

**Sequenz-spezifische DNA Rekombination  
durch  $\gamma\delta$  Resolvase  
in eukaryotischen Zellen**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Micha Schwikardi**

aus Schwelm

Köln, Mai 2001

Berichtersteller:

PD Dr. Peter Dröge  
Prof. Dr. Walter Doerfler

Tag der mündlichen Prüfung:

26. Juni 2001

## ABSTRACT

The prokaryotic  $\gamma\delta$  resolvase system has been transferred to mammalian cells. In CHO cells the efficiency of recombination by the resolvase double mutant  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLS}}$  on episomal *res* x *res* substrates was comparable to that observed with Cre on *loxP*, which indicates that resolvase can be used as a new tool for controlled manipulations of episomal DNA's. Compared to this, the wildtype resolvase was nearly inactive on episomal substrates, indicating that episomal DNA does not contain a significant level of unconstrained negative supercoiling. In addition the resolvase double mutant was able to recombine between two isolated I sites of *res* on episomal substrates, but with a low efficiency.

Furthermore recombination by the resolvase derivatives has been analyzed on genomic *res* x *res* substrates in stable CHO-AA8 Tet-Off cell lines. With  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLS}}$  only low efficiencies of recombination, which were comparable to that observed on isolated I sites of *res* on episomal substrates, could be shown. With the wildtype resolvase recombination could not be detected on genomic *res* x *res* substrates, whereas Cre was able to recombine with high efficiencies between genomic *loxP* sites in the same loci. These results suggest that the accessibility of the chromosomal full length *res* for the resolvase derivatives was reduced. We conclude that the accessibility was limited by chromatin packaging of DNA. The low recombinational activities by the resolvase double mutant over the time course of 72 h imply that the level of DNA packaging was constantly high, though there was a general chromatin dynamic due to processes of the DNA metabolism (replication, transcription). Also the inhibition of topoisomerases or histone deacetylases had no effect on recombination by  $\gamma\delta$  resolvase or Cre. However, this system could be used to detect local regions with a low level of chromatin packaging in the mammalian genome.

Because of the ability to catalyze intermolecular recombination *in vitro*, the resolvase double mutant could be also used *in vivo* for specific integrations of foreign DNA into

the mammalian genome. Therefore, I searched for functional pseudo I sites of *res* in the human genome. One of these sequences is positioned on chromosome 20 and shows functionality when used as an episomal substrate together with a modified *res* and  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLS}}$  in HeLa and CHO cells.

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	i
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	vi
<b>I. Einleitung</b>	1
1.1 Sequenz-spezifische Rekombinationssysteme	2
1.1.1 Das Cre/loxP-Rekombinationssystem	3
1.1.2 Sequenz-spezifische Rekombination durch $\gamma\delta$ Resolvase	4
1.1.2.1 Resolvase Mutanten	9
1.2 Ziele dieser Arbeit	12
<b>II. Material und Methoden</b>	14
2.1 Allgemeine Materialien und Geräte	14
2.2 Methoden	16
2.2.1 Klonierung der Expressions- und Substratplasmide	16
2.2.1.1 Fragmentierung der DNA mit Restriktionsendonukleasen	17
2.2.1.2 Polymerasekettenreaktion	17
2.2.1.3 Dephosphorylierung der 5'-Phosphat Termini von DNA-Fragmenten	20
2.2.1.4 Ligation	20
2.2.1.5 Transformation rekombinanter DNA in <i>Escherichia coli</i>	21
2.2.1.6 Selektion transformierter Bakterienklone	23
2.2.1.7 <i>In vivo</i> Rekombination von DNA-Molekülen in Bakterienzellen	23
2.2.1.8 Herstellung der Expressions- und Substratvektoren	24
A) Expressionsvektoren	24
B) SV40-Substratvektoren	28

---

C) Tet-Off-Substratplasmide	35
D) Substratplasmide mit humanen Pseudo- <i>subsite</i> I Sequenzen	39
2.2.1.9 Plasmid-Präparation aus Bakterienzellen	42
2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	43
2.2.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	44
2.2.4 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA-Molekülen	44
2.2.5 Sequenzierung nach der Dideoxy-Methode	45
2.2.6 Zellkultur	46
2.2.6.1 Halten und Vermehren von Säugetierzellen in Kultur	47
2.2.6.2 Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen	47
2.2.6.3 Bestimmung der Transfektionseffizienz	48
2.2.7 Herstellung von Zelllinien mit stabil ins Genom integrierten DNA-Sequenzen	50
2.2.8 Charakterisierung der stabilen Zelllinien	51
2.2.8.1 PCR-Analysen	51
2.2.8.2 Southern Blot Analysen	51
2.2.9 Nachweis der $\gamma\delta$ Resolvase Expression über Western Blot Analyse	53
2.2.10 Präparation von Nukleinsäuren aus eukaryotischen Zellen	55
2.2.10.1 Präparation genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen	55
2.2.10.2 Hirt-Extrakt	56
2.2.11 Nachweis sequenz-spezifischer Rekombination durch $\gamma\delta$ Resolvase in eukaryotischen Zellen	56
2.2.11.1 Rekombinationsanalyse auf DNA-Ebene	57
A) Nachweis durch PCR-Analyse	57
B) Nachweis über Southern Blot Analysen	59
2.2.11.2 Indirekter Rekombinationsnachweis durch Reporteragen-Analysen	60
A) X-Gal Färbung	60
B) Bestimmung der relativen $\beta$ -Galaktosidase Aktivität	60
2.2.12 Statistik	61

<b>III.</b>	<b>Ergebnisse</b>	63
3.1	Funktionalitätsanalyse der $\gamma\delta$ Resolvase Mutanten in <i>Escherichia coli</i>	63
3.2	Expression von $\gamma\delta$ Resolvase in eukaryotischen Zelllinien	65
3.2.1	Herstellung der eukaryotischen Expressionsvektoren für $\gamma\delta$ Resolvase Derivate	65
3.2.2	Nachweis der $\gamma\delta$ Resolvase Expression in Säugetierzellen	66
3.3	Sequenz-spezifische Rekombination episomaler DNA-Substrate durch $\gamma\delta$ Resolvase in eukaryotischen Zellen	68
3.3.1	Rekombination auf episomalen SV40-Standardsubstratvektoren ( <i>res x res</i> ) in CHO-Zellen	68
3.3.1.1	Indirekter Rekombinationsnachweis über die Messung der relativen $\beta$ -Galaktosidase Aktivität	70
3.3.1.2	Rekombinationsnachweis über X-Gal Färbung	71
3.3.1.3	Deletions- und Inversionsnachweis mittels PCR	73
3.3.2	Rekombinationsnachweis auf episomalen Substraten mit isolierten <i>subsites I</i> ( <i>subI x subI</i> ) in CHO-Zellen	75
3.3.2.1	Rekombinationsnachweis durch Messung der relativen $\beta$ -Galaktosidase Aktivität	77
3.3.2.2	Deletions- und Inversionsnachweis mittels PCR	78
3.3.3	Vergleich der Rekombinationseffizienzen von $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLS}}$ und Cre auf episomalen Substraten in Säugetierzellen	79
3.3.4	Einfluß der Substrat-Topologie auf die Rekombinationseffizienzen von $\gamma\delta$ Resolvase und Cre in eukaryotischen Zelllinien	81
3.4	$\gamma\delta$ Resolvase katalysierte Rekombination auf genomischen DNA-Substraten in eukaryotischen Zellen	83
3.4.1	Herstellung von stabilen Substrat-Zelllinien	83
3.4.2	Rekombinationsanalyse auf episomalen Tet-Off-Substraten in der Zelllinie CHO-AA8 Tet-Off	87
3.4.3	Rekombination durch $\gamma\delta$ Resolvase und Cre auf genomischen DNA-Substraten in CHO-AA8 Tet-Off Zellen	89

3.4.3.1	Vergleich der Rekombinationseffizienzen von $\gamma\delta$ Resolvase Derivaten und Cre auf genomischen DNA-Substraten	90
3.4.3.2	Einfluß der Transkriptionsaktivität auf die Rekombination durch $\gamma\delta$ Resolvase und Cre auf genomischen DNA-Substraten in CHO-AA8 Tet-Off Zellen	97
3.4.3.3	Einfluß von Topoisomerase Inhibitoren auf die Rekombinations-effizienzen von Cre und $\gamma\delta$ Resolvase auf genomischen DNA-Substraten in CHO-AA8 Tet-Off Zellen	98
3.4.3.4	Einfluß von Histon-Deacetylase Inhibitoren auf die Rekombinations-effizienzen von $\gamma\delta$ Resolvase und Cre auf genomischen DNA-Substraten in CHO-AA8 Tet-Off Zellen	101
3.5	<i>Subsite I</i> homologe Sequenzen im menschlichen Genom	104
3.5.1	Funktionalität der zur <i>subsite I</i> homologen Nukleotidsequenz TGTCAGATAGCTCCTTCTTTGTCGGACA	106
3.5.2	Funktionalität der zur <i>subsite I</i> homologen Nukleotidsequenz TGTCAGATAGCTCCTTCTTTGTCGGACA	108
<b>IV.</b>	<b>Diskussion</b>	111
4.1	Die $\gamma\delta$ Resolvase Mutanten sind rekombinationsaktiv	112
4.2	$\gamma\delta$ Resolvase wird in eukaryotischen Zellen exprimiert	113
4.3	Episomale DNA-Substrate werden in eukaryotischen Zellen durch $\gamma\delta$ Resolvase Derivate rekombiniert	115
4.3.1	Die Rekombinationseffizienzen der verschiedenen $\gamma\delta$ Resolvase Derivate deuten auf eine Relaxation der episomalen DNA-Substrate in eukaryotischen Zellen hin	116
4.3.2	Die Rekombinationseffizienzen von $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLs}}$ und Cre sind in CHO-Zellen auf episomalen Substraten vergleichbar	117
4.4	Sequenz-spezifische Rekombination auf genomischen DNA-Substraten	120
4.4.1	Cre rekombiniert auf genomischen DNA-Substraten wesentlich effizienter als die $\gamma\delta$ Resolvase Mutanten	121
4.4.2	Die Chromatinstruktur verhindert die simultane Besetzung der <i>subsites I, II und III</i> und dadurch die Bildung eines regulären Synaptosoms	122

4.4.3	Die Rekombination durch Cre und $\gamma\delta$ Resolvase wird nicht durch den Transkriptionsstatus beeinflusst	128
4.4.4	Die Inhibition der Histon-Deacetylase hat keinen Effekt auf die Rekombination durch Cre und $\gamma\delta$ Resolvase	130
4.4.5	Die Rekombination durch $\gamma\delta$ Resolvase und Cre wird durch die Hemmung der Topoisomerasen des Types I und II nicht beeinflusst	132
4.4.6	Die Chromatinstruktur wird durch Prozesse des DNA-Metabolismus nur bedingt aufgelockert	136
4.5	<i>Subsite I</i> homologe DNA-Sequenzen im menschlichen Genom	137
<b>V.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	140
<b>VI.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	142
<b>VII.</b>	<b>Anhang</b>	157

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Maße und Konzentrationen werden in den gültigen SI-Einheiten angegeben. Enzymnamen sind wie in der Fachliteratur allgemein üblich abgekürzt. Außerdem wurden folgende Abkürzungen verwendet:

A	Adenin
Å	Angström
<i>att</i>	<i>attachment</i> Regionen
Arg	Arginin
bp	DNA-Basenpaar(e)
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> ; Rinderserum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
dATP	2'-Desoxyadenosintriphosphat
Del.	Deletion
dNTP	Desoxynukleotide
DTT	Dithiothreitol
dYT	<i>double Yeast Tryptone</i> ; doppel Hefe/Trypton
E	Glutamat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
FRT	<i>FLP recognition target</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> ; fötales Kälberserum
G	Guanin
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
HCl	Salzsäure
Inv.	Inversion
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kb	DNA-Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
mRNA	<i>messenger RNA</i> ; Boten-RNA
N	Adenin oder Cytosin oder Thymin oder Guanin
NaCl	Natriumchlorid
ori	<i>origin of replication</i> ; Replikationsursprung
PBS	Phosphat Buffered Saline; Phosphat-gepufferte Salzlösung
Q	Glutamin
R	Adenin oder Guanin
rek.	Rekombiniert
RNA	ribonucleic acid; Ribonukleinsäure

RT	Raumtemperatur
S	Cytosin oder Guanin
Ser	Serin
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
U	<i>Units</i> ; Einheiten
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
W	Adenin oder Thymin
Y	a) Tyrosin b) Cytosin oder Thymin
z.B.	zum Beispiel

## I. EINLEITUNG

In jeder Zelle eines Organismus ist die gesamte genetische Information in Form der Desoxyribonukleinsäure (DNA) gespeichert. Damit die Information an die nächste Generation weitergegeben werden kann, muß die DNA zunächst verdoppelt werden; es folgt die mitotische Zellteilung. Hierbei kann es zur Umstrukturierung von Genen bzw. zum Austausch von genetischem Material kommen. Dieser in der Natur weit verbreitete Mechanismus wird als Rekombination bezeichnet und ist als wichtiger Faktor der Evolution anzusehen. Manche Viren und die transponierbaren Elemente haben sich die genetische Rekombination als Werkzeug für ihre unabhängige Vermehrung zunutze gemacht.

Allgemein unterscheidet man drei verschiedene Arten von Rekombination: Die homologe, die illegitime und die sequenz-spezifische Rekombination.

Die homologe Rekombination ereignet sich zwischen DNA-Sequenzen, die über längere Bereiche sehr ähnlich bzw. nahezu identisch sind (Bollag et al., 1989). Die beteiligten Enzyme, z.B. recA,B,C oder ruv in *E. coli* (Smith, 1988; Kowalczykowski et al., 1994) oder RAD in eukaryotischen Zellen (Baumann & West, 1998) benutzen Paare homologer Sequenzen als Substrat. Für die homologe Rekombination ist also keine Sequenzspezifität erforderlich. Mit Hilfe der homologen Rekombination wurden seit 1989 auch transgene Tiere erzeugt, wobei bestimmte Gene durch modifizierte Kopien dieser Gene ersetzt wurden (Capecchi, 1989; Müller, 1999; Rong & Golic, 2000; Suraokar & Bradley, 2000; McCreath et al., 2000). Dieser Prozess wird als *gene targeting* bezeichnet.

Die Verlagerung transponierbarer Elemente (Insertionssequenzen, Transposons) zwischen unterschiedlichen Positionen auf einem Chromosom, in einem Genom oder in verschiedenen Genomen, erfolgt durch illegitime Rekombination. Bezeichnend für diesen Rekombinationsvorgang ist die Tatsache, daß er ohne erkennbare Homologien zwischen den Sequenzen des Donors und denen des Rezipienten stattfindet. Ein

weitere Charakteristikum des Rekombinationsablaufes ist die Beteiligung von DNA-Synthese (Grindley & Reed, 1985). Die Katalyse erfolgt durch spezielle, vom Transposon selbst kodierte Enzyme, den Transposasen.

Die konservative sequenz-spezifische Rekombination wird nachfolgend detailliert beschrieben.

### ***1.1 Sequenz-spezifische Rekombinationssysteme***

Man unterscheidet zwei große Gruppen konservativer, sequenz-spezifischer Rekombinationsenzyme, die sich hinsichtlich ihrer Primärstruktur und ihrer katalytischen Aktivitäten unterscheiden: Klasse I-Rekombinasen werden der Integrase-Familie, Klasse II-Rekombinasen der Resolvase/Invertase-Familie zugeordnet (Stark et al., 1992; Sadowski, 1993).

