PCR-Amplifikat der Oligonukleotide „hRFC-5'-1f“ und „hRFC-5'-1r“ aus cDNA der Zelllinie K562. Die Sonden-DNA repräsentierte ein 82bp-Fragment des 5'-untranslatierten Bereichs der mRNA von *RFC1*. Es wurde ein spezifisches Signal mit einer Größe >12kb detektiert (rechte Seite).

Durch eine Sequenzierung des Plasmids „A106“ mit den Primern „hRFC-5'-1f“ und „hRFC-5'-1r“ konnten sowohl die Existenz der 5'-untranslatierten Region von *RFC1* auf dem Plasmid verifiziert, als auch zusätzliche Sequenzdaten des angrenzenden, genomischen 5'-Bereichs generiert werden.

Zur Isolierung des *EcoRI*-Fragments, das den 5'-genomischen Bereich von *RFC1* repräsentiert, wurden 2µg der DNA des Plasmids „A106“ wiederum einer Restriktionsspaltung mit *EcoRI* unterzogen und der gesamte Restriktionsansatz zur Ligation in den zuvor ebenfalls mittels *EcoRI* behandelten Vektor „pBluescriptIIKS+“ (Stratagene, Heidelberg) eingesetzt. Dies sollte zu einer zufälligen Insertion von *EcoRI*-Einzelfragmenten des genomischen Plasmids „A106“ in den Klonierungsvektor „pBluescriptIIKS+“ führen („Shotgun-Ligation“). Mit diesem Ligationsansatz wurden kompetente Bakterien transformiert und zur Generierung von bakteriellen Einzelklonen auf antibiotikahaltigen Agarplatten über Nacht bei 37°C inkubiert. Von den auf Agarplatten vereinzelt Bakterienklonen wurden Replika-Filter hergestellt. Diese sollten zur Identifikation von Klonen mittels Hybridisierungsanalyse dienen, die ein *EcoRI*-Subfragment des Plasmids „A106“ enthalten, das den gesuchten 5'-genomischen Bereich von *RFC1* repräsentiert. Zur Hybridisierungsanalyse der Replika-Filter wurde ein radioaktiv markiertes PCR-Amplifikat des Plasmids „A106“ mit den Primern „hRFC-5'-genom/f.“ und „hRFC-5'-genom/r.“ als Sonden-DNA eingesetzt, das einen 206bp-Bereich 41bp stromaufwärts des Startcodons von *RFC1* repräsentiert. Sequenzdaten dieses Bereichs standen durch die zuvor durchgeführte Sequenzierung des Plasmids „A106“ mit den Primern „hRFC-5'-1f“ und „hRFC-5'-1r“ zur Verfügung.

Als Ergebnis der Hybridisierungsanalyse konnten mehrere identische Subklone des Plasmids „A106“ isoliert werden, die nach Restriktionsspaltung ein *EcoRI*-Fragment mit einer Größe >12kb aufwiesen und in einer PCR-Amplifikation mit den Oligonukleotiden „hRFC-5'-genom/f.“ und „hRFC-5'-genom/r.“ ein positives Signal der erwarteten Fragmentgröße von 206bp zeigten. In Abbildung 3-3 ist das Ergebnis der Restriktionsspaltung eines der Subklone „A106 *EcoRI* 1.1“ mit *EcoRI*, sowie der PCR-Reaktion gezeigt.

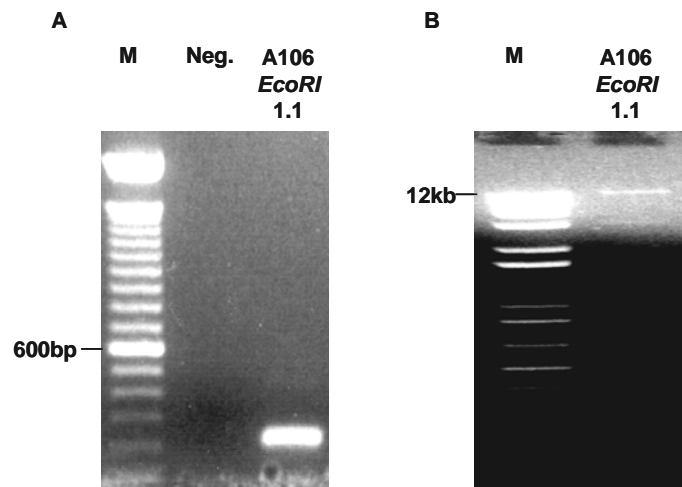


Abbildung 3-3: Verifikation des genomische Subklons „A106 *EcoRI* 1.1“ durch PCR und Restriktionsenzymspaltung. Eine gelelektrophoretische Bestimmung der DNA-Konzentration des genomischen Subklons „A106 *EcoRI* 1.1“ wurde durch Vergleich zu einem Größenstandard bekannter Konzentration vorgenommen. (A): Zur Verifikation der Identität des isolierten genomische Subklons „A106 *EcoRI* 1.1“ wurde DNA des Klons in einer PCR mit den Primern „hRFC-5'-genom/f.“ und „hRFC-5'-genom/r.“ eingesetzt. Je 5µl der PCR-Reaktionen wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Ein PCR-Ansatz ohne DNA diente als Negativkontrolle (Neg.) und ein 100bp DNA-Marker (Invitrogen) wurde zur Größenkontrolle mitgeführt (M). Es konnte ein spezifisches PCR-Amplifikat (206bp) mit DNA des genomischen Subklons „A106 *EcoRI* 1.1“ detektiert werden. (B): Plasmid-DNA des Klons „A106 *EcoRI* 1.1“ (ca.1µg) wurde zur Freisetzung des Insert-Fragments mit *EcoRI* behandelt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Ein 1kb DNA-Marker (Invitrogen) wurde zur Größenkontrolle mitgeführt (M) Das DNA-Insert des rekombinanten Subklons wies eine Größe >12kb auf.

Zur weiteren Klonierung von DNA-Fragmenten des Klons „A106 *EcoRI* 1.1“, die sich zu einer anschließenden Sequenzierung eignen sollten, wurde das Plasmid einer Restriktionsenzymsspaltung mit *HindIII*, sowie einer gleichzeitigen Restriktionsspaltung mit *EcoRI* und *HindIII* unterzogen. Das Restriktionsenzym *HindIII* war zur Generierung weiterer Subklone geeignet, da sich in Testversuchen mit dieser Restriktionsendonuklease eine Fragmentierung von „A106 *EcoRI* 1.1“ erreichen ließ. Die gesamten Restriktionsansätze wurden jeweils zur Ligation in, zuvor ebenfalls mit *EcoRI* bzw. *EcoRI* und *HindIII*-behandelte, „pBluescriptIIKS+“-Vektoren eingesetzt. Mit den Ligationsansätzen wurden wiederum kompetente Bakterien transformiert und bakterielle Einzelklone durch Inkubation auf antibiotikahaltigen Agarplatten über Nacht bei 37°C selektioniert. Die zufällige Auswahl und anschließende Sequenzierung einer Reihe von rekombinanten Subklonen, die nach Restriktionsspaltung mit *HindIII* bzw. *EcoRI* und *HindIII* unterschiedliche DNA-Fragmentgrößen aufwiesen führte zur Isolierung von insgesamt sieben verschiedenen Subklonen von „A106 *EcoRI* 1.1“. Eine Lokalisation der Subklone im genomischen Kontext von *RFC1* erfolgte durch Sequenzabgleiche mit vorläufigen Sequenzen des Humanen Genom Projektes („Draft-Sequenzen“; Acc.-No: AC023135, NT_016297, 12730548), sowie nach Abschluß der Sequenzierung des humanen Genoms, mit einer Referenzsequenz des NCBI, die einen Teil des 5'-genomischen Bereichs von *RFC1* repräsentiert (Acc.-No: AY600371). In Abbildung 3-4 ist die Lokalisation der in dieser Arbeit isolierten genomischen DNA-Klone stromauf- und stromabwärts des Startcodons von *RFC1*, sowie deren Bezeichnungen gemeinsam mit ausgewählten Teilen von Sequenzen der NCBI-Datenbank (AC023135, AY600371) schematisch dargestellt. Die DNA-Sequenzdaten der in dieser Arbeit generierten genomischen Subklone sind im Anhang aufgeführt.

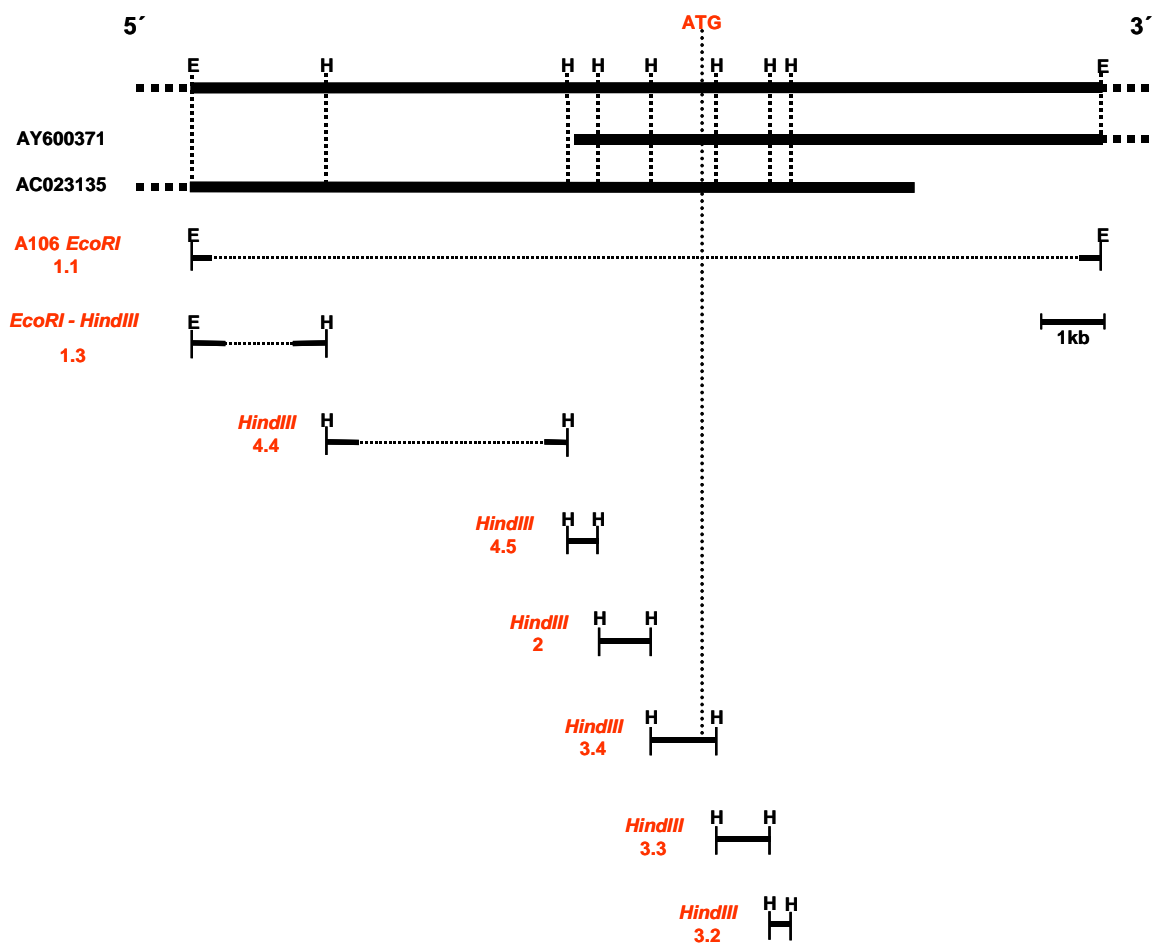


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit isolierten genomischen Klone, die Teile des genomischen Bereichs 5' und 3' des Startcodons von *RFC1* repräsentieren. Dargestellt ist die jeweilige Lokalisation der in dieser Arbeit isolierten DNA-Klone in einem genomischen Bereich einer Gesamtlänge von 15,89kb 5' und 3' des Startcodons von *RFC1*. Eine vollständige Sequenzabdeckung des Bereiches ist durch überlappende Teile genomischer Sequenzen der NCBI-Datenbank dargestellt (AY600371: 9,44kb; AC023135: 12kb; ein Sequenzbereich von 5,55kb wird von beiden Sequenzen abgedeckt). Die Existenz zusätzlicher Sequenzdaten in 5'- und 3'-Richtung des dargestellten Bereiches wird angedeutet (gepunktete Linie). Die Lokalisation der Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *EcoRI* (E) und *HindIII* (H) sind in den jeweiligen Sequenzen markiert. In der vorliegenden Arbeit konnten insgesamt acht genomische Subklone des Plamids „A106“ generiert werden, deren Sequenzen einen Teilbereich der dargestellten genomischen Region stromaufwärts und stromabwärts des Startcodons von *RFC1* repräsentieren. Die Bezeichnungen der isolierten Subklone sind in rot dargestellt und deren Sequenzlängen variierten in einem Bereich von 0,24kb (*HindIII* 3.2) bis zu 4,06kb (*HindIII* 4.4). Die in dieser Arbeit generierten Sequenzen der Subklone, sind im Anhang der Arbeit aufgeführt und in der Darstellung mit durchgehenden Linien gekennzeichnet, während Bereiche der Subklone, die nicht selbst in dieser Arbeit sequenziert wurden, als unterbrochene Linien dargestellt sind. Die genomische Lokalisation des Startcodons von *RFC1* ist eingezeichnet (ATG).

3.3 Determinierung der Transkriptionsstartstelle von *RFC1* mittels 5'-RACE

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit standen, neben einigen partiellen cDNA-Sequenzen (expressed sequence tags (ESTs)), drei repräsentative cDNA-Sequenzen des *RFC1* Gens in der Nukleotid-Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) zur Verfügung (Acc-No.: L23320, Z22642, AF040250). Diese enthielten sowohl den vollständigen, kodierenden Bereich des Gens, als auch zusätzliche Sequenzinformationen unterschiedlichen Ausmaßes der 5'- und 3'-untranslatierten Region von *RFC1*. Beim Vergleich der 5' des Startcodons gelegenen Region der oben genannten Sequenzen zeigten sich sowohl Unterschiede in der Ausdehnung der Sequenzen, als auch im Vergleich der Nukleotidsequenzen untereinander. Die 5'-untranslatierte Region der cDNA-Sequenz „AF040250“ erstreckte sich über 45bp und zeigte eine komplette Übereinstimmung mit den Sequenzen „L23320“ und „Z22642“ in diesem Bereich. Die Sequenzen der Klone „L23320“ und „Z22642“ hingegen erstreckten sich über eine Länge von 206bp bzw. 396bp stromaufwärts des ATG-Codons und zeigten eine Sequenzdivergenz ab 85bp 5' des Translationsstarts. Eine Datenbankabfrage der divergierenden Bereiche der cDNA-Sequenzen von „L23320“ und „Z22642“ mit dem Suchalgorithmus „BLAST“ zeigte keine Homologien zu anderen, mit *RFC1* verwandten Sequenzen. Somit stellte sich die Frage, ob es sich bei der 5'-Region der genannten cDNA-Sequenzen um alternative Transkriptionsstartstellen des *RFC1*-Gens handelt, oder die Sequenzunterschiede der cDNAs „L23320“ und „Z22642“ Artefakte darstellen, die keinen Bezug zum 5'-Ende der *RFC1* mRNA haben. Abbildung 3-5 zeigt einen schematischen Vergleich des 5'-untranslatierten Bereiches der cDNA-Sequenzen „L23320“, „Z22642“, „AF040250“ in Bezug auf identische und divergierende Sequenzbereiche und deren Ausdehnung stromaufwärts des Startcodons zu Beginn der Arbeit.

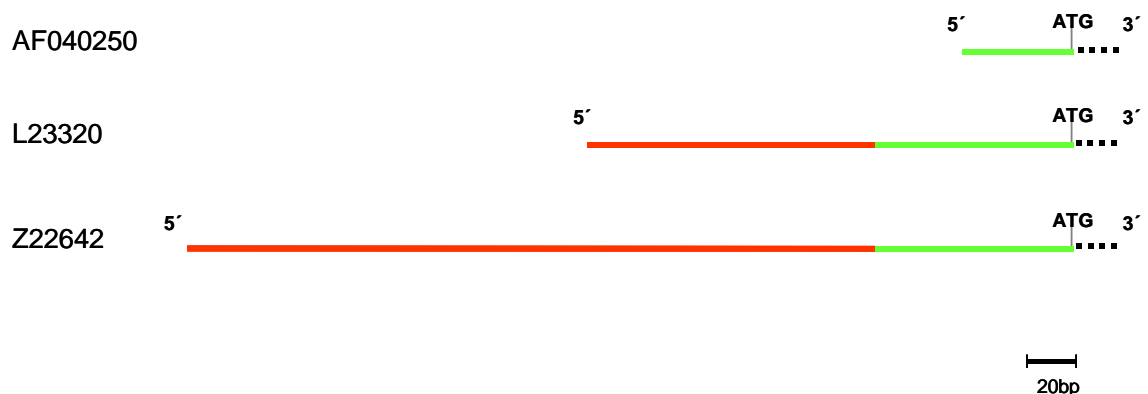


Abbildung 3-5: Schematischer Vergleich der 5'-untranslatierten Regionen repräsentativer cDNA-Sequenzen von *RFC1* zu Beginn der Arbeit. Dargestellt sind die 5'-Bereiche dreier repräsentativer cDNA-Sequenzen des *RFC1*-Gens zu Beginn der Arbeit in Bezug auf deren Ausdehnung 5' des Startcodons (ATG). Die Sequenzlängen der 5'-Region der cDNA-Sequenzen betragen 45bp (AF040250), 206bp (L23320) und 396bp (Z22642). Grün eingefärbte Bereiche zeigen Regionen der Sequenzübereinstimmung, während rote Bereiche auf divergierende Sequenzabschnitte hinweisen, die in einer Datenbankabfrage keine Homologien zu anderen, mit *RFC1* verwandten Sequenzen zeigten. Der Start des kodierenden Bereiches von *RFC1* wird angedeutet (gepunktete Linie).

Zur Determinierung des 5'-Endes der *RFC1*-mRNA wurde das „GeneRacer™-Kit“ (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet und 5µg RNA der humanen, hämatopoetischen Zelllinie Mo7e eingesetzt.

Die PCR-Amplifikation der 5'-Enden der *RFC1*-mRNA erfolgte mit einem genspezifischen Primer „hRFC-GSP1“, und dem „Gene-Racer™ 5'-Primer“ des Fertigsystems. Zur Klonierung und Sequenzierung wurden die PCR-Amplifikate mit dem Vektor „pCR4-TOPO“ (Invitrogen) ligiert, kompetente Bakterienzellen mit dem Ligationsansatz transformiert und zur Selektion von bakteriellen Einzelklonen bei 37°C über Nacht inkubiert.

Es wurde die Plasmid-DNA von insgesamt 10 Klonen isoliert, die zur Freisetzung der Insert-Fragmente einer Restriktionsanalyse mit *EcoRI* und anschließender Agarosegelelektrophorese unterzogen wurden. Vier rekombinante Plasmide, die die vermeintlich größten DNA-Inserts enthielten, wurden einer Sequenzierung mit den Standard-Oligonukleotiden „T3“ und „T7“ zugeführt. Zwei dieser Plasmide („RACE8“ und

„RACE9“) lieferten identische Sequenzinformation für den 5´-Bereich der mRNA des Gens und zeigten ebenfalls eine vollständige Übereinstimmung mit der genomischen Referenzsequenz des NCBI (Acc.-No.: AY600371) in diesem Bereich. Es zeigte sich ebenfalls eine Übereinstimmung mit der Sequenz des cDNA-Klons „L23320“ über einen Bereich von 124bp 5´ des Startcodons von *RFC1*.

Somit konnten in dieser Arbeit zusätzliche Sequenzdaten des 5´-Bereichs der mRNA von *RFC1* von 13bp im Vergleich zur Sequenz der cDNA „L23320“ generiert und eine Gesamtlänge der 5´-untranslatierten Region des Gens von 137bp ermittelt werden (Abbildung 3-6). Die Sequenzdaten wurde an die Datenbank „GENBANK“ übermittelt und stehen dort zur allgemeinen Nutzung zur Verfügung (Acc.-No.: AJ564999).

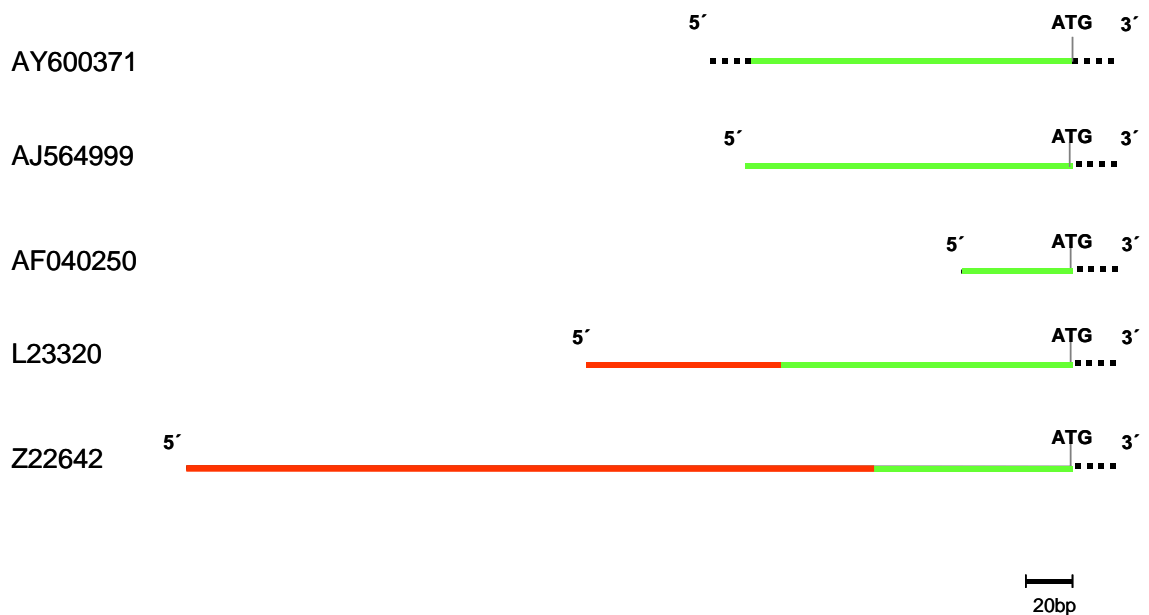


Abbildung 3-6: Schematische Darstellung der 5'-untranslatierten Region der mRNA von *RFC1*, die in der vorliegenden Arbeit mittels 5'-RACE determiniert wurde im Vergleich zu Sequenzen der NCBI-Datenbank. Dargestellt ist der 5'-untranslatierte Bereich der mRNA von *RFC1*, welcher in dieser Arbeit mittels 5'-RACE ermittelt wurde (AJ564999) im Vergleich zu drei cDNA-Sequenzen der NCBI-Datenbank des *RFC1*-Gens (AF040250, L23320, Z22642), sowie der genomischen Referenzsequenz für diesen Bereich (AY600371), bezüglich der Ausdehnung dieser Sequenzen stromaufwärts des Startcodons (ATG). Die Sequenzlängen der 5'-des Startcodons gelegenen Bereiche der cDNA-Sequenzen betragen 137bp (AJ564999), 45bp (AF040250), 206bp (L23320) und 396bp (Z22642). Grün eingefärbte Bereiche zeigen Regionen der Sequenzübereinstimmung, während rote Bereiche auf divergierende Sequenzabschnitte hinweisen, die in einer Datenbankabfrage keine Homologien zu anderen, mit *RFC1* verwandten Sequenzen zeigten. Die Existenz zusätzlicher Sequenzdaten in 5'- und 3'-Richtung des dargestellten Bereiches wird angedeutet (gepunktete Linie). Während die Sequenzen „AJ564999“ und „L23320“ über einen Bereich von 124bp stromaufwärts des Startcodons identisch sind, zeigt lediglich die in dieser Arbeit generierte Sequenz (AJ564999) eine zusätzliche Übereinstimmung von 13bp mit der genomischen Referenzsequenz der NCBI-Datenbank (AY600371) für diesen Bereich. Somit konnte eine Gesamtlänge von 137bp für die 5'-untranslatierte Region der mRNA von *RFC1* ermittelt werden.

3.4 Sequenzanalyse und Identifikation potentieller cis-regulatorischer Elemente in der proximalen genomischen 5´-Region von *RFC1*

Zur Identifizierung potentieller Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren im proximalen 5´-Bereich des *RFC1*-Gens wurde ein DNA-Fragment des in dieser Arbeit isolierten genomischen Subklons „*HindIII* 3.4“ einer Sequenzanalyse mit dem im Internet frei verfügbaren Analyseprogramm „AliBaba2“ unterzogen. Die untersuchte Sequenz des genomischen Subklons repräsentiert einen Bereich von 653bp stromaufwärts des in dieser Arbeit determinierten Transkriptionsstarts von *RFC1* und ist identisch mit der Referenzsequenz des NCBI für diese Region (Acc.-No: AY600371). Das Analyseprogramm basiert auf einem Algorithmus, bei dem die zu untersuchende Sequenz mit einer Vielzahl bekannter und teilweise experimentell verifizierter Transkriptionsfaktorbindungsstellen einer Datenbank (Transfac 4.0) verglichen wird. Bei dem Sequenzvergleich des Programms werden sowohl der Grad der Konservierung der Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors („Matrix conservation“), als auch der Übereinstimmung mit der zu untersuchenden Sequenz („Similarity of Sequence to Matrix“) berücksichtigt. Als Analyseparameter wurde hier der voreingestellte Wert für „Matrix conservation“ von 75% übernommen und der Wert für „Similarity of Sequence to Matrix“ auf 100% gesetzt, da nur potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen identifiziert werden sollten, die identisch mit der analysierten Sequenz sind. Mit Hilfe des Analyseprogrammes wurden in der proximalen 5´-Region von *RFC1* potentielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren „SP1“, „Oct-1“, „c-Jun“ und „NF-1“ identifiziert. Die Analyse des putativen Promotorbereichs mit den vorgenannten Parametern lieferte keine Hinweise auf das Vorhandensein eines sogenannten „TATA“-Box Elements in unmittelbarer Nähe des Transkriptionsstarts. In Abbildung 3-7 ist die Lokalisation der identifizierten, potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen im genomischen Bereich 653bp stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle von *RFC1* schematisch dargestellt.

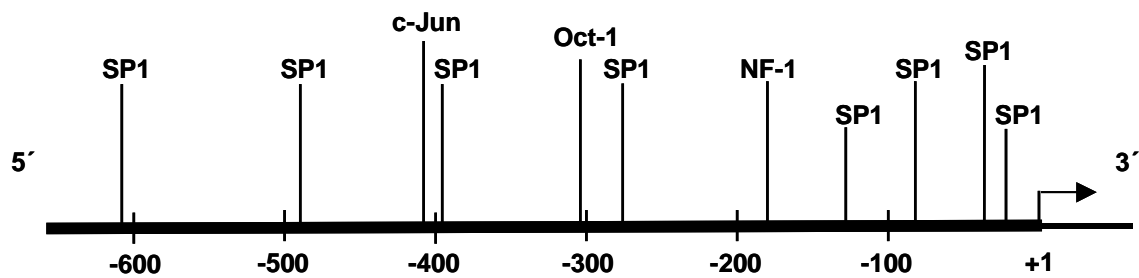


Abbildung 3-7: Schematische Darstellung der potentiellen Transkriptionsfaktorbindungsstellen in der proximalen genomischen 5'-Region von *RFC1*, die mit Hilfe des Algorithmus „AliBaba2“ identifiziert wurden. Durch die Analyse eines genomischen Bereiches, der sich über eine Region von 653bp stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle von *RFC1* erstreckt, mit dem Analyseprogramm „AliBaba2“, konnten im putativen Promotorbereich des Gens eine Reihe von potentiellen Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren auf DNA-Sequenzebene identifiziert werden. Mit den Analyseparametern des Programmes „Matrix conservation“ 75% und „Similarity of Sequence to Matrix“ 100% konnten sechs potentielle Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor „SP1“ (simian-virus 40 protein-1), und jeweils eine Erkennungssequenz für die Transkriptionsfaktoren „NF-1“ (nuclear factor-1), „Oct-1“ (octamer-binding protein-1) sowie „c-Jun“ (ju-nana) identifiziert werden. Die Positionierung der identifizierten Bindungsstellen, relativ zur Transkriptionsstartstelle von *RFC1* (+1, durch einen Pfeil gekennzeichnet), ist dargestellt. Mit den angegebenen Analyseparametern konnte kein „TATA“-Box Bindungsmotiv im untersuchten genomischen 5'-Bereich von *RFC1* identifiziert werden.

3.5 Untersuchungen zur Expression von *RFC1* und *mRFC1* in Abhängigkeit von BCR-ABL^{p210} in verschiedenen zellulären Systemen

Da für das BCR-ABL^{p210}-Onkogen sowohl ein Einfluß auf die zelluläre Proliferation als auch auf verschiedene DNA-Reparaturmechanismen beschrieben wurde und RFC1 als essentielle Untereinheit des heteropentameren RFC-Komplexes maßgeblich an DNA-Replikations- und Reparaturprozessen beteiligt ist, sollte die Expression von *RFC1*, sowie des murinen *mRFC1*, in An- bzw. Abwesenheit von BCR-ABL^{p210} in verschiedenen zellulären Systemen untersucht werden.

3.5.1 Proteinexpression von *mRFC1* in murinen hämatopoetischen Zelllinien

Zur Untersuchung der Proteinexpression der großen Untereinheit des RFC in murinen hämatopoetischen Zelllinien wurde die parentale murine Stammzelllinie 32D, sowie eine Zelllinie, die mit dem humanen BCR-ABL^{p210}-Onkogen transfiziert wurde, verwendet. Beide Zelllinien wurden von der Arbeitsgruppe von Dr. Tomasz Skorski (Philadelphia, USA) zur Verfügung gestellt.

Proteinextrakte der Zellen wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Ein spezifischer Nachweis von *mRFC* erfolgte mittels Immundetektion. Wie in Abbildung 3-8 zu sehen ist, konnte eine etwa 2-3fach gesteigerte Proteinexpression von *mRFC1* in Zellen nachgewiesen werden, welche das BCR-ABL^{p210}-Fusionsprotein exprimieren.

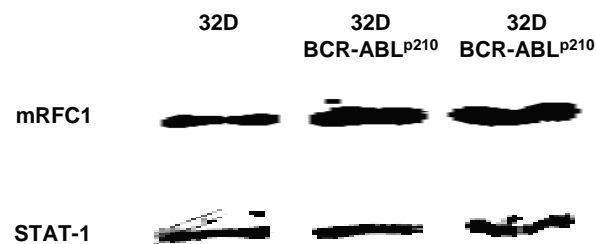


Abbildung 3-8: Analyse der Proteinexpression von mRFC1 in murinen, hämatopoetischen Zelllinien mittels Western-Blot. Jeweils 50µg angereicherter Kern-proteinextrakte der Zelllinien 32D und 32D BCR-ABL^{p210} wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Nachweis von mRFC1 erfolgte durch Immundetektion mit einem spezifischen anti-mRFC1 Antiserum. Es konnte eine etwa 2-3fach erhöhte Expression von mRFC1 in (zweifach aufgetragenen) Proteinextrakten der Zelllinie 32D BCR-ABL^{p210} detektiert werden. Eine Beladungskontrolle erfolgte durch die Hybridisierung der Membran mit einem spezifischen anti-STAT1(Signal-transducer and activator of transcription-1) Antikörper.