Der Prototyp, nach dem die Integrase-Familie benannt wurde, ist die Integrase des Phagen  $\lambda$  (Campbell, 1962). Die Hauptfunktion der  $\lambda$  Integrase ist die Integration des Phagen in das Wirtszellgenom von *Escherichia coli*. In diesem Zustand (Lysogenie) kann ein Phage durch die Replikation des bakteriellen Genoms passiv vermehrt werden. Unter Extrembedingungen erfüllt die Integrase eine weitere wichtige Funktion, die Exzision des Phagen aus dem Wirtszellgenom (Übersichtsartikel: Landy, 1993; Nash, 1996; Yang & Mizuuchi, 1997). Zu den über 100 aufgrund von Sequenzähnlichkeiten derselben Familie zugeordneten Mitgliedern (Nunes-Düby et al., 1998) gehört auch die FLP-Rekombinase. Diese rekombiniert zwischen den Rekombinationssequenzen FRT und reguliert als Genprodukt des 2  $\mu$ m-Plasmids aus *Saccharomyces cerevisiae* dessen Kopienzahl (Volkert & Broach, 1986; Sadowski, 1995). Ein weiteres Mitglied der Familie, die Cre Rekombinase des Phagen P1 (Abremski et al., 1983; Hoess & Abremski, 1985), ist vor allem durch ihre Anwendung im Bereich der Mausgenetik bekannt geworden (Kühn et al., 1995; Rajewsky et al., 1996; Nagy, 2000).

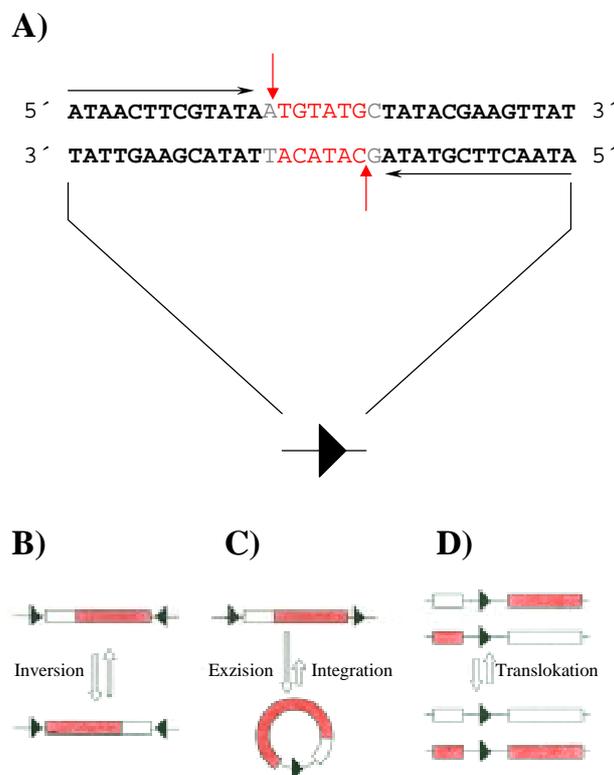
Klasse II-Rekombinasen werden in Resolvasen und Invertasen unterteilt, die sich trotz ihrer mechanistischen Ähnlichkeiten hinsichtlich ihrer Rekombinationsprodukte unterscheiden. Resolvasen lösen Cointegrate durch Deletion des zwischen den Rekombinationssequenzen lokalisierten DNA-Fragmentes auf, während Invertasen die Inversion des entsprechenden DNA-Abschnittes katalysieren (Stark et al., 1992; Nash, 1996).

Den Invertasen werden beispielsweise das Hin-Protein aus *Salmonella typhimurium* (Heichman & Johnson, 1990) und die Gin-Invertase des Phagen Mu (Kanaar et al., 1990; Deufel et al., 1997) zugeordnet. Gut untersuchte Vertreter der Resolvasen sind z.B. die  $\gamma\delta$  Resolvase aus dem Transposon Tn  $\gamma\delta$  (Tn1000) und die Resolvase aus dem Transposon Tn3 (Dröge & Cozzarelli, 1989; Grindley, 1994). Mit einer Homologie von 80% bezüglich ihrer Primärstruktur weisen sie einen hohen phylogenetischen Verwandtschaftsgrad auf.

### 1.1.1 Das Cre/*loxP*-Rekombinationssystem

Die Cre Rekombinase ist ein 38 kD großes Protein mit einer N-terminalen, DNA-bindenden Domäne. Diese ist für die Bindung von Cre an die 34 bp lange, spezifische Rekombinationssequenz *loxP* (*locus of crossing-over of P1*) zuständig. Die *loxP* Sequenz besteht aus zwei 13 bp langen, gegenläufig angeordneten, flankierenden Sequenzen, die als Bindestellen für jeweils ein Cre-Monomer fungieren (Abbildung 1.1 A). Unter Bildung eines Cre Tetramers entsteht der Rekombinationskomplex. Innerhalb der 8 bp langen, zentralen *spacer*-Region führt der nukleophile Angriff eines in der C-terminalen, katalytischen Domäne befindlichen Tyrosins zu Einzelstrangbrüchen. (Hoess & Abremski, 1985; Abbildung 1.1 A). Das Rekombinationsprodukt entsteht durch den koordinierten Austausch der Stränge unter Bildung eines Rekombinationsintermediates mit einer Holliday-Struktur (Holliday, 1964). Die durch Cre katalysierte Rekombination benötigt keine akzessorischen Proteine und erfolgt unabhängig von der Topologie des Substrates (Abremski et al., 1983).

Die zentrale *spacer*-Region ist asymmetrisch und erhält dadurch eine Richtung. Bei gleicher Orientierung der *loxP* Sequenzen führt die Rekombination zur Deletion des eingeschlossenen Fragmentes (Abbildung 1.1 C), bei entgegengesetzter Orientierung zur Inversion (Abbildung 1.1 B). Obwohl Cre bevorzugt die intramolekulare Rekombination katalysiert, ist für die Rekombinationsreaktion ihre Reversibilität charakteristisch (Kilby et al., 1993). Intermolekulare Rekombinationsereignisse können zu Integrationen (Abbildung 1.1 C) oder Translokationen (Abbildung 1.1 D) führen.



**Abbildung 1.1: Rekombinationsmöglichkeiten des Cre/loxP-Systems.**

A) Die Cre Rekombinase rekombiniert zwischen zwei 34 bp langen DNA-Sequenzen (*loxP*). Die Sequenz besteht aus zwei 13 bp langen, entgegengesetzt orientierten Sequenzwiederholungen (markiert durch Fettdruck und horizontale Pfeile), die die 8 bp lange *spacer*-Region flankieren, die aufgrund ihrer Asymmetrie die Richtung vorgibt. Die vertikalen Pfeile markieren die Strangchnittstellen; rot markierte Nukleotide entsprechen der 6 bp langen *crossing-over* Region. B) Die intramolekulare Rekombination zwischen entgegengesetzt orientierten *loxP* Sequenzen führt zur Inversion des dazwischen liegenden Segmentes. C) Die Rekombination zwischen gleich orientierten *loxP* Sequenzen führt zur Deletion bzw. Exzision der flankierten DNA. Die intermolekulare Rückreaktion (Integration) ist weniger effizient. D) Cre kann auch intermolekulare Translokationen katalysieren. Genloci bzw. DNA-Segmente sind durch rote und weiße Rechtecke symbolisiert, *loxP* wird schematisch als Dreieck dargestellt. (nach Metzger und Feil, 1999)

### 1.1.2 Sequenz-spezifische Rekombination durch $\gamma\delta$ Resolvase

Das Transposon  $\gamma\delta$  (= Tn1000) ist ein ca. 5,7 kb großes DNA-Element (Guyer, 1978; Reed et al., 1979) und wird den Klasse II Transposons zugeordnet, zu denen auch Tn3

gehört (Heffron et al., 1979). Identifiziert wurde  $Tn\gamma\delta$  als Bestandteil des F-Faktors von *Escherichia coli* (Reed, 1981).

Die Transposition verläuft in zwei Schritten. Im ersten Schritt wird die Donor-DNA in die Ziel-DNA integriert. Gleichzeitig wird das Transposon repliziert. Als Produkt entsteht ein Cointegrat mit zwei in gleicher Orientierung vorliegenden Kopien des Transposons (Heffron, et al. 1977; Gill et al., 1978; Arthur & Sherratt, 1979). Diese illegitime Rekombination wird durch die ca. 113 kD große, durch das *tnpA* Gen codierte Transposase katalysiert (Chou et al., 1979a; Gill et al., 1979; Heffron et al., 1979). Im zweiten Schritt wird die Cointegrat-Struktur durch sequenz-spezifische Rekombination zwischen den beiden Transposons wieder aufgelöst. Diese auch als Resolution bezeichnete Reaktion wird durch die 21 kD große Resolvase katalysiert (Gill et al., 1978; Arthur & Sherratt, 1979; Reed, 1981; Sherratt et al., 1981).

#### *$\gamma\delta$ Resolvase – Das Protein*

Das 183 Aminosäuren umfassende Produkt des *tnpR* Gens ist ein Polypeptid mit zwei strukturellen Domänen (Abdel-Meguid et al., 1984). Die ersten 120 Aminosäuren (AS) der 140 AS großen, N-terminalen Domäne ist die rekombinationsaktive Region, die den Strangsnitt und die Religation katalysiert. Die C-terminale, DNA-bindende Domäne des Enzyms (AS 141-183) erkennt die *res* Sequenz als spezifisches Substrat (Abdel-Meguid et al., 1984). Die Aminosäurereste 121 bis 140 bilden eine *linker*-Region, die die katalytische mit der DNA-bindenden Domäne verbindet. Diese Region funktioniert wie ein Gelenk und trägt maßgeblich zur Biegung der DNA bei.

Das Protein fungiert außerdem als Repressor und reguliert seine eigene Expression sowie die der Transposase (Gill et al., 1979; Chou et al., 1979).

#### *Die res Sequenz*

Der intercistronischen, zwischen dem *tnpA* und dem *tnpR* Gen gelegenen (Abbildung 1.2A) und als *res* bezeichneten DNA-Sequenz kommt eine doppelte Bedeutung zu. Zum einen befinden sich hier die Promotorsequenzen für *tnpA* und *tnpR*, andererseits ist sie

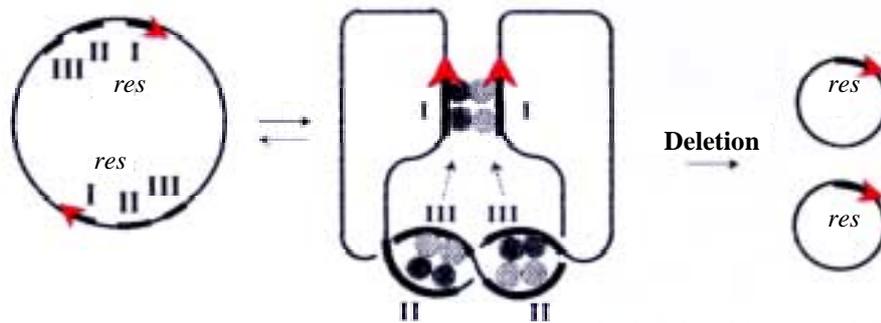


die Rekombinationssequenz für die Resolutionsreaktion (Reed, 1981). Innerhalb dieser 114 bp langen Sequenz befinden sich drei Kopien aus zwei invertierten, konservierten, aber nicht perfekt palindromischen, 12 bp langen DNA-Sequenzen, die durch eine *spacer*-Region voneinander getrennt sind (Abbildung 1.2 B). Diese Regionen werden als *subsites* I, II und III bezeichnet (Grindley et al., 1982; Wells & Grindley, 1984; Abdel-Meguid et al., 1984).

#### *Der Rekombinationsmechanismus*

Die Rekombination wird durch die Bindung eines Resolvase Dimers an jeder der drei *subsites* initiiert (Grindley et al., 1982; Grindley, 1994). Die drei an einer *res* Sequenz gebundenen Resolvase Dimere bilden schließlich einen Nukleoproteinkomplex, das Resolvosom. Innerhalb dieses Komplexes liegt die DNA gekrümmt vor. DNase I-Schutzexperimente sowie Analysen der Kristallstruktur implizierten, daß vor allem in der Mitte der *subsite* I eine starke DNA-Biegung vorliegt (Salvo & Grindley, 1988; Yang & Steitz, 1995).

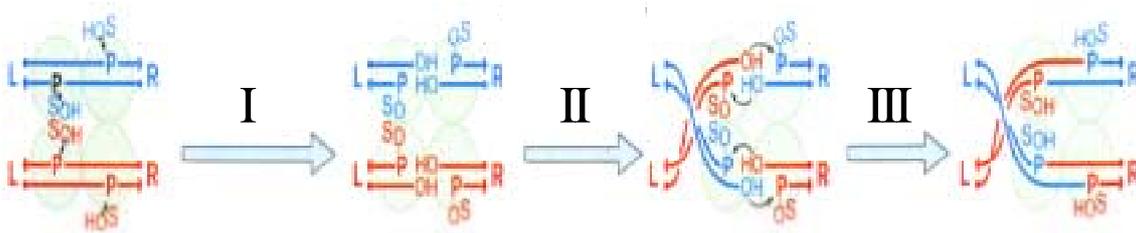
Im zweiten Schritt, der als Synapsis bezeichnet wird, erfolgt die Zusammenlagerung zweier Resolvosome zu einem Komplex höherer Ordnung, dem Synaptosom (Benjamin & Cozzarelli, 1988; Salvo & Grindley, 1988). Verschiedene Experimente lassen ein zufälliges Aufeinandertreffen (*random collision*) der Resolvosome vermuten (Boocock et al., 1986; Jiuya et al., 2000). Diskutiert werden aber auch Modelle, die auf einen nicht zufälligen Prozeß basieren (*slithering model* bzw. *tracking model*; Benjamin & Cozzarelli, 1986). Das Synaptosom wird durch Komplexierung der Proteinmoleküle unter Fixierung dreier negativer Superhelices gebildet (siehe Abbildung 1.3). Hierbei haben die an den *subsites* II und III gebundenen Dimere akzessorische Funktionen (Grindley et al., 1982; Grindley, 1994). Sie tragen über Dimer-Dimer-Interaktionen dazu bei, daß das Synaptosom in der korrekten Konfiguration bzw. Geometrie ausgebildet wird (Bednarz et al., 1990; Grindley, 1993; Watson et al., 1996; Hughes et al., 1990,1993; Murley & Grindley, 1998). Dadurch kommt es zur Annäherung der an den *subsites* I gebundenen Resolvase-moleküle (Wassermann & Cozzarelli, 1985; Benjamin & Cozzarelli, 1988) und zu deren Aktivierung.



**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Synapsis auf *res x res* Substraten.**

Synapsis auf einem zirkulären, superhelical gespannten Substrat mit zwei gleich orientierten, kompletten *res* Sequenzen. Nach Bindung der Resolvase Dimere (Kreise) an die *subsites* I, II und III von *res* wird der synaptische Komplex gebildet. Interaktionen zwischen den an den *subsites* II und III gebundenen Dimeren mit den an den *subsites* I gebundenen sind durch Pfeile symbolisiert. Das Substrat wird schließlich deletiert.

Das nukleophile Serin10 katalysiert schließlich Doppelstrangbrüche innerhalb der *subsites* I, die zu um zwei bp versetzten, 3'-überstehenden Enden mit freien 3'-Hydroxylgruppen führen (Hatfull & Grindley, 1986). Die Resolvase ist hier über eine Phospho-Serinbrücke mit dem 5'-Ende der DNA verkoppelt (Reed & Grindley, 1981; Reed & Moser, 1984). Durch eine Rotation um 180° wird die Konfiguration, die zum Strangaustausch führt, erreicht. Abschließend erfolgt die Religation der Partnerstränge (Abbildung 1.4). Hierfür werden keine zusätzlichen energieliefernden Faktoren benötigt, stattdessen wird die bei der Spaltung der Phosphodiesterbindungen freigesetzte Energie konserviert und in der Religation wieder eingesetzt.



**Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Strangaustausches durch  $\gamma\delta$  Resolvase an der *subsite* I (nach Grindley, 1997, *Current Biology*).**

Die zwei katalytischen, an den *subsites* I gebundenen Resolvase Dimere sind als hellgrün ausgefüllte Kreise dargestellt, die beiden DNA-Doppelstränge als blaue bzw. rote Pfeile. Das Resolvase Nukleophil, Serin10 ( $S_{OH}$ ), greift die DNA im *overlap*-Bereich an und erzeugt zwei Doppelstrangbrüche mit um 2 bp versetzten, 3'-OH überhängenden Enden (I). Durch eine Rotation um 180° werden die Stränge ausgetauscht (II). Die Rekombination wird schließlich durch die Religation abgeschlossen (III).

Diese nur intramolekular stattfindende Rekombination führt zur Deletion des zwischen zwei *res* Sequenzen gelegenen DNA-Fragmentes (Abbildung 1.3).

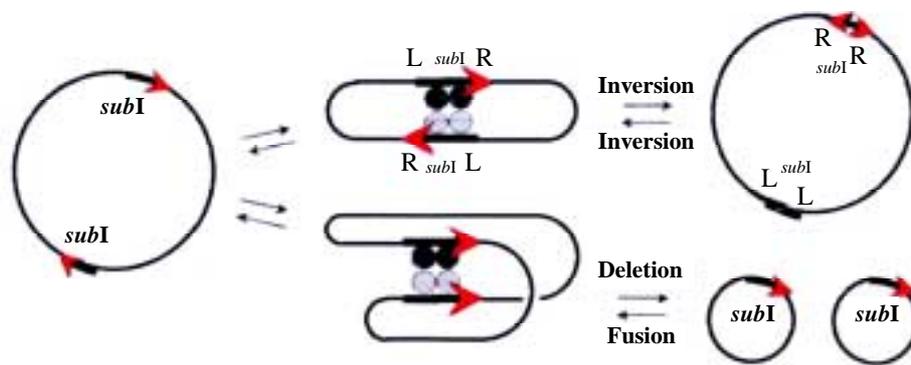
Von entscheidender Rolle für die Rekombination ist die negative Überspiralisierung des DNA-Substrates (Kanaar & Cozzarelli, 1992). Die Bindung der Resolvase an die DNA könnte durch eine infolge der vorhandenen Überspiralisierungen erhöhte lokale Konzentration positiv beeinflusst werden. Desweiteren wird die Paarung der beteiligten Resolvosome zum synaptischen Komplex begünstigt. Hierbei werden drei negative Superhelices fixiert (Reed, 1981).

### 1.1.2.1 Resolvase Mutanten

Es existieren mehrere hyperaktive Mutanten der Tn3 Resolvase. In einer der Mutanten wurde das Glutamat an Position 124 durch ein Glutamin ersetzt. Eine zweite Mutante enthält eine zusätzliche Substitution an der Position 102. Hier wurde ein Aspartat gegen ein Tyrosin ersetzt (Arnold et al., 1999). Äquivalente Substitutionen wurden auch in die  $\gamma\delta$  Resolvase eingeführt (Arnold et al., 1999; Boocock., pers. Mitteilung). Die relativen Positionen dieser Aminosäuren innerhalb des Enzymes sind in Abbildung 1.6 gezeigt.

Die normale Rekombinationsreaktion auf überspiralisierten Standardsubstraten mit zwei gleich orientierten, kompletten *res* Sequenzen (*res x res*) wird *in vitro* nicht durch die beiden Mutationen beeinträchtigt. Die Einfachmutante  $\gamma\delta^{E124Q}$  ist jedoch in der Lage auch relaxierte Substrate zu rekombinieren. Auch Substrate, in denen eine komplette *res* Sequenz durch eine isolierte *subsite* I ersetzt ist (*res x subI*), können *in vitro* und *in vivo* durch diese Mutante rekombiniert werden. Auf Substraten, in denen beide *res* Sequenzen durch isolierte *subsites* I ersetzt sind (*subI x subI*), können zwar Doppelstrangbrüche, aber keine Rekombinationsprodukte detektiert werden. Die Doppelmutterante  $\gamma\delta^{E102Y,E124Q}$  zeigt hingegen auch auf diesen Substraten Rekombinationsaktivität; die Effizienz wird aber durch die Präsenz der akzessorischen *subsites* II und III erhöht. Außerdem verläuft die Rekombination auf *subI x subI*

Substraten ungerichtet (Abbildung 1.5). So konnten auf diesen Substraten äquimolare Mengen von Deletions- und Inversionsprodukten unterschiedlicher Topologie beobachtet werden. Das  $\gamma\delta$  Resolvase Derivat ist zudem in der Lage Substrate mit invertierten *res* Sequenzen zu rekombinieren und intermolekulare Rekombinationsreaktionen zu katalysieren (Arnold et al., 1999; Boocock., pers. Mitteilung).



**Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Synapsis auf *subI x subI* Substraten.**

Synapsis auf einem zirkulären Substrat mit isolierten *subsites* I (*subI*). Nach Bindung der Resolvase Dimere (schwarze und graue Kreise) an die *subsites* I führt ein zufälliges Aufeinandertreffen (*random collision*) zur Ausbildung zweier unterschiedlicher, funktioneller synaptischer Komplexe. Eine antiparallele Orientierung (oben) führt zur Inversion, eine parallele (unten) zur Deletion des Substrates. Die Rekombinationsreaktionen sind reversibel.

Über die mechanistischen Auswirkungen dieser Aminosäuresubstitutionen ist man sich im Unklaren. Es wird spekuliert, daß sich Interaktionen des Glutamats124 mit dem aktiven Serin10 sowie dem Arginin68 der Partneruntereinheit regulierend auf die Rekombinationsaktivität der Resolvase auswirken. Ein Austausch könnte diesen Mechanismus zerstören, so daß daraus eine Hyperaktivierung der Resolvase resultiert. Das Glutamat102 befindet sich in einer Region, die in Dimer-Dimer-Interaktionen involviert ist. Die Mutation könnte eine Zerstörung des Kontrollmechanismus, der nur die Ausbildung des korrekten synaptischen Komplexes mit den *subsites* II und III zulässt, verursachen. Eine zweite Hypothese ist, daß infolge der Mutation die Eigenschaften der *hinge*-Region zwischen der  $\alpha$ -E-Helix und dem Hauptteil der N-terminalen Region verändert wird. Eine durch den Aminosäureaustausch erhöhte



**Abbildung 1.5:** Stereo-Struktur eines an die *subsite I* gebundenen  $\gamma\delta$  Resolvase Dimers. Die DNA-Doppelhelix ist schwarz dargestellt. Die katalytische Domäne der Resolvase ist dunkelblau, die  $\alpha$ -E-Helix mit der *linker*-Region ist blau gekennzeichnet. Die DNA-bindende Domäne ist türkis dargestellt. Die Resolvase interagiert mit Nukleotiden in der großen und in der kleinen Furche (Rimphanitchayakit et al., 1989). Das zur DNA gerichtete nukleophile Ser10 ist rot markiert. Die beiden in den Mutanten substituierten Glutaminsäuren an den Positionen 102 und 124 sind gelb bzw. orange markiert. Es ist zu erkennen, daß Glu124 zum Ser10 ausgerichtet ist und mit diesem interagieren kann. Glu102 hingegen befindet sich in der *hinge*-Region, die die lange  $\alpha$ -E-Helix mit dem Rest der katalytischen Domäne verbindet, und fixiert die Konfiguration des Dimers. An dieser Position kann die Aminosäure aber auch Dimer-Dimer Interaktionen fördern. (Die Strukturen wurden mit RasMol 2.6 angefertigt.)

Flexibilität der *hinge*-Region könnte durch eine Konfigurationsveränderung zur Aktivierung der Resolvase führen (Arnold et al., 1999).

## ***1.2 Ziele dieser Arbeit***

Die Entdeckung, daß verschiedene Rekombinasen in Zellen höherer Eukaryoten aktiv sind, führte zu deren Einsatz als Werkzeug zur Manipulation eukaryotischer Genome. Vor allem Cre und FLP werden heute oft mit Erfolg angewendet. Mittlerweile konnte auch für Mutanten der  $\lambda$ -Integrase (Int-h; Miller et al., 1980 und Int-h/218; Christ & Dröge, 1999), die unabhängig von Cofaktoren und der Topologie des Substrates rekombinieren können, gezeigt werden, daß sie in menschlichen Zellen rekombinationsaktiv sind (Lorbach et al., 2000). Auch die  $\beta$ -Rekombinase, die Integrase des Phagen  $\phi$ C31 und die Integrase des Phagen HK022 zeigen Rekombinationsaktivität in eukaryotischen Zellen (Diaz et al., 1999; Groth et al., 2000; Kolot et al., 1999). Das prokaryotische, sequenz-spezifische Rekombinationssystem der  $\gamma\delta$  Resolvase wurde hingegen noch nicht auf ihre Funktionalität in Zellen höherer Organismen analysiert.

In dieser Arbeit sollte das System auf Säugetierzellen transferiert werden. Die Rekombination der Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase sowie der beiden Mutanten  $\gamma\delta^{E124Q}$  und  $\gamma\delta^{E102Y,E124Q}$  sollte zunächst auf episomalen DNA-Substraten untersucht werden. Aufgrund der Resultate sollten Rückschlüsse auf den topologischen Zustand dieser Substrate in eukaryotischen Zellen gezogen werden. Außerdem sollten die Rekombinationseffizienzen von  $\gamma\delta$  Resolvase Derivaten und Cre direkt miteinander verglichen werden.

Auf genomischen Substraten sollten ebenfalls die Rekombinationseffizienzen von  $\gamma\delta$  Resolvase und Cre verglichen werden. Durch die Untersuchungen des Einflusses der Transkription sowie der Effekte von Histon-Deacetylase - und Topoisomerase

Inhibitoren auf die Rekombination sollten zudem Aussagen über die Dynamik der Chromatinstruktur ermöglicht werden.

Im Säugergenom gibt es mehrere rekombinationsaktive Erkennungssequenzen für prokaryotische Rekombinasen. So konnten beispielsweise kryptische *loxP* Sequenzen (Pseudo-*loxP*) gefunden werden, auf denen Cre rekombinieren kann (Thyagarayan et al., 2000). In dieser Arbeit sollte schließlich eine erste Suche nach *subsite I* homologen Sequenzen im Genom von Säugetierzellen durchgeführt und deren Funktionalität analysiert werden.

## II. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Allgemeine Materialien und Geräte

In der folgenden Liste sind die verwendeten Materialien und Geräte aufgeführt.

Chemikalien	wenn nicht gesondert angegeben von den Firmen Fluka, Merck, Roth, Serva, Sigma
Agarosegel-Kammern	eigene Herstellung
Proteingel-Kammern	Minigel-System, Multigel-System von Biometra
Powersupplier	Modell 2197 von LKB Bromma ECPS 3000/150 von Pharmacia Minicell Power Pack P20 von Biometra Electrophoresis Power Supply von Consort Model 200/2.0 von BIO-RAD PTC-100 <sup>TM</sup> von MJ Research, Inc.
PCR	PCR Master-Mix Q von Qiagen
Oligonukleotide	von ARK (Sigma)
Western Blot	BM Chemiluminescence Western blotting Kit (mouse/rabbit) von Boehringer Mannheim; Western Blot Apparatur von Biotech Fischer
DNA-Größenmarker	100 bp DNA Ladder und 1 kb DNA Ladder von Gibco BRL oder NEB
Protein-Größenmarker	Protein Marker Broad Range von NEB
DNA-Präparation aus Agarosegelen	QIAquick Gel Extraction Kit von QIAGEN
Präparation genomischer DNA aus Zellen;	QIAamp DNA Blood Mini Kit von Qiagen
DNA-Präparation aus Bakterien	QIAprep Spin Miniprep Kit; Endo Free Plasmid Maxi Kit; von Qiagen
Membranen	GeneScreen Plus Hybridization Transfer Membrane von NEN; Immobilon P von Millipore
Filterpapier	Whatman 3MM-Papier
Geltrockner	Gel Slab Dryer Mod. 224 von BIO-RAD

Spektrophotometer zur Bestimmung der DNA-Konzentration	Gene Quant II von Pharmacia Biotech MicroVolumeCell (70 µl) –Küvette von Pharmacia Biotech
Küvetten für Proteinmessung	1,5 ml halbmikro PMMA von Brand
Spektrophotometer zur Bestimmung des Proteingehaltes von Zellysaten	UV-160A von Shimadzu
Küvetten für β-Gal Messung	5 ml; 75x12 mm Röhrchen von Sarstedt
Luminometer für β-Gal Messung	Lumat LB 9501 von Berthold
Ligase	T <sub>4</sub> -DNA-Ligase und Ligationspuffer von NEB
Alkalische Phosphatase	Calf intestinal Phosphatase und One Phor All Buffer Plus von Amersham Pharmacia
Restriktionsenzyme	Restriktionsenzyme und Enzym-Puffer von NEB, Gibco BRL und Boehringer Mannheim
pH-Meter	Mikroprozessor-pH-Meter pH537 von WTW
DNA Probenpuffer	25 % Ficoll 400; 50 mM EDTA; 0,25 % Xylencyanol; 0,25 % Bromphenolblau
Protein Probenpuffer	Sample Buffer 3x von NEB
Pumpen	Modell MZ2C/1.7, Modell RS-2 von Vacuubrand
Röntgenfilme	X-OMAT Xar Filme von Kodak
Röntgenfilmentwicklung	Entwickler G153, Fixierer G354 von Agfa-Gevaert Entwicklermaschine Modell 9432/101 von Agfa-Gevaert
UV-Detektionssystem	Image Master VDS von Pharmacia Biotech
Phospho-Imager	BAS 1000 / FUJIX ; Software TINA 2.09g
Sequenzierung	DNA Sequencing Kit – BigDye™ ; ABI PRISM DNA Sequencer 377, von Perkin Elmer
Thermoblock	Ori-Block OB-3 von Techne
Vakuumtrockner	von Kartell
Waagen	L2200S und H51 von Sartorius; K7 von Mettler, Zürich
Reaktionsgefäße	1,5 ml; 2,0 ml Safe-Lock von Eppendorf; 0,6 ml von BIOzym; Multi Ultra PCR Tube von Sorenson BioScience, Inc.
Pipetten	von Eppendorf und Gilson
Sterile Pipetten und -spitzen	Pipette P8 steril 10 ml von Sterilin; Gestopfte Pipettenspitzen 1000 µl, 250 µl, 30 µl von BIOzym
Polypropylene-Röhrchen	15 ml und 50 ml von Greiner und Falcon
Magnetrührer	MR82 von Heidolph
Gel-Schüttler	REAX3 von Heidolph; LS10 von Gerhard

Bakterienschüttler	G10- und GIO-Gyrotory Shaker von New Brunswick Scientific
Brutschränke	B5060 EK – CO <sub>2</sub> von Heraeus
Sterilbänke	Lamin air HB2448, HA2448GS von Heraeus
Zellkulturschalen	96 well flat bottom (3596), 48 well (3548) von Costar 24 well (3047), 12 well (3043), 6 well (3046) von Falcon 10 cm Kulturschalen (3003) von Falcon
Wasserbad	von GFL
Inkubatoren	B30 von Memmert
Hybridisierungsöfen	OV4 von Biometra
Zentrifugen	Eppendorf-Tischzentrifuge: Biofuge 13, Biofuge pico von Heraeus; Mitteltourige Zentrifuge: Modell GPKR von Beckmann; Ultrazentrifuge: RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge von Sorvall PicoFuge: PicoFuge von Stratagene

## 2.2 Methoden

Im den folgenden Abschnitten werden die in dieser Arbeit durchgeführten Methoden dargestellt.

### 2.2.1 Klonierung der Expressions- und Substratplasmide

#### Material:

E. coli Sicherheitsstämme	BMH8117 <sup>recA</sup> (Oehler et al., 1990; modifiziert zu recA <sup>-</sup> ) DH5 $\alpha$ (Woodcock, 1989) JC5543 <sup>recA,B,C</sup> (Willets et al., 1969) XL1-Blue (Bullock et al., 1987) 294-Cre (Buchholz et al., 1996)
---------------------------	--

Antibiotika	Ampicillin, Chloramphenicol, Hygromycin, Kanamycin; alle von Sigma
X-Gal	von PeqLab
dYT-Nährmedium (Maniatis et al., 1982)	bacto-Trypton 16 g bacto-Hefe-Extrakt 10 g NaCl 5 g H <sub>2</sub> O bidest.; auf 1 l
dYT-Agarplatten (Maniatis et al., 1982)	wie dYT-Medium, + bacto-Agar 15 g

### 2.2.1.1 Fragmentierung der DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA an spezifischen DNA-Sequenzen endonukleolytisch spalten. Die entstandenen restringierten DNA-Fragmente können nach einer Größenauftrennung im Agarosegel aufgereinigt (2.2.3) und in einen geeigneten Vektor bzw. mit anderen Fragmenten ligiert werden (2.2.1.4).

Zur Durchführung eines erfolgreichen Restriktionsverdaus wurden in der Regel 1 µg DNA mit 10 U des Enzyms (NEB oder Boehringer) in einem Gesamtvolumen von 20 µl unter Einhaltung der vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen inkubiert. Bei größeren DNA-Mengen wurde das Gesamtvolumen um den jeweiligen Faktor erhöht.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme sind in der Beschreibung des jeweiligen Experimentes aufgeführt. Die Durchführung eines Restriktionsverdaus von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen wird in Kapitel 2.2.8.2 gesondert dargestellt.

### 2.2.1.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (engl. *Polymerase Chain Reaction* = PCR) wird zur Amplifikation geringer DNA-Mengen angewendet. Hierbei wird ein bestimmter Bereich eines DNA-Doppelstranges, der als Matrize fungiert, mit Hilfe zweier Oligonukleotide

(ca. 20 bp komplementärer Sequenzbereich), die zu den Enden des zu amplifizierenden Fragmentes komplementär sind, durch eine thermostabile DNA-Polymerase exponentiell vervielfältigt (Mullis & Faloona, 1987).

Die in einer PCR-Reaktion eingesetzte Menge der Matrizen-DNA (Template) betrug in dieser Arbeit zwischen 250 pg und 50 ng. Die Oligonukleotide (Primer) wurden so gewählt, daß die Schmelztemperatur im Bereich von 55°C - 65°C lag und keine Komplementarität zu anderen Bereichen des Templates vorlag. Die Primer wurden in einer Konzentration von 50 pmol/µl in Aqua dest. gelöst. Gewöhnlich wurden die PCR-Reaktionen mit dem MasterMix-Q von QIAGEN durchgeführt. Die Reaktionstemperaturen und -zeiten wurden auf den jeweiligen Primersequenzen und der Länge der erwarteten Produkte basierend kalkuliert. Die Reaktionsbedingungen sind in den einzelnen Experimenten gesondert aufgeführt. Eine typische PCR wurde wie folgt angesetzt:

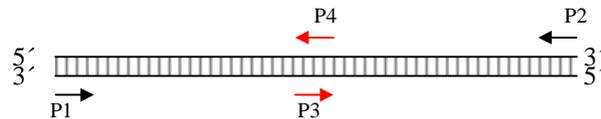
Template-DNA	1 µl
Primer 1+2	je 1 µl
MasterMix-Q	25 µl
Aqua dest.	ad 50 µl

In dieser Arbeit wurde die Polymerasekettenreaktion zur Charakterisierung von stabilen Zelllinien (2.2.8), in Rekombinationsanalysen (2.2.11) und für Klonierungen (2.2.1.8) eingesetzt. Über PCR amplifizierte Rekombinationsprodukte wurden zusätzlich sequenziert (2.2.5). Für die Weiterverwendung von PCR-Fragmenten bei Klonierungsarbeiten mußten diese aufgereinigt (2.2.3) und restringiert (2.2.1.1) werden.

#### Einführung von Punktmutationen durch Assembly-PCR:

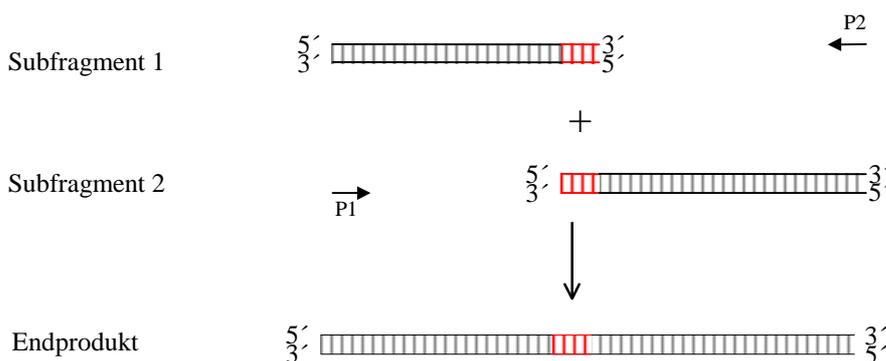
Das Einführen von Punktmutationen durch Assembly-PCR erfolgt in zwei Schritten unter Verwendung von vier Primern. Die Primer P1 und P2 flankieren das 3'- bzw. das 5'-Ende des zu amplifizierenden Fragmentes, während die Primer P3 und P4 zueinander

komplementär sind und durch die entsprechenden Nukleotidaustausche modifiziert sind (Abbildung 2.1).



**Abbildung 2.1: Primerauswahl für die Einführung von Punktmutationen durch Assembly-PCR**

Mit den Primerpaaren P1 und P4, sowie P2 und P3 wurden im ersten Schritt der Assembly-PCR zwei Subfragmente synthetisiert, die sich in dem Bereich, der mutiert werden soll, überschneiden. Diese Fragmente wurden über ein Agarosegel aufgereinigt und anschließend in äquimolaren Mengen in einer zweiten PCR als Template unter Verwendung der Primer P1 und P2 als Template eingesetzt, so daß das gewünschte Endfragment mit den integrierten Mutationen über die Gesamtlänge amplifiziert werden konnte (Abbildung 2.2).



**Abbildung 2.2: Synthese eines mutierten DNA-Fragmentes durch PCR über zwei Subfragmente**

### 2.2.1.3 Dephosphorylierung der 5'-Phosphat Termini von DNA-Fragmenten

Sollen DNA-Fragmente mit Plasmidvektoren über *sticky ends* (überstehende Enden) ligiert werden (2.2.1.4), müssen die Fragmente bzw. die Vektoren mit Restriktionsenzymen geschnitten werden, die kompatible freistehende Enden erzeugen. Beim Verdau mit Enzymen, die diese Bedingung nicht erfüllen, können durch weitere enzymatische Zwischenschritte *blunt ends* (stumpfe Enden) erzeugt werden, über die die DNA-Fragmente ebenfalls miteinander ligiert werden können. Es besteht allerdings jeweils die Gefahr einer Religation der Ausgangsfragmente.

Dieses Problem versucht man zu umgehen, indem man die 5'-Enden des DNA-Fragmentes dephosphoryliert, das den Replikationsursprung trägt. Diese auch als 'Cippen' bezeichnete Reaktion wird durch das Enzym alkalische CIP (*Calf Intestinal Phosphatase*) katalysiert. Aufgrund der fehlenden Phosphat-Gruppen an den 5'-Termini des DNA-Stranges kann die kovalente Verknüpfung der DNA-Enden nicht mehr durch die T<sub>4</sub>-DNA Ligase katalysiert werden. Erst wenn den dephosphorylierten Molekülen unbehandelte DNA-Fragmente zugegeben werden, kann die Ligationsreaktion aufgrund der jetzt wieder vorhandenen Phosphatgruppen ablaufen.

In der Regel wurde die Plasmid-DNA in dieser Arbeit mit 2 µl alkalischer Phosphatase und 3 µl OPA-Puffer in einem Gesamtvolumen von 30 µl für 30-60 min bei 37°C inkubiert und vor der Ligation aufgereinigt (2.2.3). Alternativ wurde das Enzym auch direkt in einen Restriktionsansatz gegeben.

### 2.2.1.4 Ligation

Mit Ligation bezeichnet man die durch eine Ligase katalysierte kovalente Verknüpfung zwischen 5'-Phosphat- und 3'-OH-Gruppen von DNA-Fragmenten.

Ein Ligationsansatz wurde wie folgt zusammengesetzt:

T <sub>4</sub> -DNA Ligase (NEB, 10 U/μl)		2 μl
Ligasepuffer 10x (NEB)		4 μl
Vektor- und Insert-DNA	molares Verhältnis von 1:3	
Aqua bidest		ad 40 μl

### 2.2.1.5 Transformation rekombinanter DNA in *Escherichia coli*

Um für weiterführende Experimente ausreichende Mengen an rekombinanter Plasmid-DNA zu erhalten, vermehrt man den zuvor konstruierten Vektor in Bakterienzellen der Spezies *Escherichia coli*.

Bei diesem als Transformation bezeichneten Prozeß macht man sich die natürliche DNA-Aufnahmebereitschaft (Kompetenz) einzelner Bakterienarten zunutze, die von mehreren Parametern, wie z.B. dem physiologischem Zustand der Zellen und der Wachstumsphase abhängt.

Herstellung kompetenter Bakterienzellen:

Eine Übernachtskultur wurde 1:100 in dYT verdünnt und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von OD<sub>600</sub> = 0,4-0,5 wachsen gelassen. Anschließend erfolgte eine 15 minütige Zentrifugation der auf 50 ml aliquotierten Bakterienzellen bei 4°C und 4000 rpm. Die Zellpellets wurden in je 15 ml eiskaltem TFB1 resuspendiert und 30 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C und 4000 rpm wurden die Zellen in 2 ml TFB2 aufgenommen. Aliquots von jeweils 100 μl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt (Hanahan et al., 1983, 1985).

Durch diese Methode ließ sich eine Kompetenz von 0.05 Transformanden pro lebender Zelle induzieren.

Die Puffer TFB 1 und TFB 2 setzten sich wie folgt zusammen:

<u>TFB 1:</u>	RbCl <sub>2</sub>	2,40 g
	MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	2,00 g
	Kaliumacetat (1 M)	6,00 ml
	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,30 g
	Glycerol	30,00 ml
	pH-Wert auf 5,8 einstellen mit 0,2 M CH <sub>3</sub> COOH	

<u>TFB 2:</u>	MOPS (1M)	2,00 ml
	RbCl <sub>2</sub>	0,24 g
	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	2,20 g
	Glycerol	30,00 ml
	pH-Wert auf 6,8 einstellen mit 0,2 M CH <sub>3</sub> COOH	

Durchführung der Transformation:

Für eine Transformation wurden 200 µl kompetente Zellen (*Escherichia coli*) auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz vermischt und 30 min auf Eis gestellt. Es folgte eine Inkubation für 45 sec bis 2 min (je nach Bakterienstamm) bei 42°C, bevor sie erneut für 3 min auf Eis gestellt wurden. Nach Zugabe von dYT-Medium ad 1 ml wurden sie 1 h bei 37°C und 225 rpm im Bakterienschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 1 min bei 4000 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Die Bakterien wurden in 50 µl dYT-Medium resuspendiert, auf eine Agar-Platte mit den entsprechenden Selektionsmarkern ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet.

### 2.2.1.6 Selektion transformierter Bakterienklone

Um eine Vorauswahl erfolgreich transformierter Bakterienklone treffen zu können, wurden dem Nährboden bzw. dem Nährmedium Antibiotika (Ampicillin, Hygromycin, Kanamycin, Chloramphenicol) zugesetzt. Durch diese Selektion wurde gewährleistet, daß nur die Bakterienzellen, die ein Plasmid mit dem jeweiligen Resistenzgen aufgenommen haben, überleben konnten. Hierbei wurden jeweils die in der Literatur angegebenen Standardkonzentrationen eingesetzt (Ausubel et al., 1995).

Einige Plasmide enthalten ein für ein  $\alpha$ -Peptid codierendes lacZ-Gen. Dieses Peptid bildet zusammen mit dem Produkt des lacZ M15-Gens aus den Bakterienzellen ein funktionales  $\beta$ -Galaktosidase Protein.

Das den Agarplatten zugesetzte X-Gal (30  $\mu$ g/ml) wird durch die Galaktosidase gespalten und führt zu einer optisch sichtbaren Blaufärbung der Kolonien. Bakterien, die dieses Gen nicht aufgenommen haben, bilden weiße Kolonien.

### 2.2.1.7 *In vivo* Rekombination von DNA-Molekülen in Bakterienzellen

Einige *E. coli*-Stämme tragen natürlich vorkommende Nukleotidsequenzen, die für sequenz-spezifische Rekombinationsenzyme wie  $\gamma\delta$  Resolvase codieren. So trägt z.B. der Bakterienstamm DH5 $\alpha$  ein F-Plasmid, auf dem sich die Sequenz des Transposons Tn1000 (= Tn $\gamma\delta$ ) befindet. Auf diesem Transposon befindet sich die für die  $\gamma\delta$  Resolvase codierende DNA-Sequenz. Ein anderer Stamm, 294-Cre, trägt im bakteriellen Genom integriert die für die Cre Rekombinase codierende DNA-Sequenz.

Mit diesen Stämmen wurden die Positivkontrollen für die in den späteren Rekombinationsanalysen verwendeten Substratplasmide generiert. Die Substratvektoren wurden nach Retransformation in die entsprechenden Bakterienstämme durch die jeweils exprimierte Rekombinase *in vivo* rekombiniert und anschließend aufgereinigt.

Über entsprechende Restriktionsverdauung wurde überprüft, ob ein Rekombinationsereignis stattgefunden hat. Auf diesem Wege konnte auch die Funktionalität von modifizierten Rekombinationssequenzen sichergestellt werden.

Die *in vivo* Rekombination wurde außerdem angewendet, um einen Funktionalitätstest der mutierten  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate  $\gamma\delta^{E124Q}$  und  $\gamma\delta^{E102Y,E124Q}$  bzw. aller NLS (*Nuclear Localisation Sequence*) tragenden Varianten durchzuführen. Hierzu wurde das für das jeweilige Enzym codierende Gen in den prokaryotischen Expressionsvektor pTrc99a (Pharmacia) kloniert und anschließend in  $BMH8117^{recA}$ -Zellen transformiert. Unter Selektionsdruck wurde sichergestellt, daß die Bakterien das mit einem Ampicillin-Resistenzgen ausgestattete Plasmid nicht verlieren. Das in der nachfolgenden Transformation eingebrachte, mit einer Chloramphenicol-Resistenz versehene Substratplasmid pACZ1 (bereitgestellt von Peter Dröge) sollte schließlich *in vivo* rekombiniert werden. Die Plasmid-DNA wurde aufgereinigt, mit NheI fragmentiert und über ein Agarosegel analysiert.

### 2.2.1.8 Herstellung der Expressions- und Substratvektoren

Im folgenden werden alle durchgeführten Klonierungen detailliert beschrieben.