3.5.2 Proteinexpression von RFC1 in humanen hämatopoetischen Zelllinien

Der Hinweis auf eine deregulierte Proteinexpression der großen Untereinheit des murinen Replikationsfaktors C in Zellen, die mit dem Onkogen BCR-ABL^{p210} transfiziert sind, führte zu der Frage, ob dieses Phänomen ebenfalls in humanen Zellen zu beobachten ist. Hierzu wurden humane hämatopoetische Zelllinien, die von der Arbeitsgruppe Dr. Justus Duyster (München) zur Verfügung gestellt wurden, untersucht. Die Zelllinie Mo7e BCR-ABL^{p210} wurde durch Transfektion der parentalen Zelllinie Mo7e mit dem BCR-ABL^{p210}-Onkogen in der oben genannten Arbeitsgruppe hergestellt. Proteinextrakte der beiden Zelllinien wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembranen transferiert und die Expression von c-ABL, BCR-ABL^{p210} und RFC1 durch Immundetektion nachgewiesen. Es zeigte sich, wie im murinen Zellsystem, eine etwa 2-3fach erhöhte Expression des RFC1-Proteins in Zellen, die ebenfalls das BCR-ABL^{p210} Fusionsprotein exprimieren (Abbildung 3-9).

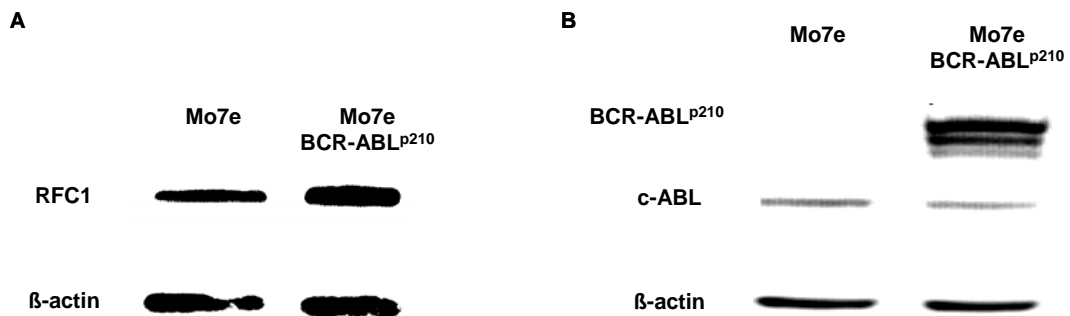


Abbildung 3-9: Analyse der Proteinexpression von RFC1 in humanen, hämatopoetischen Zelllinien mittels Western-Blot. Jeweils 50 μ g Gesamtzellextrakte der Zelllinien Mo7e und Mo7e BCR-ABL^{p210} wurden elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen transferiert. (A): Die Immundetektion von RFC1 erfolgte mittels spezifischem anti-RFC1 Antiserum. Eine etwa 2-3fach erhöhte Expression von RFC1 konnte in Proteinextrakten der Zelllinie Mo7e BCR-ABL^{p210} nachgewiesen werden. Die Beladungskontrolle wurde durch Hybridisierung der Membran mit einem anti- β -actin Antikörper durchgeführt. (B): Die Expression des BCR-ABL^{p210} Fusionsproteins in der Zelllinie Mo7e BCR-ABL^{p210} wurde durch Immundetektion mit einem spezifischem anti-c-ABL Antikörper nachgewiesen. Dies ermöglichte sowohl eine Detektion des endogenen c-ABL Proteins beider Zelllinien, als auch des BCR-ABL^{p210} Fusionsproteins in der Zelllinie Mo7e BCR-ABL^{p210}. Eine gleichmäßige Beladung wurde durch Hybridisierung der Membran mit einem anti- β -actin Antikörper nachgewiesen.

3.5.3 Proteinexpression von RFC1 in primären humanen, hämatopoetischen Vorläuferzellen (Progenitorzellen)

Da es sich bei der Chronisch myeloischen Leukämie (CML) um eine Erkrankung handelt, die ihren Ursprung in den Stamm- und Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems hat, stellte sich die Frage, ob die in murinen und humanen Zelllinien beobachtete Überexpression von RFC1 in Anwesenheit von BCR-ABL^{p210} auch in primären hämatopoetischen Stammzellen von Patienten nachzuweisen ist, welche an einer CML erkrankt sind. Zu diesem Zweck wurden humane Stammzellpräparate, die keiner weiteren Verwendung mehr dienten, durch das Stammzell-Labor der Universitätsklinik Mainz zur Verfügung gestellt. Die Präparate stammten sowohl von Patienten, die an einer BCR-ABL^{p210}-positiven CML erkrankt waren, als auch von

Personen, deren Erkrankung in keinem Zusammenhang zu einer Expression des BCR-ABL^{p210}-Onkogens stand. Durch eine vorherige Aufbereitung der Zellpräparate durch das Stammzell-Labor enthielten diese einen Anteil von über 90% Zellen, die den hämatopoetischen Stammzellmarker „CD34“ auf ihrer Oberfläche präsentierten. Das Oberflächenmolekül „CD34“ (CD=*cluster of differentiation*) wird neben einigen anderen membranständigen Proteinen exklusiv von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen exprimiert und somit repräsentierten die hier untersuchten zellulären Präparate fast ausschließlich hämatopoetische Progenitorzellen. Proteinextrakte der Zellen wurden elektrophoretisch aufgetrennt, mittels Western-Blot auf Nitrocellulose-Membranen transferiert und schließlich RFC1 spezifisch immundetektiert. Abbildung 3-10 zeigt eine erhöhte Proteinexpression von RFC1 in primären hämatopoetischen, CD34-positiven Progenitorzellen von Patienten, die an einer CML erkrankt sind im Vergleich zu Personen, deren Vorläuferzellen keine Expression des BCR-ABL^{p210} Onkogens aufweisen. Die Assoziation einer deregulierten Expression von RFC1 mit der Expression des BCR-ABL^{p210} Fusionsproteins, die in den hier untersuchten murinen und humanen Zelllinien beobachtet wurde, läßt sich demnach auch in primären, hämatopoetischen, CD34-positiven Vorläuferzellen von Patienten nachweisen, die an einer BCR-ABL^{p210}-positiven CML erkrankt sind.

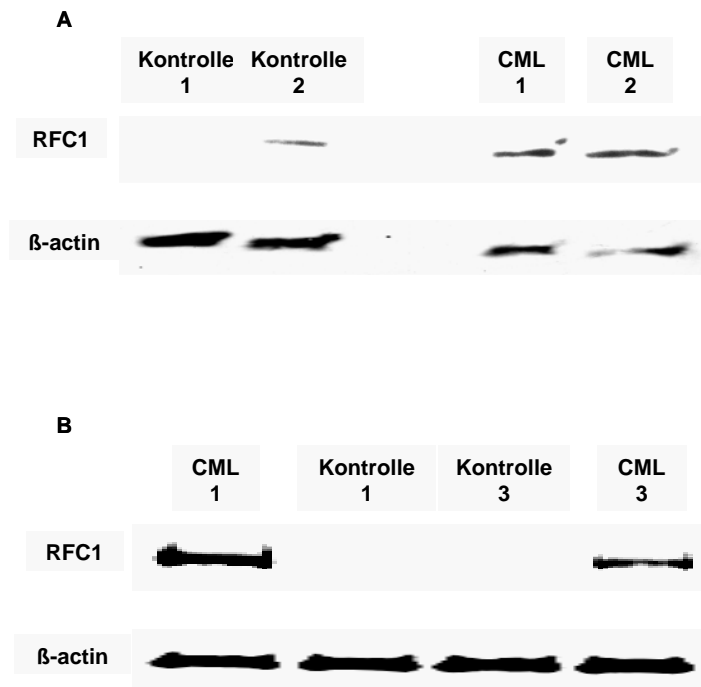


Abbildung 3-10: Detektion der Proteinexpression von RFC1 in humanen, hämatopoetischen CD34-positiven Progenitorzellen mittels Western-Blot. In zwei unabhängigen Experimenten wurden angereicherte Kernproteinextrakte (A: 15µg; B: 50µg) humaner, hämatopoetischer Vorläuferzellen von Patienten, die an einer chronisch myeloischen Leukämie (CML) erkrankt waren (CML 1-3), sowie von Patienten, deren Erkrankung nicht in Zusammenhang mit einer Expression von BCR-ABL^{p210} steht (Kontrolle 1-3) elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen transferiert. Die spezifische Immundetektion von RFC1 erfolgte jeweils durch ein anti-RFC1 Antiserum. In beiden Versuchen konnte eine erhöhte Expression von RFC1 in Proteinextrakten hamatopoetischer, CD34-positiven Progenitorzellen von CML-Patienten nachwiesen werden (A: CML 1 und 2; B: CML 1 und 3). Im Vergleich dazu war in Probenmaterial von Patienten, deren Erkrankung nicht ursächlich mit einer Expression von BCR-ABL^{p210} in Zusammenhang steht, RFC1 nur schwach oder gar nicht nachweisbar (A: Kontrolle 1 und 2; B: Kontrolle 1 und 3). Eine Hybridisierung der Membranen mit anti-β-actin Antikörper diente der Beladungskontrolle.

3.5.4 Analyse zu Auswirkungen einer Blockade der Kinase-Aktivität von BCR-ABL^{p210} auf die Proteinexpression von RFC1

Die starke Abhängigkeit BCR-ABL^{p210}-transformierter Zellen von einer dauerhaften Kinaseaktivität des Onkogens in Bezug auf ein Überleben der Zellen, sowie deren Wachstumsfaktor-unabhängigen Proliferation macht sie gleichzeitig äußerst empfindlich gegenüber einer Blockade der BCR-ABL^{p210}-Kinase durch spezifische Inhibitoren. Eine solche Substanz, die spezifisch an die ATP-Bindungsdomäne von BCR-ABL^{p210}, c-ABL und strukturverwandter Rezeptortyrosinkinasen wie PDGFR (Platetet-derived growth factor receptor) und c-KIT (Stammzellefaktor-Rezeptor) bindet, stellt die Substanz „STI-571“ (Signal-transduction Inhibitor-571) dar. „STI-571“ (alternative Bezeichnungen: Imatinib bzw. Imatinib mesylat) blockiert die ATP-Bindungsdomäne der oben genannten Kinasen und führt hierdurch zu einem Verlust der Kinaseaktivität, was in BCR-ABL^{p210}-transformierten Zellen aufgrund des plötzlichen Ausbleibens von autonomen proliferativen und anti-apoptischen Signalen zum Zelltod durch Apoptose führt (Druker et al., 1996; Gambacorti-Passerini et al., 1997). Um zu prüfen, ob die deregulierte Proteinexpression von RFC1 in BCR-ABL^{p210}-transformierten Zellen spezifisch durch die Kinaseaktivität des Onkogens vermittelt wird, wurde die Zelllinie Mo7e BCR-ABL^{p210} mit „STI-571“ behandelt. Da „STI-571“ in BCR-ABL^{p210}-positiven Zellen zum Zelltod durch Apoptose führt und RFC1 im Verlauf der Apoptose durch aktivierte Caspase-3 proteolytisch gespalten wird, war es das Ziel der Versuche, innerhalb der gewählten Inkubationszeiten der Zellen mit dem Inhibitor eine Blockade der BCR-ABL^{p210}-Kinase zu erreichen, gleichzeitig jedoch eine Aktivierung von Caspasen zu verhindern. Die optimalen Versuchsparameter zur Erfüllung dieser Kriterien wurden durch Variation sowohl der Inkubationszeiten, wie auch der eingesetzten Konzentrationen des Inhibitors empirisch ermittelt. Um eine proteolytische Spaltung von RFC1 durch aktivierte Caspasen auszuschließen, wurden Zellen in den Versuchreihen zusätzlich in einem Parallelansatz gleichzeitig mit „STI-571“ und mit dem Caspasen-Inhibitor „z-VAD-FMK“ inkubiert. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen wurde jeweils nach Abschluß der Behandlung der Zellen durchflußzytometrisch bestimmt und bewegte sich bei den dargestellten Versuchen innerhalb einer Toleranzgrenze von +/- 5% (Daten wurden nicht gezeigt). In den dargestellten Versuchreihen wurde die Zelllinie Mo7e BCR-ABL^{p210} mit 0,5µM bzw. 0,1µM „STI-571“ für 12h bzw. 22h, sowie jeweils ein

Parallelansatz in Anwesenheit des Caspasen-Inhibitors „z-VAD-FMK“ (100µM) inkubiert. Nach Abschluß der Inkubation wurden Proteinextrakte der Zellen mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran transferiert und RFC1 spezifisch mittels Immundetektion nachgewiesen. In Abbildung 3-11 sind die Auswirkungen der Inkubation der Zelllinie Mo7e BCR-ABL^{p210} mit „STI-571“ auf die Proteinexpression von RFC1 dargestellt. Eine Blockade der BCR-ABL^{p210}-Kinase führt in beiden Versuchsreihen zu einer reduzierten Expression von RFC1. Dieses Ergebnis läßt sich ebenfalls in Proteinextrakten der Zellen nachweisen, die sowohl mit „STI-571“, als auch mit dem Caspasen-Inhibitor „z-VAD-FMK“ behandelt wurden.

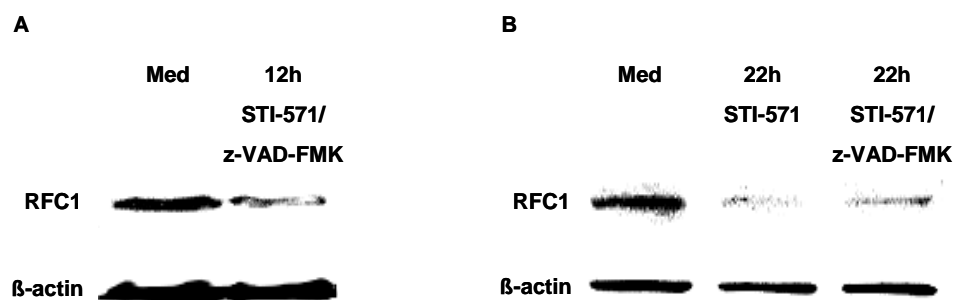


Abbildung 3-11: Analyse der Proteinexpression von RFC1 in der Zelllinie Mo7e BCR-ABL^{p210} mittels Western-Blot nach Inhibition der BCR-ABL^{p210}-Kinase. Die Zellen wurden jeweils 24h vor Beginn des Versuches subkonfluent (50-70%) ausgesät. Die Inhibition der Kinaseaktivität von BCR-ABL^{p210} erfolgte durch Inkubation der Zellen mit 0,5µM „STI-571“ für 12h (A) bzw. 0,1µM „STI-571“ für 22h (B). Eine gleichzeitige Inkubation der Zellen mit „z-VAD-FMK“ (100µM) diente der Inhibition von Caspasen. Als Negativkontrolle wurde jeweils ein Parallelansatz un behandelter Zellen für 12h bzw. 22h inkubiert („Med“). Nach Abschluß der Inkubation wurden jeweils 100µg (A) bzw. 50µg (B) Gesamtzellysat der Zellen mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen transferiert. Die Detektion von RFC1 erfolgte durch Hybridisierung der Membranen mit spezifischem anti-RFC1 Antiserum. Die Hybridisierung der Membranen mit anti-β-actin Antikörper diente jeweils der Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung. Die Inkubation der Zellen mit „STI-571“ führte in beiden Versuchsreihen zu einer Reduktion von RFC1 (A und B).

3.5.5 Analyse der mRNA-Expression von *RFC1* und *mRFC1* in humanen und murinen, hämatopoetischen Zelllinien

Die Regulation der Transkription nimmt bei der Expression von Genen eine zentrale Rolle ein, da dies die erste Ebene der Expressionskontrolle darstellt. Die Tatsache, daß bereits ein Einfluß von BCR-ABL^{p210} auf die Transkriptionsregulation einer Reihe von Genen bekannt ist, warf die Frage auf, ob die deregulierte Proteinexpression von RFC1 in Zellen, die eine Expression von BCR-ABL^{p210} aufweisen, auf eine gesteigerte Transkription zurückzuführen ist.

Aus diesem Grund wurde die mRNA-Expression von *RFC1* bzw. *mRFC1* in den humanen und murinen Zelllinien überprüft, für die bereits eine Analyse der Proteinexpression der großen Untereinheit des Replikationsfaktors durchgeführt wurde.

3.5.5.1 Nachweis der mRNA-Expression von *RFC1* durch semiquantitative PCR in humanen, hämatopoetischen Zelllinien

Zur Analyse der mRNA-Expression von *RFC1* in der parentalen Zelllinie Mo7e, sowie der Mo7e BCR-ABL^{p210}-Zelllinie wurde aus 5µg RNA beider Zelllinien cDNA synthetisiert und diese zur Amplifikation eines Fragments von RFC1 mit den genspezifischen Oligonukleotiden „hRFCPr.6f“ und „hRFCPr.6r“ mittels PCR eingesetzt. In Abbildung 3-12 ist das Ergebnis einer PCR mit limitierter Zyklenzahl (28 Zyklen) dargestellt. Diese Untersuchung zeigte keine signifikanten Unterschiede bezüglich der mRNA-Expression der großen Untereinheit von RFC zwischen der Zelllinie Mo7e und der transformierten Zelllinie Mo7e BCR-ABL^{p210}. Aus diesem Ergebnis läßt sich schließen, daß die deregulierte Proteinexpression von RFC1 in der Zelllinie Mo7e BCR-ABL^{p210} nicht auf eine gesteigerte Transkription zurückzuführen ist.

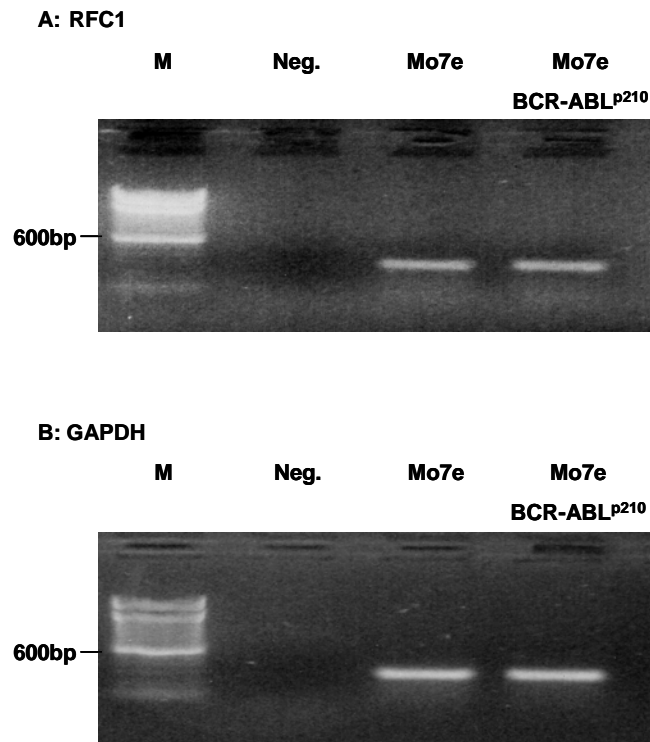


Abbildung 3-12: Analyse der mRNA-Expression von *RFC1* in humanen Zelllinien durch semiquantitative PCR. Aus je 5µg RNA der Zelllinien Mo7e und Mo7e BCR-ABL^{p210} wurde cDNA synthetisiert und jeweils 1µl der cDNA zur Amplifikation eines Fragments der *RFC1* mRNA mit den genspezifischen Oligonukleotiden „hRFCPr.6f“ und „hRFCPr.6r“ mit 28 PCR-Zyklen eingesetzt (A). Ein Parallelansatz zur Amplifikation eines Fragments der mRNA des *GAPDH*-(Glycerinaldehyd-3-phosphat dehydrogenase) Gens mit den Oligonukleotiden „GAPDH/f“ und „GAPDH/r“ diente zur Kontrolle der Verwendung vergleichbarer cDNA-Mengen (B). Je 10µl der PCR-Reaktionen wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Ein PCR-Ansatz ohne cDNA diente jeweils als Negativkontrolle (Neg.) und ein 100bp DNA-Marker (Invitrogen) wurde zur Größenkontrolle mitgeführt (M). Es konnte keine signifikant erhöhte mRNA-Expression von *RFC1* in der Zelllinie Mo7e BCR-ABL^{p210} im Vergleich zur parentalen Zelllinie Mo7e detektiert werden (A).

3.5.5.2 Analyse der mRNA-Expression von *mRFC1* in murinen, hämatopoetischen Zelllinien mittels semiquantitativer PCR und Northern-Hybridisierung

In der murinen Zelllinie 32D, die durch das BCR-ABL^{p210} Onkogen transformiert wurde, ließ sich, wie bereits für RFC1 im humanen Zellsystem gezeigt, eine erhöhte Proteinexpression von mRFC1 in Abhängigkeit von einer Expression des BCR-ABL^{p210} Fusionsproteins nachweisen. Es sollte überprüft werden, ob diese Veränderung der Proteinexpression durch eine Steigerung der mRNA-Expression von *mRFC1* hervorgerufen wird. Zur Untersuchung der mRNA-Expression von *mRFC1* durch semiquantitative PCR wurde aus 2µg Gesamt-RNA der Zelllinien 32D und 32D BCR-ABL^{p210} cDNA synthetisiert und zur Amplifikation mit den genspezifischen Primern „mRFCPr.2f“ und „mRFCPr.2r“ eingesetzt. In Abbildung 3-13A ist das Ergebnis einer semiquantitativen PCR mit diesen Oligonukleotiden dargestellt. Zur Analyse der Expression von *mRFC1* auf RNA-Ebene mittels Northern-Blot wurden je 5µg angereicherter polyA⁺ RNA der zwei Zelllinien 32D und 32D BCR-ABL^{p210} in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Zur Hybridisierungsanalyse wurde ein radioaktiv markiertes PCR-Amplifikat der spezifischen Oligonukleotide „mRFCPr.1f“ und „mRFCPr.1r“ eingesetzt. In Abbildung 3-13C ist das Ergebnis der Hybridisierungsanalyse dargestellt. Aus dem Ergebnis beider vergleichenden Untersuchungen zur mRNA-Expression von *mRFC1* in den Zelllinien 32D und 32D BCR-ABL^{p210} ist ersichtlich, daß sich auch im murinen Zellsystem kein eindeutiger Hinweis auf eine transkriptionelle Regulation von *mRFC1* in Abhängigkeit einer Expression von BCR-ABL^{p210} findet.

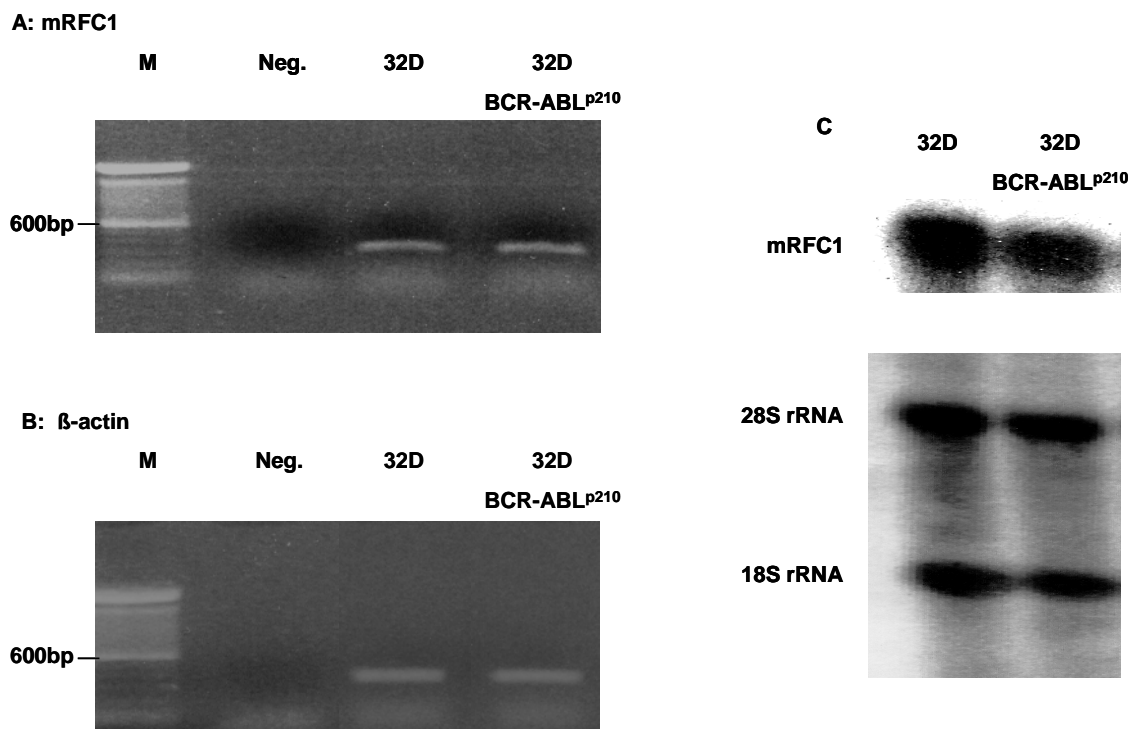


Abbildung 3-13: Analyse der mRNA-Expression von *mRFC1* mittels semiquantitativer PCR und Northern-Blot. Aus je 2µg RNA der Zelllinien 32D und 32D BCR-ABL^{p210} wurde cDNA synthetisiert und jeweils 1µl der cDNA zur PCR-Amplifikation eines *mRFC1*-Fragments mit den genspezifischen Primern „*mRFCPr.2f*“ und „*mRFCPr.2r*“ eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit 25 PCR-Zyklen (A). Ein Parallellansatz zur Amplifikation eines Fragments der mRNA des murinen *β-actin* Gens mit den Oligonukleotiden „*actin/f*“ und „*actin/r*“ diente zur Kontrolle der Verwendung vergleichbarer cDNA-Mengen. Die Amplifikation erfolgte mit 22 PCR-Zyklen (B). Je 10µl der PCR-Reaktionen wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Ein PCR-Ansatz ohne cDNA diente jeweils als Negativkontrolle („Neg.“) und ein 100bp DNA-Marker (Invitrogen) wurde zur Größenkontrolle mitgeführt („M“). Es konnte keine signifikant erhöhte Expression der mRNA von *mRFC1* in der Zelllinie 32D BCR-ABL^{p210} im Vergleich zur parentalen Zelllinie 32D detektiert werden (A).

(C): Zur Analyse der mRNA-Expression mittels Northern-Blot wurden jeweils 5µg angereicherter polyA⁺ RNA der Zelllinien 32D und 32D BCR-ABL^{p210} mittels denaturierender Formaldehyd-Gelelektrophorese elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Detektion der mRNA von *mRFC1* erfolgte durch Hybridisierungsanalyse mit einem radioaktiv markierten PCR-Amplifikat der Oligonukleotide „*mRFCPr.1f*“ und „*mRFCPr.1r*“. Eine Kontrolle des Transfers, sowie vergleichbarer RNA-Mengen auf der Membran wurde durch Färbung der Membran mit Methyleneblau-Färbelösung vorgenommen und zeigte in beiden Proben eine gleichmäßige Anfärbung der aufgetrennten und transferierten RNA-Fragmente. Eine verstärkte Anfärbung von in den Proben vorhandener Reste ribosomaler RNA (18S- und 28S rRNA) ist zu sehen (C, unterer Teil). Die Hybridisierung zeigte keine erhöhte mRNA-Expression von *mRFC1* der Zelllinie 32D BCR-ABL^{p210} im Vergleich zur parentalen Zelllinie 32D (C, oberer Teil).

3.5.6 Untersuchungen zur Proteinstabilität von RFC1 in humanen, hämatopoetischen Zelllinien

Da bisher keine Erkenntnisse bezüglich der Proteinstabilität von RFC1 vorliegen und die gesteigerte Proteinexpression der großen Untereinheit des Replikationsfaktors in BCR-ABL^{p210}-positiven Zellen offensichtlich nicht auf eine transkriptionelle Regulation zurückzuführen ist, sollte dessen Stabilität auf Proteinebene untersucht werden. Hierzu wurden parentale, und durch BCR-ABL^{p210}-transformierte Mo7e-Zellen mit Cycloheximid, einem Antibiotikum, welches die Translation eukaryontischer Zellen inhibiert (Obrig, T.G. et.al.), behandelt. Zu festgesetzten Zeitpunkten nach Inkubation mit Cycloheximid wurden Proteinextrakte der Zellen hergestellt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen transferiert. Der spezifische Nachweis von RFC1 erfolgte durch eine anschließende Immundetektion. Da sich das Tumorsuppressor-Protein p53 durch eine geringe Stabilität und damit kurze Halbwertszeit auszeichnet, diene dessen Nachweis der Kontrolle der Translationsblockade durch Cycloheximid. Um auszuschließen, daß quantitative Veränderungen des RFC1 Proteins auf eine proteolytische Spaltung durch aktivierte Caspasen und eine damit einhergehende Apoptose zurückzuführen sind, wurden Teile der Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten einer durchflußzytometrischen Zellzyklusmessung zur Determinierung der apoptotischen Zellfraktion zugeführt. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen bewegte sich bei den dargestellten Versuchen innerhalb einer Toleranzgrenze von +/- 5% (Daten wurden nicht gezeigt).

Wie in Abbildung 3-14 dargestellt, führt eine Blockade der Translation durch Cycloheximid in der parentalen Zelllinie Mo7e zur kontinuierlichen Abnahme sowohl von p53 innerhalb der ersten Stunden, als auch von RFC1 nach einer Inkubationszeit mit Cycloheximid von 4-8h, so daß schließlich das p53-, wie auch RFC1-Protein nach einer dauerhaften Blockade der zellulären Translation von 8h kaum mehr nachweisbar sind. Dieses Ergebnis ließ sich in unabhängigen Versuchsreihen mit unterschiedlichen Cycloheximid-Konzentrationen reproduzieren (Abbildung 3-14A und B).

Eine Blockade der Translation der Zelllinie Mo7e BCR-ABL^{p210} durch Inkubation der Zellen mit unterschiedlichen Cycloheximid-Konzentrationen führte ebenfalls zur Reduktion von p53 innerhalb der ersten Stunden, während sich jedoch, im Gegensatz zu den Ergebnissen der parentalen Zelllinie Mo7e, keine signifikante quantitative

Veränderung von RFC1 innerhalb von 8h nachweisen ließ (Abbildung 3-15A und B). Darüber hinaus führte selbst eine Inkubation der Zellen mit Cycloheximid über 24h nicht zu einer nachweisbaren Reduktion von RFC1 (Abbildung 3-15C). Aufgrund dieser Ergebnisse läßt sich postulieren, daß als eine mögliche Ursache der veränderten Expression von RFC1 in BCR-ABL^{p210}-positiven Zellen eine gesteigerte Proteinstabilität der großen Untereinheit des Replikationsfaktors in Frage kommt.