#### A) Expressionsvektoren

Die eukaryotischen Expressionsvektoren für  $\gamma\delta$  Resolvase (pPGK $\gamma\delta$ /pPGK $\gamma\delta$ NLS) sowie für die  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten  $\gamma\delta^{E124Q}$  (pPGK $\gamma\delta$ 124/pPGK $\gamma\delta$ 124NLS) und  $\gamma\delta^{E102Y,E124Q}$  (pPGK $\gamma\delta$ 102/pPGK $\gamma\delta$ 102NLS) sind Derivate von pPGKCrebpa (Fellenberg, 1998). Der Vektor enthält den Phosphoglycerat-Kinase I Promotor (P-PGK; Adra et al., 1987) und die Polyadenylierungs-Signalsequenzen des Rinder-Wachstumshormons (bovine growth hormone; Pfarr et al., 1986). Die durch PCR klonierten Gene für die  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten wurden zwischen diese Elemente in den Vektor ligiert (Abbildung 2.3).

Für die Klonierung der Resolvase-Gene wurden folgende Primer verwendet:

P- $\gamma\delta$ A:	5' GATACTGCAGCATGCGACTTTTTGGTTACGCACGGGTATCA 3'
P- $\gamma\delta$ B:	5' GATATCTAGATTAGTTGCTTTCATTTATTACTTTATA 3'
P- $\gamma\delta$ 124Q:	5' CGACAGAGAATACTACAGCGTACCAATGAA 3'
P- $\gamma\delta$ 124Qanti:	5' TTCATTGGTACGCTGTAGTATTCTCTGTCTG 3'
P- $\gamma\delta$ 102Y:	5' AGTACCGATGGGTATATGGGTAAAATGGTT 3'
P- $\gamma\delta$ 102Yanti:	5' AACCATTTTACCCATATAACCCATCGGTACT 3'
P-2972:	5' CATATCTAGACTATTAACCTTCCTCTTCTTCTTAGGGTTGCTTT CATTTATTACTTTATA 3'

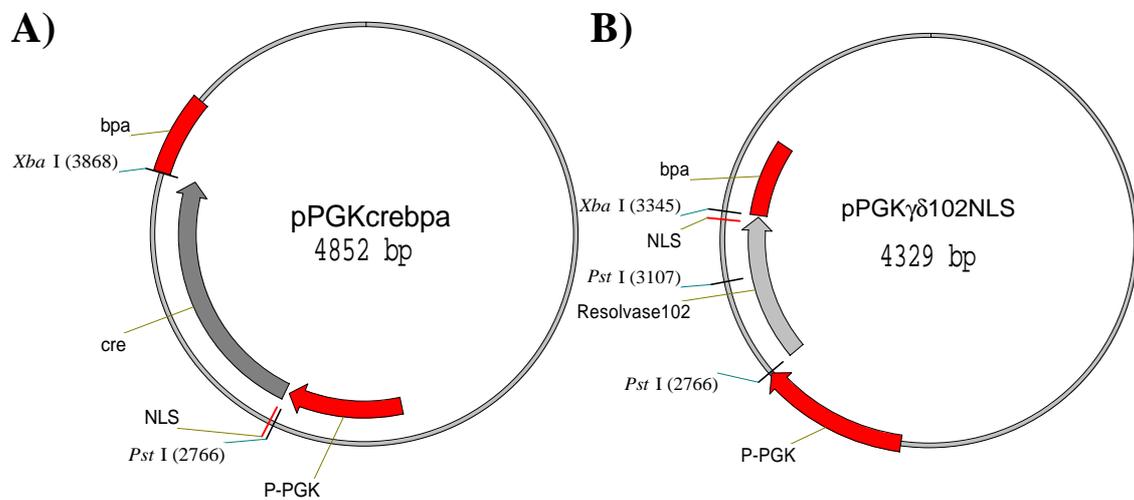
Die Amplifikation des Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase Gens ohne bzw. mit nuklearer Lokalisationssequenz (NLS; Kalderon et al., 1984) erfolgte mit den Primern P- $\gamma\delta$ A und P- $\gamma\delta$ B, bzw. P-2972 nach einem ersten Denaturierungsschritt bei 94°C (5 min.) mit 28 Zyklen von Denaturierung (95°C, 30 sec.), Primer-Bindung (56°C, 30 sec.) und DNA-Synthese (72°C, 45 sec.), gefolgt von einem letzten Syntheseschritt (72°C, 4 min.). Das resultierende PCR-Fragment wurde nach Restriktion mit PstI und XbaI für das mit denselben Enzymen herausgeschnittene Cre Gen in pPGKCrebpa eingesetzt.

Die Resolvase Mutanten wurden durch Assembly-PCR hergestellt. Hierbei wurden im ersten Schritt der Assembly-PCR in zwei getrennten PCR-Ansätzen mit den Primern P- $\gamma\delta$ A und P- $\gamma\delta$ 124Qanti bzw. P- $\gamma\delta$ 124Q und P- $\gamma\delta$ B zwei Fragmente des Resolvase Gens amplifiziert, die im überlappenden Bereich die Mutation E124Q enthielten. Die PCR-Produkte wurden anschließend, im zweiten Schritt der Assembly-PCR, in äquimolaren Mengen als Matrize für die folgende dritte PCR mit den Primern P- $\gamma\delta$ A und P- $\gamma\delta$ B eingesetzt.

Die Amplifikationen erfolgten jeweils nach einem ersten Denaturierungsschritt (94°C, 5 min.) durch 30 Zyklen von Denaturierung (94°C; 45 sec.), Primerbindung (60°C; 45 sec.) und DNA-Synthese (72°C; 45 sec.), sowie einem letzten Syntheseschritt (72°C; 6 min.). Analog dazu wurde mit den Oligonukleotiden P- $\gamma\delta$ A, P- $\gamma\delta$ 102Y, P- $\gamma\delta$ 102Yanti und P- $\gamma\delta$ B die zweite Mutation E102Y ins Gen eingeführt. Wie die Wildtyp  $\gamma\delta$

Resolvase wurden auch die Mutanten durch eine PCR mit den Primern P- $\gamma\delta$ A und P-2972 unter denselben Reaktionsbedingungen mit einer NLS am C-Terminus des Proteins versehen.

Wiederum wurden die modifizierten Resolvase Gene über die Restriktionsschnittstellen PstI und XbaI in den pPGK-Vektorhintergrund kloniert. Die nukleare Lokalisationssequenz entspricht der in pPGKCrebpa, am N-Terminus des Cre Gens positionierten NLS und stammt aus dem großen T-Antigen des SV40 (Gu et al., 1993).



**Abbildung 2.3: Schematische Abbildung der eukaryotischen Expressionsplasmide für Cre und  $\gamma\delta^{E102YE124QNLS}$ .**

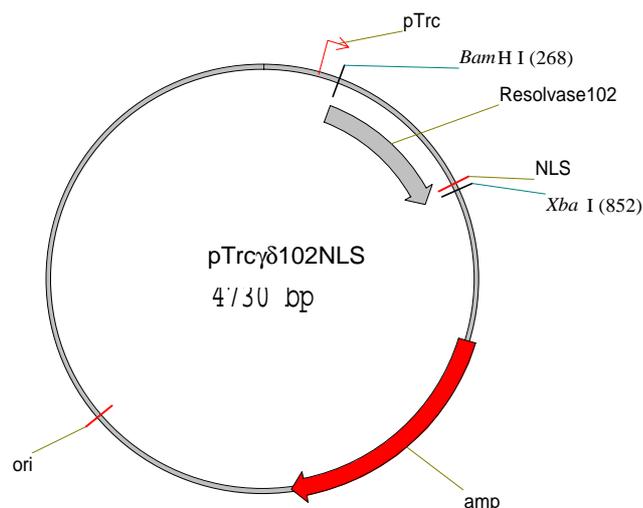
A) pPGKCrebpa: Das Gen für Cre (Cre) mit N-terminaler nuklearer Lokalisationssequenz (NLS) wird durch den PGK-Promotor (P-PGK) reguliert. Stromabwärts befindet sich die Polyadenylierungssequenz des Gens für das Rinderwachstumshormon (bpa). B) pPGK $\gamma\delta$ 102NLS: Das Cre Gen wurde mit PstI und XbaI aus dem Vektor deletiert, so daß das durch PCR hergestellte Gen für  $\gamma\delta^{E102Y,E124QNLS}$  über diese Restriktionsschnittstellen eingefügt werden konnte (Resolvase102). Die jeweilige Länge der Vektoren sowie die Positionen der Restriktionsschnittstellen sind angegeben.

Auf demselben Wege wurden auch eukaryotische Expressionsvektoren hergestellt, die anstelle des PGK-Promotors den Promotor des Cytomegalovirus (P-CMV; Boshart et al., 1985) tragen. Da diese Vektoren in den Rekombinationsanalysen nicht verwendet wurden, sollen hier nicht näher auf die Details der Klonierungen dieser Plasmide eingegangen werden.

Die prokaryotischen Expressionsvektoren für die  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate (pTrc $\gamma\delta$ NLS; pTrc $\gamma\delta$ 124NLS; pTrc $\gamma\delta$ 102NLS) sind Derivate des Plasmids pTrc99a (Pharmacia). Das Plasmid verfügt über den IPTG-induzierbaren, prokaryotischen Promotor pTrc, der aber auch im nicht induzierten Zustand eine ausreichende Expression der  $\gamma\delta$  Resolvase gewährleistet. Über PCR wurden die entsprechenden Resolvase Gene amplifiziert, die dann über die Restriktionsschnittstellen BamHI und XbaI in den Vektor kloniert worden sind (Abbildung 2.4). Die Durchführung der PCR erfolgte unter den für die Herstellung der eukaryotischen Expressionsvektoren angegebenen Bedingungen, unter Verwendung der jeweiligen pPGK-Vektoren als Matrize und den Primern P- $\gamma\delta$ 1 sowie P- $\gamma\delta$ 1anti.

P- $\gamma\delta$ 1: 5' GATACTGCAGGATCCCCACCATGCGACTTTTTGG 3'

P- $\gamma\delta$ 1anti: 5' GATATCTAGAGGATCCTAGACTATTAACCTTCC 3'



**Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des prokaryotischen Expressionsvektors pTrc $\gamma\delta$ 102NLS.**

Das durch PCR hergestellte Gen für  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNL}}$  (Resolvase102) wurde über die Restriktionsschnittstellen BamHI und XbaI in den Vektor pTrc99a kloniert und kann durch den Trc-Promotor (pTrc) exprimiert werden. Die Größe des Plasmids, die Positionen der verwendeten Restriktionsschnittstellen, die relative Lage des  $\beta$ -Lactamase Gens (amp) sowie des Replikationsursprunges (ori) sind angegeben.

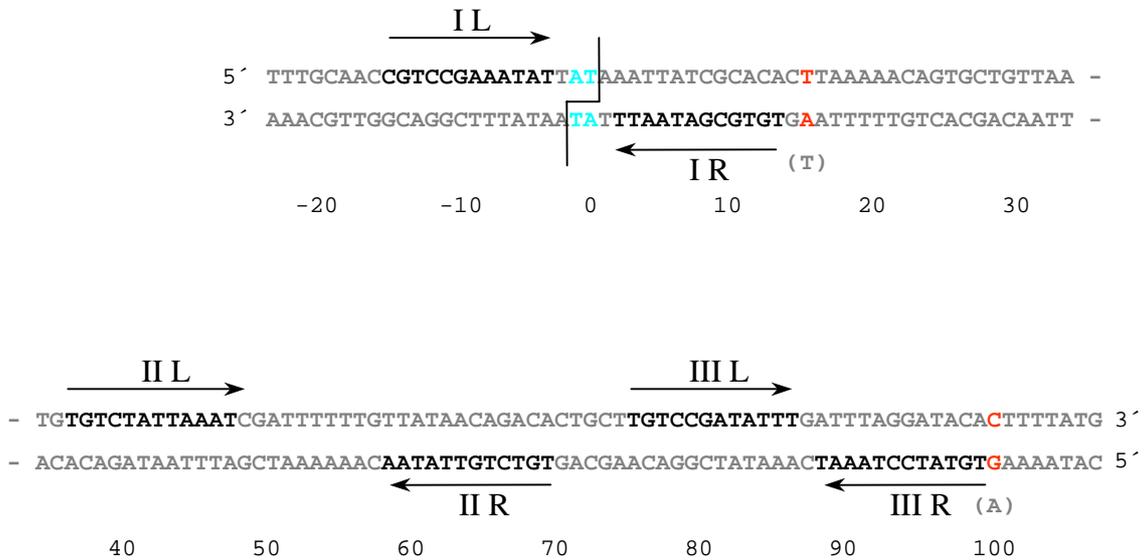
## B) SV40-Substratvektoren

Die SV40-Substratvektoren sind Derivate von pCH110 (Hall et al., 1983; Pharmacia). Hierbei stehen die Rekombinationskassetten unter der Kontrolle des SV40-Promotors, der eine starke Expression in eukaryotischen Zellen garantiert. Desweiteren besitzt das Plasmid die Polyadenylierung-Signalsequenzen des SV40 Tumor-Antigens.

Das im Ausgangsvektor mitsamt prokaryotischem Promotor enthaltene  $\beta$ -Galactosidase-Gen (*lacZ*) wurde zunächst mit HindIII und BamHI ausgeschnitten, um es nach PCR-Amplifikation mit den Primern P-*lacZ*1 und P-*lacZ*anti1 ohne dem prokaryotischen Promotor wieder einzufügen. Es wurde ein erster Denaturierungsschritt (94°C; 5 min.) durchgeführt, gefolgt von 30 Zyklen von Denaturierung (94°C; 1 min.), Primerbindung (56°C; 1 min.) und DNA-Synthese (72°C; 4 min.) und einem abschließendem Syntheseschritt (72°C; 10 min.). Für die Klonierung von pCH-RNRZ (Abbildung 2.6) wurde anschließend das Neomycin-Resistenzgen (*neo*) aus dem Vektor pSV2Neo (Southern et al., 1982) mit SmaI und BglIII herausgeschnitten. Über diese Schnittstellen wurde es mit durch PCR hergestellten Erkennungssequenzen für  $\gamma\delta$  Resolvase flankiert. Die Rekombinationssequenzen (*res*) wurden im Konstrukt in gleicher Orientierung angeordnet.

Die Amplifikation der *res* Sequenzen erfolgte mit den Primern P-RESmod und P-RESmodanti bzw. P-RESanti2. Sie begann mit einem ersten Denaturierungsschritt (94°C; 5 min.) und 30 Zyklen von Denaturierung (94°C; 30 sec.), Primerbindung (56°C; 30 sec.) und DNA-Synthese (72°C; 30 sec.). Es folgte ein abschließender Syntheseschritt (72°C; 4 min.). Die am 5'-Terminus des Neomycin-Resistenzgens gelegene *res* Sequenz wurde über BglIII an *neo* ligiert, die zweite *res* Sequenz wurde durch eine *blunt end*-Ligation mit dem 3'-Ende des Gens verbunden. Die entstandene Rekombinationskassette *res-neo-res* wurde über die HindIII-Schnittstelle zwischen SV40-Promotor und *lacZ*-Gen in das Substratplasmid kloniert. Dieser wurde als pCH-RNRZ bezeichnet. Da in der Wildtyp *res* Sequenz zwei ATG-Triplets vorkamen, die, da sie nicht im selben Leseraster wie das Startcodon des stromabwärts gelegenen *lacZ* Gens auftauchten, die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase negativ beeinträchtigt haben

(Kozak, 1986, 1991, 1992, 1995, 1997), wurden diese durch die verwendeten Primer modifiziert (Abbildung 2.5).