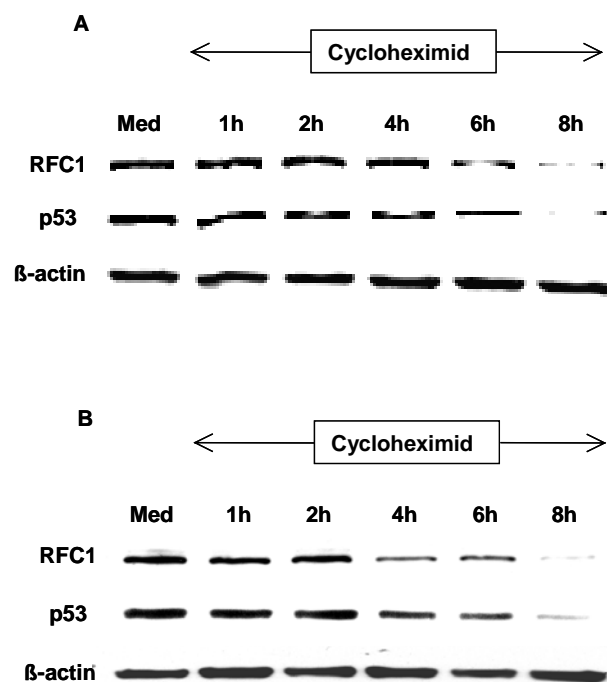


Abbildung 3-14: Analyse der Proteinstabilität von RFC1 mittels Western-Blot in der Zelllinie Mo7e nach Inhibition der Translation. Die Zellen wurden 24h vor Beginn der Inkubation mit Cycloheximid subkonfluent (50-70%) ausgesät. Die Behandlung der Zellen erfolgte für 1-8h mit unterschiedlichen Cycloheximid-Konzentrationen (A: 30µg/ml; B: 40µg/ml). Als Negativkontrolle diente ein Parallelansatz der für 8h ohne Cycloheximid-Zugabe inkubiert wurde („Med“). Nach Abschluß der Inkubation wurde jeweils 50µg Gesamtzellysat der Zellen mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen transferiert. Die Detektion von RFC1 und p53 erfolgte durch Hybridisierung der Membranen mit spezifischem anti-RFC1 Antiserum bzw. anti-p53 Antikörper. Die Beladungskontrolle wurde mittels Hybridisierung mit anti-β-actin Antikörper durchgeführt. Eine Reduktion von RFC1-Protein konnte innerhalb von 4-8h nachgewiesen werden (A und B).

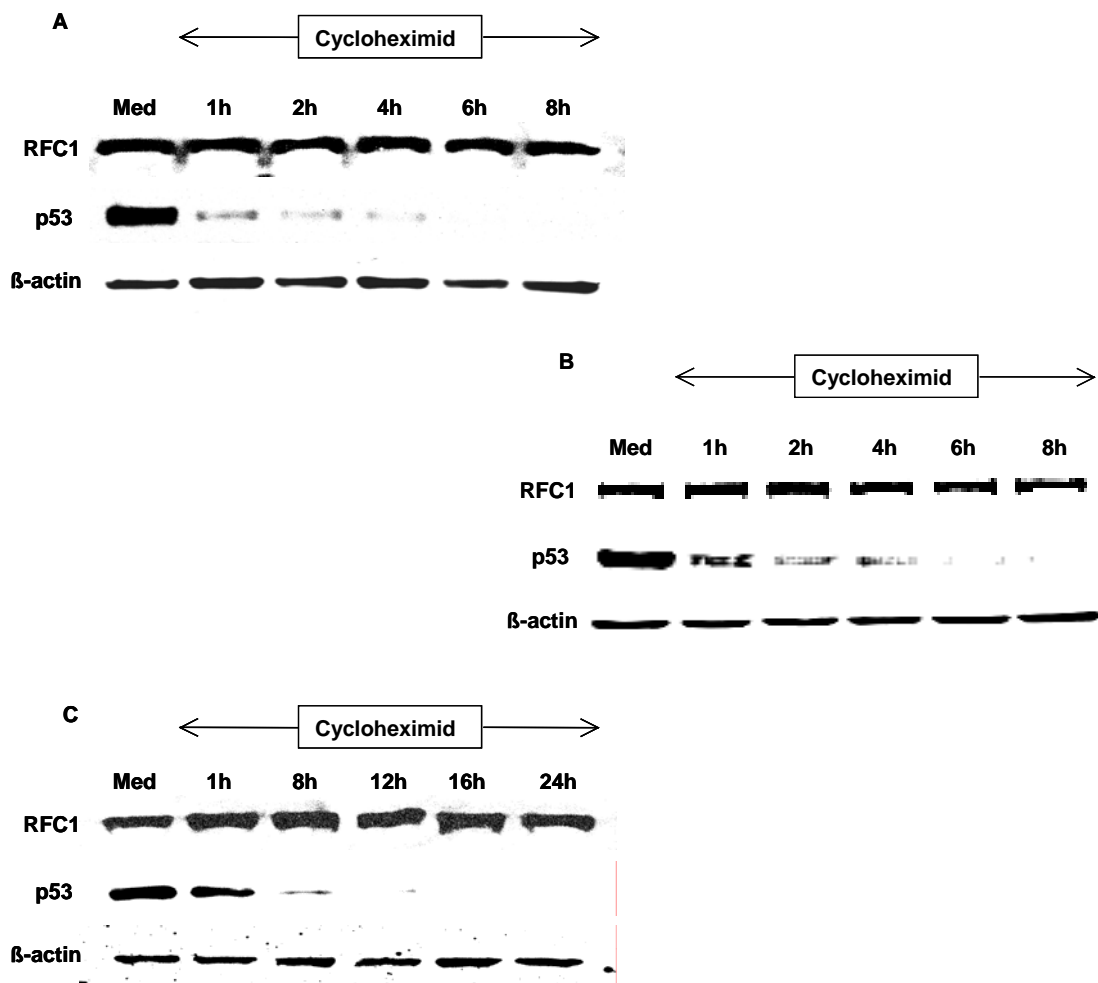


Abbildung 3-15: Analyse der Proteinstabilität von RFC1 mittels Western-Blot in der Zelllinie Mo7e BCR-ABL^{p210} nach Inhibition der Translation. Die Zellen wurden 24h vor Beginn der Inkubation mit Cycloheximid subkonfluent (50-70%) ausgesät. Die Behandlung der Zellen erfolgte für 1-8h bzw. 1-24h mit unterschiedlichen Cycloheximid-Konzentrationen (A und C: 30µg/ml; B: 40µg/ml). Als Negativkontrolle diente jeweils ein Parallelansatz der für 8h bzw. 24h ohne Cycloheximid-Zugabe inkubiert wurde („Med“). Nach Abschluß der Inkubation wurden jeweils 50µg (A und B) bzw. 100µg (C) Gesamtzelllysate der Ansätze mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen transferiert. Die Detektion von RFC1 und p53 erfolgte durch Hybridisierung der Membranen mit spezifischem anti-RFC1 Antiserum bzw. anti-p53 Antikörper. Die Beladungskontrolle wurde mittels Hybridisierung mit anti-β-actin Antikörper durchgeführt. Innerhalb der Inkubationszeiträume der Zellen mit Cycloheximid von 8h (A und B) bzw. 24h (C) konnte in der Zelllinie Mo7e BCR-ABL^{p210} keine signifikante Reduktion des RFC1-Proteins detektiert werden.

3.6 Analyse der Sensitivität der humanen, hämatopoetischen Zelllinien Mo7e und Mo7e BCR-ABL^{p210} gegenüber Zytostatika und UV-Bestrahlung

Obwohl die Mehrzahl klinischer Beobachtungen, wie auch *in vitro* durchgeführter Untersuchungen zu belegen scheint, daß eine Expression des BCR-ABL^{p210}-Onkogens zu einer verminderten zellulären Sensitivität gegenüber zytotoxischen Stimuli, wie beispielsweise einer Behandlung durch Zytostatika oder ultravioletter (UV) Strahlung führt, wurde jedoch in einigen Untersuchungen eine erhöhte Sensitivität von BCR-ABL^{p210}-positiven Zellen gegenüber zytotoxischen Einflüssen demonstriert. Bislang ist noch nicht vollständig aufgeklärt, wie diese unterschiedlichen Eigenschaften von BCR-ABL^{p210}-transformierten Zellen in Bezug auf zellschädigende Einflüsse erklärt werden können. Die in dieser Arbeit verwendete humane hämatopoetische Zelllinie Mo7e BCR-ABL^{p210} zeigte im Vergleich zur parentalen Zelllinie Mo7e eine posttranslational gesteigerte Proteinexpression von RFC1 und die Sensitivität der beiden Zelllinien gegenüber UV-Bestrahlung und einer Behandlung mit verschiedenen Zytostatika sollte getestet werden. Zur Analyse der Sensitivität gegenüber UV-Bestrahlung wurden die Zellen mit unterschiedlichen Energien (10-50mJ) bestrahlt und der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen 8h nach UV-Bestrahlung durchflußzytometrisch bestimmt. Zur Untersuchung der Sensitivität der Zellen gegenüber einer Zytostatika-Behandlung wurden diese mit Etoposid (25µM) bzw. Doxorubicin (0,25µM) für 24h inkubiert. Nach Abschluß der Inkubation wurde auch hier der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen mittels Durchflußzytometrie bestimmt.

In den Abbildungen 3-16 und 3-17 sind die Ergebnisse der UV-Bestrahlung bzw. Zytostatika-Behandlung der Zellen quantitativ dargestellt und es zeigte sich ein heterogenes Bild. Eine UV-Bestrahlung der Zellen führte in der Zelllinie Mo7e zu einer dosisabhängigen Steigerung des Anteils apoptotischer Zellen, während sich die BCR-ABL^{p210}-transformierte Zelllinie im Vergleich dazu als relativ resistent gegenüber ultravioletter Bestrahlung in diesem Energiebereich zeigte (Abbildung 3-16). Ein gegenteiliges Ergebnis ergab sich nach Inkubation der beiden Zelllinien mit Etoposid bzw. Doxorubicin. Nach Zytostatika-Behandlung für 24h zeigte die Zelllinie Mo7e BCR-ABL^{p210} einen deutlich erhöhten Anteil apoptotischer Zellen im Vergleich zur parentalen Zelllinie Mo7e (Abbildung 3-17).

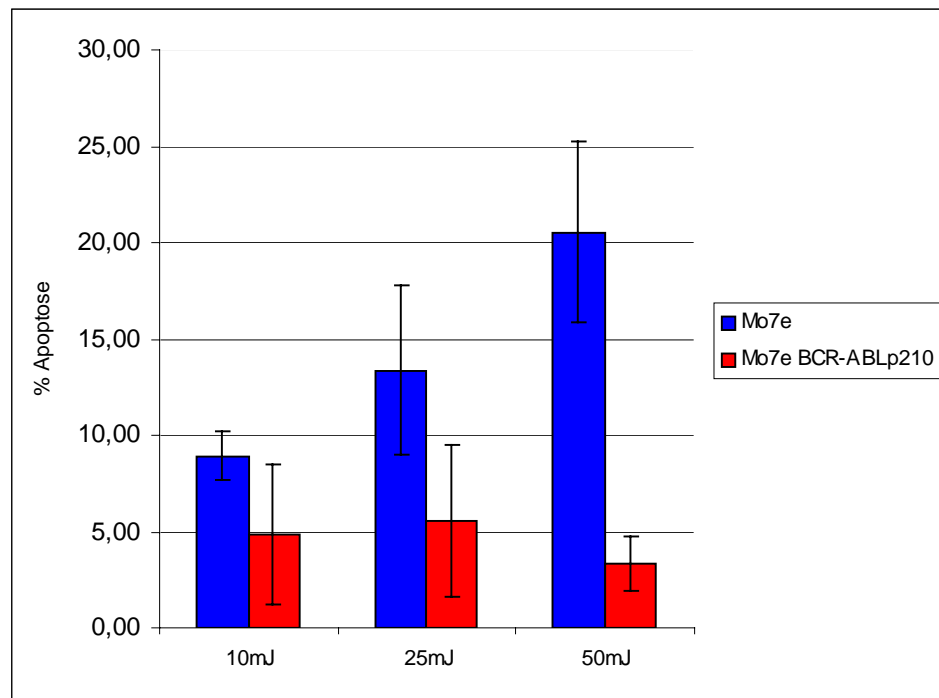


Abbildung 3-16: Untersuchung der Apoptose der humanen Zelllinien Mo7e und Mo7e BCR-ABL^{p210} mittels Durchflußzytometrie nach UV-Bestrahlung. Jeweils 5×10^4 Zellen wurden 24h vor UV-Bestrahlung ausgesät und die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit verschiedenen Energien (10-50mJ). Eine durchflußzytometrische Messung des prozentualen Anteils der apoptotischen Zellfraktion erfolgte 8h nach UV-Bestrahlung. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Experimenten mit den Zelllinien Mo7e und Mo7e BCR-ABL^{p210}. Während die Zelllinie Mo7e eine dosisabhängige Steigerung der apoptotischen Zellfraktion zeigte, konnte für die Zelllinie Mo7e BCR-ABL^{p210} im Vergleich dazu keine signifikante Steigerung des prozentualen Anteils apoptotischer Zellen im gewählten Energiebereich nachgewiesen werden.

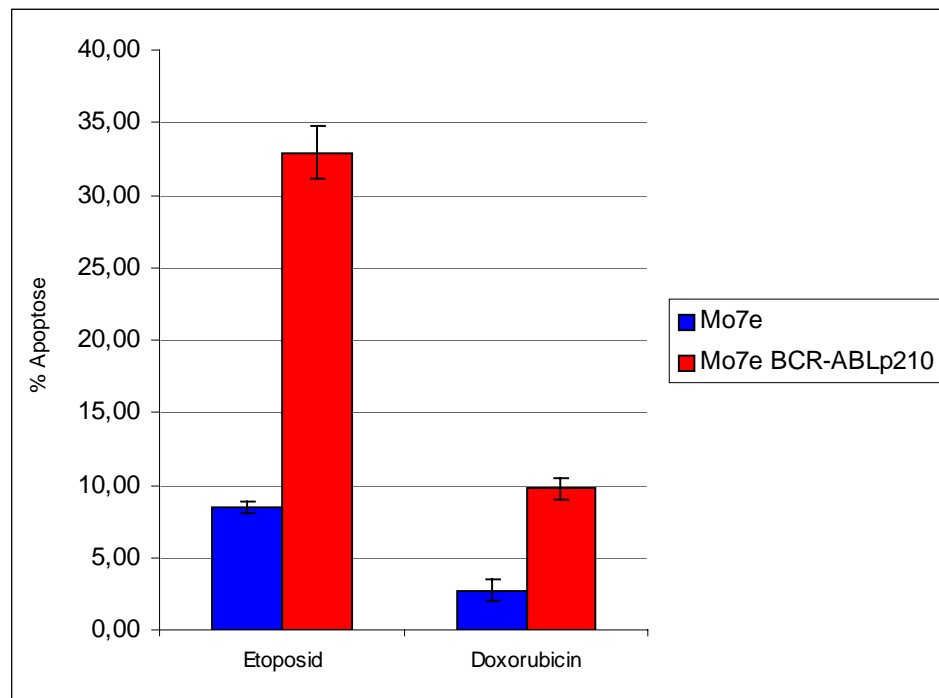


Abbildung 3-17: Untersuchung der Apoptose der humanen Zelllinien Mo7e und Mo7e BCR-ABL^{p210} mittels Durchflußzytometrie nach Zytostatika-Behandlung. Jeweils 5×10^4 Zellen wurden 24h vor Beginn der Zytostatika-Behandlung ausgesät. Der Inkubation der Zellen mit Etoposid ($25 \mu\text{M}$) und Doxorubicin ($0,25 \mu\text{M}$) für 24h schloß sich eine durchflußzytometrische Messung des prozentualen Anteils der apoptotischen Zellfraktion an. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten mit den Zelllinien Mo7e und Mo7e BCR-ABL^{p210}. Eine Behandlung der Zelllinie Mo7e BCR-ABL^{p210} mit den Zytostatika Etoposid bzw. Doxorubicin führte im Vergleich zur parentalen Zelllinie Mo7e zu einem erhöhten prozentualen Anteil apoptotischer Zellen.

3.7 Stabile Transfektion humaner Zelllinien zur ektoptischen Expression von *RFC1*

Um die Auswirkungen einer dauerhaften, ektoptischen Expression von *RFC1* in humanen Zellen zu untersuchen, wurde die humane Zelllinie HEK293 (embryonales Nierenzellkarzinom) mit rekombinanten Expressionsplasmiden, die den kodierenden Bereich von *RFC1* enthalten, stabil transfiziert. Zur Generierung der rekombinanten Expressionsplasmide wurde aus RNA der Zelllinie Mo7e cDNA hergestellt und die kodierende Region von *RFC1* mittels PCR amplifiziert. Zur Amplifikation wurden die Oligonukleotide „hRFCcdsNotI-f“ bzw. „hRFCcdsFLAGNotI-f“ und „hRFCcdsNotI-r“ eingesetzt, die an ihren jeweiligen 5'-Enden eine Erkennungssequenz der Restriktionsendonuklease *NotI* besitzen. Dies ermöglichte, nach Restriktionsspaltung des Expressionsplasmids und der PCR-Amplifikate durch *NotI*, eine Integration der PCR-Produkte in das pIRES-Neo3 Plasmid. Der kodierende Bereich von *RFC1* der rekombinanten Expressionsplasmide wurde vor Transfektion der HEK293-Zellen sequenziert, um unerwünschte Mutationen auszuschließen. HEK293 Zellen wurden jeweils mit den rekombinanten Expressionsplasmiden „pIRES-Neo3-RFC1“ und „pIRES-Neo3-FLAGRFC1“, sowie dem Plasmid „pIRES-Neo3“ („Leervektor“-Kontrolle) mittels Elektroporation transfiziert und 48h nach Transfektion durch Zugabe von 0,5mg/ml G418 unter dauerhafter Selektion inkubiert. Zur Kontrolle der ektoptischen Expression von *RFC1*, sowie des Fusionsproteins „FLAGRFC1“ in den transfizierten Zelllinien wurden Proteinextrakte der jeweiligen Zelllinien mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembranen transferiert und die Expression der Proteine mittels Immundetektion nachgewiesen.

Wie in Abbildung 3-18 dargestellt, zeigten beide, mit den rekombinanten Expressionsplasmiden transfizierte Zelllinien „HEK293 pIRES-Neo3-RFC1“ und „HEK293 pIRES-Neo3-FLAGRFC1“ eine erhöhte, ektoptische Expression von *RFC1* bzw. des Fusionsproteins „FLAG-RFC1“ im Vergleich zur Kontrollzelllinie, die mit dem Vektor „pIRES-Neo3“ transfiziert wurde („HEK293 pIRES-Neo3“).

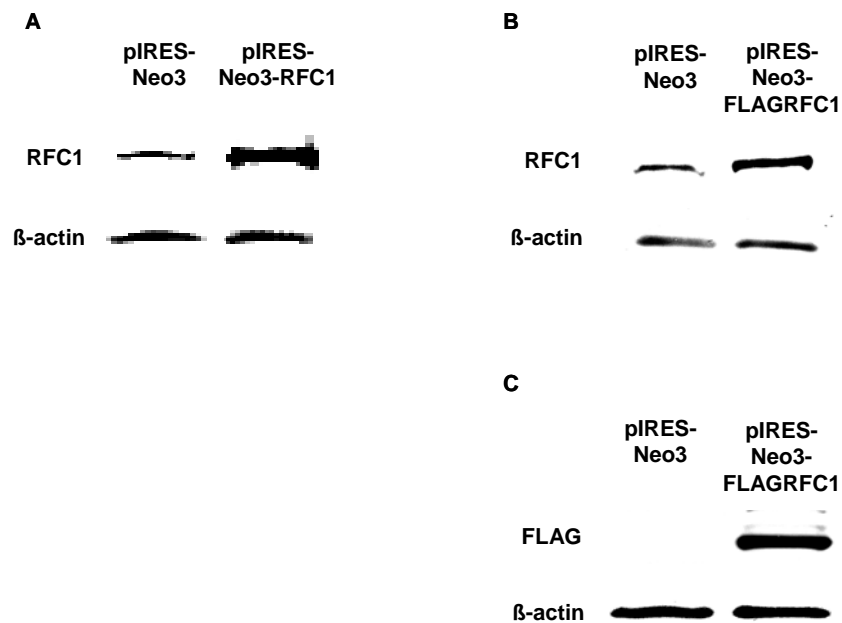


Abbildung 3-18: Analyse der ectopischen Expression von RFC1 in stabil transfizierten HEK293-Zellen mittels Western-Blot. Jeweils 50 μ g Gesamtzellsate der Zelllinien wurde mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen transferiert. Die Expression von RFC1 wurde durch Hybridisierung der Membranen mit einem spezifischen anti-RFC1 Antiserum nachgewiesen (A und B). Der Nachweis der ectopischen Expression des Fusionsproteins „FLAGRFC1“ erfolgte mittels Immundetektion mit anti-FLAG Antikörper (C). Eine gleichmäßige Beladung wurde durch Hybridisierung der Membranen mit anti- β -actin Antikörper nachgewiesen. Eine ectopische Expression von RFC1 bzw. des Fusionsproteins „FLAGRFC1“ konnte in Proteinextrakten der Zelllinien „HEK293 pIRES-Neo3-RFC1“ (A) bzw. „HEK293 pIRES-Neo3-FLAGRFC1“ (B und C) im Vergleich zur Proteinextrakten der Kontrollzelle „HEK293 pIRES-Neo3“ nachgewiesen werden.

3.8 Analyse der Sensitivität humaner Zelllinien, die eine ektoische Expression von *RFC1* aufweisen, gegenüber UV-Bestrahlung

Um den Einfluß einer ektoisch erhöhten Expression von RFC1 auf die Sensitivität von HEK293-Zellen gegenüber UV-Bestrahlung zu testen, wurden die stabil transfizierten Zelllinien „HEK293 pIRES-Neo3-RFC1“ und „HEK293 pIRES-Neo3-FLAGRFC1“ wie auch die Kontrollzelllinie „HEK293 pIRES-Neo3“ mit unterschiedlichen Energien bestrahlt und der Anteil apoptotischer Zellen 24h nach UV-Bestrahlung durchflußzytometrisch bestimmt.

Es zeigte sich in allen Zelllinien eine dosisabhängige Steigerung der apoptotischen Zellpopulation, wobei die stabil transfizierten Zelllinien, welche eine ektoische Expression von RFC1 bzw. des Fusionsproteins „FLAGRFC1“ aufwiesen, im Vergleich zur Kontrollzelllinie, eine erhöhte Sensitivität gegenüber UV-Bestrahlung zeigten. Dies ließ sich durch eine Steigerung der apoptotischen Zellpopulation der stabilen Transfektanden im Vergleich zu den Werten der Kontrollzellen nach Bestrahlung nachweisen (Abbildung 3-19).

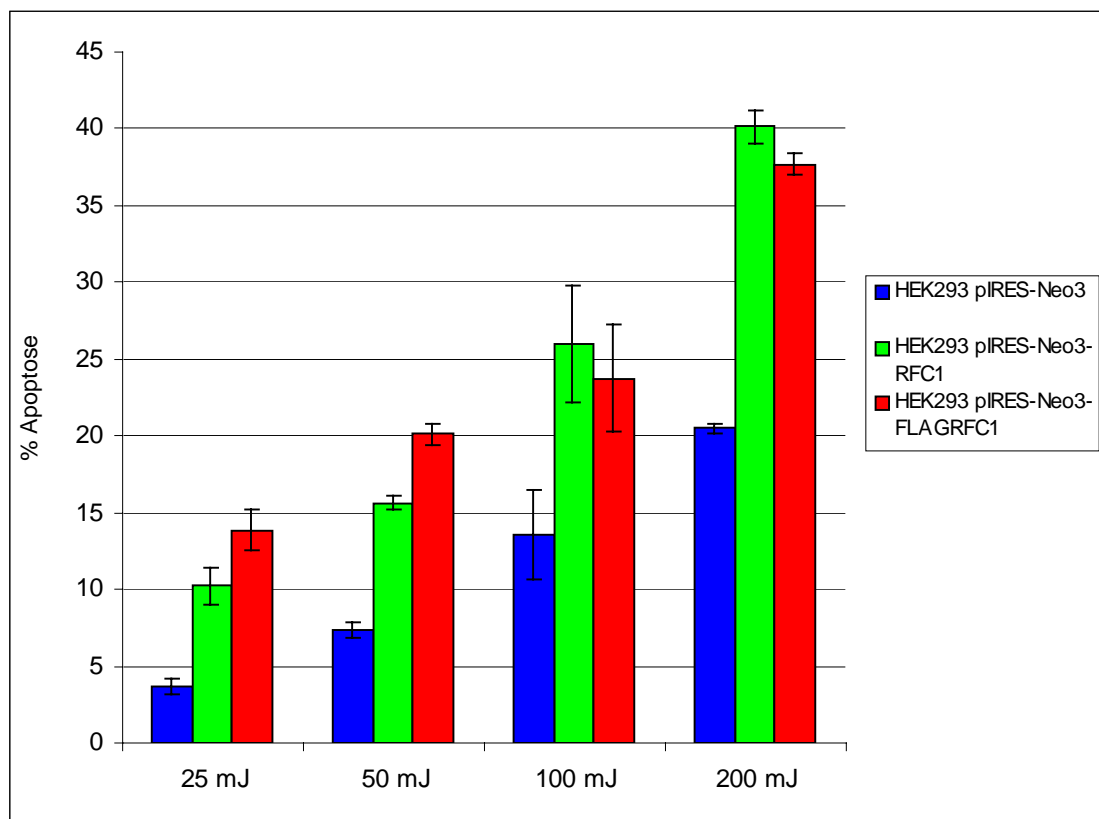


Abbildung 3-19: Analyse der Apoptose von stabil transfizierten HEK293-Zellen, die eine ektopische Expression von RFC1 bzw. des Fusionsproteins „FLAGRFC1“ aufweisen nach UV-Bestrahlung mittels Durchflußzytometrie. Jeweils 5×10^4 Zellen wurden 24h vor UV-Bestrahlung ausgesät und die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit verschiedenen Energien (25-200mJ). Die durchflußzytometrische Messung des prozentualen Anteils der apoptotischen Zellfraktion erfolgte 24h nach UV-Bestrahlung. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens vier unabhängigen Experimenten mit den Zelllinien „HEK293 pIRES-Neo3“, „HEK293 pIRES-Neo3-RFC1“ und „HEK293 pIRES-Neo3-FLAGRFC1“. Es zeigte sich eine proportionale Steigerung des prozentualen Anteils apoptotischer Zellen in allen analysierten Zelllinien in Abhängigkeit von der gewählten Bestrahlungsenergie. Im Vergleich zur Kontrollzelllinie konnte in Zelllinien, die eine erhöhte ektopische Expression von RFC1 bzw. des Fusionsproteins „FLAGRFC1“ aufwiesen eine gesteigerte Sensitivität gegenüber UV-Bestrahlung nachgewiesen werden.

3.9 Reversion des UV-hypersensitiven Phänotyps RFC1-transfizierter Zelllinien durch Blockade der Caspasen-Aktivierung

Die sequentielle Aktivierung von Caspasen führt nach irreparabler Schädigung der zellulären DNA zum programmierten Zelltod durch Apoptose. Da eine stabile ektopische Expression von RFC1 wie auch des Fusionsproteins „FLAGRFC1“ in HEK293-Zellen zu erhöhter Sensitivität gegenüber einer Schädigung der zellulären DNA nach UV-Bestrahlung führt, sollte die Abhängigkeit dieses Phänomens von einer Caspasenaktivierung überprüft werden. Hierzu wurden die Zellen nach Bestrahlung mit einer Energie von 200mJ in An- bzw. Abwesenheit des Caspase-Inhibitors „z-VAD-FMK“ (100µM) für 24h inkubiert. Im Anschluß wurde der Anteil der apoptotischen Zellpopulation mittels Durchflußzytometrie gemessen.

Es zeigte sich, wie in Abbildung 3-20 dargestellt, im Vergleich zur Kontrollzelllinie die bekannt erhöhte Sensitivität der Zelllinien „HEK293 pIRES-Neo3-RFC1“ und „HEK293 pIRES-Neo3-FLAGRFC1“ gegenüber DNA-Schäden durch UV-Bestrahlung. Eine Blockade der Caspasenaktivierung der Zellen führte in allen Proben zu einer Verminderung der apoptotischen Zellfraktion nach UV-Bestrahlung. Eine Reversion des UV-hypersensitiven Phänotyps der stabil transfizierten Zellen läßt sich folglich durch eine Blockade der Caspasenaktivierung erreichen.

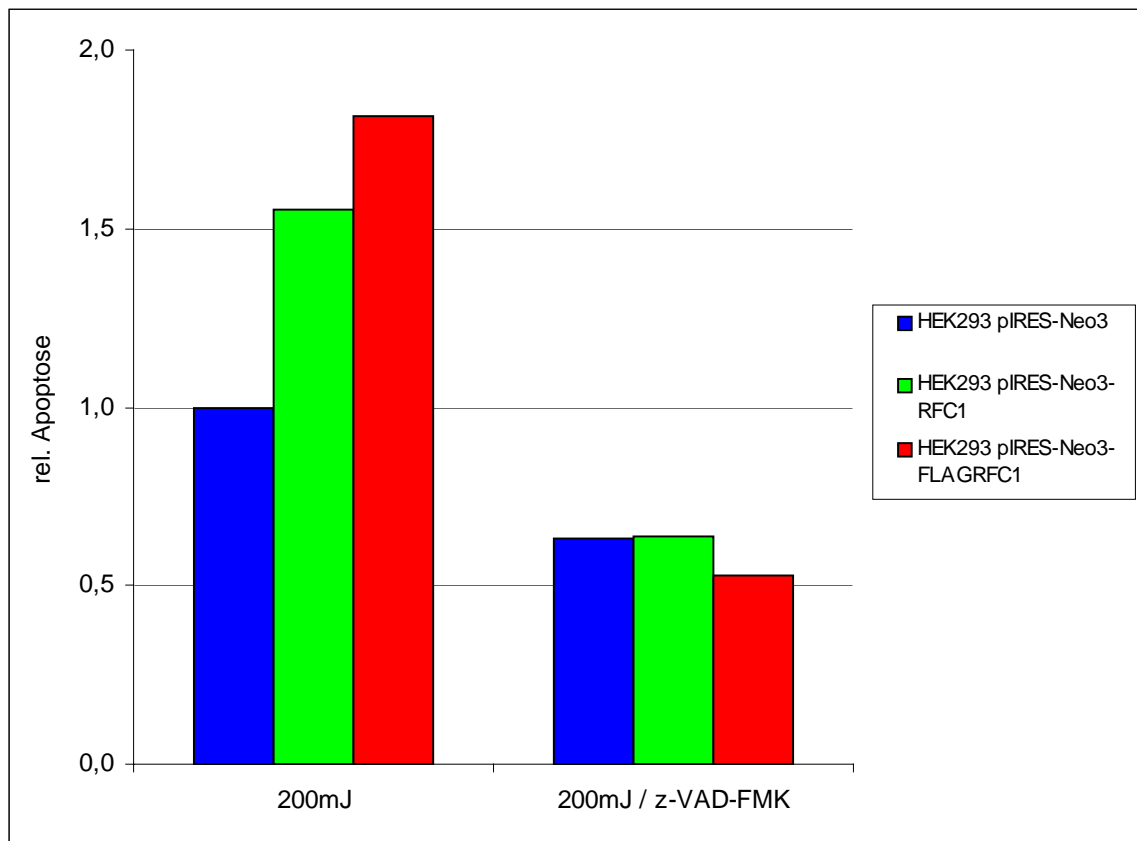


Abbildung 3-20: Untersuchung zu Auswirkungen einer Blockade der Caspasen-Aktivierung auf die Apoptose von stabil transfizierten HEK293-Zellen nach UV-Bestrahlung mittels Durchflußzytometrie. Jeweils 5×10^4 Zellen wurden 24h vor UV-Bestrahlung ausgesät und die Bestrahlung der Zellen erfolgte mit 200mJ. Eine Inkubation der Zelllinien nach UV-Bestrahlung erfolgte für 24h in An- bzw. Abwesenheit des Caspasen-Inhibitors „z-VAD-FMK“ (100µM). Nach Beendigung der Inkubation wurde der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellfraktion durchflußzytometrisch bestimmt. Aufgeführt ist der relative Anteil apoptotischer Zellen der Zelllinien bezogen auf die ermittelten Werte der Kontrollzelllinie nach Bestrahlung mit 200mJ. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchsreihen mit den Zelllinien „HEK293 pIRES-Neo3“, „HEK293 pIRES-Neo3-RFC1“ und „HEK293 pIRES-Neo3-FLAGRFC1“. Die Zelllinien „HEK293 pIRES-Neo3-RFC1“ und „HEK293 pIRES-Neo3-FLAGRFC1“ zeigten sich im Vergleich zur Kontrollzelllinie „HEK293 pIRES-Neo3“ sensitiver gegenüber UV-Bestrahlung. Dieser Sensitivitätsunterschied konnte durch die Inhibition von Caspasen ausgeglichen werden.

3.10 Analyse der Sensitivität humaner, RFC1-transfizierter Zelllinien, gegenüber einer Behandlung mit verschiedenen Zytostatika

Die Erkenntnis, daß eine erhöhte ektopische Expression von RFC1 bzw. „FLAGRFC1“ in humanen Zellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber UV-Bestrahlung zur Folge hat, führte zu der Frage, ob dieser Effekt gleichermaßen durch verschiedene Zytostatika ausgelöst werden kann, die auch klinische Verwendung finden und unterschiedliche Wirkmechanismen besitzen. Um die zytotoxische Wirkung dieser Substanzen auf HEK293-Zellen zu testen, die eine ektopische Expression von RFC1 bzw. des Fusionsproteins „FLAGRFC1“ zeigen, wurden die transfizierten Zelllinien für 24h bzw. 48h in Anwesenheit der verschiedenen Zytostatika inkubiert und anschließend der Anteil der apoptotischen Zellpopulation durchflußzytometrisch bestimmt. Wie in Abbildung 3-21 dargestellt, zeigte sich eine erhöhte Sensitivität der RFC1- bzw. „FLAGRFC1“-Transfektanden gegenüber Kontrollzellen bei einer Behandlung durch Etoposid und Doxorubicin. Im Gegensatz dazu führte eine Inkubation dieser Zellen mit Staurosporin und Taxol, im Vergleich zur Kontrollzelllinie, nicht zu einem signifikant gesteigerten prozentualen Anteil apoptotischer Zellen.

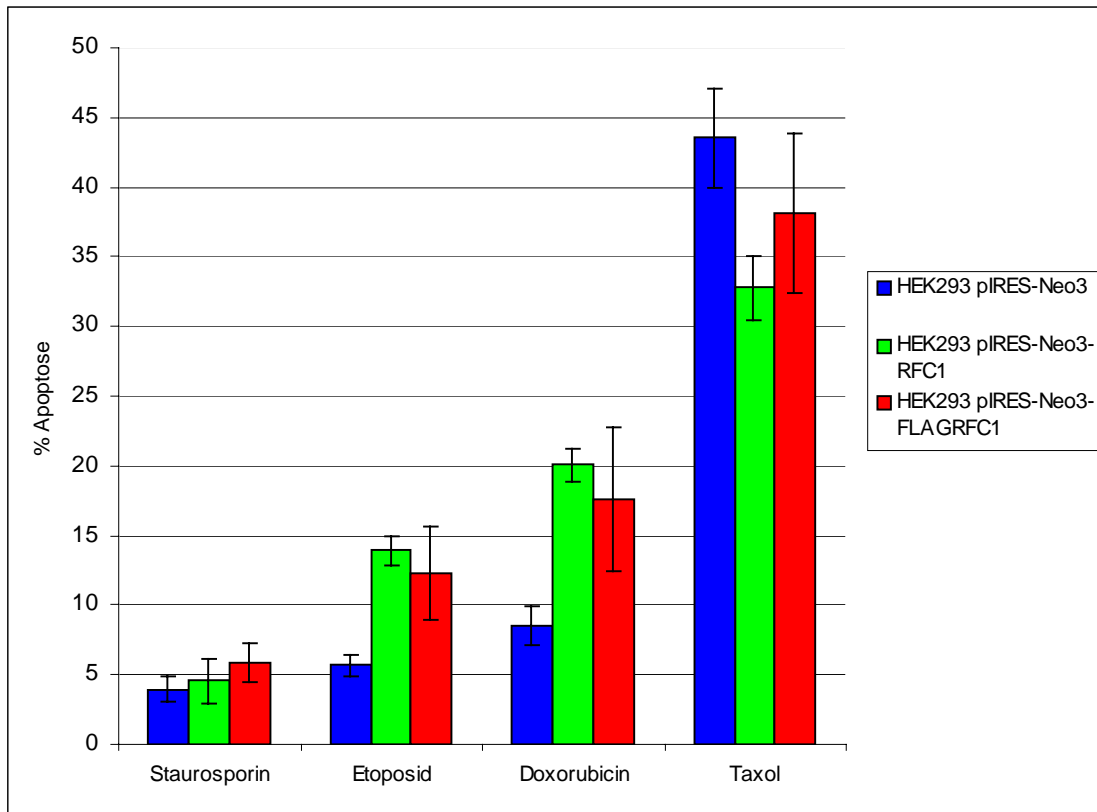


Abbildung 3-21: Analyse der Apoptose von stabil transfizierten HEK293-Zellen, die eine ektopische Expression von RFC1 bzw. des Fusionsproteins „FLAGRFC1“ aufweisen nach Zytostatika-Behandlung mittels Durchflußzytometrie. Jeweils 5×10^4 Zellen wurden 24h vor Beginn der Zytostatika-Behandlung ausgesät. Der Inkubation der Zellen mit Etoposid ($25 \mu\text{M}$), Doxorubicin ($0,5 \mu\text{M}$), Staurosporin (250nM) für 24h und Taxol (5nM) für 48h schloß sich jeweils die durchflußzytometrische Messung des prozentualen Anteils der apoptotischen Zellfraktion an. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus sechs unabhängigen Experimenten mit den Zelllinien „HEK293 pIRES-Neo3“, „HEK293 pIRES-Neo3-RFC1“ und „HEK293 pIRES-Neo3-FLAGRFC1“. Im Vergleich zur Kontrollzelllinie „HEK293 pIRES-Neo3“ zeigte sich eine erhöhte Sensitivität der Zelllinien „HEK293 pIRES-Neo3-RFC1“ und „HEK293 pIRES-Neo3-FLAGRFC1“ gegenüber einer Behandlung mit Etoposid und Doxorubicin. Eine Behandlung dieser Zelllinien mit Staurosporin und Taxol führte zu keiner signifikanten Steigerung der apoptotischen Zellfraktion im Vergleich zur Kontrollzelllinie.

3.11 Nachweis von NER-(Nukleotid-Exzisionsreparatur) induzierten DNA-Strangbrüchen nach UV-Bestrahlung mittels alkalischer Einzelzell-Gelelektrophorese („Comet assay“) in *RFC1*-transfizierten, humanen Zelllinien

Durch die Beobachtung einer Hypersensitivität der Zelllinien „HEK293 pIRES-Neo3-RFC1“ und „HEK293 pIRES-Neo3-FLAGRFC1“ gegenüber UV-induzierten DNA-Schäden stellte sich die Frage, ob in diesen Zelllinien eine Störung der initialen Prozesse der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) vorliegt. Hierzu wurde die alkalische Einzelzell-Gelelektrophorese („Comet-assay“) zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen eingesetzt, die nach UV-Bestrahlung im Verlauf der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) bei der Beseitigung von DNA-Schäden entstehen. Da durch UV-Strahlung keine direkten Brüche im Zucker-Phosphat Gerüst der DNA verursacht werden, kann eine erhöhte Mobilität der zellulären DNA unter alkalischen Elektrophoresebedingungen nach UV-Bestrahlung auf DNA-Strangbrüche zurückgeführt werden, die während der ersten Schritte der NER durch spezifische Endonukleasen induziert werden („Inzisions“-Schritt). Hierzu wurden die Zellen der zu untersuchenden Zelllinien „HEK293 pIRES-Neo3“, „HEK293 pIRES-Neo3-RFC1“ und HEK293 pIRES-Neo3-FLAGRFC1“ mit einer Energie von 200mJ bestrahlt und für 4h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Gelelektrophorese unter alkalischen Bedingungen und die Mobilität der zellulären DNA wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Das Ausmaß der aus dem Zellkern ausgetretenen (mobilen) DNA gab Aufschluß über den Grad der durch die NER verursachten DNA-Strangbrüche in den Zellen innerhalb der Inkubationszeit nach UV-Bestrahlung. Ein unbestrahlter Parallelansatz der jeweiligen Zelllinie diente als interne Negativkontrolle. In Abbildung 3-22 ist das Ergebnis eines einmalig durchgeführten Versuches mit den genannten Zelllinien anhand repräsentativer Einzelzellen gezeigt. In allen Zelllinien konnte eine erhöhte Mobilität zellulärer DNA 4h nach Bestrahlung im Vergleich zu Zellen des jeweiligen unbestrahlten Kontrollansatzes nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede bezüglich der DNA-Mobilität zwischen den einzelnen Zelllinien konnten 4h nach UV-Bestrahlung nicht festgestellt werden.

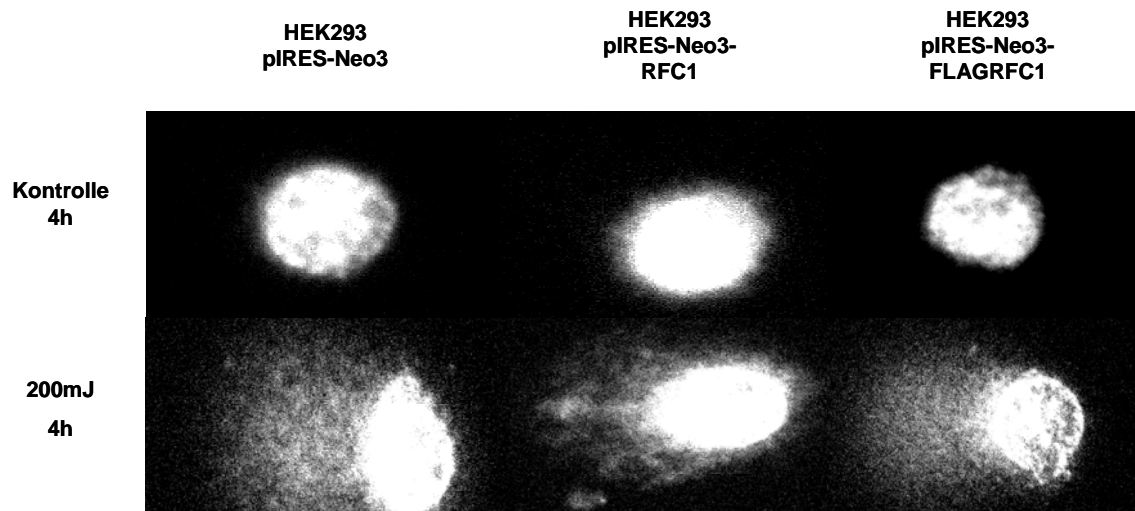


Abbildung 3-22: Nachweis von NER-(Nukleotid Exzisionsreparatur) induzierten DNA-Strangbrüchen von stabil transfizierten HEK293-Zellen, die eine ektopische Expression von RFC1 bzw. des Fusionsproteins „FLAGRFC1“ aufweisen nach UV-Bestrahlung durch alkalische Einzelzell-Gelelektrophorese („Comet-assay“). Jeweils zwei Parallelansätze jeder Zelllinie (je 5×10^4 Zellen) wurden 24h vor UV-Bestrahlung ausgesät und die Bestrahlung eines Zellansatzes erfolgte mit einer Energie von 200mJ, während der Kontrollansatz unbehandelt blieb. Im Anschluß an die UV-Bestrahlung wurden die Zellen für 4h bei 37°C inkubiert und anschließend einer Gelelektrophorese unter alkalischen Bedingungen unterzogen, um eine Migration geschädigter DNA aus dem Kern der Zellen zu ermöglichen. Nach Anfärbung mit Ethidiumbromid-Färbelösung wurde das Ausmaß der DNA-Strangbrüche einzelner Zellen fluoreszenzmikroskopisch beurteilt. Je Zelllinie wurden 10 Einzelzellen optisch ausgewertet. Eine gesteigerte DNA-Mobilität konnte in allen Zelllinien 4h nach UV-Bestrahlung im Vergleich zu unbestrahlten Zellen des Kontrollansatzes der jeweiligen Zelllinie nachgewiesen werden. Ein Vergleich des Ausmaßes der DNA-Migration nach UV-Bestrahlung der Zelllinien „HEK293 pIRES-Neo3“, „HEK293 pIRES-Neo3-RFC1“ und „HEK293 pIRES-Neo3-FLAGRFC1“ zeigte keine signifikanten Unterschiede.

3.12 Analyse der DNA-Synthese RFC1-transfizierter, humaner Zelllinien nach UV-Bestrahlung mittels durchflußzytometrischer Messung der BrdU-Inkorporation

In dieser Versuchsreihe sollte die DNA-Syntheserate der stabil transfizierten HEK293-Zelllinien nach DNA-Schädigung durch UV-Bestrahlung im Vergleich zur Kontrollzelllinie determiniert werden. Die Zelllinien wurden hierzu zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung für 30min in Anwesenheit des Basenanalogs 5'-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) inkubiert. Die Inkorporation von BrdU in die zelluläre DNA wurde anschließend durch Bindung eines spezifischen FITC-gekoppelten Antikörpers an BrdU durchflußzytometrisch gemessen. Durch Färbung der Proben mit Propidiumiodid-Färbelösung war eine gleichzeitige Messung der apoptotischen Zellpopulation möglich. In Abbildung 3-23 ist der Verlauf der BrdU-Inkorporation der Zelllinien „HEK293 pIRES-Neo3-RFC1“ und „HEK293 pIRES-Neo3-FLAGRFC1“ im Vergleich zur Kontrollzelllinie „HEK293 pIRES-Neo3“ nach UV-Bestrahlung dargestellt. Die aufgeführten Werte bemessen den Anteil der BrdU-Inkorporation der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach UV-Bestrahlung im Vergleich zu unbestrahlten Zellen der entsprechenden Zelllinie zu Beginn des Versuches. Es zeigt sich eine deutliche Reduktion der DNA-Syntheserate bei allen Zellen im Verlauf der Inkubation nach Bestrahlung. Beide, mit RFC1- bzw. „FLAGRFC1“-transfizierten Zelllinien zeigten jedoch noch 4h nach Bestrahlung eine deutlich erhöhte DNA-Syntheserate im Vergleich zu Kontrollzellen, deren BrdU-Inkorporation zu diesem Zeitpunkt bereits kaum mehr meßbar war.

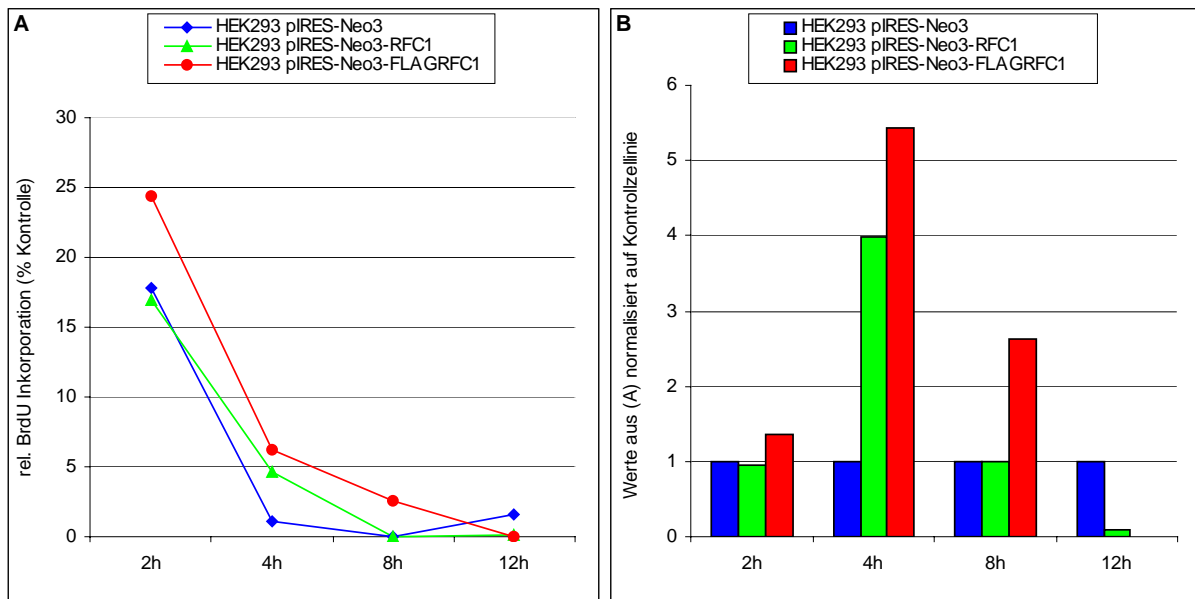


Abbildung 3-23: Analyse der DNA-Synthese von stabil transfizierten HEK293-Zellen, die eine ektopische Expression von RFC1 bzw. des Fusionsproteins „FLAGRFC1“ aufweisen nach UV-Bestrahlung mittels durchflußzytometrischer Messung der BrdU-Inkorporation. Jeweils 5×10^4 Zellen wurden 24h vor Start des Versuches ausgesät und die Inkubation der Zellen mit BrdU ($10 \mu\text{M}$) erfolgte für jeweils 30min zu den angegebenen Zeitpunkten nach UV-Bestrahlung mit 200mJ. Zur Bestimmung der DNA-Synthese der Zellen wurde deren BrdU-Inkorporation zu den jeweiligen Zeitpunkten durchflußzytometrisch bestimmt. (A): Die aufgeführten Werte bemessen den prozentualen Anteil der BrdU-Inkorporation der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach UV-Bestrahlung in Relation zu unbestrahlten Zellen der jeweiligen Zelllinie zu Beginn des Versuches. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchsreihen mit den Zelllinien „HEK293 pIRES-Neo3“, „HEK293 pIRES-Neo3-RFC1“ und „HEK293 pIRES-Neo3-FLAGRFC1“. (B): Darstellung der Werte aus (A) normalisiert auf die Kontrollzelllinie „HEK293 pIRES-Neo3“.

In allen Zelllinien konnte eine Reduktion der BrdU-Inkorporation in den ersten 8-12h nach UV-Bestrahlung beobachtet werden, jedoch konnte 4h nach Bestrahlung in den Zelllinien „HEK293 pIRES-Neo3-RFC1“ und „HEK293 pIRES-Neo3-FLAGRFC1“ eine deutlich erhöhte Inkorporation von BrdU im Vergleich zur Kontrollzelllinie „HEK293 pIRES-Neo3“ gemessen werden.

4 Diskussion

4.1 Klonierung und Sequenzanalyse der putativen Promotorregion, sowie des Transkriptionsstarts von *RFC1* zur Identifikation potentieller cis-regulatorischer Sequenzelemente

Die Regulation der Transkription stellt einen der wichtigsten Mechanismen der spezifischen, zeitlichen und räumlichen Regulation der Genexpression pro- und eukaryontischer Organismen dar. In Eukaryonten ist die Rekrutierung und korrekte Positionierung der RNA- Polymerase II an der Transkriptionsstartstelle von Genen abhängig von der Bindung allgemeiner Transkriptionsfaktoren an konservierte DNA-Sequenzelemente im proximalen Bereich des Transkriptionsstarts, dem Kern-Promotor („Core“-Promoter). Der Kern-Promotor ist ausreichend für eine basale Transkription durch die RNA-Polymerase II *in vitro*. Konservierte Sequenzelemente, die sich in dieser Region einer Vielzahl eukaryontischer Gene in variabler Kombination finden, sind das „TATA“-Box Element, das „Initiator“-Element („Inr“), sowie das „Downstream promoter“ Element („DPE“). Das „TATA“-Box Motiv, mit der Consensus-Sequenz „TATAAA“, befindet sich in höheren Eukaryonten typischerweise 25-30bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts und dient der Bindung von TBP („TATA“-binding protein), einer Untereinheit des allgemeinen Transkriptionsfaktors TFIID (Hernandez, 1993; Burley und Roeder, 1996). Das „Inr“-Element, eine pyrimidinreiche DNA-Sequenz, welche sich direkt im Bereich -3 bis +5 des Transkriptionsstarts befindet und die Consensus-Sequenz „Py₂CA(+1)Py₅“ aufweist kann ebenfalls, alternativ oder zusätzlich zum „TATA“-Box Element, als Bindungsstelle für TFIID bzw. dessen Untereinheiten sowie assoziierter Proteine wie TBP und TAFs („TBP-associated factors“) dienen (Smale und Baltimore, 1989; Martinez et al., 1994; Smale et al., 1998). Gleiches gilt für das „DPE“-Element, das in eukaryontischen Kern-Promotoren etwa 30bp stromabwärts der Transkriptionsstartstelle lokalisiert ist und ebenfalls eine konservierte Sequenz, „A/GGA/TCGTG“, besitzt (Burke und Kadonaga, 1996; Burke und Kadonaga 1997). Die Bildung und Positionierung des basalen Transkriptionskomplexes, bestehend aus RNA-Polymerase II und einer Reihe allgemeiner Transkriptionsfaktoren am Transkriptionsstart ist eine grundlegende Voraussetzung zur Transkriptionsinitiation. Eine aktivierende oder reprimierende Regulation der Transkription wird durch die

Bindung weiterer Faktoren an regulatorische Sequenzelemente in der unmittelbaren Umgebung des Kern-Promotors, die sich häufig stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle befinden, und deren Interaktion mit Komponenten des basalen Transkriptionskomplexes ermöglicht (Roberts, 2000). Eine spezifische Transkriptionsregulation wird oftmals durch weitere regulatorische Sequenzelemente, sogenannte „Enhancer“ und „Silencer“ ermöglicht. Diese Elemente können sich in variabler Entfernung und orientierungsunabhängig sowohl im 5´ als auch im 3´-Bereich des Promotors befinden (Mitchell und Tjian, 1989). Das Zusammenspiel von aktivierenden und reprimierenden Faktoren, deren direkte oder indirekt vermittelte Interaktion mit dem basalen Transkriptionskomplex, sowie die gewebsspezifische Expression von Transkriptionsfaktoren ermöglichen schließlich eine große Variabilität der Transkriptionsregulation von Genen.

Erste Untersuchungen der mRNA-Expression von *RFC1* bzw. *mRFC1* zeigten eine ubiquitäre, jedoch quantitativ unterschiedliche Expression zweier genspezifischer Transkripte in adulten murinen (ca. 4,5 und 5kb) und humanen (ca. 4,5 und 5,3kb) Geweben, wobei die jeweils größere mRNA-Spezies deutlich abundanter als das kürzere Transkript war (Luckow et al., 1994; Lu et al., 1993). Durch Lu und Riegel (1994) konnte nachgewiesen werden, daß die beiden Transkripte von *RFC1* das Resultat einer differentiellen Prozessierung der *RFC1*-mRNA, bedingt durch zwei alternative Polyadenylierungsstellen im 3´-untranslatierten Bereich des Gens, sind. Weiterhin fand sich eine Induktion der mRNA-Expression des Gens bei Wiedereintritt von Zellen aus einer Ruhephase (G₀-Phase) nach Serumentzug in den Zellzyklus, wie auch eine gesteigerte Expression in hoch proliferativen Geweben (Haque et al., 1996, Luckow et al., 1994, van der Kuip 1997, van der Kuip et al., 1999). Während sich die Mehrzahl dieser Ergebnisse im Einklang mit der essentiellen Funktion von *RFC1* im Rahmen der DNA-Replikation und Reparatur in proliferierenden Zellen befindet, zeigten sich jedoch in einigen dieser Untersuchungen Diskrepanzen im Hinblick auf den Zusammenhang zwischen der mRNA-Expression des Gens und der vermeintlichen Proliferationsaktivität verschiedener Gewebe. So konnte beispielsweise eine starke mRNA-Expression von *mRFC1* bzw. *RFC1* in adulten Herz- und Hirngeweben nachgewiesen werden, wohingegen keine Expression von *RFC1* in Gewebeproben des Dünndarms feststellbar war (Luckow et al., 1994; Lu et al., 1993). Die in dieser Arbeit

durchgeführte Hybridisierung eines kommerziellen Northern-Blots zeigte ebenfalls eine variable Expression der beiden *RFC1*-Transkripte in verschiedenen adulten humanen Geweben und das Ergebnis dieser Analyse findet sich wiederum nur teilweise in Einklang mit den vorgenannten Untersuchungen (Abbildung 3-1). Somit ergibt sich hinsichtlich der transkriptionellen Regulation von *RFC1* ein sehr heterogenes Bild. Trotz dieser Tatsache sind bisher keine Untersuchungen zur Struktur des potentiellen Promotorbereiches von *RFC1*, sowie keine eindeutige Determinierung der Transkriptionsstartstelle des Gens durchgeführt worden.

4.1.1 Die Transkriptionsstartstelle von *RFC1*

Repräsentative cDNA-Sequenzen von *RFC1* der NCBI-Datenbank zeigten zu Beginn der Arbeit sowohl Sequenzunterschiede in der 5'-untranslatierten Region, als auch Divergenzen bezüglich der Ausdehnung dieses Bereiches, stromaufwärts des Startcodons (Abbildung 3-5). Da unklar war, ob es sich hierbei um alternative Transkriptionsstartstellen von *RFC1* handelt, oder diese Sequenzdaten möglicherweise Artefakte darstellen wurde die Transkriptionsstartstelle von *RFC1*, sowie die exakte Sequenz der 5'-untranslatierten Region der mRNA des Gens mittels 5'-RACE ermittelt. Der 5'-untranslatierte Bereich der *RFC1*-mRNA erstreckt sich demzufolge über 137bp stromaufwärts des Startcodons und die hier ermittelte Sequenz der 5'-untranslatierten Region von *RFC1* (AJ564999) ist identisch mit der genomischen Referenzsequenz des NCBI in diesem Bereich (AY600371), sowie 124bp der cDNA „L23320“ und 85bp der cDNA „Z22642“ (Abbildung 3-6). Hiervon abweichende Sequenzen der cDNAs „L23320“ und „Z22642“ zeigen demzufolge ebenfalls keine Übereinstimmungen mit der genomischen Sequenz von *RFC1*. Daher kann postuliert werden, daß es sich bei diesen Sequenzabschnitten nicht um alternative Transkripte von *RFC1* handelt, sondern um Artefaktsequenzen, die keinen Bezug zur 5'-untranslatierten Region der mRNA des Gens haben. Die aktualisierte Version der Referenzsequenz des NCBI für die *RFC1*-mRNA (NM_002913) wurde mittlerweile entsprechend korrigiert und die hier ermittelten Sequenzdaten der 5'-untranslatierten Region des Gens integriert.

4.1.2 Isolierung genomischer Subklone und Sequenzanalyse des putativen Promotorbereichs von *RFC1*

Da zu Beginn der Arbeit keine Sequenzdaten des potentiellen Promotorbereiches bzw. der 5'-genomischen Region von *RFC1* bekannt waren, wurden genomische DNA-Klone isoliert, deren Sequenzen Teile des genomischen 5'-Bereichs von *RFC1* repräsentieren (Abbildung 3-4). Durch die, im Verlauf dieses Projektes, zunehmend verfügbaren Sequenzdaten des Humanen Genom Projektes der NCBI Datenbank wurde ein direkter Sequenzvergleich der hier isolierten genomischen Subklone mit entsprechenden Referenzsequenzen der Datenbank ermöglicht und es zeigte sich ein hohes Maß an Sequenzübereinstimmung ($\geq 97\%$; siehe Anhang). Da hierdurch auch eine eindeutige Lokalisation der isolierten Subklone im genomischen Kontext von *RFC1* möglich war, wurde auf die Isolierung von zusätzlichen Klonen mit Sequenzüberlappungen verzichtet. Zur Identifikation potentieller cis-regulatorischer Sequenzen, die möglicherweise von Bedeutung für die transkriptionelle Regulation von *RFC1* sind, wurden in der vorliegenden Arbeit 653bp der genomischen Sequenz stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle des Gens einer Datenbankanalyse unterzogen. In dieser Analyse wurde kein „TATA“-Box Sequenzelement im proximalen Promotorbereich von *RFC1* detektiert, jedoch konnten potentielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren „SP1“ (Simian-virus-40 protein 1), „NF-1“ (Nuclear factor-1), „Oct-1“ (Octamer-binding protein-1) und „c-Jun“ (ju-nana) identifiziert werden. (Abbildung 3-7). Eine nicht unwesentliche Anzahl eukaryontischer Gene zeigt, wie *RFC1*, im Promotorbereich an Position -25 bis -30 keine „TATA“-Box Sequenzelemente (Smale, 2001). In diesen Fällen dienen häufig „Inr“- oder „DPE“-Elemente der Bindung allgemeiner Transkriptionsfaktoren und damit der korrekten Positionierung der RNA-Polymerase II am Transkriptionsstart (Burke et al, 1998; Smale et al., 1998). Die genomische Sequenzumgebung, der in dieser Arbeit bestimmten Transkriptionsstartstelle von *RFC1*, zeigt eine weitgehende Übereinstimmung mit der Consensus-Sequenz von „Inr“-Elementen (siehe Anhang) und könnte daher als alternative Bindungsstelle für allgemeine Transkriptionsfaktoren bei der Transkriptionsinitiation von *RFC1* dienen. Da in dieser Arbeit der Sequenzbereich stromabwärts des Transkriptionsstarts des Gens nicht im Hinblick auf cis-regulatorische Sequenzelemente untersucht wurde, kann keine Aussage über eine mögliche Existenz

einer „DPE“-Sequenz in dieser Region gemacht werden. Die Transkription von Genen deren Kern-Promotor keine „TATA“-Box, jedoch ein „Inr“-Element aufweisen, wird häufig positiv reguliert durch Bindung des Transkriptionsfaktors „SP1“ an multiple Erkennungssequenzen im Promotorbereich stromaufwärts des Transkriptionsstarts (Smale et al., 1990; Emami et al., 1998). Dies könnte gleichermaßen für die Transkription des *RFC1*-Gens zutreffen, in dessen genomischer Sequenz stromaufwärts des Transkriptionsstarts multiple, potentielle Bindungsstellen für „SP1“, einen ubiquitären Transkriptionsfaktor, dessen DNA-Bindung an „GC“-reiche Sequenzen über eine „Zink-Finger“-Domäne erfolgt, identifiziert werden konnten. In der analysierten Region fanden sich, wie bereits erwähnt, ebenfalls potentielle Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren „Oct-1“, „NF-1“ und „c-Jun“.