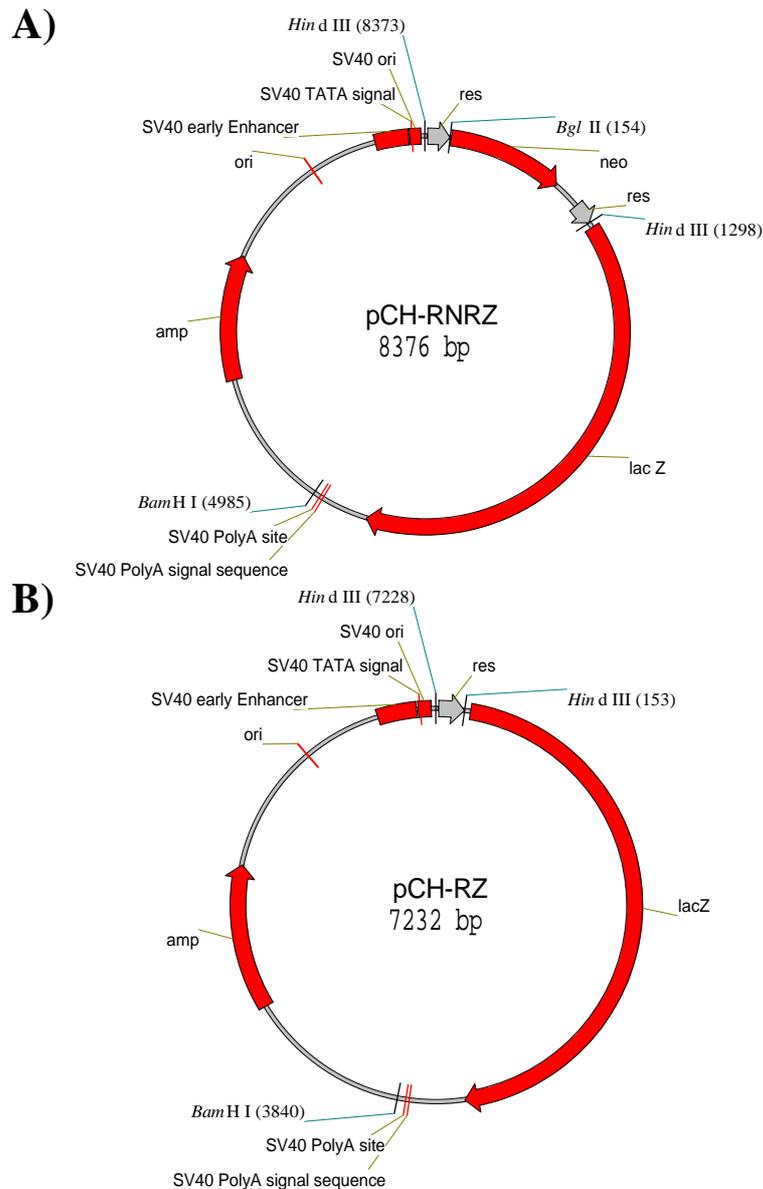
**Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der modifizierten *res* Sequenz.**

Die in den Substratvektoren proximal zum Promotor gelegenen *res* Sequenzen wurden an zwei Positionen modifiziert. Durch Assembly-PCR wurde jeweils ein Nucleotid neben der *subsite* IR bzw. neben der *subsite* IIR substituiert, so daß in der Wildtyp Sequenz vorhandene Startcodons eliminiert wurden. Die entsprechenden Nucleotide sind rot markiert, die in der Wildtyp Sequenz vorhandenen Basen sind darunter in Klammern aufgeführt.

Die verwendeten Oligonukleotide werden im folgenden aufgelistet:

- P-lacZ1: 5' GATAAAGCTTGCCGTAGATAAACAGGCTG 3'
- P-lacZanti1: 5' GATAGGATCCAGACATGATAAGATA 3'
- P-RESmod: 5' GATAAAGCTTGGGCCCAAAAAGTCGCATAAAAAGTGATCCTAA 3'
- P-RESmodanti: 5' ATAAGATCTAACAATTTTGCAACCGTCCGAAATATTATAAATTAT  
CGCACACTTAAAAACAGT 3'
- P-RESanti2: 5' GATAAAGCTTAACAATTTTGCAACCGTCCGA 3'

Das Plasmid pCH-RNRZ wurde *in vivo* in *E.coli* DH5 $\alpha$ -Zellen rekombiniert (2.2.1.7). Dieser Bakterienstamm zeichnet sich dadurch aus, daß er ein F-Plasmid trägt, das für die



**Abbildung 2.6: Schematische Abbildung des Substrates pCH-RNRZ und des Rekombinationsproduktes pCH-RZ.**

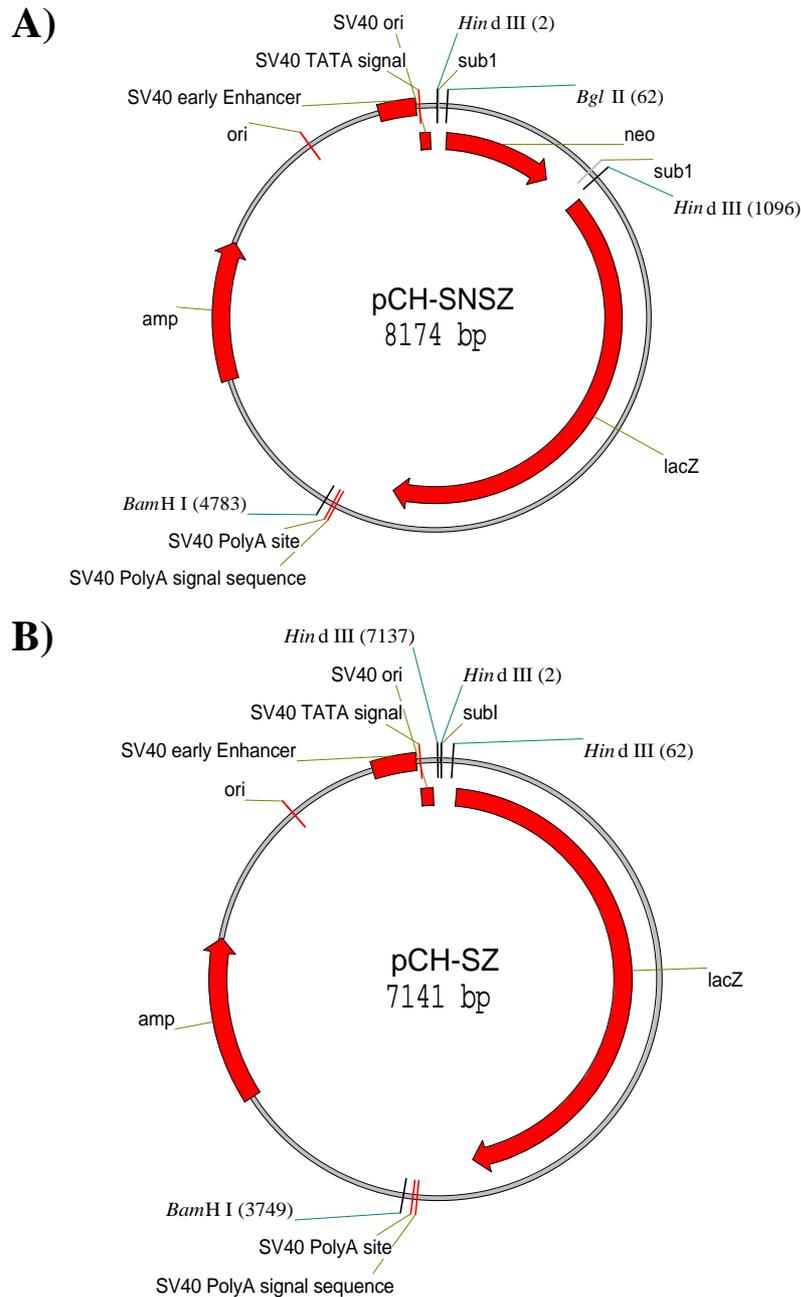
A) pCH-RNRZ: Das lacZ-Gen (lacZ) aus dem Ausgangsvektor pCH110 wurde durch PCR so modifiziert, daß es keinen prokaryotischen Promotor mehr enthält. Das Neomycin-Resistenzgen (*neo*) aus pSV2Neo wurde über SmaI und BglII mit *res* Sequenzen, die in gleicher Orientierung angeordnet sind, flankiert. Das entstandene Fragment *res-neo-res* wurde über Hind III zwischen SV40-Promotor und lacZ-Gen in den Vektor eingefügt. Die wichtigsten Elemente des SV40-Promotors sind der frühe Enhancer und die TATA-Box. Stromabwärts des lacZ-Gens befindet sich die SV40-Polyadenylierungssequenz. Angegeben sind auch die relativen Positionen des  $\beta$ -Lactamase Gens (*amp*) sowie die pro- und eukaryotischen Replikationsursprünge (*ori*; SV40 *ori*). B) Rekombinationsprodukt pCH-RZ. Durch  $\gamma\delta$  Resolvase werden *neo* sowie eine komplette *res* Sequenz deletiert, so daß das lacZ-Gen durch den SV40-Promotor exprimiert werden kann. Die verwendeten Restriktionsschnittstellen sowie die Größe des Plasmides sind jeweils angegeben.

Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase codiert. Das entstandene rekombinierte Plasmid pCH-RZ wurde in den Rekombinationsanalysen als Positivkontrolle verwendet.

Diesen Vektoren homolog sind die Plasmide pCH-SNSZ und pCH-SZ (Abbildung 2.7). Der Unterschied zu den erstgenannten Vektoren liegt darin, daß hier nicht die kompletten *res* Sequenzen, sondern nur die für den Strangaustausch notwendigen Sequenzen der *subsite* I enthalten sind. Die für die Bildung des synaptischen Komplexes notwendigen, akzessorischen *subsites* II und III fehlen also in diesen Konstrukten. Die erste *res* Sequenz wurde durch PCR mit den Primern P-RESsubI-1 und P-NEOanti deletiert. Die Amplifikation erfolgte nach einem ersten Denaturierungsschritt (94°C; 5 min) durch 30 Zyklen von Denaturierung (94°C; 1 min), Primerbindung (60°C; 1 min) und DNA-Synthese (72°C; 1 min), gefolgt von einem letzten Syntheseschritt (94°C; 5 min) mit pCH-RNRZ als Template. Die zweite *subsite* I wurde durch Hybridisierung der Primer P-RESsubI-2 und P-RESsubI-anti hergestellt und über die HindIII-Schnittstelle mit dem lacZ-Gen ligiert. Dieses Ligationsprodukt wurde über die NheI-Schnittstelle mit dem PCR-Fragment verbunden und dann über HindIII und BamHI in pCH110 eingebracht. Der Kontrollvektor pCH-SZ wurde durch eine Ligation der durch Primerhybridisierung der Primer P-RESsubI-1 und P-RESsubIanti hergestellten *subsite* I mit dem HindIII-restringiertem Vektorrückgrat pCH-Z konstruiert.

Folgende Primer wurden für diese Klonierungen verwendet:

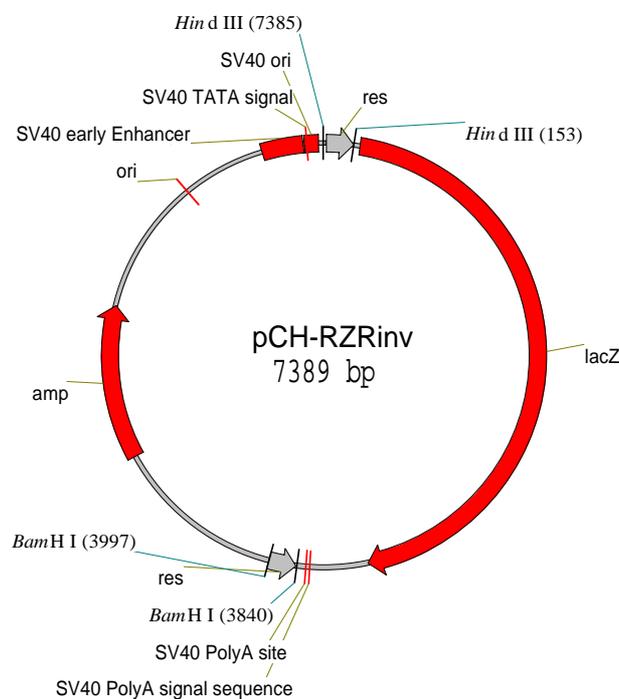
P-RESsubI-1:	5' GATAAAGCTTACTGTTTTTATGTGTGCGATAA 3'
P-RESsubI-2:	5' GATACCCGGGACTGTTTTTATGTGTGCGATAATTTATAATATTTTC GGACGGTTGCAAAATTGTTAAGCTTTATC 3'
P-RESsubI-anti:	5' ATAAAGCTTAACAATTTTGCAACCGTCCGAAATATTATAAATTA TCGCACACATAAAAACAGTCCCGGGTATC 3'
P-NEOanti:	5' GATACCCGGGGTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAG 3'



**Abbildung 2.7: Schematische Abbildung des Substrates pCH-SNSZ und des Rekombinationsproduktes pCH-SZ.**

A) pCH-SNSZ: Der Vektor ist analog zum Substrat pCH-RNRZ aufgebaut. Die *res* Sequenzen aus pCH-RNRZ wurden hier durch isolierte *subsites* I, die ebenfalls in gleicher Orientierung angeordnet sind, ersetzt. B) Rekombinationsprodukt pCH-SZ. Durch  $\gamma\delta$  Resolvase werden *neo* sowie eine *subsite* I deletiert, so daß das *lacZ*-Gen durch den SV40-Promotor exprimiert werden kann. Die verwendeten Restriktionsschnittstellen, die Größe des Plasmides und die wichtigsten DNA-Elemente sind jeweils angegeben.

Ausgehend von pCH-RZ wurde ein weiteres Substrat, pCH-RZR<sub>inv</sub>, konstruiert. Hierbei wurde eine mit den Primern P-RESmodBamHI und P-RESBamHIanti über PCR generierte *res* Sequenz über die BamHI-Schnittstelle in invertierter Orientierung hinter das *lacZ*-Gen des Vektors pCH-RZ kloniert. Man erhielt dadurch ein in den Rekombinationsanalysen verwendetes Inversionssubstrat (Abbildung 2.8). Die Amplifikation der *res* Sequenz erfolgte unter den oben aufgeführten Bedingungen für die Amplifikation von *res* für pCH-RNRZ.



**Abbildung 2.8: Schematische Darstellung des Substratvektors pCH-RZR<sub>inv</sub>.**

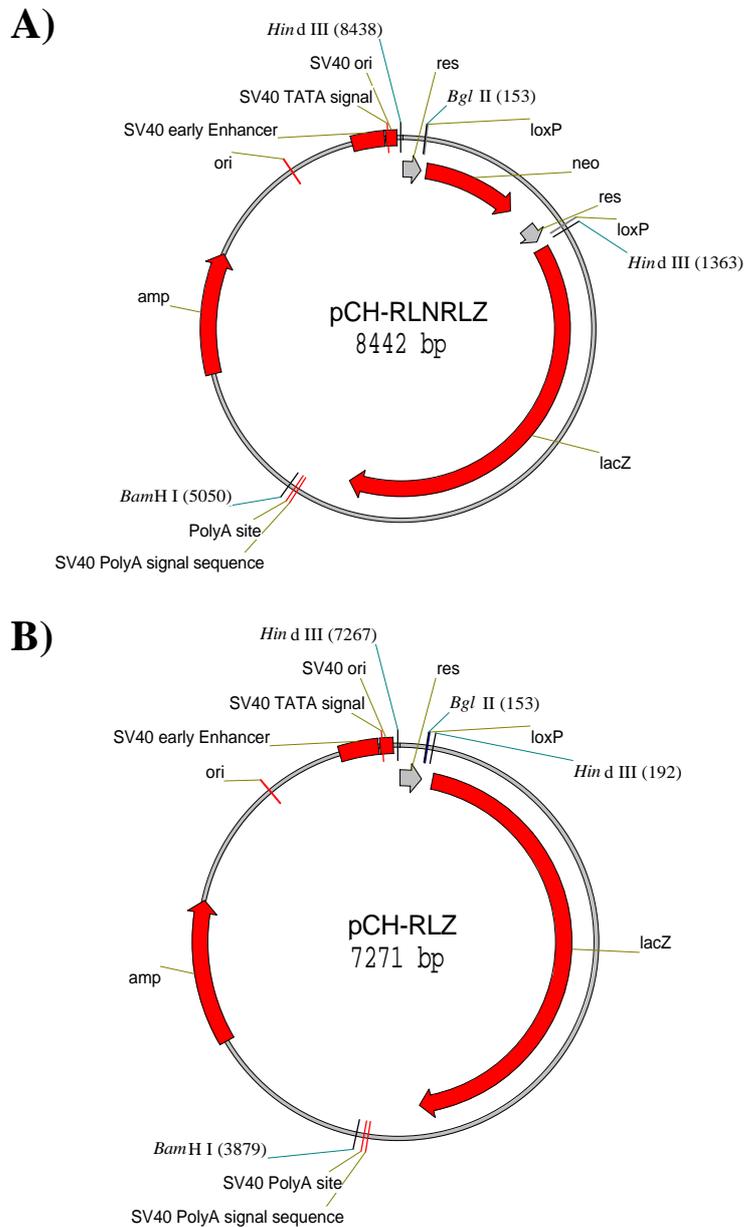
Unter Verwendung der BamHI-Restriktionsschnittstelle wurde in den Vektor pCH-RZ eine durch PCR generierte *res* Sequenz in invertierter Orientierung stromabwärts des *lacZ*-Gens eingefügt. Die Größe des Plasmides sowie die relativen Positionen der verwendeten Restriktionsschnittstellen und der wichtigen Vektor-Elemente sind angegeben.

Es wurden folgende Primer für die Klonierung von pCH-RZR<sub>inv</sub> verwendet:

P-RESmodBamHI: 5' GATAGGATCCGGGCCCAAAAAGTCGCATAAAAAGTGTATCC 3'

P-RESBamHIanti: 5' GATAGGATCCAACAATTTTGCAACCGTCCG 3'

Mit dem Vektor pCH-RLNRLZ wurde ein weiteres Substratplasmid konstruiert.



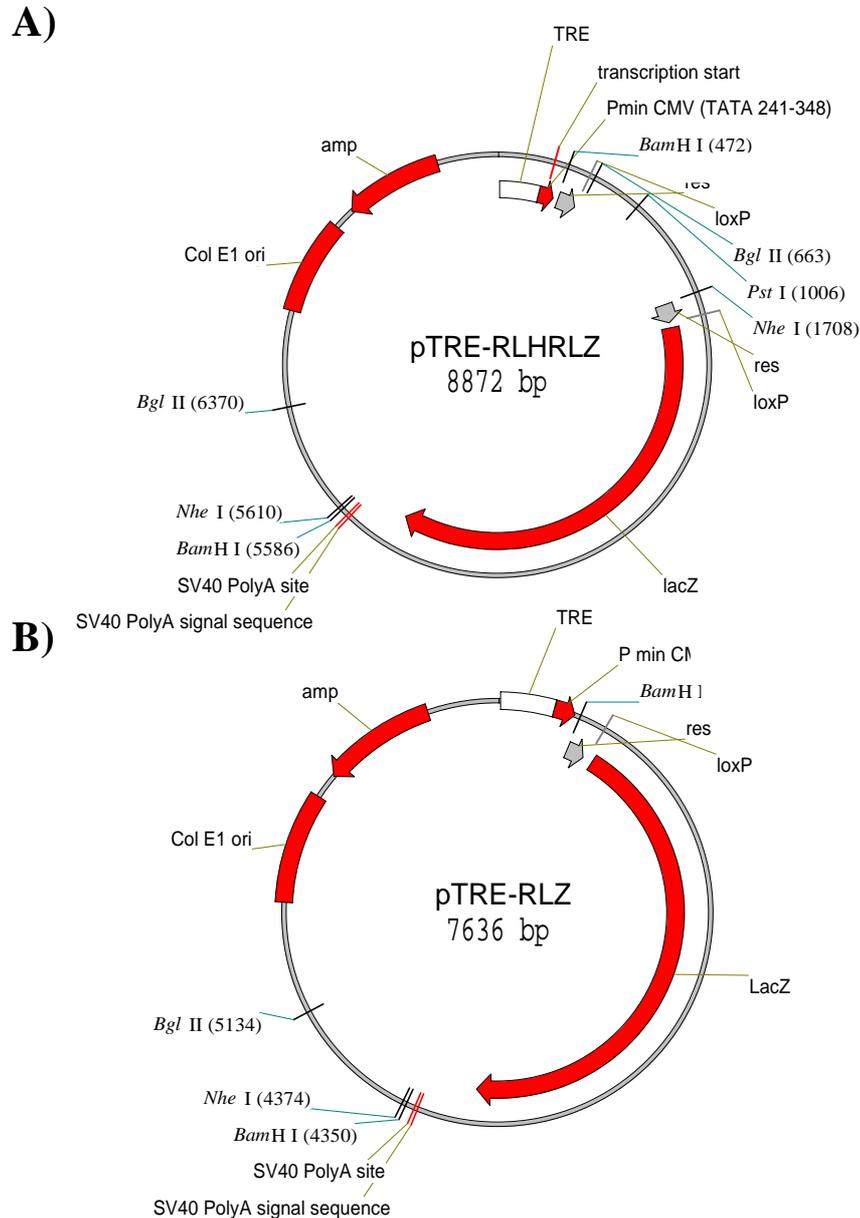
**Abbildung 2.9: Schematische Darstellung des Substratplasmides pCH-RLNRLZ und des Rekombinationsproduktes pCH-RLZ.**

A) pCH-RLNRLZ: Der Vektor ist analog zum Substrat pCH-RNRZ aufgebaut. *neo-res* wurde mit BglIII und HindIII aus pCH-RNRZ ausgeschnitten und durch PCR mit zwei gleich orientierten *loxP* Sequenzen flankiert. Anschließend wurde *loxP-neo-res-loxP* wieder in den Vektor ligiert. B) Rekombinationsprodukt pCH-RLZ. Durch  $\gamma\delta$  Resolvase werden *neo* sowie eine *res* und *loxP* Sequenz deletiert, so daß das *lacZ*-Gen durch den SV40-Promotor exprimiert werden kann. Die verwendeten Restriktionsschnittstellen, die Größe des Plasmides und die wichtigsten DNA-Elemente sind jeweils angegeben.



kontrollierten transkriptionalen Transaktivator (tTA), ein Fusionsprotein aus dem Wildtyp *tet*-Repressor (*tetR*) und der VP16-Aktivierungsdomäne (AD) des Herpes simplex Virus, wird die Transkription reguliert. Der Transaktivator bindet an TRE und aktiviert so den Promotor. Bei zusätzlicher Anwesenheit von Tetracyclin oder Doxycyclin wird die Konformation des Transkriptionsaktivators in dem Maße verändert, daß dieser nicht mehr an TRE binden kann. Der Promotor kann dann nicht mehr aktiviert werden, also wird die Transkription abgestellt. Um die Rekombinationseffizienzen von Cre und  $\gamma\delta$  Resolvase bei induzierter und inhibierter Transkription vergleichen zu können, wurde das Substrat pTRE-RLHRLZ (Abbildung 2.10) hergestellt. Dazu wurden mehrere DNA-Fragmente über PCR amplifiziert. Zunächst wurde mit den Primern P-Hyg und P-Hyganti das Hygromycingen aus dem Vektor pTk-Hyg (Clontech) nach einem ersten Denaturierungsschritt (94°C; 5 min) durch 30 Zyklen von Denaturierung (94°C, 45 sec), Primerbindung (60°C; 45 sec) und DNA-Synthese (72°C, 1 min), gefolgt von einem abschließendem Syntheseschritt (72°C; 4 min) synthetisiert. Das Produkt wurde mit einem ebenfalls durch PCR hergestelltem *res-loxP* Fragment über die Restriktionsschnittstelle BglII ligiert. Das *res-loxP* Fragment wurde mit den Primern P-RESmodBamHI und P-loxPBglIIanti amplifiziert. Unter Verwendung des Plasmids pCH-RLZ als Matrize wurden nach einem ersten Denaturierungsschritt (94°C; 5 min) 30 Zyklen von Denaturierung (94°C; 30 sec), Primerbindung (60°C; 30 sec) und DNA-Synthese (72°C; 30 sec) und ein abschließender Syntheseschritt (72°C; 30 sec) durchgeführt. Das Ligationsprodukt wurde über die NheI-Erkennungssequenz mit einem weiteren PCR-Produkt *res-loxP-lacZ* zusammenligiert. Letzteres PCR-Produkt wurde mit den Oligonukleotiden P-RESNheI und P-lacZanti synthetisiert. Als Template fungierte wiederum pCH-RLZ. Nach einem ersten Denaturierungsschritt bei 94°C für 5 min wurden 30 Zyklen von Denaturierung (94°C; 1 min), Primerbindung (60°C; 1 min) und DNA-Synthese (72°C; 4 min) durchgeführt. Ein abschließender Syntheseschritt (72°C; 10 min) vervollständigte die Amplifikation dieses PCR-Produktes. Das ligierte Gesamtfragment

*res-loxP-hyg-res-loxP-lacZ* wurde abschließend über die Restriktionsschnittstelle BamHI in die MCS (*Multi Cloning Site*) des Vektors pTRE2



**Abbildung 2.10: Schematische Darstellung des Substratplasmides pTRE-RLHRLZ und des Rekombinationsproduktes pTRE-RLZ.**

A) pTRE-RLHRLZ. Das Hygromycin-Resistenzgen (*hyg*) aus pTkHyg, wurde über BglIII mit *res-loxP* und über NheI mit *res-loxP-lacZ* aus pCH-RLZ ligiert. Über BamHI wurde *res-loxP-hyg-res-loxP-lacZ* in den Vektor pTRE2 kloniert, so daß das Konstrukt durch den minimalen CMV-Promotor, der durch das TRE regulierbar ist, transkribiert werden kann. B) pTRE-RLZ. Die Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase bzw. Cre führt zur Deletion von *hyg* und einer Sequenz von *res* und *loxP*. Das lacZ-Gen wird nun durch den Promotor exprimiert. Die Größe der Plasmide sowie die relativen Positionen der wichtigen Elemente und der verwendeten Restriktionsschnittstellen sind jeweils angegeben.

ligiert. Die MCS liegt unmittelbar stromabwärts des Promotors. Die entsprechenden Rekombinationsprodukte pTRE-RLZ wurden wiederum durch *in vivo* Rekombination in *E. coli* DH5 $\alpha$  bzw. *E. coli* 294-Cre hergestellt.

Im folgenden sind die für die Klonierung verwendeten Primer aufgelistet:

P-Hyg:	5' GATAAGATCTATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTC 3'
P-Hyganti:	5' GATAGCTAGCTCAGTTAGCCTCCCCCATCTCCCGATCCC 3'
P-RESmodBamHI:	5' GATAGGATCCGGGCCCAAAAAGTCGCATAAAAAGTGTATCC 3'
P-loxPBgIIanti:	5' GATAAGATCTATAACTTCGTATAATGTATGCTA 3'
P-RESNheI:	5' GATAGCTAGCGGGGCCCAAAAAGTCGCATAAAAATGTATCC 3'
P-lacZanti1:	5' GATAGGATCCAGACATGATAAGATA 3'

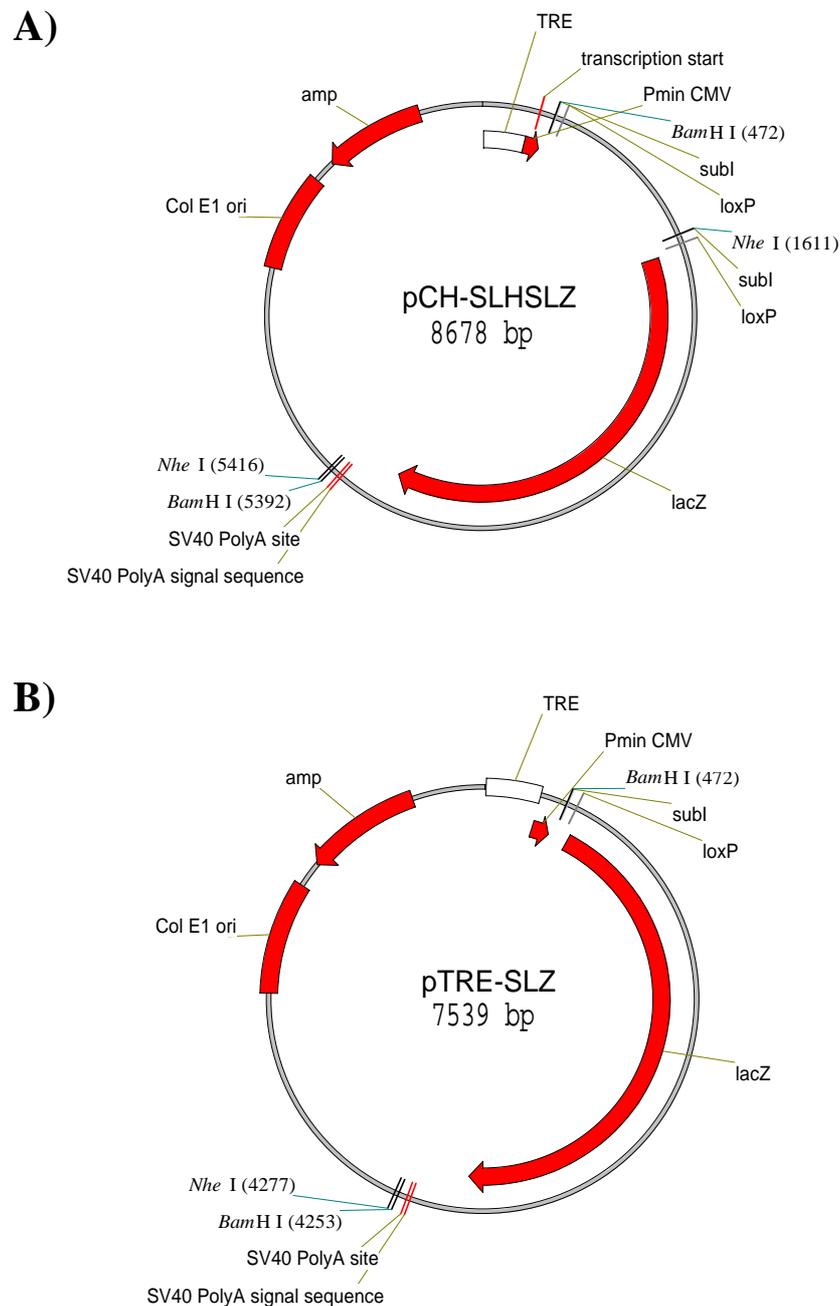
Analog zum oben beschriebenen Vektor pTRE-RLHRLZ wurde das Substrat pTRE-SLHSLZ mit isolierten *subsites* I, anstelle der kompletten *res* Sequenzen, konstruiert (Abbildung 2.11). Zunächst wurde über PCR das Fragment SLH (*subI-loxP-hyg*) amplifiziert. Mit pTRE-RLHRLZ als Matrize und den Oligonukleotiden P-Sub1BamHI sowie P-Hyganti wurden nach einem ersten Denaturierungsschritt (94°C; 5 min) 32 Zyklen von Denaturierung (94°C; 1 min), Primerbindung (60°C; 1 min) und DNA-Synthese (72°C; 90 sec) durchgeführt, gefolgt von einem letzten Syntheseschritt (72°C; 5 min). In einer weiteren PCR wurde das Fragment SLZ (*subI-loxP-lacZ*) unter Verwendung der Primer P-Sub1NheI und P-lacZanti1 und pTRE-RLZ als Template amplifiziert. Nach einem ersten Denaturierungsschritt (94°C; 5 min) wurden 32 Zyklen von Denaturierung (94°C; 1 min), Primerbindung (60°C; 1 min) und DNA-Synthese (72°C; 4 min) durchgeführt, gefolgt von einem letzten Syntheseschritt (72°C; 5 min). Die beiden PCR-Produkte wurden über die NheI-Schnittstelle zusammenligiert und schließlich über die BamHI-Schnittstellen in den Vektor pTRE2 gebracht.