Bei „Oct-1“ handelt es sich um einen ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktor dessen Bindung an spezifische DNA-Sequenzen („Oktamer“-Sequenzen) durch ein „Homeodomänen“-Bindungsmotiv (POU-Motiv) erfolgt (Sturm et al., 1988). Für „Oct-1“ konnte eine Transkriptionsaktivierung in Kooperation mit „SP1“, wie auch eine Stabilisierung des Präinitiationskomplexes durch physikalische Interaktion mit TBP gezeigt werden (Zwilling et al., 1994; Janson et al., 1990; LeBowitz et al., 1988). Gleichermäßen trägt die Bindung des, ebenfalls ubiquitär exprimierten, Transkriptionsfaktors „NF-1“ an sogenannte „CCAAT“-Box Sequenzelemente im erweiterten Promotorbereich von Genen häufig zu deren Transkriptionsregulation bei, wobei auch „NF-1“ eine aktivierende Funktion durch direkte Interaktion mit Komponenten des basalen Transkriptionskomplexes zugeschrieben wurde (Santoro et al., 1988; Dussere et al. 1992, Kim et al., 1994). „c-Jun“, ist ein Mitglied der „AP-1“ (activating protein-1) Familie von Transkriptionsfaktoren mit basischem Leucin-Zipper (bZIP) Dimerisierungs- und DNA-Bindungsmotiv. Die DNA-Bindung von „c-Jun“ an spezifische Sequenzelemente kann sowohl als Homo-, wie auch als Heterodimer mit weiteren Mitgliedern der „AP-1“ Familie, wie „c-Fos“ und „ATF“ erfolgen und abhängig vom jeweiligen Dimerisierungspartner und dem zellulären Kontext, die Transkription einer Vielzahl von Genen positiv oder negativ regulieren (Shaulian und Karin, 2002).

Die funktionelle Bedeutung der hier identifizierten potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen für die Transkription von *RFC1* muß in zukünftigen Versuchen ermittelt werden. Eine funktionelle Charakterisierung, der für die Transkription des Gens

essentieller Bereiche könnte sowohl durch sukzessive Verkürzung des potentiellen Promotorbereichs von *RFC1*, als auch durch selektive Mutation der identifizierten Bindungsstellen in Reporter-gen-Assays auf Grundlage der in dieser Arbeit generierten Daten erfolgen.

4.2 Exemplarische Untersuchungen zum Einfluß von BCR-ABL^{p210} auf die Expression von *RFC1*

Die Chronisch myeloische Leukämie (CML) ist eine maligne hämatopoetische Erkrankung, welche durch Transformation einer multipotenten, hämatopoetische Stammzelle entsteht. Pathogenetisch ist die CML durch das sogenannte „Philadelphia-Chromosom“ gekennzeichnet. Dieses abnormale Chromosom ist das Resultat einer reziproken Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen 9 und 22 (t(9;22)(q34;q11)) (Rowley, 1973). Hierbei wird ein Großteil des Proto-Onkogens *c-Abl* (Abelson murine leukemia virus), welches auf dem langen Arm von Chromosom 9 lokalisiert ist, in die Region des *Bcr*-(Breakpoint cluster region) Gens auf Chromosom 22 transloziert (de Klein et al., 1982; Bartram et al., 1983; Groffen et al., 1984). Die Fusion eines Großteils des kodierenden Bereiches von *c-Abl* mit aminoterminalen Anteilen des *Bcr*-Gens führt zur Formation des sogenannten *BCR-ABL* Fusionsgens, das für ein Protein, BCR-ABL^{p210}, mit einem Molekulargewicht von 210kDa kodiert (Ben Neriah et al., 1986) und in etwa 95% der CML-Patienten nachgewiesen werden kann (Bennett et al., 1994). Nach heutigem Verständnis ist dieses Gen bzw. sein Genprodukt, die BCR-ABL^{p210} Tyrosinkinase, monokausal für die Entstehung der Erkrankung verantwortlich. Die konstitutive Tyrosinkinaseaktivität, wie auch eine ausschließlich zytoplasmatische Lokalisation des Fusionsproteins, ermöglichen es BCR-ABL^{p210} mit einer großen Vielzahl verschiedenster Proteine intrazellulärer Signalkaskaden zu interagieren und deren Aktivität zu beeinflussen (Konopka et al., 1984; McWhirter et al., 1991). Dies führt im allgemeinen zu drei, für die Leukämogenese wesentlichen, Veränderungen: Einer, von externen Wachstumsfaktoren unabhängigen zellulären Proliferation, einer häufig erhöhten Resistenz von Leukämiezellen gegenüber apoptotischen Stimuli, sowie veränderten Eigenschaften der zellulären Adhäsion im Knochenmark und peripheren Blut (Warmuth et al., 1999; Deininger et al., 2000a).

Auf molekularer Ebene konnte, bedingt durch die konstitutive Tyrosinkinaseaktivität von BCR-ABL^{p210}, in einer Reihe von Untersuchungen eine veränderte Expression von Genen nachgewiesen werden, die an der Zellzyklusregulation, der zellulären Proliferation, wie auch an DNA-Reparaturprozessen beteiligt sind (Canitrot et al., 1999; Gesbert et al., 2000; Jonuleit et al., 2000; Deininger et al., 2001; Jena et al., 2002; Skorski, 2002; Slupianek et al., 2001; Deutsch et al., 2001; Deutsch et al., 2003)

Vor diesem Hintergrund und aufgrund der Tatsache, daß RFC1 in seiner Funktion als Untereinheit des RFC-Komplexes, essentielle Bedeutung bei der Beladung von PCNA nicht nur im Rahmen der DNA-Replikation, sondern auch bei der PCNA-vermittelten Reparatursynthese zukommt, wurde die RFC1-Expression in Abhängigkeit von BCR-ABL^{p210} untersucht. Die in dieser Arbeit verwendeten, BCR-ABL^{p210}-transfizierten humanen und murinen Zelllinien (Mo7e BCR-ABL^{p210}, 32D BCR-ABL^{p210}) zeigten jeweils im Vergleich zu nicht-transfizierten, parentalen Zelllinien (Mo7e und 32D) reproduzierbar, eine 2-3fach gesteigerte Proteinexpression von RFC1 bzw. mRFC1 (Abbildungen 3-8 und 3-9). Durch die, im Rahmen eines Kooperationprojektes mit Dr. Tomasz Skorski (Temple University, Philadelphia, USA), durchgeführten Untersuchungen zur Detektion der Proteinexpression von mRFC1 mittels Immunfluoreszenz in den hier verwendeten murinen Zelllinien 32D und 32D BCR-ABL^{p210} konnte dies bestätigt werden (Daten wurden nicht gezeigt). Schließlich war ebenfalls eine gesteigerte Expression von RFC1 in primären, hämatopoetischen Stammzellen von Patienten nachweisbar, welche an einer BCR-ABL^{p210}-positiven Chronischen myeloischen Leukämie (CML) erkrankt waren. In den Stammzellen der hier untersuchten CML-Patienten konnte, im Vergleich zu Proben von verschiedenen Patienten, deren Erkrankungen in keinem Zusammenhang mit einer Expression von BCR-ABL^{p210} standen, eine erhöhte Expression des RFC1-Proteins nachgewiesen werden (Abbildung 3-10). Um sicherzustellen, daß es sich bei der erhöhten Proteinexpression von RFC1 nicht um einen unspezifischen Sekundäreffekt in den hier untersuchten BCR-ABL^{p210}-transfizierten Zellen handelt, sondern eine direkte Konsequenz der BCR-ABL^{p210} Kinaseaktivität ist, wurde die Proteinexpression von RFC1 nach einer Inkubation der Zelllinie Mo7e BCR-ABL^{p210} mit „STI-571“ (Imatinib-mesylat, Gleevec^R) untersucht. Bei „STI-571“ handelt es sich um einen „TKI“ („Tyrosinkinase-Inhibitor“), der durch kompetitive Blockade der ATP-Bindungsdomäne von c-ABL, BCR-ABL, sowie strukturverwandter

Rezeptortyrosinkinasen, wie c-KIT (Stammzellofaktor-Rezeptor) und PDGFR (Platelet-derived growth factor receptor), zu einer Inhibition der Kinaseaktivität dieser Moleküle führt. Dies hat, in BCR-ABL^{p210}-positiven Zellen, eine Inhibition der durch BCR-ABL^{p210} aktivierten Signalkaskaden zur Folge und führt hierdurch zu einer Hemmung der Proliferation, sowie schließlich zum apoptotischen Zelltod (Druker et al., 1996; Gambacorti-Passerini, et al., 1997; Goldman, 2000; Schindler et al., 2000).

Eine Blockade der Kinaseaktivität von BCR-ABL^{p210} durch „STI-571“ in unterschiedlichen Konzentrationen führte jeweils zu einer Reduktion des RFC1-Proteins in der Zelllinie Mo7e BCR-ABL^{p210} innerhalb von 12h bzw. 22h (Abbildung 3-11). Das RFC1-Protein besitzt multiple Erkennungssequenzen für Caspase-3 und in apoptotischen Zellen konnte eine proteolytische Degradation von RFC1 durch aktivierte Caspasen nachgewiesen werden (Rheume et al., 1997; Ubeda und Habener, 1997). Dies kann jedoch als Ursache für die hier beobachtete Reduktion von RFC1 ausgeschlossen werden, da unter den gewählten Versuchsbedingungen in durchflußzytometrischen Messungen kein signifikanter Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen erkennbar war. Dies wurde zusätzlich durch Parallelansätze sichergestellt, in welchen eine gleichzeitige Inkubation der Zellen mit „STI-571“ und einem Caspasen-Inhibitor („z-VAD-FMK“) ebenfalls zu einer Reduktion von RFC1 führte. Da „STI-571“, neben einer Blockade der BCR-ABL^{p210}-Kinase, ebenfalls zu einer Inhibition der Kinaseaktivität von c-ABL, c-KIT und PDGFR führt, wäre denkbar, daß eine Reduktion des RFC1-Proteins nicht die direkte Folge einer Blockade der BCR-ABL^{p210}-Kinase ist, sondern auf einer Inhibition der genannten, strukturverwandten Kinasen beruht. Dies erscheint jedoch eher unwahrscheinlich, da eine Behandlung von BCR-ABL^{p210}-negativen Zellen mit „STI-571“ im Rahmen präklinischer Untersuchungen des Inhibitors nicht zu einer Veränderung der Proteinexpression von RFC1 geführt hat (Kindler et al., 2003). Damit konnte in dieser Arbeit interessanterweise eine deregulierte Proteinexpression von RFC1 bzw. mRFC1 in Abhängigkeit von einer Expression des BCR-ABL^{p210}-Onkogens sowohl in murinen und humanen Zelllinien, wie auch in primären, hämatopoetischen Stammzellen von CML-Patienten gezeigt werden. Desweiteren kann ein direkter, kausaler Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Proteinexpression von RFC1 und der Kinaseaktivität von BCR-ABL^{p210} in den humanen Zelllinien Mo7e und Mo7e BCR-ABL^{p210} postuliert werden.

Eine Frage, die sich aus der Beobachtung einer gesteigerten Proteinexpression von RFC1 in Abhängigkeit von BCR-ABL^{p210} ergab, war welche regulatorische Ebene der Genexpression von *RFC1* durch das BCR-ABL^{p210}-Onkogen beeinflusst wird und damit zu einer erhöhten Expression des RFC1-Proteins führt.

In einer Reihe von Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Expression des BCR-ABL^{p210}-Onkogens in primären Zellen von CML-Patienten, wie auch in verschiedenen murinen und humanen Zelllinien, zu einer transkriptionell veränderten Expression einer Vielzahl von Genen führt (Deininger et al., 2000b; Gesbert und Griffin, 2000; Deininger et al., 2001; Jena et al., 2002; Slupianek et al., 2001; Nowicki et al., 2003).

Sowohl die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung zur mRNA-Expression von *RFC1*, wie auch in der bisherigen Literatur bekannte Daten zur Expressionsregulation des Gens deuteten darauf hin, daß die primäre Regulationsebene der Expression des *RFC1*-Gens transkriptioneller Natur ist (Lu et al., 1993; Luckow et al., 1994; Lu und Riegel, 1994; van der Kuip, 1997; van der Kuip et al., 1999). Daher war es zunächst naheliegend, die mRNA-Expression von *RFC1* bzw. *mRFC1* in den humanen und murinen Zelllinien zu untersuchen, für die in dieser Arbeit eine gesteigerte Expression der entsprechenden Proteine in Abhängigkeit von einer Expression des BCR-ABL^{p210} Onkogens nachgewiesen wurde. Sowohl durch semiquantitative PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden, wie auch im Fall der murinen Zelllinien, durch eine Northern-Hybridisierung mit einer genspezifischen Sonde, konnte keine gesteigerte mRNA-Expression von *RFC1* bzw. *mRFC1* in BCR-ABL^{p210}-transfizierten murinen und humanen Zelllinien gezeigt werden (Abbildungen 3-12 und 3-13). Eine durch BCR-ABL^{p210} transkriptionell gesteigerte Expression der humanen bzw. murinen Gene in diesen Zelllinien kann daher ausgeschlossen werden.

Da eine erhöhte mRNA-Expression offenbar nicht ursächlich verantwortlich für eine gesteigerte Proteinexpression von *mRFC1* bzw. *RFC1* in den hier untersuchten Zelllinien ist und bisher keine experimentellen Daten zur Proteinhalbwertszeit von *RFC1* existieren, wurde in weiteren Versuchen die Proteinstabilität von *RFC1* in den humanen Zelllinien Mo7e und Mo7e BCR-ABL^{p210} untersucht. Dies erfolgte durch Western-Analysen des *RFC1*-Proteins zu festgelegten Zeitpunkten nach Inhibition der zellulären Translation durch Cycloheximid über einen Zeitraum von 8h bzw. 24h. In diesen

Experimenten zeigte sich eine deutlich erhöhte Stabilität des RFC1-Proteins in BCR-ABL^{p210}-transfizierten Zellen im Vergleich zur parentalen Zelllinie (Abbildungen 3-14 und 3-15). Damit konnte erstmals ein Einfluß von BCR-ABL^{p210} auf die Proteinstabilität von RFC1 auf posttranslatonaler Ebene gezeigt werden. Eine mögliche Ursache für diese gesteigerte Proteinstabilität von RFC1 in BCR-ABL^{p210}-positiven Zellen könnte in einer veränderten Prozessierung durch das „Ubiquitin-Proteasom“ System liegen. Hierbei handelt es sich um einen schrittweisen, hierarchischen Prozess, an dessen Ende die proteolytische Degradation polyubiquitinerter Proteine durch einen Multienzym-Komplex, das 26S-Proteasom, steht. Die Phosphorylierung definierter Aminosäuren von Proteinsubstraten stellt einen von zahlreichen möglichen Mechanismen der posttranslationalen Modifikation zur Kennzeichnung von Proteinen dar, die zum proteasomalen Abbau bestimmt sind. Gleichsam können jedoch posttranslationale Modifikationen einer Polyubiquitinierung von Proteinen und damit deren proteasomaler Degradation entgegenwirken, was eine erhöhte Stabilität der entsprechenden Proteine zur Folge hat (Ciechanover, 1998; Glickman und Ciechanover, 2001). Bisher liegen keine Erkenntnisse zum Einfluß posttranslationaler Modifikationen auf die Proteinstabilität von RFC1 vor. Jedoch ergeben sich Hinweise auf eine mögliche Phosphorylierung von RFC1 durch Copräzipitations-Experimente, wie auch die biochemische Isolation von hochmolekularen Proteinkomplexen in verschiedenen Zellzyklusphasen synchronisierter Zellen, in welchen eine Assoziation von RFC1 mit unterschiedlichen CDK/Cyclin-Komplexen nachgewiesen wurde (van der Kuip, 1997; van der Kuip et al., 1999; Frouin et al., 2002). Neuere Arbeiten zeigen erstmals funktionelle Konsequenzen einer Phosphorylierung von RFC1 durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs), die Rückschlüsse auf die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse zulassen. So konnte beispielsweise durch Munshi und Mitarbeiter (2003) in synchronisierten Zellen eine zunehmende Phosphorylierung von RFC1 *in vivo* nachgewiesen werden, welche in Zellen, die sich in der G2/M-Phase des Zellzyklus befanden, maximal war und zu einer Dissoziation von RFC1 aus dem RFC-Komplex führte. Desweiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die Phosphorylierung von RFC1 durch Cyclin-abhängige Kinasen, präferentiell durch den CDK1/Cyclin B-Kinasekomplex erfolgt und exklusiv RFC1, jedoch nicht die kleinen Untereinheiten des RFC-Komplexes (RFC2-5), betrifft. Obwohl bisher noch nicht experimentell

nachgewiesen, erscheint eine Degradation des RFC1-Proteins nach Dissoziation aus dem Komplex in der G2/M-Phase des Zellzyklus plausibel. Somit könnte eine verminderte bzw. veränderte Phosphorylierung von RFC1 nicht nur zu einer Stabilisierung von RFC1 selbst, sondern auch zur erhöhten Stabilität des gesamten RFC1-Komplexes beitragen. Indirekte Hinweise hierfür ergaben sich aus Untersuchungen zur Proteinstabilität einer kleinen Untereinheit (RFC4), die ebenfalls, wie RFC1, eine erhöhte Proteinstabilität in BCR-ABL^{p210}-transfizierten Zellen im Vergleich zu BCR-ABL^{p210}-negativen Zellen zeigte (Daten wurden nicht gezeigt).

Bereits in früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß eine Expression von BCR-ABL^{p210} zu einer veränderten posttranslationalen Stabilität verschiedener Proteinen führt und analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit, ließ sich ebenfalls in einigen dieser Untersuchungen ein direkter Bezug zur Tyrosinkinaseaktivität des Onkogens durch Inhibition der BCR-ABL^{p210}-Kinase mit dem Tyrosinkinaseinhibitor „STI-571“ herstellen (Gesbert et al., 2000; Jonuleit et al., 2000; Deutsch et al., 2001; Deutsch et al., 2003). In diesen Arbeiten führte die BCR-ABL^{p210}-Kinaseaktivität zu einer gesteigerten proteasomalen Degradation der Proteine, die durch einen spezifischen Inhibitor des 26S-Proteasoms (Lactacystin) blockiert werden konnte. Um der Frage nachzugehen, inwieweit das RFC1-Protein generell einer Degradation durch das 26S-Proteasom unterliegt bzw. die durch die BCR-ABL^{p210}-Kinase posttranslational erhöhte Stabilität des Proteins auf eine verminderte proteasomale Degradation zurückzuführen ist, wurden in dieser Arbeit verschiedene Versuche durchgeführt. So wurde die RFC1-Expression in der parentalen Zelllinie Mo7e nach Inhibition des 26S-Proteasoms mit Lactacystin, wie auch in der BCR-ABL^{p210}-transfizierte Zelllinie Mo7e BCR-ABL^{p210} nach Parallelinkubation mit „STI-571“ und Lactacystin, untersucht. In mehrfachen Versuchen konnten hierbei jedoch keine reproduzierbaren Ergebnisse generiert werden, so daß letztendlich zur Regulation der Proteinstabilität von RFC1, wie auch zum Mechanismus, der zur erhöhten Stabilität des RFC1-Proteins in Abhängigkeit von der BCR-ABL^{p210}-Kinaseaktivität führt, keine abschließende Aussage gemacht werden kann. Die oben aufgeführten Ergebnisse, sowie bekannte Daten zum Einfluß der BCR-ABL^{p210}-Kinase auf die Proteinstabilität einiger Proteine lassen allerdings vermuten, daß durch Aktivierung von BCR-ABL^{p210}-vermittelten Signalkaskaden möglicherweise eine

veränderte posttranslationale Modifikation von RFC1 vermittelt und damit der proteolytische Abbau des Proteins dereguliert bzw. verhindert wird.

4.3 Beeinflußt eine durch BCR-ABL^{p210} erhöhte Expression von RFC1 das Überleben von Zellen nach DNA-Schädigung ?

Die Expression des BCR-ABL^{p210}-Onkogens führt in einer Vielzahl von Zellen zu einer verminderten Sensitivität gegenüber zytotoxischen Stimuli, wie beispielsweise UV-Bestrahlung oder Behandlung der Zellen durch Zytostatika (Daley et al., 1992; Sirard et al., 1994; Bedi et al., 1994; Bedi et al., 1995). In einigen Untersuchungen wurde jedoch ebenfalls eine Hypersensitivität von BCR-ABL^{p210}-positiven Zellen gegenüber zytotoxischen Einflüssen demonstriert (Santucci et al., 1993; Albrecht et al., 1996). Bislang ist noch nicht vollständig aufgeklärt, wie diese unterschiedlichen Eigenschaften von BCR-ABL^{p210}-transformierten Zellen in Bezug auf verschiedenste zellschädigende Einflüsse erklärt werden können. In dieser Arbeit konnte eine erhöhte Proteinexpression von RFC1 in BCR-ABL^{p210}-transfizierten Zelllinien, wie auch primären Stammzellen von CML-Patienten gezeigt werden. Diese Ergebnisse erfuhr besonderes Interesse, durch eine Untersuchung, in der ein verbessertes Überleben von Zellen in Abhängigkeit von einer Interaktion des RFC1-Proteins mit dem Retinoblastoma-Protein (Rb) nach DNA-Schädigung durch UV-Bestrahlung, ionisierender Strahlung sowie DNA-schädigenden Zytostatika gezeigt werden konnte (Pennaneach et al., 2001). Daher erschien es möglich, daß eine posttranslational gesteigerte Proteinstabilität von RFC1 in den hier untersuchten BCR-ABL^{p210}-transfizierten Zellen ebenfalls zu einer erhöhten Resistenz der Zellen gegenüber einer DNA-Schädigung beiträgt. In dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen zur Sensitivität der Zelllinien Mo7e und Mo7e BCR-ABL^{p210}, für die eine veränderte Proteinexpression von RFC1 gezeigt wurde, gegenüber einer Schädigung der zellulären DNA durch UV-Strahlung, Etoposid oder Doxorubicin, ergaben jedoch ein heterogenes Bild. So zeigten BCR-ABL^{p210}-transfizierte Zellen hier im Vergleich zur parentalen Zelllinie Mo7e nach einer DNA-Schädigung durch UV-Bestrahlung einen deutlich reduzierten Anteil apoptotischer Zellen und damit einen resistenteren Phänotyp. Im Gegensatz hierzu waren BCR-ABL^{p210}-positive Zellen signifikant sensitiver gegenüber einer Behandlung mit Etoposid und Doxorubicin (Abbildungen 3-16 und 3-17). Bekanntermaßen beeinflusst BCR-ABL^{p210} die Expression, Aktivität und Interaktion

einer Vielzahl von Proteinen, die an der Reparatur, sowohl UV-induzierter DNA-Schäden, wie auch DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt sind. Entsprechend heterogen sind die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen bezüglich der Sensitivität BCR-ABL^{p210}-positiver Zellen gegenüber unterschiedliche DNA-Schäden. So zeigten beispielsweise Canitrot und Mitarbeiter (2003), daß die Sensitivität BCR-ABL^{p210}-transfizierter Zelllinien unter anderem abhängig vom jeweiligen zellulären Hintergrund zu sein scheint. In dieser Untersuchung waren BCR-ABL^{p210}-transfizierte, lymphoide Zellen vermehrt, myeloische Zellen jedoch weniger sensitiv gegenüber UV-Bestrahlung. Assoziiert mit diesen Sensitivitätsunterschieden war eine veränderte Interaktion eines, an der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) beteiligten Proteins (XPB, Xeroderma Pigmentosum Gruppe B), mit PCNA feststellbar. Gleichmaßen existieren heterogene Ergebnisse bezüglich der Sensitivität BCR-ABL^{p210}-positiver Zellen gegenüber DNA-Doppelstrangbrüchen. So konnten Slupianek und Mitarbeiter (2001) ein verbessertes Überleben BCR-ABL^{p210}-transfizierter Zellen nach Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen nachweisen. In dieser Untersuchung wurde die erhöhte Resistenz der BCR-ABL^{p210}-transformierten Zellen gegenüber DNA-Schäden auf eine verbesserte bzw. beschleunigte Reparatur durch homologe Rekombination, unter anderem vermittelt durch eine erhöhte Expression und Aktivität von RAD51, zurückgeführt. Im Gegensatz hierzu fanden Deutsch und Mitarbeiter (2001) eine erhöhte Sensitivität BCR-ABL^{p210}-positiver Zellen gegenüber DNA-Doppelstrangbrüchen, hervorgerufen durch ionisierende Strahlung. Hierfür wurde wiederum die verminderte Expression eines Proteins des NHEJ-(Non-homologous end joining) Reparaturwegs (DNA-PKcs, DNA-abhängige Proteinkinase) verantwortlich gemacht.

Somit können die detektierten Sensitivitätsunterschiede gegenüber dem Ansprechen auf zytotoxische Stimuli in BCR-ABL^{p210}-positiven Zellen nicht ausschließlich auf eine erhöhte Expression des RFC1-Proteins zurückgeführt werden. Zum jetzigen Zeitpunkt ist daher die Frage offen, ob ein Zusammenhang existiert, zwischen der posttranslational erhöhten Proteinstabilität von RFC1 in BCR-ABL^{p210}-positiven Zellen und der Sensitivität gegenüber DNA-Schädigung durch UV-Strahlung oder einer Behandlung durch Zytostatika. So scheiterten sowohl multiple Versuche der Etablierung einer stabilen, ektopischen Expression von RFC1 in der Zelllinie Mo7e, als auch Ansätze, im Rahmen eines Kooperationsprojektes, die Expression von RFC1 in BCR-

ABL^{p210}-transfizierten Zellen durch „Antisense“-Konstrukte zu verringern (Skorski, persönliche Kommunikation).

4.4 Eine stabile, ektopische Expression von *RFC1* in humanen Zellen führt zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber UV-Bestrahlung und DNA-schädigenden Zytostatika

Um mögliche Auswirkungen einer gesteigerten Expression von *RFC1* in humanen Zellen im Hinblick auf die Sensitivität der Zellen gegenüber verschiedenen zytotoxischen Stimuli, unabhängig von den pleiotropen Effekten des BCR-ABL^{p210}-Onkogens zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die Zelllinie HEK293 stabil transfiziert.

In Untersuchungen zur Sensitivität der transfizierten Zelllinien gegenüber einer DNA-Schädigung durch UV-Bestrahlung zeigten Zellen, die eine stabile, ektopische Expression von *RFC1* bzw. des N-terminal markierten Fusionsproteins „FLAG*RFC1*“ aufwiesen, überraschenderweise einen deutlich erhöhten Anteil apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrollzelllinie (Abbildung 3-19). Dieser UV-hypersensitive Phänotyp *RFC1*- bzw. „FLAG*RFC1*“-transfizierter Zellen konnte durch Inkubation der Zellen mit einem Caspasen-Inhibitor („z-VAD-FMK“) revertiert und damit nachgewiesen werden, daß es sich bei der gesteigerten Sensitivität der transfizierten Zellen, um Caspasen-vermittelte Apoptose nach DNA-Schädigung durch UV-Bestrahlung handelt (Abbildung 3-20).

Diese Beobachtung, daß eine stabile, ektopische Expression von *RFC1* in humanen Zellen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber UV-induzierten DNA-Schäden führt, ließ die Frage aufkommen, ob dieser Effekt auf eine direkte Schädigung der zellulären DNA zurückzuführen ist, oder gleichermaßen durch zytotoxische Substanzen ausgelöst werden kann, deren zelltoxische Wirkung nicht auf einer direkten Schädigung der DNA beruht. Um dem nachzugehen, wurden *RFC1*-transfizierte Zellen mit verschiedenen Zytostatika behandelt, die sich aufgrund ihrer Wirkmechanismen in zwei Gruppen aufteilen lassen. Zum einen Substanzen, die durch Inhibition DNA-modifizierender Enzyme zur Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen in der zellulären DNA führen. Zu dieser Wirkstoffklasse sind Etoposid und Doxorubicin, zwei Substanzen, deren zytotoxische Wirkung hauptsächlich auf einer Inhibition der zellulären Topoisomerase II beruht, zu zählen (Cummings und Smyth, 1993; Bromberg et al., 2003). Zum anderen

wurden zwei unterschiedliche Zytostatika gewählt, die keinen unmittelbaren Einfluß auf die DNA-Struktur nehmen, Staurosporin und Taxol. Während Staurosporin durch eine unspezifische Inhibition von Kinasen der Proteinkinase C-(PKC) Familie zum apoptotischen Zelltod führt, ist die Hauptwirkung von Taxol auf eine Stabilisierung von Mikrotubuli zurückzuführen und dies führt zunächst zu einer Mitoseblockade und schließlich zur Apoptose (Tamaoki et al., 1986; Yamaki et al., 2002; Jordan et al., 1993; Woods et al., 1995).

In diesen Untersuchungen zeigten Zelllinien, welche eine ektoische Expression von RFC1 aufwiesen, im Vergleich zur Kontrollzelllinie, eine erhöhte Sensitivität gegenüber den Zytostatika, deren zytotoxische Wirkung auf einer Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen beruht (Etoposid und Doxorubicin). Im Gegensatz hierzu führte eine Behandlung der Zelllinien mit Substanzen, deren zytotoxische Wirkung keine unmittelbare DNA-Schädigung hervorruft (Staurosporin und Taxol), in unterschiedlichem Ausmaß zur Induktion von Apoptose, jedoch zeigten hier *RFC1*-transfizierte Zelllinien keine signifikanten Sensitivitätsunterschiede im Vergleich zur Kontrollzelllinie (Abbildung 3-21).

Die Beobachtungen, daß eine ektoische Expression von RFC1 zu einer erhöhten Sensitivität, sowohl gegenüber UV-induzierten DNA-Schäden, als auch durch Zytostatika induzierte DNA-Doppelstrangbrüchen führt, waren einerseits neu und ließen sich andererseits nicht mit der Funktion von RFC1 als Teil des RFC-Komplexes im Rahmen der DNA-Reparatursynthese erklären. Eine funktionelle Störung des RFC-Komplexes durch die ektoisch gesteigerte Expression von RFC1, und damit der Reparatursynthese nach UV-induzierter DNA-Schädigung, ist nicht auszuschließen, jedoch ergeben sich hierfür keine Hinweise aus der bisherigen Literatur. Daher sollte in einem weiteren Versuch überprüft werden, ob eine erhöhte Expression von RFC1 möglicherweise mit den initialen Prozessen der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER), wie der Erkennung und Prozessierung von DNA-Schäden, interferiert. Die initiale Erkennung, Prozessierung und Exzision von UV-induzierten DNA-Schäden, wie Pyrimidin-Dimeren und (6-4) Photoaddukten, erfolgt in Säugerzellen durch Multiproteinkomplexe der Xeroderma Pigmentosum-Komplementationsgruppe (XP-Proteine, XPA-XPG). Die Reparatursynthese durch allgemeine Replikationsfaktoren, wie

den RFC-Komplex und PCNA, stellt einen der abschließenden Prozesse der NER nach erfolgter Exzision geschädigter DNA-Abschnitte dar (de Laat et al., 1999).

Zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen, die nach UV-Bestrahlung im Verlauf der NER entstehen, wurde in dieser Arbeit die alkalische Einzelzell-Gelelektrophorese („Comet-assay“) eingesetzt. Eine erhöhte Mobilität der zellulären DNA unter alkalischen Elektrophoresebedingungen nach UV-Bestrahlung kann zum Großteil auf Einzelstrangbrüche zurückgeführt werden, die bei der Prozessierung UV-induzierter DNA-Schäden durch die Aktivität spezifischer Endonukleasen beiderseits der Schadensstelle bedingt sind („Inzisions“-Schritt) (Collins, 2004). In diesem Versuch konnte gezeigt werden, daß eine erhöhte Expression von *RFC1*, auf die Initiation und Prozessierung von UV-induzierten DNA-Schäden im Verlauf der NER keinen Einfluß zu haben scheint, da sowohl *RFC1*-transfizierte Zellen, wie auch die Kontrollzellelinie 4h nach UV-Bestrahlung ein vergleichbares Maß an DNA-Mobilität aufwiesen (Abbildung 3-22). Die Ergebnisse dieser exemplarischen Untersuchung zu den initialen Schritten der NER, unter der Annahme, daß eine erhöhte Expression von *RFC1* nicht zu einer funktionellen Beeinträchtigung der DNA-Reparatursynthese im Rahmen der NER führt, legten die Vermutung nahe, daß die beobachtete Hypersensitivität *RFC1*-transfizierter Zellen gegenüber UV-induzierten DNA-Schäden nicht durch eine funktionelle Störung der NER bedingt ist.

Zellen reagieren bei einer Schädigung ihrer DNA durch Aktivierung einer Vielzahl interner Signalkaskaden („Checkpoints“), die unter anderem ein Fortschreiten des Zellzyklus verhindern. Damit wird ein Zeitfenster zur Reparatur von DNA-Schäden geschaffen und eine Konsequenz der Checkpoint-Aktivierung und der damit verbundenen Zellzyklusblockade ist eine verminderte zelluläre DNA-Syntheserate (Melo and Toczyski, 2002). Die Inaktivierung von Genen, die essentiell für die Initiierung und Vermittlung dieser Signalkaskaden sind, kann zu einer Verzögerung oder einem völligen Ausbleiben der Checkpoint-Aktivierung und hierdurch zu genetischer Instabilität, sowie einer erhöhten Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Einflüssen führen (Elledge 1996; Kastan und Bartek, 2004). Um zu prüfen, ob eine ektopische Expression von *RFC1* möglicherweise zu einer Störung der Checkpoint-Aktivierung und einer damit einhergehenden Blockade der DNA-Synthese nach DNA-Schädigung führt, wurde die BrdU-Inkorporation von *RFC1*-transfizierten Zellen, sowie der Kontrollzellelinie zu

definierten Zeitpunkten nach UV-Bestrahlung über einen Zeitraum von 12h ermittelt. In diesen Versuchen konnte eine Reduktion der BrdU-Inkorporation nach UV-Bestrahlung sowohl in *RFC1*-transfizierten Zellen, wie auch der Kontrollzelle innerhalb dieses Zeitraumes beobachtet werden. Obwohl damit eine Checkpoint-Aktivierung nach UV-induzierter DNA-Schädigung sowohl in Zellen mit ektopischer Expression von *RFC1* bzw. „*FLAGRFC1*“, als auch in der Kontrollzelle nachgewiesen werden konnte, war jedoch in diesen Experimenten eine zeitlich verzögerte Reduktion der DNA-Synthese in *RFC1*- bzw. „*FLAGRFC1*“-transfizierten Zellen feststellbar. So zeigten transfizierten Zellen 4h nach UV-Bestrahlung noch eine nachweisbare BrdU-Inkorporation, während die Kontrollzelle zu diesem Zeitpunkt bereits kaum mehr meßbare DNA-Syntheseaktivität aufwies. Dieser Effekt war in der „*FLAGRFC1*“-transfizierten Zelle am deutlichsten zu beobachten und in diesen Zellen konnte noch eine Inkorporation von BrdU selbst 8h nach UV-Bestrahlung nachgewiesen werden (Abbildung 3-23). Die Ergebnisse dieser Versuche weisen erstmals auf einen möglichen Mechanismus hin, der die erhöhte Sensitivität *RFC1*-transfizierter Zellen in Bezug auf eine DNA-Schädigung erklären könnte.

Eine Reihe von Untersuchungen zur Funktion der Untereinheiten des homologen RFC-Komplexes in *S. cerevisiae* und *S. pombe* ließen vermuten, daß den kleinen Untereinheiten des Komplexes (*RFC 2-5*), zusätzlich zu ihrer essentiellen Funktion bei der DNA-Replikation und Reparatur im Komplex mit *RFC1*, eine Bedeutung bei der Checkpoint-Aktivierung nach DNA-Schädigung zukommt (Sugimoto et al., 1996; Noskov et al., 1998; Shimomura et al., 1998; Shimada et al., 1999; Naiki et al., 2000). Diese Beobachtungen wurden durch die Isolierung und Charaktarisierung eines alternativen RFC-Komplexes in *S. cerevisiae* und *S. pombe* und schließlich in humanen Zellen bestätigt, welcher an der Aktivierung von Checkpoint Signalkaskaden nach Schädigung zellulärer DNA beteiligt ist (Green et al., 2000; Lindsey-Boltz et al., 2001; Kai et al., 2001). Der humane, Checkpoint-spezifische Komplex, hRad17-RFC, ist ein zum replikativen RFC-Komplex strukturell homologer heteropentamerer Proteinkomplex, der aus den Untereinheiten *RFC 2-5*, sowie hRad17 an Stelle von *RFC1* besteht. Für diesen Proteinkomplex konnte ebenfalls in humanen Zellen die Interaktion mit einem, strukturell zu PCNA ähnlichen, heterotrimeren Proteinkomplex (hRad9-hRad1-hHus1, „9-1-1“ Komplex) nachgewiesen werden (Rauen et al., 2000; Burtelow et al., 2001). Analog zur

Funktion des replikativen RFC-Komplexes als Beladungsfaktor für PCNA, konnte ebenfalls *in vitro* eine ATP-abhängige DNA-Beladung des „9-1-1“ Komplexes durch den hRad17-RFC Komplex gezeigt werden (Bermudez et al., 2003). Biochemische Untersuchungen zur DNA-Strukturspezifität des Checkpoint-Komplexes weisen jedoch auf eine präferentielle Bindung von hRad17-RFC an diskontinuierliche DNA-Strukturen (wie beispielsweise DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche) mit prozessierten 5'-Enden der DNA hin, wohingegen eine Beladung von PCNA durch den RFC Komplex an 3'-OH Enden von Primer/Template-Strukturen erfolgt (Ellison und Stillman, 2003). Die Lokalisation von hRad17-RFC und des „9-1-1“-Komplexes an Stellen geschädigter DNA begünstigt offensichtlich eine Sequestrierung und Aktivierung von Checkpoint-Kinasen (Zhou und Elledge, 2000; Melo und Toczyski, 2002). Nach einer DNA-Schädigung durch UV-Bestrahlung entstehen die erwähnten DNA-Strukturen, die eine Bindung des RFC-Komplexes, wie auch des hRad17-RFC-Komplexes ermöglichen, erst nach Prozessierung durch NER-Proteine. Somit wären auch die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen erklärbar, in welchen keine signifikante Störung der initialen Prozesse der NER nachweisbar war, sich jedoch Hinweise auf eine verzögerte Checkpoint-Aktivierung nach UV-Bestrahlung in RFC1-transfizierten Zellen ergaben.

Interessanterweise zeigte eine Untersuchung, in welcher RFC1, hRad17, sowie die RFC-Untereinheiten 2-5 parallel *in vitro* exprimiert wurden, eine Konkurrenz von RFC1 und hRad17 in Bezug auf die Bindung dieser Untereinheiten (Lindsey-Bolz et al., 2001). Bislang ist unklar, inwieweit eine solche Konkurrenz von RFC1 und hRad17 ebenfalls *in vivo* bei der Bildung der jeweiligen alternativen Komplexe mit den Untereinheiten RFC2-5 stattfindet, jedoch wäre vorstellbar, daß in den hier durchgeführten Untersuchungen eine ektopisch erhöhte Expression von RFC1 zu einer vermehrten Sequestrierung von RFC2-5 in den Replikations- und Reparaturkomplex auf Kosten der Bildung eines funktionellen hRad17-RFC Checkpoint-Komplexes führt und hierdurch zu einer deregulierten Checkpoint-Aktivierung beiträgt. Das Gesamtbild wird allerdings deutlich komplexer durch neuere Untersuchungen, in denen weitere, alternative RFC-Komplexe identifiziert wurden, die sich ebenfalls aus einer alternativen großen Untereinheit anstelle von RFC1, und den kleinen Untereinheiten RFC2-5, zusammensetzen. Die Funktion dieser weiteren, alternativen RFC-Komplexe ist bisher nur unzureichend

charakterisiert, jedoch weisen genetische Untersuchungen auf eine teilweise funktionelle Redundanz mit hRad17-RFC bei der Checkpoint-Aktivierung, wie auch auf zusätzliche Funktionen, wie der Ausbildung von Kohäsionskomplexen zwischen Schwesterchromatiden, hin (Naiki et al., 2001; Ben-Aroya et al., 2003; Majka und Burgers, 2004).

In dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, eine stabile, ektopische Expression von RFC1 in humanen Zellen zu etablieren. Damit verbunden konnte interessanterweise eine Hypersensitivität gegenüber UV-induzierten DNA-Schäden, sowie durch Zytostatika bedingten DNA-Doppelstrangbrüchen, wie auch Hinweise einer deregulierten Checkpoint-Aktivierung nach UV-Bestrahlung beobachtet werden. Aufgrund der Komplexität, sowie der teilweisen Redundanz der an der Checkpoint-Aktivierung und DNA-Reparatur in unterschiedlichen Zellzyklusphasen beteiligten Proteinkomplexe müssen detailliertere Untersuchungen zur Zusammensetzung der beschriebenen alternativen Proteinkomplexe (insbesondere der RFC- bzw. hRad17-RFC-Komplexe) in den hier generierten RFC1-überexprimierenden Zellen durchgeführt werden. Hierfür wurden sich beispielsweise Immunpräzipitationsexperimente anbieten, durch die eine potentiell veränderte Zusammensetzung der Proteinkomplexe mittels Western-Blot Analysen nachgewiesen werden könnte.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß eine veränderte Expression von *RFC1*, möglicherweise auch bedingt durch pathologische Mechanismen, wie in BCR-ABL^{p210}-positiven Zellen beobachtet, fundamentale Auswirkungen auf den „DNA-Stress-Response“ von Zellen haben kann.

4.5 Ausblick

Die Grundlage für weitergehende, funktionelle Untersuchungen zur Expressionsregulation von *RFC1* auf transkriptioneller Ebene wurde in dieser Arbeit durch die Determinierung der Transkriptionsstartstelle, der Klonierung des proximalen Promotorbereichs, sowie der Identifizierung potentieller Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen in der genomischen Region stromaufwärts des Transkriptionsstarts des Gens, gelegt. In einem nächsten Schritt sollten zunächst durch Reporteragen-Assays, cis-regulatorische Sequenzregionen, die an der Transkriptionsregulation von *RFC1* in verschiedenen Geweben, wie auch beim G0/G1-Zellzyklusübergang beteiligt sind,

identifiziert werden. Nach hinreichender Eingrenzung solcher Sequenzelemente können DNA-bindende Proteine durch die Kombination von „Band-shift“ bzw. „Super-shift“-Assays und der selektiven Mutation der identifizierten Sequenzabschnitte näher charakterisiert werden.

Desweiteren wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals Untersuchungen zur Proteinstabilität von RFC1 durchgeführt. In einer humanen Zelllinie zeigte das RFC1-Protein eine Halbwertszeit von etwa 4-6h, während die Stabilität des Proteins in Zellen, die das BCR-ABL^{p210}-Onkogen exprimieren, deutlich erhöht war. Zunächst sollte grundlegend geklärt werden, ob RFC1 einer proteasomalen Degradation unterliegt und möglicherweise durch Polyubiquitinierung modifiziert wird. Die Blockade der Aktivität des 26S-Proteasoms durch spezifische Inhibitoren, wie beispielsweise Lactacystin, sowie die Untersuchung einer Polyubiquitinierung von RFC1 nach Immunpräzipitation durch Western-Analysen stellen hierfür komplementäre, experimentelle Ansätze dar. Im Fokus weiterführender Untersuchungen sollte die Frage nach der Ursache für die posttranslational gesteigerte Proteinstabilität von RFC1 in BCR-ABL^{p210}-positiven Zellen stehen. Ursächlich hierfür könnten sowohl differentielle posttranslationale Modifikationen des Proteins, wie auch veränderte Protein-Protein Interaktionen von RFC1 in BCR-ABL^{p210}-positiven Zellen sein. Zur Untersuchung beider Fragestellungen würden sich sowohl Immunpräzipitations-Experimente, als auch die biochemische Isolierung RFC1-assoziiierter Proteinkomplexe in verschiedenen Zellzyklusphasen synchronisierter Zellen, beispielsweise durch Gelfiltration, eignen. Mit dieser Vorgehensweise ließe sich zusätzlich die nicht unbedeutende Frage klären, ob eine erhöhte Stabilität von RFC1 gleichzeitig zu einer Stabilisierung des gesamten RFC-Komplexes und damit zu einer Bindung der kleinen Untereinheiten des Komplexes (RFC 2-5) in BCR-ABL^{p210}-positiven Zellen führt.

Schließlich ist es in dieser Arbeit erstmals gelungen, eine stabile ektopische Expression von *RFC1* in einer humanen Zelllinie zu etablieren. Mit *RFC1*-transfizierte Zellen zeigten eine Hypersensitivität gegenüber UV-induzierten DNA-Schäden, wie auch durch Zytostatika hervorgerufenen DNA-Doppelstrangbrüchen und durch erste Untersuchungen ergaben sich Hinweise auf eine verzögerte Checkpoint-Aktivierung nach UV-Bestrahlung. Zur Verifikation dieser Beobachtungen sollte daher zunächst der zeitliche Verlauf der Aktivierung von Proteinen, die an der Checkpoint-Aktivierung nach

DNA-Schädigung beteiligt sind, in *RFC1*-transfizierten Zellen und Kontrollzellen durch Western-Analysen überprüft werden. Desweiteren sollte geklärt werden, ob die ektopische Expression von *RFC1* zu einer vermehrte Rekrutierung der kleinen Untereinheiten (RFC 2-5) in den RFC-Komplex und damit zu einer stöchiometrische Fehlverteilung auf Kosten alternativer Komplexe, insbesondere des hRad17-RFC Checkpoint-Komplexes, führt. Für vergleichende Untersuchungen der Zusammensetzung des RFC-Komplexes bzw. alternativer Komplexe würden sich wiederum Immunpräzipitations-Experimente, wie auch chromatographische Trennmethode (z.B. Affinitäts- oder Ausschlußchromatographie (Gelfiltration)) anbieten.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden allgemeine und funktionelle Untersuchungen zur großen Untereinheit des humanen Replikationsfaktors C (*RFC1*) durchgeführt. *RFC1* ist als Untereinheit des heteropentameren RFC-Komplexes essentiell an der ATP-abhängigen Beladung des Prozessivitätsfaktors PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) an 3'-Enden von Primer/Template-Strukturen im Rahmen der DNA-Replikation, wie auch an PCNA-vermittelten DNA-Reparaturprozessen beteiligt. Neben diesen gut charakterisierten Funktionen als essentieller DNA-Replikations- und Reparaturfaktor weisen vereinzelte Untersuchungen auf eine Funktion von *RFC1* als transkriptionellen Cofaktor hin, wobei jedoch die funktionelle Bedeutung dieser Beobachtungen in den meisten Fällen bisher nicht näher charakterisiert wurde.

Zu Beginn der Arbeit vorliegende Daten ließen auf eine primär transkriptionell regulierte Expression von *RFC1* schließen. Die Ergebnisse verschiedener Untersuchungen zur mRNA-Expression von *RFC1* bzw. des murinen *mRFC1*-Gens in unterschiedlichen Geweben waren jedoch heterogen und teilweise widersprüchlich. Eine, in dieser Arbeit durchgeführte, Hybridisierung eines kommerziellen Northern-Blots zeigte eine variable mRNA-Expression von *RFC1* in verschiedenen adulten humanen Geweben und das Ergebnis dieser Analyse fand sich wiederum nur teilweise in Einklang mit Untersuchungen anderer Gruppen.

Zu diesem Zeitpunkt waren keine Sequenzdaten des potentiellen Promotorbereiches bzw. der 5'-genomischen Region von *RFC1* bekannt. Desweiteren bestand Unklarheit bezüglich der Lokalisation der Transkriptionsstartstelle des Gens, da verfügbare, repräsentative cDNA-Sequenzen der NCBI-Datenbank von *RFC1* sowohl Sequenzunterschiede in der 5'-untranslatierten Region, als auch Divergenzen bezüglich der Ausdehnung dieses Bereiches zeigten. Zur initialen Charakterisierung des Promotorbereiches von *RFC1* und um eine Grundlage für weitergehende, funktionelle Untersuchungen der transkriptionellen Regulation des Gens zu schaffen, wurden daher einerseits die Transkriptionsstartstelle des Gens mittels 5'-RACE bestimmt, sowie andererseits genomische DNA-Klone isoliert, deren Sequenzen Teile des genomischen 5'-Bereichs von *RFC1* repräsentieren. Zur Identifikation potentieller cis-regulatorischer Sequenzelemente, die möglicherweise von Bedeutung für die transkriptionelle Regulation von *RFC1* sind, wurde schließlich ein genomischer Sequenzbereich von

653bp stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle des Gens einer Datenbankanalyse unterzogen.

Entsprechend diesen Untersuchungen erstreckt sich der 5'-untranslatierte Bereich der *RFC1*-mRNA über 137bp stromaufwärts des Startcodons und die hier ermittelte Sequenz der 5'-untranslatierten Region von *RFC1* ist in diesem Bereich identisch mit der Sequenz eines in dieser Arbeit isolierten genomischen Subklons wie auch der genomischen Referenzsequenz des NCBI. In der, mittels Datenbankanalyse untersuchten, genomischen Region konnten multiple, potentielle Bindungsstellen für allgemeine Transkriptionsfaktoren wie „SP1“, „NF-1“, „Oct-1“ und „c-Jun“ identifiziert werden. In dieser Analyse fand sich kein „TATA“-Box Sequenzelement stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle des Gens. Weitergehende funktionelle Untersuchungen des putativen Promotorbereiches von *RFC1* wurden bisher nicht durchgeführt.

Die BCR-ABL^{p210} Tyrosinkinase ist nach derzeitigem Kenntnisstand monokausal für die Entstehung der Chronisch myeloischen Leukämie (CML), einer malignen hämatopoetischen Erkrankung, welche durch Transformation einer multipotenten, hämatopoetischen Stammzelle entsteht, verantwortlich. Das BCR-ABL^{p210}-Onkogen führt, bedingt durch die konstitutive Tyrosinkinaseaktivität des Fusionsproteins, unter anderem zu einer veränderten Expression bzw. Aktivität von Genen, die an der zellulären Proliferation, sowie verschiedenen DNA-Reparaturprozessen beteiligt sind. Aufgrund der Tatsache, daß RFC1 in seiner Funktion als Untereinheit des RFC-Komplexes, nicht nur essentielle Bedeutung im Rahmen der DNA-Replikation, sondern auch der PCNA-vermittelten Reparatursynthese zukommt und darüber hinaus verschiedene Untersuchungen darauf hinweisen, daß speziell RFC1 eine besondere Bedeutung bei der Bildung, funktionellen Regulation und Stabilität des gesamten RFC-Komplexes zukommt, wurde in einem weiteren Teil der Arbeit die Expression von *RFC1*, sowie des murinen *mRFC1*-Gens, in Abhängigkeit von BCR-ABL^{p210} in verschiedenen zellulären Systemen untersucht.

In den, in dieser Arbeit verwendeten, BCR-ABL^{p210}-transfizierten humanen und murinen Zelllinien konnte interessanterweise im Vergleich zu nicht-transfizierten, parental Zelllinien jeweils reproduzierbar, eine 2-3fach gesteigerte Proteinexpression von RFC1 bzw. des murinen Proteins *mRFC1* nachgewiesen werden. Eine erhöhte Proteinexpression von RFC1 in Abhängigkeit von einer Expression des BCR-ABL^{p210}-

Onkogens war ebenfalls in primären Zellen nachweisbar. So zeigten primäre, hämatopoetische Vorläuferzellen von Patienten, welche an einer BCR-ABL^{p210}-positiven Chronisch myeloischen Leukämie (CML) erkrankt waren, im Vergleich zu Patienten, deren Erkrankungen in keinem Zusammenhang mit einer Expression von BCR-ABL^{p210} standen, ebenfalls eine gesteigerte Expression des RFC1-Proteins. Um sicherzustellen, daß es sich bei der erhöhten Proteinexpression von RFC1 nicht um einen unspezifischen Sekundäreffekt handelt, sondern eine direkte Konsequenz der Kinaseaktivität des Onkogens ist, wurde die Proteinexpression von RFC1 nach Blockade der BCR-ABL^{p210}-Kinase durch einen spezifischen Inhibitor („STI-571“) untersucht. Die Inkubation der humanen, BCR-ABL^{p210}-transfizierten Zelllinie mit „STI-571“ in unterschiedlichen Konzentrationen führte in unabhängigen Versuchen jeweils zu einer Reduktion des RFC1-Proteins. Somit konnte in diesen Zellen ein direkter, kausaler Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Proteinexpression von RFC1 und der Kinaseaktivität von BCR-ABL^{p210} nachgewiesen werden.

Weiterhin konnte in BCR-ABL^{p210}-transfizierten humanen und murinen Zelllinien durch semiquantitative PCR, wie auch im Fall der murinen Zelllinien, durch eine Northern-Hybridisierung, gezeigt werden, daß die erhöhte Proteinexpression von RFC1 bzw. mRFC1 in BCR-ABL^{p210}-transfizierten Zelllinien nicht auf eine gesteigerte mRNA-Expression der humanen bzw. murinen Gene zurückzuführen ist.

Da bisher keine experimentellen Daten zur Proteinhalbwertszeit von RFC1 existieren und sich keine Anhaltspunkte für eine transkriptionell erhöhte Expression von RFC1 in den BCR-ABL^{p210}-transfizierten Zelllinien zeigten, wurden vergleichende Untersuchungen zur Proteinstabilität von RFC1 in den humanen Zelllinien durchgeführt.

Zum einen zeigte sich nach Inhibition der zellulären Translation in Western-Analysen eine Halbwertszeit des RFC1-Proteins von etwa 4-6h und in dieser Arbeit wurden damit erstmals experimentelle Daten zur Proteinhalbwertszeit von RFC1 generiert. Zum anderen konnte in diesen Untersuchungen eine deutlich erhöhte Stabilität des RFC1-Proteins in BCR-ABL^{p210}-transfizierten Zellen im Vergleich zur parentalen Zelllinie beobachtet werden. Somit konnte nachgewiesen werden, daß der erhöhten Proteinexpression von RFC1 in BCR-ABL^{p210}-transfizierten, humanen Zellen offensichtlich eine posttranslational gesteigerte Proteinstabilität von RFC1 zugrunde liegt.

In der Arbeit wurden weiterhin Untersuchungen zur Sensitivität der humanen, BCR-ABL^{p210}-transfizierten Zelllinie, die eine gesteigerte Proteinexpression von RFC1 aufwies, im Vergleich zur parentalen, BCR-ABL^{p210}-negativen Zelllinie, hinsichtlich einer DNA-Schädigung durch UV-Strahlung, sowie den Zytostatika Etoposid und Doxorubicin durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen ergaben ein heterogenes Bild. So zeigten BCR-ABL^{p210}-transfizierte Zellen hier im Vergleich zur parentalen Zelllinie nach einer DNA-Schädigung durch UV-Bestrahlung einen deutlich reduzierten Anteil apoptotischer Zellen und damit einen resistenteren Phänotyp. Im Gegensatz hierzu waren BCR-ABL^{p210}-positive Zellen signifikant sensitiver gegenüber einer Behandlung mit Etoposid und Doxorubicin.

Um die Auswirkungen einer gesteigerten Expression von RFC1 unabhängig vom Einfluß der BCR-ABL^{p210}-Kinase im Hinblick auf die Sensitivität gegenüber verschiedenen zytotoxischen Stimuli zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit eine humane Zelllinie (HEK293) mit RFC1 bzw. einem N-terminalen Fusionsprotein „FLAGRFC1“ stabil transfiziert. Zellen, die eine stabile, ektopische Expression von RFC1 bzw. des Fusionsproteins aufwiesen, zeigten interessanterweise im Vergleich zu Kontrollzellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber einer DNA-Schädigung durch UV-Bestrahlung, sowie einer Behandlung mit den DNA-schädigenden Zytostatika Doxorubicin und Etoposid. Im Gegensatz hierzu waren *RFC1*-transfizierte Zellen nicht signifikant sensitiver gegenüber den Zytostatika Staurosporin und Taxol, deren zytotoxische Wirkung nicht auf einer direkten DNA-Schädigung beruht.

Schließlich zeigten weitere Versuchen, daß eine erhöhte Expression von *RFC1*, auf die Initiation und Prozessierung von UV-induzierten DNA-Schäden im Verlauf der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) keinen Einfluß zu haben scheint, jedoch ergaben sich in *RFC1*-transfizierten Zellen erste Hinweise auf eine verzögerte Checkpoint-Aktivierung nach einer DNA-Schädigung durch UV-Bestrahlung als mögliche Ursache für die beobachtete Hypersensitivität dieser Zellen gegenüber DNA-schädigenden Stimuli.

6 Literaturverzeichnis

Abelson, H.T., Rabstein, L.S. (1970). Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Res.* 30: 2213-2222

Ahuja, H., Bar-Eli, M., Advani, S.H., Benchimol, S., Cline, M.J. (1989). Alterations in the p53 gene and the clonal evolution of the blast crisis of chronic myelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6783-6787

Albrecht, T., Schwab, R., Henkes, M., Peschel, C., Huber, C. and Aulitzky, W.E. (1996). Primary proliferating immature myeloid cells from CML patients are not resistant to induction of apoptosis by DNA damage and growth factor withdrawal. *Br. J. Hematol.* 95: 501-507

Alwine, J.C., Kemp, D.J. and Stark, G.R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5350-5354

Amarante Mendes, G.P., Naekyung, K.C., Liu, L., Huang, Y., Perkins, C.L., Green, D.R. and Bhalla, K. (1998). Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3. *Blood* 91: 1700-1705

Anderson, L.A. and Perkins, N.D. (2002). The large subunit of Replication factor C interacts with the Histone deacetylase, HDAC1. *J. Biol. Chem.* 277: 29550-29554

Anderson, L.A. and Perkins, N.D. (2003). Regulation of RelA (p65) function by the large subunit of Replication factor C. *Mol. Cell. Biol.* 23: 721-732

Araujo, S.J., Tirode, F., Coin, F., Pospiech, H., Syväoja, J.E., Stucki, M., Hübscher, U., Egly, J-M. and Wood, R.D. (2000). Nucleotide excision repair of DNA with recombinant human proteins: definition of the minimal set of factors, active forms of TFIIH, and modulation by CAK. *Genes Dev.* 14: 349-359

Arnaudeau, C., Rozier, L., Cazaux, C., Defais, M., Jenssen, D. and Helleday, T. (2001). RAD51 supports spontaneous non-homologous recombination in mammalian cells, but not the corresponding process induced by topoisomerase inhibitors. *Nucl. Acids Res.* 29: 662-667

Bartram, C.R., de Klein, A., Hagemeijer, A., van Agthoven, T., van Kessel, A.G., Bootsma, D., Grosveld, G., Ferguson Smith, M.A., Davies, T., Stone, M., Heisterkamp, N., Stephenson, J.R. and Groffen, J. (1983). Translocation of *c-abl* oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. *Nature* 306: 277-280

- Bedi, A., Barber, J.P., Bedi, G.C., el-Deiry, W.S., Sidransky, D., Vala, M.S., Akhtar, A.J., Hilton, J. and Jones, R.J. (1995). BCR-ABL mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood* 86: 1148-1158
- Bedi, A., Zehnbauer, B.A., Barber, J.P., Sharkis, S.J., Jones, R.J. (1994). Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood* 83: 2038-2044
- Ben Neriah, Y., Daley, G.Q., Mes Masson, A.M., Witte, O.N. and Baltimore, D. (1986). The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science* 233: 212-214
- Ben-Aroya, S., Koren, A., Batia, L., Steinlauf, R. and Kupiec, M. (2003). ELG1, a yeast gene required for genome stability forms a complex related to Replication factor C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 9906-9911
- Bennett, J.H. (1845). Case of hypertrophy of the spleen and liver, in which death took place from suppuration of the blood. *Edinburgh Med. Surg. J.* 64: 413-423
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H., Sultan, C. and Cox, C. (1994). The chronic myeloid leukemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukemia. Proposals by the French-American-British Cooperative Leukemia Group. *Br. J. Hematol.* 87: 746-754
- Bermudez, V.P., Lindsey-Boltz, L.A., Cesare, A.J., Maniwa, Y., Griffith, J.D., Hurwitz, J. and Sancar, A. (2003). Loading of the human 9-1-1 checkpoint complex onto DNA by the checkpoint clamp loader hRad17-replication factor C complex *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 1633-1638
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1523
- Bittner, M., Kupferer, P., Morris, C.F. (1980). Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. *Anal. Biochem.* 192: 459-471
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254

- Bresser, J. and Gillespie, D. (1983). Quantitative binding of covalently closed circular DNA to nitrocellulose in NaI. *Anal. Biochem.* 129: 357-364
- Bromberg, K.D., Burgin, A.B. and Osheroff, N. (2003). A two-drug model for etoposide action against human topoisomerase II α . *J. Biol. Chem.* 278: 7406-7412
- Bunz, F., Kobayashi, R. and Stillman, B. (1993). cDNAs encoding the large subunit of human replication factor C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11014-11018
- Burbelo, P.D., Utani, A., Pan, Z.Q. and Yamada, Y. (1993). Cloning of the large subunit of activator 1 (replication factor C) reveals homology with bacterial DNA ligases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11543-11547
- Burgers, P.M. (1991). *Saccharomyces cerevisiae* Replication factor C. II. Formation and activity of complexes with the proliferating cell nuclear antigen and with DNA polymerases delta and epsilon. *J. Biol. Chem.* 266: 22698-22706
- Burke, T.W. and Kadonaga, J.T. (1996). *Drosophila* TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev.* 10: 711-724
- Burke, T.W. and Kadonaga, J.T. (1997). The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAF_i60 of *Drosophila*. *Genes Dev.* 11: 3020-3031
- Burke, T.W., Willy, P.J., Kutach, A.K., Butler, J.E. and Kadonaga, J.T. (1998). The DPE, a conserved downstream core promoter element that is functionally analogous to the TATA box. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 63 : 75-82
- Burley, S.K. and Roeder, R.G. (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem* 65: 769-799
- Burtelow, M.A., Roos-Mattjus, P.M.K., Rauen, M.A., Babendure, J.R. and Karnitz, L.M. (2000). Reconstitution and molecular analysis of the hRad9-hHus1-hRad1 (9-1-1) DNA damage responsive checkpoint complex. *J. Biol. Chem.* 276: 25903-25909
- Canitrot, Y., Falinski, R., Louat, T., Laurent, G., Cazaux, C., Hoffmann, J-S., Lautier, D. and Skorski, T. (2003). P210 BCR/ABL kinase regulates Nucleotide excision repair (NER) and resistance to UV irradiation. *Blood* 102: 2632-2637

- Canitrot, Y., Lautier, D., Laurent, G., Frechet, M., Ahmed, A., Turhan, A.G., Salles, B., Cazaux, C. and Hoffmann, J.S. (1999). Mutator phenotype of BCR-ABL transfected Ba/F3 cell lines and its association with enhanced expression of DNA polymerase β . *Oncogene* 18: 2676-2680
- Cartwright, R.A., Alexander, F.E., McKinney, P.A. and Ricketts, T.J. (1991). Leukemia Research Fund data collection survey: descriptive epidemiology of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 5: 138-141
- Chai, S.K., Nichols, G.L., Rothman, P. (1997). Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J Immunol.* 159: 4720-4728
- Chen, M., Pan, Z.Q. and Hurwitz, J. (1992a). Sequence and expression in *Escherichia coli* of the 40-kDa subunit of activator 1 (replication factor C) of HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2516-2520
- Chen, M., Pan, Z.Q. and Hurwitz, J. (1992b). Studies of the cloned 37-kDa subunit of activator 1 (replication factor C) of HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5211-5215
- Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 17: 7151-7160
- Collins, A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnology* 26: 249-261
- Collins, A.R., Dobson, V.L., Dusinska, M., Kennedy, G., Stetina, R. (1997). The comet assay: what can it really tell us ? *Mutat. Res.* 375: 183-193
- Cullmann, G., Fien, K., Kobayashi, R. and Stillman, B. (1995). Characterisation of the five Replication factor C genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 15: 4661-4671
- Cummings J. and Smyth, J.F. (1993). DNA topoisomerase I and II as targets for rationale design of new anticancer drugs. *Ann Oncol.* 4: 533-543
- Daley, G.Q., Baltimore, D. (1992). Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210^{bcr/abl} protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9312-9316
- de Groot, R.P., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., Jove, R., Koenderman, L. (1999). STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells. *Blood* 94: 1108-1112

de Klein, A., van Kessel, A.G., Grosveld, G., Bartram, C.R., Hagemeijer, A., Bootsma, D., Spurr, N.K., Heisterkamp, N., Groffen, J. and Stephenson J.R. (1982). A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. *Nature* 300: 765-767

de Laat, W.L., Jaspers, N.G.J. and Hoeijmakers, J.H.J. (1999). Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 13: 768-785

Deininger, M.W.N., Goldman, J.M. and Melo, J.V. (2000a). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96: 3343-3356

Deininger, M.W.N., Vieira, S., Mendiola, R., Schultheis, B., Goldman, J.M. and Melo, J.V. (2000b). BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of Chronic myeloid leukemia. *Cancer Res.* 60: 2049-2055

Deininger, M.W.N., Vieira, S.A.D., Parada, Y., Banerji, L., Lam, E.W-F., Peters, G., Mahon, F-X., Köhler, T., Goldman, J.M. and Melo, J.V. (2001). Direct relation between BCR-ABL tyrosine kinase activity and Cyclin D2 expression in lymphoblasts. *Cancer Res.* 61: 8005-8013

Denhardt, D.T. (1996). Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem. J.* 318: 729-747

Deutsch, E., Dugray, A., Karim, B.A., Marangoni, E., Maggiorella, L., Vaganay, S., M'Kacher, R., Rasy, S.D., Eschwege, F., Vainchenker, W., Turhan, A.G. and Bourhis, J. (2001). BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKcs. *Blood* 97: 2084-2090

Deutsch, E., Jarousse, S., Buet, D., Dugray, A., Bonnet, M-L., Vozenin-Brottons, M-C., Guilhot, F., Turhan, A.G., Feunteun, J. and Bourhis, J. (2003). Down-regulation of BRCA1 in BCR-ABL-expressing hematopoietic cells. *Blood* 101: 4583-4588

Diekmann, D., Brill, S., Garrett, M.D., Totty, N., Hsuan, J., Monfries, C., Hall, C., Lim, L., and Hall, A. (1991). Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature* 351: 400-402

Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. and Roeder, R.G. (1983). Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl. Acids Res.* 11: 1475-1489

Druker, B.J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G.M., Fanning, S., Zimmermann, J. and Lydon, N.B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat. Med.* 2: 561-566

Dubrez, L., Eymin, B., Sordet, O., Droin, N., Turhan, A.G., Solary, E. (1998). BCR-ABL delays apoptosis upstream of procaspase-3 activation. *Blood* 91: 2415-2422

Dusserre, Y. and Mermod, N. (1992). Purified cofactors and histone H1 mediate transcriptional regulation by CTF/NF-I. *Mol. Cell. Biol.* 12: 5228-5237

Elledge, S.J. (1996). Cell cycle checkpoints: Preventing an identity crisis. *Science* 274: 1664-1672

Ellison, V. and Stillman, B. (1998). Reconstitution of recombinant human Replication factor C (RFC) and identification of an RFC subcomplex possessing DNA-dependent ATPase activity. *J. Biol. Chem.* 273: 5979-5987

Ellison, V. and Stillman, B. (2003). Biochemical characterization of DNA damage checkpoint complexes: Clamp loader and clamp complexes with specificity for 5' recessed DNA. *PLoS Biology* 1: 231-243

Emami, K.H., Burke, T.W. and Smale, S.T. (1998). Sp1 activation of a TATA-less promoter requires a species-specific interaction involving transcription factor IID. *Nucl. Acids Res.* 26: 839-846

Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., Kantarjian, H.M. (1999). The biology of chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 341: 164-172

Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13

Fotedar, R., Mossi, R., Fitzgerald, P., Rousselle, T., Maga, G., Brickner, H., Messier, H., Kasibhatla, S., Hübscher, U. and Fotedar, A. (1996). A conserved domain of the large subunit of Replication factor C binds PCNA and acts like a dominant negative inhibitor of DNA replication in mammalian cells. *EMBO J.* 15: 4423-4433

Frouin, I., Montecucco, A., Biamonti, G., Hübscher, U., Spadari, S. and Maga, G. (2002). Cell cycle-dependent dynamic association of cyclin/Cdk complexes with human DNA replication proteins. *EMBO J.* 21: 2485-2495

Gambacorti-Passerini, C., le Coutre, P., Mologni, L., Fanelli, M., Bertazzoli, C., Marchesi, E., Di Nicola, M., Biondi, A., Corneo, G.M., Belotti, D., Pogliani, E. and Lydon, N.B. (1997). Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. *Blood Cells Mol Dis.* 23: 380-394

Garcia, S.I., Zanca, M.D. (1997). Regulation of Bcl-2 gene expression by BCR-ABL is mediated by Ras. *J Mol Biol.* 267: 225-228

Gary Schmidt, S.L., Gomes, X.V. and Burgers, P.M.J. (2001). ATP utilization by yeast Replication factor C. III. The ATP-binding domains of Rfc2, Rfc3 and Rfc4 are essential for DNA recognition and clamp loading. *J. Biol. Chem.* 276: 34784-34791

Gary, S. and Burgers, M.J. (1995). Identification of the fifth subunit of *Saccharomyces cerevisiae* Replication factor C. *Nucl. Acids Res.* 23: 4986-4991

Gesbert, F. and Griffin, J.D. (2000). Bcr/Abl activates transcription of the *Bcl-X* gene through STAT5. *Blood* 96: 2269-2276

Gesbert, F., Sellers, W.R., Signoretti, S., Loda, M. and Griffin, J.D. (2000). BCR/ABL regulates expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1} through the Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT pathway. *J. Biol. Chem.* 275: 39223-39230

Glickman, M.H. and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev* 82: 373-428

Goldman, J.M. (2000). Tyrosine-kinase inhibition in treatment of chronic myeloid leukemia. *Lancet* 355: 1031-1032

Gomes, X.V. and Burgers, P.M.J. (2001). ATP utilization by yeast Replication factor C. I. ATP mediated interaction with DNA and with Proliferating cell nuclear antigen. *J. Biol. Chem.* 276: 34768-34775

Gomes, X.V., Gary Schmidt, S.L. and Burgers, P.M.J. (2001). ATP utilization by yeast Replication factor C. II. Multiple stepwise ATP binding events are required to load Proliferating cell nuclear antigen onto primed DNA. *J. Biol. Chem.* 276: 34776-34783

Green, C.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Lowndes, N.F. (2000). A novel Rad24 checkpoint protein complex closely related to Replication factor C. *Curr. Biol.* 10: 39-42

Groffen, J., Stephenson, J.R., Heisterkamp, N., de Klein, A., Bartram, C.R., Grosveld, G. (1984). Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 36: 93-99

Groves, F.D., Linet, M.S. and Devesa, S.S. (1995). Patterns of occurrence of the leukemias. *Eur. J. Cancer* 31A: 941-949

Haque, S.J., van der Kuip, H., Kumar, A., Aulitzky, W.E., Rutherford, M.N., Huber, C., Fischer, T., Williams, B.R.G. (1996). Overexpression of mouse p140 subunit of Replication factor C accelerates cellular proliferation. *Cell Growth Diff.* 7: 319-326

Hehlmann, R., Heimpel, H., Hasford, J., Kolb, H.J., Pralle, H., Hossfeld, D.K., Queisser, W., Löffler, H., Hochhaus, A., Heinze, B., Georgii, A., Bartram, C.R., Griesshammer, M., Bergmann, L., Essers, U., Falge, C., Queisser, U., Meyer, P., Schmitz, N., Eimermacher, H., Walther, F., Fett, W., Kleeberg, U.R., Käbisch, A., Nerl, C., Zimmermann, R., Meuret, G., Tichelli, A., Kanz, L., Tigges, F.J., Schmid, L., Brockhaus, W., Tobler, A., Reiter, A., Perker, M., Emmerich, B., Verpoort, K., Zankovich, R., Wussow, P.V., Prümmer, O., Thiele, J., Buhr, T., Carbonell, F., Ansari, H., and the German CML Study Group. (1994). Randomized comparison of interferon alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood* 84: 4046-4077

Hernandez, N. (1993). TBP, a universal eukaryotic transcription factor ? *Genes Dev.* 7: 1291-1308

Hingorani, M.M. and Coman, M.M. (2002). On the specificity of interaction between the *Saccharomyces cerevisiae* clamp loader Replication factor C and primed DNA templates during DNA replication. *J. Biol. Chem.* 277: 47213-47224

Holmes, A.M. and Haber, J.E. (1999). Double-strand break repair in yeast requires both leading and lagging strand DNA polymerases. *Cell* 96: 415-424

Horita, M., Andreu, E.J., Benito, A., Arbona, C., Sanz, C., Benet, I., Prosper, F. and Fernandez-Luna, J.L. (2000). Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J. Exp. Med.* 191: 977-984

Ilaria, R.L., van Etten, R.A. (1996). P210 and P190 (BCR/ABL) induce tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J. Biol. Chem.* 271: 31704-31710

Janson, L. and Pettersson, U. (1990). Cooperative interactions between transcription factors Sp1 and OTF-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4732-4736

Jena, N., Deng, M., Sicinska, E., Sicinski, P. and Daley, G.Q. (2002). Critical role for Cyclin D2 in BCR/ABL-induced proliferation of hematopoietic cells. *Cancer Res.* 62: 535-541

Jeruzalmi, D., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. (2002). Clamp loaders and sliding clamps. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 217-224

Jonuleit, T., Peschel, C., Schwab, R., van der Kuip, H., Buchdunger, E., Fischer, T., Huber, C. and Aulitzky, W.E. (1998). Bcr-Abl kinase promotes cell cycle entry of primary myeloid cells in the absence of growth factors. *Br. J. Hematol.* 100: 295-303

Jonuleit, T., van der Kuip, H., Miething, C., Michels, H., Hallek, M., Duyster, J. and Aulitzky, W.E. (2000). Bcr-Abl kinase down-regulates cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in human and murine cell lines. *Blood* 96: 1933-1939

Jordan, M.A., Toso, R.J., Thrower, D. and Wilson, L. (1993). Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by Taxol at low concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 9552-9556

Kai, M., Tanaka, H. and Wang, T.S.F (2001). Fission yeast Rad17 associates with chromatin in response to aberrant genomic structures. *Mol. Cell. Biol.* 21: 3289-3301

Kastan, M.B. and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432: 316-323

Kim, T.K. and Roeder, R.G. (1994). Proline-rich activator CTF1 targets the TFIIB assembly step during transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4170-4174

Kindler, T., Breitenbuecher, F., Kasper, S., Stevens, T., Carius, B., Gschaidmeier, H., Huber, C. and Fischer, T. (2003). In BCR-ABL-positive cells, STAT-5 tyrosine-phosphorylation integrates signals induced by imatinib mesylate and Ara-C. *Leukemia* 17: 999-1009

Konopka, J.B., Watanabe, S.M., Witte, O.N. (1984). An alteration of the human c-Abl protein in K562 leukemia cells unmask associated tyrosine kinase activity. *Cell* 37: 1035-1042

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Laurent, E., Talpaz, M., Kantarjian, H. and Kurzrock, R. (2001). The *BCR* gene and Philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res.* 61: 2343-2355

LeBowitz, J.H., Kobayashi, T., Staudt, L., Baltimore, D. and Sharp, P.A. (1988). Octamer-binding proteins from B or HeLa cells stimulate transcription of the immunoglobulin heavy-chain promoter in vitro. *Genes Dev.* 2: 1227-1237

Lee, S.H., Kwong, A.D., Pan, Z.Q., Hurwitz, J. (1991). Studies on the activator 1 protein complex, an accessory factor for proliferating nuclear antigen-dependent DNA polymerase delta. *J. Biol. Chem.* 266: 594-602

Lee, S.J. (2000). Chronic myelogenous leukemia. *Br. J. Hematol.* 111: 993-1009

Lewis, J.M., Schwartz, M.A. (1998). Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by c-Abl. *J. Biol. Chem.* 273: 14225-14230

Li, S., Ilaria, R.L., Million, R.P., Daley, G.Q. and van Etten, R.A. (1999). The p190, p210 and the p230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *J. Exp. Med.* 189: 1399-1412

Li, X. and Burgers, P.M. (1994a). Cloning and characterisation of the essential *Saccharomyces cerevisiae* RFC4 gene encoding the 37-kDa subunit of Replication factor C. *J. Biol. Chem.* 269: 21880-21884

Li, X. and Burgers, P.M. (1994b). Molecular cloning and expression of the *Saccharomyces cerevisiae* RFC3 gene, an essential component of Replication factor C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 868-872

Lindsey-Boltz, L.A., Bermudez, V.P., Hurwitz, J. and Sancar, A. (2001). Purification and characterization of human DNA damage checkpoint Rad complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11236-11241

Lu, Y. and Riegel, A.T. (1994). The human DNA-binding protein, PO-GA, is homologous to the large subunit of mouse Replication factor C. Regulation by alternate 3' processing of mRNA. *Gene* 145: 261-265

Lu, Y., Zeft, A.S. and Riegel, A.T. (1993). Cloning and expression of a novel human DNA binding protein, PO-GA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193: 779-786

Luckow, B., Bunz, F., Stillman, B., Lichter, P. and Schütz, G. (1994). Cloning, expression and chromosomal localisation of the 140-kilodalton subunit of Replication factor C from mice and humans. *Mol. Cell. Biol.* 14: 1626-1634

- Maga, G., Mossi, R., Fischer, R., Berchtold, M.W. and Hübscher, U. (1997). Phosphorylation of the PCNA binding domain of the large subunit of Replication factor C by Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Protein kinase II inhibits DNA synthesis. *Biochemistry* 36: 5300-5310
- Majka, J. and Burgers, P.M.J. (2004). The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. *Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.* 78: 227-260
- Martinez, E., Chiang, M., Ge, H. and Roeder, R.G. (1994). TATA-binding protein-associated factor(s) in TFIID function through the initiator to direct basal transcription from TATA-less class II promoter. *EMBO J.* 13: 3115-3126
- Matsumoto, Y., Kim, K., Hurwitz, J., Gary, R., Levin, D.S., Tomkinson, A.E. and Park, M.S. (1999). Reconstitution of proliferating cell nuclear antigen-dependent repair of apurinic/apyrimidinic sites with purified human proteins. *J. Biol. Chem.* 274: 33703-33708
- McWirther, J.R., Galasso, D.L. and Wang, J.Y. (1993). A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol. Cell. Biol.* 13: 7587-7595
- McWirther, J.R., Wang, J.Y. (1991). Activation of tyrosine kinase and microfilament-binding functions of c-abl by bcr sequences in bcr/abl fusion proteins. *Mol. Cell. Biol.* 11: 1553-1565
- Melo, J. and Toczyski, D. (2002). A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr. Opin Cell Biol.* 14: 237-245
- Melo, J.V., Myint, H., Galton, D.A., Goldman, J.M. (1994). P190BCR-ABL chronic myeloid leukemia: the missing link with chronic myelomonocytic leukemia ? *Leukemia* 8: 208-211
- Mitchell, P.J. and Tjian, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* 245: 371-378
- Mossi, R. and Hübscher, U. (1998). Clamping down on clamps and clamp loaders. *Eur. J. Biochem.* 254: 209-216
- Mullis, K.B., Faloona, F., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Horn, G., Erlich, H.A. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273

- Munshi, A., Cannella, D., Brickner, H., Salles-Passador, I., Podust, V., Fotedar, R. and Fotedar, A. (2003). Cell cycle-dependent phosphorylation of the large subunit of Replication factor C (RF-C) leads to its dissociation from the RF-C Complex. *J. Biol. Chem.* 278: 48467-48473
- Naiki, T., Kondo, T., Nakada, D., Matsumoto, K. and Sugimoto, K. (2001). Chl12 (Ctf18) forms a novel Replication factor C-related complex and functions redundantly with Rad24 in the DNA replication checkpoint pathway. *Mol. Cell. Biol.* 21: 5838-5845
- Naiki, T., Shimomura, T., Kondo, T., Matsumoto, K. and Sugimoto, K. (2000). Rfc5, in cooperation with Rad24, controls DNA damage checkpoints throughout the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 20: 5888-5896
- Nilamani, J., Ming, D., Sicinska, E., Sicinski, P. and Daley, G.Q. (2002). Critical role for Cyclin D2 in BCR/ABL-induced proliferation of hematopoietic cells. *Cancer Res.* 62: 535-541
- Nishii, K., Kabarowski, J.H., Gibbons, D.L., Griffiths, S.D., Titley, I., Wiedemann, L.M. and Greaves, M.F. (1996). Ts BCR-ABL kinase activation confers increased resistance to genotoxic damage via cell cycle block. *Oncogene* 13: 2225-2234
- Noskov, V., Maki, S., Kawasaki, Y., Leem, S.H., Ono, B., Araki, H., Pavlov, Y. and Sugino, A. (1994). The RFC2 gene encoding a subunit of Replication factor C of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.* 22: 1527-1535
- Noskov, V.N., Araki, H. and Sugino, A. (1998). The RFC2 gene, encoding the third-largest subunit of the Replication factor C complex, is required for an S-phase checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 18: 4914-4923
- Nowell, P.C. and Hungerford, D.A. (1960). A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* 132: 1497-1501
- Nowicki, M.O., Pawlowski, P., Fischer, T., Hess, G., Pawlowski, T. and Skorski, T. (2003). Chronic myelogenous leukemia molecular signature. *Oncogene* 22: 3952-3963
- Obrig, T.G., Culp, W.J., McKeehan, W.L. and Hardesty, B. (1971). The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J. Biol. Chem.* 246: 174-181

Pane, F., Frigeri, F., Sindona, M., Luciano, L., Ferrara, F., Cimino, R., Meloni, G., Saglio, G., Salvatore, F., Rotoli, B. (1996). Neutrophilic chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* 88: 2410-2414

Pascucci, B., Stucki, M., Jonsson, Z.O., Dogliotti, E. and Hübscher, U. (1999). Long patch base excision repair with purified human proteins. *J. Biol. Chem.* 274: 33696-33702

Pendergast, A.M., Quilliam, L.A., Cripe, L.D., Bassing, C.H., Dai, Z., Li, N., Batzer, A., Rabun, K.M., Der, C.J. and Schlessinger, J. (1993). BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 75: 175-185

Pennaneach, V., Salles-Passador, I., Munshi, A., Brickner, H., Regazzoni, K., Dick, F., Dyson, N., Chen, T.T., Wang, J.Y.J., Fotedar, R. and Fotedar, A. (2001). The large subunit of Replication factor C promotes cell survival after DNA damage in an LxCxE Motif- and Rb-dependent manner. *Mol. Cell* 7: 715-727

Podust, V.N., Tiwari, N., Stephan, S. and Fanning, E. (1998). Replication factor C disengages from Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) upon sliding clamp formation, and PCNA itself tethers DNA polymerase δ to DNA. *J. Biol. Chem.* 273: 31992-31999

Puil, L., Liu, J., Gish, G., Mbamalu, G., Bowtell, D., Pelicci, P.G., Arlinghaus, R. and Pawson, T. (1994). Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J.* 13: 764-773

Rauen, M., Burtelow, M.A., Dufault, V.M. and Karnitz, L.M. (2000). The human checkpoint protein hRad17 interacts with the PCNA-like proteins hRad1, hHus1, and hRad9. *J. Biol. Chem.* 275: 29767-29771

Ravandi, F., Cortes, J., Albitar, M., Arlinghaus, R., Qiang Guo, J., Talpaz, M., Kantarjian, H.M. (1999). Chronic myelogenous leukemia with p185(BCR/ABL) expression: characteristics and clinical significance. *Br. J. Hematol.* 107: 581-586

Reuter, G.W., Fu, H., Cripe, L.D., Collier, R.J. and Pendergast, A.M. (1994). Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins of the 14-3-3 family. *Science* 266: 129-133

Rheaume, E., Cohen, L.Y., Uhlmann, F., Lazure, C., Alam, A., Hurwitz, J., Sekaly, R.-P. and Denis, F. (1997). The large subunit of Replication factor C is a substrate for Caspase-3 in vitro and is cleaved by a Caspase-3-like protease during Fas-mediated apoptosis. *EMBO J.* 16: 6346-6354

Richardson, C., Stark, J.M., Ommundsen, M., Jasin, M. (2004). Rad51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability. *Oncogene* 23: 546-553

- Roberts, S.G. (2000). Mechanisms of action of transcription activation and repression domains. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1149-1160
- Rowley, J.D. (1973). A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243: 290-293
- Sacchi, S., Kantarjian, H.M., O'Brien, S., Cortes, J., Rios, M.B., Giles, F.J., Beran, M., Koller, C.A., Keating, M.J. and Talpaz, M. (1999). Chronic myelogenous leukemia in nonlymphoid blastic phase- Analysis of the results of first salvage therapy with three different treatment approaches for 162 patients. *Cancer* 86: 2632-2641
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- Salles-Passador, I., Munshi, A., Cannella, D., Pennaneach, V., Koundrioukoff, S., Jacquiod, M., Forest, E., Podust, V., Fotedar, A. and Fotedar, R. (2003). Phosphorylation of the PCNA binding domain of the large subunit of Replication factor C on Thr⁵⁰⁶ by cyclin-dependent kinases regulates binding to PCNA. *Nucl. Acids Res.* 31: 5202-5211
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour, New York.
- Santoro, C., Mermod, N., Andrews, P.C. and Tjian, R. (1988). A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs. *Nature* 334: 218-224
- Santucci, M.A., Anklesaria, P., Laneuville, P., Das, I.J., Sakakeeny, M.A., Fitzgerald, T.J. and Greenberger, J.S. (1993). Expression of p210 bcr/Abl increases hematopoietic progenitor cell radiosensitivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 26: 831-836
- Sawyers, C.L., McLaughlin, J., Goga, A., Havlik, M., Witte, O. (1994). The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell* 77: 121-131
- Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W.T., Clarkson, B. and Kuriyan, J. (2000). Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 289: 1938-1942

Schwab, R., Peschel, C., Despres, D., Derigs, G., Fischer, T., Huber, C. and Aulitzky, W.E. (1995). Deficient cell cycle control in myeloid cells of patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *Cytokines and Molecular Therapy* 1: 281-288

Shaulian, E. and Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* 4: E131-E136

Shimada, M., Okuzaki, D., Tanaka, S., Tougan, T., Tamai, K.K., Shimoda, C. and Nojima, H. (1999). Rfc3 of *Schizosaccharomyces pombe*, a small subunit of Replication factor C complex, is required for both replication and damage checkpoints. *Mol. Biol. Cell.* 10: 3991-4003

Shimomura, T., Ando, S., Matsumoto, K. and Sugimoto, K. (1998). Functional and physical interaction between Rad24 and Rfc5 in the yeast checkpoint pathways. *Mol. Cell. Biol.* 18: 5485-5491

Shivji, M.K.K., Podust, V.N., Hübscher, U. and Wood, R.D. (1995). Nucleotide excision repair DNA synthesis by DNA Polymerase ϵ in the presence of PCNA, RFC, and RPA. *Biochemistry* 34: 5011-5017

Sillaber, C., Gesbert, F., Frank, D.A., Sattler, M., Griffin, J.D. (2000). STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood* 95: 2118-2125

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.T. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191

Sirard, C., Laneuville, P., Dick, J.E. (1994). Expression of bcr-abl abrogates factor-dependent growth of human hematopoietic M07E cells by an autocrine mechanism. *Blood* 83: 1575-1585

Skorski, T., Bellacosa, A., Nieborowska-Skorska, M., Nieborowska-Skorska, M., Majewski, M., Martinez, R., Choi, J.K., Trotta, R., Wlodarski, P., Perrotti, D., Chan, T.O., Wasik, M.A., Tschlis, P.N. and Calabretta, B. (1997). Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J.* 16: 6151-6161

Slupianek, A., Hoser, G., Majsterek, I., Bronisz, A., Malecki, M., Blasiak, J., Fishel, R., Skorski, T. (2002). Fusion tyrosine kinases induce drug resistance by stimulation of homology-dependent recombination repair, prolongation of G(2)/M phase and protection from apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 22: 4189-4201

Slupianek, A., Schmutte, C., Tomblin, G., Nieborowska-Skorska, M., Hoser, G., Nowicki, M.O., Pierce, A.J., Fishel, R. and Skorski, T. (2001). BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol. Cell* 8: 795-806

Smale, S.T. (2001). Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. *Genes Dev.* 15: 2503-2508

Smale, S.T. and Baltimore, D. (1989). The "initiator" as a transcription control element. *Cell* 57: 103-113

Smale, S.T., Jain, A., Kaufmann, J., Emami, K.H., Lo, K. and Garraway, I.P. (1998). The initiator element: A paradigm for core promoter heterogeneity within metazoan protein-coding genes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 63: 21-31

Smale, S.T., Schmidt, M.C., Berk, A.J. and Baltimore, D. (1990). Transcriptional activation by SP1 as directed through TATA or initiator: specific requirement for mammalian transcription factor IID. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4509-4513

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517

Sturm, R.A., Das, G. and Herr, W. (1988). The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain. *Genes Dev.* 2: 1582-1599

Sugimoto, K., Ando, S., Shimomura, T. and Matsumoto, K. (1997). Rfc5, a Replication factor C component, is required for regulation of Rad53 protein kinase in the yeast checkpoint pathway. *Mol. Cell. Biol.* 17: 5905-5914

Tamaoki, T., Nomoto, H., Takahashi, I., Kato, Y., Morimoto, M. and Tomita, F. (1986). Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺ dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135: 397-402

Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354

Tsurimoto, T and Stillman, B. (1989). Purification of a cellular replication factor, RF-C, that is required for coordinated synthesis of leading and lagging strands during Simian virus 40 DNA replication in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 9: 609-619

Ubeda, M. and Habener, J.F. (1997). The large subunit of the DNA replication complex C (DSEB/RF-C140) is cleaved and inactivated by Caspase-3 (CPP32/YAMA) during Fas-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272: 19562-19568

- Uchiyama, F., Watanabe, M. and Tanuma, S. (1999). Characterisation of Telomere-binding activity of Replication factor C large subunit p140. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258: 482-489
- Uhlmann, F., Cai, J., Flores-Rozas, H., Dean, F.B., Finkelstein, J., O'Donnell, M. and Hurwitz, J. (1996). *In vitro* reconstitution of human Replication factor C from its five subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6521-6526
- Uhlmann, F., Cai, J., Gibbs, E., O'Donnell, M. and Hurwitz, J. (1997a). Deletion analysis of the large subunit p140 in human Replication factor C reveals regions required for complex formation and replicative activities. *J. Biol. Chem.* 272: 10058-10064
- Uhlmann, F., Gibbs, E., Cai, J., O'Donnell, M. and Hurwitz, J. (1997b). Identification of regions within the four small subunits of human Replication factor C required for complex formation and DNA replication. *J. Biol. Chem.* 272: 10065-10071
- van der Kuip, H. (1997). Funktionelle und deskriptive Analysen zur großen Untereinheit des Replikationsfaktors C (RFC-p140). Dissertation
- van der Kuip, H., Carius, B., Haque, S.J., Williams, B.R.G., Huber, C. and Fischer, T. (1999). The DNA-binding subunit p140 of replication factor C is upregulated in cycling cells and associates with G₁ phase cell cycle regulatory proteins. *J. Mol. Med.* 77: 386-392
- van Etten, R.A. (1999). Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol.* 9: 179-186
- Virchow, R. (1845). Weisses Blut. *Frorieps Notizen* 36: 1515-156
- Voncken, J.W., Kaartinen, V., Pattengale, P.K., Germeraad, W.T.V. and Groffen, J. (1995). BCR/ABL p210 and p190 cause distinct leukemia in transgenic mice. *Blood* 86: 4603-4611
- Warmuth, M., Danhauser-Riedl, S. and Hallek, M. (1999). Molecular pathogenesis of chronic myeloid leukemia: implications for new therapeutic strategies. *Ann Hematol* 78: 49-64
- Wilson-Rawls, J., Xie, S., Liu, J., Laneuville, P., Arlinghaus, R.B. (1996). P210 Bcr-Abl interacts with the interleukin 3 receptor beta c subunit and constitutively induces its tyrosine phosphorylation. *Cancer Res.* 56: 3426-3430

- Wong, T.-K. and Neumann, E. (1982). Electric field mediated gene transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 584-587
- Wood, R.D. and Shivji, M.K.K. (1997). Which DNA polymerases are used for DNA-repair in eukaryotes ? *Carcinogenesis* 18: 605-610
- Woods, C.M., Zhu, J., McQueney, P.A., Bollag, D. and Lazarides, E. (1995). Taxol-induced mitotic block triggers rapid onset of a p53-independent apoptotic pathway. *Mol Med* 1: 506-526
- Yamaki, K., Hong, J., Hiraizumi, K.,ahn, J.W., Zee, O. and Ohuchi, K. (2002). Participation of various kinases in staurosporine induced apoptosis of RAW 264.7 cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 54: 1535-1544
- Yoder, B.L. and Burgers, P.M. (1991). *S. cerevisiae* Replication factor C. I. Purification and characterisation of its ATPase activity. *J. Biol. Chem.* 266: 22689-22697
- Yuan, Z.M., Shioya, H., Ishiko, T., Sun, X., Gu, J., Huang, Y.Y., Lu, H., Kharbanda, S., Weichselbaum, R. and Kufe, D. (1999). p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* 399: 814-817
- Zhou, B-B.S. and Elledge, S.J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408: 433-439
- Zwilling, S., Anweiler, A. and Wirth, T. (1994). The POU domains of the Oct1 and Oct2 transcription factors mediate specific interaction with TBP. *Nucl. Acids Res.* 22: 1655-1662

7 Anhang: Oligonukleotide und Sequenzen

Oligonukleotide

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide in 5'-3'-Orientierung dargestellt.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Bemerkung
Oligonukleotide für humane Sequenzen		
hRFC-GSP1	AATGTCCATCGCAGCCCCAGGAT	Zur PCR-Amplifikation des 5'-Endes der <i>RFC1</i> -mRNA mit „Gene-Racer TM “ 5'-Primer
„Gene-Racer TM “ 5'-Primer	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	Zur PCR-Amplifikation des 5'-Endes der <i>RFC1</i> -mRNA mit hRFC-GSP1-Primer
hRFC-5'-1f	ACTGTCTTCGCCTTCTTG	
hRFC-5'-1r	CGGTTGAGGAATCTGTTATC	
hRFC-5'-genom/f	TGGTTCCTCTCGATGTCA	
hRFC-5'-genom/r	CCGTTGAGGAATCTGTTAT	
hRFCPr.4.1f	CTCACAAGGAGTAGACGGAG	
hRFCPr.6f	TGGACATTCGGAAATCTTT	
hRFCPr.6r	CCGTGAAATTTTACCAGGTT	
hRFCPr.7f	GTAAAATTTTACGGCAGGAT	
hRFCPr.7r	GCTTGCCACCATCTTCTTAT	
hRFCPr.10f	TCACAGAGCCAAAAAGGATA	
hRFCPr.10r	GTACCCCTCATCAACTCTC	
hRFCPr.11f	TAATTGGACAGCAAGGTGAC	
hRFCPr.11r	TTTCGTGCTTACTGAAGAGG	
hRFCPr.12f	ATGAAGAGTTTGCCAGAACA	
GAPDH/f	CGTCTTACCACCATGGAGA	
GAPDH/r	CGGCCATCACGCCACAGTTT	
Oligonukleotide für Expressionskonstrukte		
hRFCcdsNotI-f	<u>AACGCGGCCGCACG</u> ATGGACA <i>TTCGGAAATCT</i>	künstliche NotI-Erkennungsstelle (unterstrichen); Startcodon von <i>RFC1</i> (fett); Beginn des kodierender Bereiches von <i>RFC1</i> (kursiv)
hRFCcdsFLAGNotI-f	<u>AACGCGGCCGCACG</u> ATGGATT <i>ACAAGGACGACGACAAGG</i> <i>ACATTCGGAAATCT</i>	künstliche NotI-Erkennungsstelle (unterstrichen); Startcodon des FLAG-Epitops (fett); Kodierender Bereich von <i>RFC1</i> (kursiv)
hRFCcdsNotI-r	<u>TGCGCGGCCGCT</u> CATTTCTTC GAACTTTTTCCCTTTTCCT	Enthält am 5'-Ende künstliche NotI-Erkennungssequenz (unterstrichen)

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Bemerkung
Oligonukleotide für murine Sequenzen		
mRFCPr.1f	ACGTCAGTGCCTCGACTATTT	
mRFCPr.1r	CTCCCTCTTCAGAATCCTTT	
mRFCPr.2f	TTGGGAGCTAATCAAGATGT	
mRFCPr.2r	AGTGCTTTTTTCATGTCACCT	
actin/f	TCCTGTGGCATCCACGAAACT	
actin/f	GAAGCATTGCGGTGGACGAT	
Standard-Oligonukleotide zur Sequenzierung		
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	
T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
M13	GTAAAACGACGGCCAGT	
M13rev	GGAAACAGCTATGACCATG	

cDNA-Sequenzen

Sequenz des cDNA-Klons „IMAGp950D0348“ des RZPD in 5'-3'-Orientierung. Erkennungsstellen für die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *NotI* sind optisch gekennzeichnet (fett, kursiv). Das 3'-Ende des kodierenden Bereiches von *RFC1* (TGA) ist durch einen Rahmen gekennzeichnet.

„IMAGp950D0348“ (743bp)

GAATTCGGGCACGAGGGGAGCCAGAAAAAGGAAAAAGGAAAAAGTTCTGAAGA
AA**TGA**AACCATTTTTCACTAGCGACAGCCACTTTTTACTCTCCCTCCTGA
CCAGTCCAGCTGGTCTAGAGAAAAGCCTTGTTTTTTCCAGAGCAACCATG
TTTTAGCATAATGGGATGACCTGGTGTCCCATATAAAATAAAGGGTGGTA
TGGCTAGAAGGGTATGAGCAGTAGGCTTATGTACACCTCTTATAGAGGTT
GATAGGACTGCCTGGGTCCCTCACTGTCTCTGTCAATCTAGTTAGACGT
GCTTCTGAATGACTGTAGAATTGGAAC TAGAACTACACCTGGGCTTTGG
AGTCAGATTTTAGTTAACAATAATGAGCCTGGGAGCAGTAGTACTAAGGC
GTCTTTTGTAGGCTTAAGAATTTATCCTAATGGCCTTTATAGGACCAATG
CTGATTTTTTTTTAAAGGCAGTTCCTATTATGTGGTGAAATTTGTAAATA
AATGATTATACAAAACAGTCACCACCTAGAACTGGGTATTCTTTGTACAT
TGTCAGATATCTTTCAAAGTATAAATTAGGAATAAAAAATGTTCCACATGA
TATGTGTACAAATCTTTTTAAGATTGTCATCTTGTACAGCAAAATATTA
TGTTGGTATATTACTTCCTTATTAATTTGCAAATGATTGGATTAAAAAAG
CTCACTGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAT**GGCGGCCGC**

Genomische Sequenzen

Im folgenden sind die Nukleotidsequenzen in 5'-3'-Orientierung der in der vorliegenden Arbeit isolierten genomischen Subklone dargestellt, die bislang nicht an eine Datenbank übermittelt wurden. Erkennungsstellen für die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII* sind optisch gekennzeichnet (fett, kursiv). Nicht sequenzierte Bereiche der Subklone, die lediglich durch Sequenzen der Datenbank (Acc.-No.: AC023135, AY600371) repräsentiert werden, sind durch eine Unterbrechung der Sequenz (XXX) markiert. Die angegebene Sequenzlänge der entsprechenden Klone resultiert aus der Kombination eigener Sequenzdaten mit denen des nicht in dieser Arbeit sequenzierten Bereiches der Datenbanksequenz (#). In der Sequenz des Subklons „*HindIII* 3.4“ ist das Startcodon von *RFC1* (ATG) durch einen Rahmen gekennzeichnet, sowie die in dieser Arbeit ermittelte Transkriptionsstartstelle des Gens durch doppelte Unterstreichung hervorgehoben (A).

Divergenzen zu genomischen Referenzsequenzen der NCBI-Datenbank sind wie folgt gekennzeichnet:

-fett, unterstrichen dargestellte Nukleotide: Datenbanksequenz(en) zeigen an dieser Stelle eine alternative Base

-kursiv, unterstrichen dargestellte Nukleotide: Datenbanksequenz(en) besitzen an der entsprechenden Stelle keine Base

“A106 *EcoRI* 1.1” (15896bp[#])

GAATTCTCATTCATATTTTCAGCAATGTTTGTGATAAAAATACATTTTGCC
 CCGTCTCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCGGGCATGGTGGCGGGTGCC
 TGTAGTTCCAGCTGCTTGAGAGGCTGGGGCAGGAGAATGGTGTGAACCCG
 GGAGGCGGAGCTTGCAGTGAGCCGACAGAGCGAGACTCAGTCTCAAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAACATTTTGAACTTTCATGGAAATCTCACATGTTGT
 CTTTCTTGACATGAAGTTTAAATAGAATTAAATATGATCATCAGTTTATA
 CGGAGTAGTGTATATTAXXXXXXXXXXXTGGCAGTGGGGATAGAGGGGAGA
 AGACAGCAGTATTTGGGAGATCGTTTAGGTTGGATGATTAGGTGGAGGGC
 CAGAGGTAGGAGTAAAAGCAGTGTCCATGTTTCTGTTTTGGGTGAATGGT
 GGTGCTATGCATGGAGATGGGAATAAAGGAATAGAAGCAGGTCACAGCT
 GAAGATAAATTTAGTTGAGGACGTTATTAGTTAGATGGCACCTTTGGGAG
 ATTTGCAATGGGATGGATTTGGCTGCATGTTGACTGCATAAATAGG**GAAT**
TC

„EcoRI-HindIII 1.3“ (2314bp[#])

GAATTCTCATTCATATTTTCAGCAATGTTTGTGATAAAAAATACATTTTGCC
CCGTCCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCGGGCATGGTGGCGGGTGCC
TG TAGTTCCAGCTGCTTGAGAGGCTGGGGCAGGAGAATGGTGTGAACCCG
GGAGGCGGAGCTTG CAGTGAGCCGACAGAGCGAGACTCAGTCTCAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAACATTTTGAAC TTTTCATGGAAATCTCACATGTTGT
CTTTCTTGACATGAAGTTTAAATAGAAATAAATATGATCATCAGTTTATA
CGGAGTAGTGTATATTAGACGTTT TAAAATTTTACAAATACATCCGGTGG
TGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTCTGGAGGGCAGAGTTGGGCGG
GTTGTTTGAGGTCAGGAGTTCAGACTAGCCTAGCCAACATGGTGAAACC
CCATCTCTTCAAACCATACAAAAGTTAACTGGGAGTGGTGGCGTGCATCT
GTAGTCCCAGGTATTTGGGAGGCTGAGGCACAAGAATCACTTGAATCACT
TGCACCTGGGAGGTTGGAGGTTGCAGTGAGCCCAGACCGCACTATTGCAC
TCCAGCCTCGGCGACAGAGAGAGACTGTCTXXXXXXXXXXAGTAGTTCAG
TTGTCAGCAAATCTCTACACATTAAGAAATATTTTTCTTAGCGATTGCT
CTAAGAAATATATATACATAAAATATATATGTATAATAGGATATCTCCTA
TTTAGAAGTCGTCATAGTTTCCCTCATTCATACACCCTGCATTATAGATTG
TGTAGAATTTAAATACTGCTATTCATATTTCCACTGGAGGCCGGGCACAG
TGGCTCCTGCCTGTAATCCCCGCACTTTGGGAGGCCAAGGTGGGAGGACT
GCTTGAGGCCAGGAGTTTGAGCCCAGCCTGGGCAACAGAGCAAGATCCCG
TCTCTACAAAAATAAAATAAAATAAAGTAAAAATAAAATAAAGTTCCAC
TGGAGTCAAAGTTCTGAAAAATTATAGGTGAATATGTAATTATAAATAGA
AATAATTGAACAAGTAATAGACTTAAACTAAAAGAAATTTTGTATTAATG
GCAACTACTGATAACTTTATGACATACTAAAATTTTCTCTATCAGCTA
AATGCAACCTATGCCATTGTTACCTGCTTCATAGAGATACAGATGTTATT
TTTTGTGTGTGTGCAGTGAAATATTTTATCCTCATTTTCATTCATAAAAT
TCACTGAGGTAGGGA**AAGCTT**

„HindIII 4.4“ (4068bp[#])

AAGCTTTTACTGATCTTTCCATTCAGCCTGAACAGCCAGCAAAATATATT
GCATATGGAATAGATGCTTCTTTTGCTCAATGGTATATGTATTAGCCCAT
TTTCACACTGCTCATAAAGACATACCCAAGACTGGGCAATTTACAAAAGA
AATAAATTTATTGACTTGCAGTTCACATGGCTGGGGAGGCCTCACAAAT
CACGGTGAAGGCAAGGAGGAGTAAGTCACAAC T TACATGGATGGCAGCA
GGCAAAGAGAGAGAGTATGTGCAGAGAACTCACATTTTTAAAACCATCA
GATGTTGTGAGACCCATTCATATTACGAGAACAGCATGGGAAAGACCTG
CCCCATGATTCATCATCTCGCACTGGGTCCCTCCCACAACATGTGAGAA
TTATGGGAGCTACAAGATGAGATTTGGGTGGGAACACAGAGCCAAACCAT
ATCATTCATCCCTGGTCCCTCCCAAATCTCATATCTTCACATTTCAAAA

CCAATCATGCCTTTCCAGCAGTCCCCAAAAGTCTTAACTCATTTTCAGCAT
 TAACTCAAAGTCTACAGTCTAAAGTCTCATCCAAGACAAGGCAAAGTCC
 CTTCTGCCTATGAGCCTGTAAAATCAAGAGCAAGXXXXXXXXXXTCTCAA
 TCATGTATTGAAAGCATAAAATTCATAAGCATCATAGTGAACACATGCCAC
 GTGATGGTATGCTGATCATGAAACAAAGATCTATTGCAATGAACTAAAA
 TTGAAGGGAATTGTGCATATTCAACTGGCTGGTTGCATAAAATTTAAGAAA
 AGACAGGGTGTACATTTTTAAAAAATCTGTGGCAATAAAGCATCTGCTG
 ATCACAAAGCAGTGGAGAAATGTGTTGATGAATTTGCCAATATTTTCACT
 CATGAAAATCTGACACTAGACCAAGTCTACAAGATTGCTGAAACATCACT
 GTTTTGGTGTATTGCCCCAGATAGATACTAACTATGGCTGATGAGCTA
 GCCATAAAGGAATTAAGGATGGGAAGGATGGAATAACAGTGCCGGCATG
 TGCTAATGCAGCAGGCATCCATAAATGTAAACTTGCTGTGATAGGCAA**AA**
GCTT

„*Hind*III 4.5“ (541bp)

AAGCTTATATCCATACTGTTTTCAAGGAGTGAATTTCTTTCCATGCCATT
 ATTCTGCTAACAAAAAGGCATGGATCAGCAGGGAAATCTTTTCTGATTGG
 TTTCACTTTTTTTTTGTTTTGTTTTTTTTCTTGAGACAAGGCCTCTCA
 AAGTGTGGGATATAGGCATGTGCCACCATGCTCAGTCCTATTTTGGGT
 CTTCAAAAATATTTCCATTCTGGATATCTATTCCTTTATAAGAAACCACT
 CCAATACTTATTACCTTAACAGAGCAATCATTTAATTATGTTACAGCTAC
 TGTGGGTCAGGAAATTTGGACAGGCCTTGACTGAGTGATTTTTCTGCTCT
 CCCAGGTGTTGAATGGGTCAACAAAGCTAGTGAAATTCATCAGTTGCT
 GGATGGGATCTGAGATGGCTTCATTTACATGCATGGTGCCTGGTGGAGAT
 GGCTATAAGGCTGGTCTCAGATGACCACCTCCCTGGCTTTACATGGTGCT
 CCAAGAGAGCAAGACAGGAGCTGCCAGTCTTCTTA**AAGCTT**

„*Hind*III 2“ (893bp)

AAGCTTAGGTCTGGAGTTGGCATAAGTATCACTTCCATTGTATTCTTTGAT
 CAAATCAGTCATAGCCAGTCCAGGTTCAAGGGAGGAGTTTCAAAGCATA
 TGCAGTCATTTTAGATCTGGTATATTTCTGAGATAGAGTATTTTCATGTA
 AATAAATATTCCTAAAGAAAACAATCTCACAAAGAAGTTACAGTCTCCTG
 ACTTAAGTCTCATTTAACTCAAGGAAGGCTTCAAATGCCAAAAAAAAAA
 AAAAGCAAAGTTAAGAGGAATGTAATATAAAAGACACGTACAACCTTTTT
 ATGTCTTATTTACTCATTTATGATTTATAACACAATGAACATTATAAAT
 TGGTGTAGGTCCTCTAAAATTTATGGGCAAAAATTTGTGTGATATGTCTGC
 TAAGACAAAACCGAGGCACAGTAACTTGCCCTTGGTCACATAAATAGCAG
 GTGGTGGGGCTGGAGACCTAGCATCCTGGCTTCAGAGGGAACAGTGCAGT
 GAGGCCCTGTTAATAAGTAACAGTCTGTCTGTAAATTCGGGATAAGAGTA
 GTCAGTGTATCATGGGGATAAAATGAGCTAGGCTAGTCCAGAGCTGCAC

GTACAACAATAGGCGTTTAATAAAATACAAGCTGTCAATGCTCAGCCTCTG
TTGTATTCCAGGCTGTTCTATCTTTTCGCCATAGAAATGTTGGTGTCTATAA
AGCGCAAGACCCAACAGGGGGTGGATGGGTGAGAATTTCAAAGTGTAGC
TAGAGCCAAAGCTGGAGATACTGCTTTCTCCATTGAACTCTTTATGGTCT
AATCTTTCTCTTGAAATCGTACGCAAATGTTTCATTGTATTCCGTGATTC
AATTGCTAATCTATTTCATATACAACCTGGTTTACCCCA**AAGCTT**

„HindIII 3.4“ (1179bp)

AAGCTTTCGGTATCTTTTCTTTTTTTTGGAGCGGAGTTTTCGCTCTGTCTGC
CCAGGCTAAAGGGCAGTAGCTCGATCTCGGCTCACTGCACCACTGCCTCC
TGGGTTCAAGCAATTCTCCTGTCTCAGTCTCCCGAGTAGCTGGGACTACA
GGCACACGTCACCACCCCTGGCTAATTTTTGTATTTTTAGTAGAGACGG
GGTTTACCACATTGGTTCAGTGGTCTCGAACTCCTGACCTCAGGTGACC
CACCCGCTCGGCTCCCAAAGTGTGGGATTAGAGGGGTGAGCCACCGC
GTCCGGCTCTTGATGAACTTATTACAGAATAGATATTTATACATAAT
ATGTA AACGCACAGCTAAAAATTTATCTTACTAAAGTTGGTAGTAAAA
ACTTTTCAAAGTTACTATAGGGAAGTGCATTGTCCAGACGTGTAACCGGG
AGGTACTTGGGTACCCCGCTGCCAAGGAAACCAATATCGGATCCCCCTA
CTTTAGCGCCCCCGCAAAAACCGAGCTCACACCAAAGCACCGTGGTTCC
TCTCGATGTCAGCGGCCACCTGCCCTCGGGCAGCACCTGGGCAGGCGT
CGCACCTCCCGCTCTGGGCGGGACGGAAGCAAAGCTCGCGCTCCTGAC
GTCATCACC CGCGCCACTGTCTTCGCCTTCTTGCACTTTCGCGGGAGAAG
TTGTTGGCGGAATGGATCCTGAGCCTCGATAACAGATTCTCAACCGGC
CCACCCGCCAGCCAGCCAGCGCTTCATCCTGGGGCTGCG**ATG**GTGAGCC
GCTGGGGGAGGCCGTGCGGCTCGGGTCTGGGGGGCTTTGCAGGCCTGG
TGTGGACCGGGCACTCCTGGTATGCAGGGTGGGGGAGGATGGCGGTGGGT
GGTTCCGGAGGCTAGCAAAGGCAGAGAAGGGCCGACACCGGGCACTGG
ACGCAAACTTTTATTCATCGCGGCTCTGGCTCTGGGCGGCAGCC**GGC**
GCGCAGGGATTTTGTGCTACGTGTACTTGCCTTTCCCCCGCCCCCA
CTCTTGGGGGAAGGGAGAAAGGAAGAGAGGAAGGATGGTGGTTTTGGGAC
GCATTGGTAAAGTTATTTCTTGTTCGGCGTTGCCCGAACCTCAGTTTGA
GTACTGCCTAAAGCGTGGATTTCA**AAGCTT**

„HindIII 3.3“ (904bp)

AAGCTTTGGGTCACGAGGGAGAAGAATGTAACAACTTTTCTTTCTTAGG
GAATATGTTGTGTAGGGCTTAACTTTTATCATTAAACAGCTCAGCTCGT
CTCATCTCCGCTCGTCAATTAACGATCACCTGAGCGGTGTTGAGACCGAGG
GCATGGAGAGGATATTTTATTTGTTTAGATGAGTTCATAGGAGTCAAAA
GGATAACATGGCTTACTAGGAAAAAGAAGTACAGCGAATAGAAACAGATG

CAAGACATTTGACAGCTGTCATCCTCTTACCACCTGATGTTTAAAATCTG
AAAAAAACCCAAGCCTCACTGCATAATTCTGGATAAAAATGTTCAAACAAA
TTGAAAGTGAAATGATTATGCAGCCAGCAAAGCAGACATTCCTGATGGTA
TGGCAATGGATATGGCTCTGTGTTTGGAAATATTTTTAAAGGACCATTTAA
AATGTTTCATTAAGCTAGAAGATACTTAACAATCCGATATAATTTTTTTCA
ATCATTTGGTCAACGTGTACAGTGACAACATTCTGGGGGGGGCGGTGAA
AATTTTATGCCACACTGGGAAACGTTGCAGGCCTTTGTGTTTCTTCTCAA
AAAAGGGCAACAGTAATGATAGTAGCTACCTTGTACCAAGCATCTTCTTT
AGGTCAATATGTGAACGTGGTTTTCCATGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
TTTTTTTTTCATTTCAACCCACATCGATGCAGTTTTACAGATGGTGCAAGC
ACTTTTTTGGAATTTAAACAGTGTATCATATAACTAGTAGGTGGTTGAAC
TAGAATTAGAATCTTGGTGTCTGACCACCATGTTATACTACTTCCCTA
TAATGATCATCATTACATTTTGGAGGCCAAAGCACTGTGGTATTTTGGAA
GCTT

„*Hind*III 3.2“ (247bp)

AAGCTTGAGACTTGGAGTCTTGAAGATGAAGAACGTGGTAATATTTTAGT
TTAATGGTTTATATATTAATTTATAGTTATATTACTATGTTAGTATAGTC
TAGTTTAATAGTTACGTGGTCTTGGGCAAGTAAATAGCTTAAGTTAATC
TCTTTAAGCCTCTGTTTCCTTATCTGTAAAAGAGGGGAAAATAATAGCTG
CCATAGTGATTGTTTTGGGGATTAAGCAAGATGTATAGGTA**AAGCTT**

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
α	alpha
Abb.	Abbildung
Acc.-No.	Accession number (Identifikationsnummer der Genbank des NCBI)
A.dest.	Aqua destillata
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
β	Beta
<i>Bcr</i>	Bcr-(Breakpoint-cluster region) Gen
<i>BCR-ABL</i>	chimäres Fusionsgen von <i>Bcr</i> und <i>c-Abi</i>
BER	Basen Exzisionsreparatur
bp	Basenpaar(e)
BrdU	5'-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
<i>c-Abi</i>	zelluläres Homolog des „Abelson murine leukemia virus“ Onkogens
cDNA	komplementäre DNA
CDK	Cyclin-dependent Kinase (Cyclin-abhängige Kinase)
CIP	Calf intestine phosphatase
c-KIT	Stammzellefaktor-Rezeptor
CML	Chronisch myeloische Leukämie
δ	delta
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSB	Doppelstrangbruch
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol

ε	Epsilon
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal calf serum (Fötale Kälberserum)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G	Guanin
γ	Gamma
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl] piperazin-N´-[2-ethansulfonsäure]
IL-3	Interleukin-3
kbp	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
λ	Lambda
LB	Wachstumsmedium nach Luria und Bertani
M	Molar
MBq	Mega-Bequerel
$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	Mikrogramm/Mikroliter
MOPS	3-[N-Morpholino] propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NER	Nukleotid Exzisionsreparatur
NP-40	Nonidet-P40
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor

PKC	Proteinkinase C
poly-A ⁺ RNA	polyadenylierte RNA
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
Rb	Retinoblastoma Protein
RFC	Replikationsfaktor C
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Sodium dodecylsulfat
<i>S. pombe</i>	<i>Saccharomyces pombe</i>
STI-571	Signal-transduction inhibitor-571
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
TKI	Tyrosinkinase Inhibitor
Tris	Tris (Hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit(s)
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolettes Licht
VT	Volumenteil(e)
WWW	World wide web
XP	Xeroderma Pigmentosum
Z-VAD-FMK	N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp- fluoromethyl-ke-ton
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

Für Mengen-, Größen-, Zeit- und weitere physikalische Angaben wurden SI- oder gesetzliche Einheiten benutzt.

9 Lebenslauf und Publikationen

Persönliche Daten	Name	Frank Breitenbücher
	Anschrift	In den Dörrwiesen 5 55296 Harxheim
	Geburtsdatum	25.09.1970
	Geburtsort	Mannheim
	Familienstand	ledig, 1 Tochter
Schulbildung	1977-1981	Käthe Kollwitz Grundschule, Mannheim
	1981-1990	Lessing-Gymnasium, Mannheim
	1990	Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
Berufsausbildung	1990-1992	Ausbildung zum Industriekaufmann, Knoll AG (BASF-Pharma), Ludwigshafen/Rh.
	1992	Abschluß: Industriekaufmann (IHK)
Ersatzdienst	1992-1993	Ausbildung zum Rettungssanitäter, Malteser Hilfsdienst e.V., Mannheim
	1992-1999	Ersatzdienst im Katastrophenschutz und Rettungsdienst, Malteser Hilfsdienst e.V., Mannheim
Hochschule	1992-1997	Biologiestudium, Phillips-Universität Marburg
	11/1997-12/1998	Praktische Diplomarbeit am Medizinischen Zentrum für Humangenetik Marburg
	Thema:	„Charakterisierung einer putativen Kontrollregion des humanen <i>TWIST</i> -Gens“
	01/1999	Abschluß: Diplom
	05/1999-10/2004	Praktischer Teil der Promotion an der III. Medizinischen Klinik, Abteilung für Hämatologie/Onkologie, Universitätsklinikum Mainz, Arbeitsgruppe PD. Dr. T. Fischer

Beschäftigungen	1994-1998	Tätigkeit als studentische Hilfskraft in der Krankenpflege, Internistische Intensivstation 8, Universitätsklinikum Marburg
	1999-dato	Nebenberufliche Tätigkeit als Rettungssanitäter Malteser Hilfsdienst e.V., Mannheim; Malteser Hilfsdienst gGmbH, Rhein-Neckar

Publikationen

Kindler, T., Breitenbuecher, F., Kasper, S., Estey, E., Giles, F., Feldman, E., Ehninger, G., Schiller, G., Klimek, V., Nimer, S.D., Gratwohl, A., Choudhary, C.R., Mueller-Tidow, C., Serve, H., Gschaidmeier, H., Cohen, P.S., Huber, C. and Fischer, T. (2005). Identification of a novel activating mutation (Y842C) within the activation loop of FLT3 in patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 105: 335-340

*both authors contributed equally to this study

Kindler, T., Breitenbuecher, F., Marx, A., Beck, J., Hess, G., Weinkauff, B., Duyster, J., Peschel, C., Kirkpatrick, C.J., Theobald, M., Gschaidmeier, H., Huber, C. and Fischer, T. (2004). Efficacy and safety of imatinib in adult patients with c-kit-positive acute myeloid leukemia. *Blood* 103: 3644-3654

Kindler, T., Breitenbuecher, F., Kasper, S., Stevens, T., Carius, B., Gschaidmeier, H., Huber, C. and Fischer, T. (2003) In BCR-ABL-positive cells, STAT-5 tyrosine-phosphorylation integrates signals induced by imatinib mesylate and Ara-C. *Leukemia* 17: 999-1009

Kindler, T., Breitenbuecher, F., Marx, A., Hess, G., Gschaidmeier, H., Gamm, H., Kirkpatrick, C.J., Huber, C. and Fischer, T. (2003). Sustained complete hematologic remission after administration of the tyrosine kinase inhibitor imatinib mesylate in a patient with refractory, secondary AML. *Blood* 101: 2960-2962

Schuler, M., Maurer, U., Goldstein, J.C., Breitenbücher, F., Hoffarth, S., Waterhouse, N.J. and Green, D.R. (2003). p53 triggers apoptosis in oncogene-expressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial Bax translocation. *Cell Death Differ.* 10: 451-60

10 Danksagung

Herrn PD Dr. Thomas Fischer danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas, sowie der Unterstützung im Verlauf der Arbeit, seiner ständigen Diskussionsbereitschaft und dafür, daß er mir immer sehr viele Freiheiten eingeräumt hat eigene Ideen zu verfolgen. Darüber hinaus danke ich Thomas für sein anhaltendes Vertrauen in meine Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Bölker danke ich herzlich für die Betreuung der Arbeit am Fachbereich Biologie, sowie für die Übernahme des Hauptgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Martin Schuler für viele, äußerst fruchtbare Diskussionen, sowie seine zahlreichen Anregungen. Von Martins unnachahmlicher Art, sich mit wesentlichen Punkten komplexer Problemstellungen kompromißlos auseinanderzusetzen und die entscheidenden Fragen zu stellen, konnte ich sehr viel lernen und profitieren.

Bei Dr. Tomasz Skorski (Temple University, Philadelphia) bedanke ich mich für die Kooperation beim „RFC/BCR-ABL-Projekt“, sowie die Überlassung der murinen Zelllinien.

Dr. Thomas Kindler danke ich besonders für die exzellente und erfolgreiche Zusammenarbeit im Labor, in der wir uns häufig perfekt ergänzt haben und viel voneinander lernen konnten. Die vielen guten Gespräche, auch außerhalb des Labors bei gemeinsamen „Denkpausen“, werde ich vermissen ! Viel Spaß und Erfolg in Boston.

Bei Brigit Carius kann ich mich nicht genug bedanken. Nicht nur für die Einarbeitung im Labor, als wir beide noch „unter uns“ waren, sondern auch für die zahllosen schönen Momente, die ohne sie nicht denkbar gewesen wären. Als Dreh- und Angelpunkt der gesamten Arbeitsgruppe war sie immer Ansprechpartnerin für fachliche, wie auch persönliche Probleme und „Problemchen“.

Bei Stefan Kasper möchte ich mich nicht nur herzlich für die Zusammenarbeit im Labor, sondern auch die vielfältige private Unterstützung bedanken. Stefan hat es auch immer wieder verstanden durch unkonventionelle fachliche Fragen, neue Denkanstöße zu geben. Schließlich ist Stefan der lebende Beweis dafür, daß sich gutes Aussehen und hohe Intelligenz nicht grundsätzlich ausschließen müssen und ein „gesunder“ Narzißmus auch sympathisch sein kann.

Für die gute Zusammenarbeit möchte ich mich weiterhin bei allen, „neuen“ und „alten“ Mitgliedern der Arbeitsgruppe, wie Kerstin Kunz, Fian Solem, Yvette Höhn, Dr. Florian Heidel und Dr. Daniel Lipka bedanken.

Ursel und Heidrun, den „Damen vom FACS“, gebührt ein besonderer Dank für ihre Unterstützung und Geduld bei den zahllosen Messungen und ihre Problemlösungen, wenn „die Kiste“ mal wieder nicht so wollte, wie sie sollte !

Den Dres. Christian Kosan, Simone Lier, Christina Afting und Matthias Pfeiffer möchte ich für die schöne gemeinsame Zeit, während des Studiums in Marburg danken und insbesondere dafür, daß trotz der mittlerweile völlig unterschiedlichen Tätigkeitsbereiche der Kontakt nie völlig verloren ging.

Sandra danke ich aus tiefstem Herzen dafür, daß sie in schweren Zeiten immer an meiner Seite ist und es immer wieder versteht, mich aus den tiefsten Tälern wieder herauszuführen, wenn ich vor lauter Bäumen den Weg nicht mehr sehe und aufgeben möchte. Durch ihre Unterstützung und ihren unerschütterlichen Optimismus war es mir überhaupt erst möglich, diese Arbeit zu schreiben.

Bei Alina, der besten Tochter, die man sich wünschen kann, bedanke ich mich für ihr Verständnis dafür, daß sie mich so häufig mit der Arbeit „teilen“ mußte und unsere gemeinsame Zeit daher oftmals zu kurz gekommen ist.

Meiner Großmutter danke ich dafür, daß sie mich auf meinem Lebensweg mit ihrer liebevollen Art begleitet und stets bedingungslos unterstützt hat.

Meinen Eltern danke ich für ihr Interesse an meiner Arbeit, sowie dafür, daß sie es mir ermöglicht haben, meine Talente und Fähigkeiten selbstbestimmt zu entwickeln.

Schließlich möchte ich meinen Freunden Mario, Markus, Andreas und Mattias danken, die immer da waren, wenn man wahre Freunde braucht. Insbesondere dafür, daß sie in schweren Zeiten stets dafür gesorgt haben, daß meine „Bodenhaftung“ nicht verloren geht und die Seele gesund bleibt.

Erklärung

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

Allgemeine und funktionelle Untersuchungen zur großen Untereinheit des humanen Replikationsfaktors C (RFC1), sowie initiale Untersuchungen zur Regulation der Expression von RFC1 durch das BCR-ABL^{p210}-Onkogen

selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Mainz, 20.02.05