Die verwendeten Oligonukleotide sind im folgenden aufgeführt:

P-Sub1BamHI:           5´ GATAGGATCCACTGTTTTTAAGTGTGCGATAATTTA 3´  
 P-Hyganti:             5´ GATAGCTAGCTCAGTTAGCCTCCCCCATCTCCCGATCCC 3´  
 P-Sub1NheI:           5´ GATAGCTAGCACTGTTTTTATGTGTGCGATAATTTA 3´  
 P-lacZanti1:           5´ GATAGGATCCAGACATGATAAGATA 3´

#### D) Substratplasmide mit humanen Pseudo-*subsite* I Sequenzen

Aufgrund einer Datenbankanalyse in der EMBL-Datenbank wurden zwei Sequenzen ausgewählt, die natürlicherweise im humanen Genom vorkommen und homolog zur *subsite* I von *res* sind (Pseudo-*subsite* I). Um zu überprüfen, ob diese Sequenzen in eukaryotischen Zellen funktional sind, wurden sie in den Vektor pCH-RNRZ kloniert. Für die dem Promotor proximale *res* Sequenz wurde die humane Pseudo-*subsite* I eingesetzt, die distale *res* Sequenz wurde im *overlap*-Bereich modifiziert. Hierzu wurde das Fragment *res-neo-res* mit HindIII aus dem Vektor ausgeschnitten und als Template für eine PCR mit den Primern P-Sub1h und P-RESoh-anti bzw. P-Sub1h20 und P-RESoh20 eingesetzt. Nach einem ersten Denaturierungsschritt (94°C, 5 min) wurden jeweils 30 Zyklen von Denaturierung (94°C; 1 min), Primerbindung (60°C, 1 min) und DNA-Synthese (72°C; 90 sec.) sowie ein abschließender Syntheseschritt (72°C; 5 min) durchgeführt. Über die HindIII-Schnittstelle wurde das Amplifikat in den Vektor ligiert, der als pCH-S<sub>h</sub>NR\*Z bzw. pCH-S<sub>h20</sub>NR\*Z bezeichnet wurde (Abbildung 2.12).

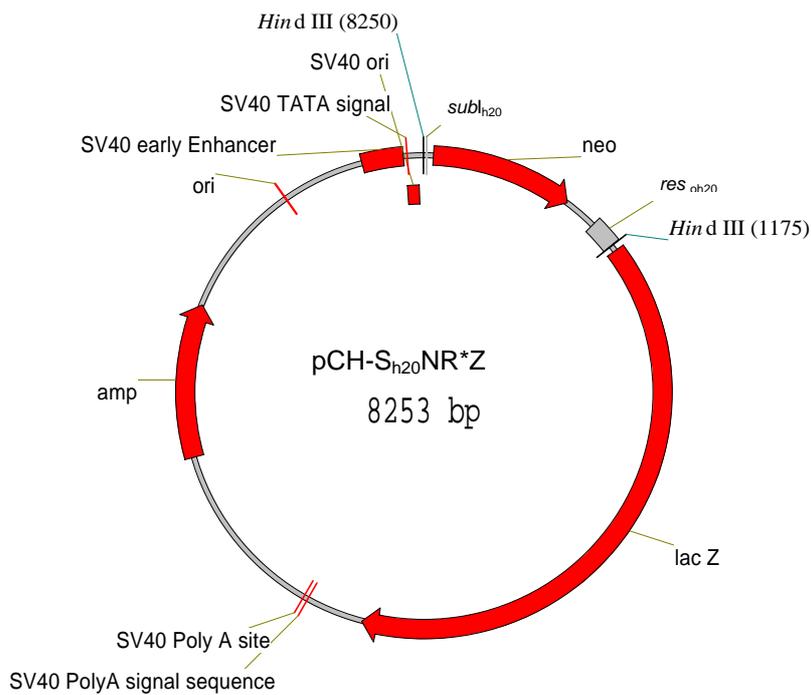


**Abbildung 2.10: Schematische Darstellung des Substratplasmides pTRE-SLHSLZ und des Rekombinationsproduktes pTRE-SLZ.**

A) pTRE-SLHSLZ ist ein Derivat von pTRE-RLHRLZ. Die *res* Sequenzen wurden jeweils durch isolierte *subsite* I Sequenzen ersetzt, die auch in gleicher Orientierung angeordnet sind. B) pTRE-SLZ. Die Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase bzw. Cre führt zur Deletion von *hyg* und einer Sequenz von *subI* und *loxP*. Das *lacZ*-Gen wird nun durch den Promotor exprimiert. Die Größe der Plasmide sowie die relativen Positionen der wichtigen Elemente und der verwendeten Restriktionsschnittstellen sind jeweils angegeben.

Folgende Oligonukleotide wurden für die Klonierung eingesetzt:

- P-Sub1h: 5' GATAAAGCTTTGTCAGATAGCTCCTTCTTTGTCGGACAAGATCTA  
GCATGATTGAACAAGATGGATTGC 3'
- P-RESoh-anti: 5' GATAAAGCTTAACAATTTTGCAACCGTCCGAAATATTAGAAATT  
ATCGCACACA 3'
- P-Sub1h20: 5' GATAAAGCTTTGTCCTATAACTATCCAATTAACGCACAAGATCTA  
GCAGATTGAACAAGATGGATTGC 3'
- P-RESoh20: 5' GATAAAGCTTAACAATTTTGCAACCGTCCGAAATATTGAAAATT  
ATCGCACACA 3'



**Abbildung 2.12: Schematische Darstellung des Substratplasmides pCH-S<sub>h20</sub>NR\*Z.**

Das Substrat pCH-S<sub>h20</sub>NR\*Z ist analog zum Vektor pCH-RNRZ aufgebaut. Die zum Promotor proximale *res* Sequenz wurde hier durch eine humane Pseudo-subsite I Sequenz (*subI<sub>h20</sub>*) ersetzt. Der *overlap*-Bereich der distalen *res* Sequenz wurde entsprechend modifiziert (*res<sub>oh20</sub>*). Dementsprechend wurde auch das Plasmid pCH-S<sub>h</sub>NR\*Z hergestellt. Die Größe des Vektors sowie die relativen Positionen der wichtigen Elemente und der verwendeten Restriktions-schnittstellen sind angegeben.

### 2.2.1.9 Plasmid-Präparation aus Bakterienzellen

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse und anschließender Affinitätschromatographie. Die durch die Transformation in die Bakterienzellen eingebrachte Plasmid-DNA wird über Nacht durch den bakterieneigenen Replikationsapparat vermehrt und schließlich aus den Zellen gewonnen, indem man die Zellwand durch ein alkalisches Reagenz (NaOH) lysiert. Die DNA wird schließlich über eine Anionen-Austauscherharz-Säule aufgereinigt.

Für spätere Arbeiten mit Zellkulturen (Transfektionen) muß darauf geachtet werden, daß die DNA nicht mit Endotoxinen kontaminiert ist, da die Transfektionseffizienz aufgrund dieser Substanzen empfindlich beeinflusst werden kann. Zudem wirken sich diese Substanzen toxisch auf die Zellen aus. Der von QIAGEN mitgelieferte *Endotoxin Removal Buffer* verhindert die Bindung der LPS-Moleküle an der Säule, so daß diese in den Waschschritten entfernt werden können, während die DNA an der Säule gebunden bleibt.

Für DNA-Minipräparationen wurden 1,5 ml einer 3 ml Übernachtskultur eingesetzt, für DNA-Midipräparationen 25 ml, für DNA-Maxipräparationen 200 ml Bakteriensuspension. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wurden folgende Kits von QIAGEN verwendet:

QIAprep Spin Miniprep Kit  
QIAprep Plasmid Midi/Maxi Kit  
EndoFree Plasmid Maxi Kit

Die DNA-Konzentration wurde bei 260 nm photometrisch bestimmt nach:

$$\begin{aligned} \text{OD}_{260} &= 1; \\ \Rightarrow c &= 50 \mu\text{g/ml} \end{aligned}$$

Beträgt der Quotient  $\frac{OD_{280}}{OD_{260}} < 1,8$ , sind Protein-Kontaminationen in der gelösten DNA enthalten.

Expressionsplasmide wurden aus den Stämmen *E. coli* DH5 $\alpha$  oder XL1-blue, rekombinierte Produktvektoren aus den Stämmen *E. coli* DH5 $\alpha$  oder 294-Cre mittels Affinitätschromatographie (Qiagen, Deutschland) isoliert. Sämtliche Substratplasmide wurden aus den Stämmen *E. coli* JC5547<sup>recA,B,C</sup> oder BMH8117<sup>recA</sup> isoliert.

### 2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

In Agarosegelen können DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden.

#### Material:

Agarose:	PeqGOLD Universal Agarose von Peqlab
TBE-Puffer (10x), 5 l:	TRIS 540 g (Sigma) Borsäure 275 g (Sigma) Na <sub>2</sub> EDTA 46,5 g (Sigma)
Ethidiumbromid-Lösung:	Ethidiumbromid (Fluka), in Aqua bidest. gelöst

Die Konzentration der verwendeten Agarose wurde je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente (0,8%-1,5%) gewählt. Als Gel- und Laufpuffer diente jeweils 1x TBE-Puffer. Zur Größenauftrennung wurde eine Spannung von 30-220 Volt angelegt, so daß die durch die Phosphatgruppen negativ geladenen DNA-Fragmente durch das Gel in Richtung Kathode wandern konnten.

Anschließend wurden die Gele ca. 10 min. in einer wäßrigen Ethidiumbromidlösung inkubiert, so daß der Farbstoff in die DNA-Fragmente interkalieren und diese dann im UV-Licht detektiert und abgelichtet werden konnten.

Durch diese Technik wurden einerseits Klonierungsexperimente überprüft, andererseits konnten bestimmte DNA-Fragmente, die weiterverwendet werden sollten, soweit aufgetrennt werden, daß man sie isoliert wiedergewinnen konnte (2.2.3). Desweiteren wurden mit Hilfe dieser Methode Rekombinationsanalysen durchgeführt (2.2.11).

### **2.2.3 DNA-Extraktion aus Agarosegelen**

In dieser Arbeit wurden DNA-Extraktionen aus Agarosegelen mit dem QIAquick Gel Extraction-Kit von QIAGEN nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde die DNA nach Schmelzen der Agarose durch Affinitätschromatographie aufgereinigt.

### **2.2.4 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA-Molekülen**

Diese Methode kann zur Aufreinigung von DNA aus Reaktionsgemischen, wie beispielsweise Restriktionsansätzen, PCR-Reaktionen oder *in vitro* Rekombinationsanalysen verwendet werden.

Im Einzelnen werden folgende Schritte durchgeführt:

- Um die DNA eines Reaktionsansatzes von Proteinen und Salzen zu trennen, wurde das gegebene Volumen mit demselben Volumen Phenol versetzt. Die sich im wäßrigem Überstand befindliche DNA wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und ein weiteres mal mit Phenol versetzt. Durch diese Phenol-Extraktion konnten die in der Lösung befindlichen Proteine entfernt werden.

- Um die Phenolreste vollständig zu beseitigen erfolgte eine Chloroform-Extraktion, die nach demselben Prinzip der Phenolaufreinigung stattfand, und u.U. auch wiederholt werden mußte.
- Der Überstand wurde in einem neuen Eppendorfgefäß auf ein Volumen von max. 400 µl reduziert, um eine Ethanol-Präzipitation durchführen zu können. Dazu wurden 2,5 Volumenanteile Ethanol (abs. 99,6%) sowie 1/40 Volumenanteile NaAc (3 M; pH 5,2) und bei Fragmenten von <100 bp zusätzlich 0,01 M MgCl<sub>2</sub> zugegeben. Nach Zentrifugation wurde das DNA-Pellet nochmals mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Die DNA konnte so von den in Lösung befindlichen Salzen befreit werden.
- Das nach Zentrifugation erhaltene DNA-Pellet wurde schließlich in TE-Puffer oder Aqua dest. gelöst.

### **2.2.5 Sequenzierung nach der Dideoxy-Methode**

Die Sequenzierung von DNA-Molekülen nach Sanger et al. (1977) erfolgte zur Überprüfung der DNA-Sequenz nach Klonierungen und zur Ermittlung der Nukleotidsequenz von PCR-Produkten aus Rekombinationsanalysen.

Hierzu wurden 1 µg der zu sequenzierenden DNA-Probe zusammen mit 1 µl eines entsprechenden Primers (50 pmol/µl) und 7 µl eines Sequenziermixes (DNA Sequencing Kit – BigDye™) in einen Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl gegeben. Durch eine PCR wurde das Produkt amplifiziert und nach Denaturierung über ein 4%-iges Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die PCR erfolgte nach dem vom Hersteller eingegebenen ABI-Programm im Thermocycler PTC-100™ von MJ Research, Inc..

Die Sequenzen wurden durch den ABI-PRISM DNA-Sequencer 377, (Perkin Elmer) analysiert und ausgedruckt.

Zusammensetzung des Polyacrylamidgels:

Polyacrylamid (PAA); 30%:	8,4 ml
Urea:	21,0 g
H <sub>2</sub> O:	20,0 ml
TBE-Puffer 10x:	6,0 ml
Ammoniumpersulfat (APS); 10%:	500 µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED):	25 µl

## 2.2.6 Zellkultur

Material:

Zellen:	NIH3T3 – Swiss mouse embryo fibroblasts (Andersson et al., 1969) HeLa – human cervix carcinoma cells (Scherer et al., 1953) CHO-K1 – Chinese Hamster Ovary cells (Puck et al., 1958) CHO-AA8 Tet-Off (Clontech, 1998)
Zellkultur-Medium	Dulbecco´s Minimal Essential Medium, BRL 041-01885 (Life Technologies) 10% FCS , Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (0,1 mg/ml), L-Glutamin (2 mM)
FCS (fetal calf serum):	von PAA; für Doxycyclin-Experimente von Clontech
L-Glutamin:	L-Glutamin, 100x (Life Technologies)
Antibiotika:	Geneticin G-418 (Life Technologies) Hygromycin (Serva) Penicillin (Life Technologies) Streptomycin (Life Technologies)
RPMI-Medium:	RPMI ohne Phenolrot, ohne L-Glutamin (Life Technologies)
PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> :	137 mM NaCl; 3 mM KCl; 16,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Trypsin:	90 ml PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> ; 10 ml Trypsin (2,5%) (Life Technologies)

### 2.2.6.1 Halten und Vermehren von Säugetierzellen in Kultur

Die adhären, als Monolayer-Kultur wachsenden Zellen wurden in Zellkulturschalen mit ca. 80 cm<sup>2</sup> Grundfläche in 10 ml DMEM und bei einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 7,5% gehalten. Zur Vermehrung durch Teilung wurden die Zellen bei einer Dichte von 80%, also im subkonfluenten Zustand, mit Trypsin vom Boden der Kulturschale gelöst, in frischem Medium aufgenommen und auf neue Schalen verteilt. Der Teilungsquotient betrug bei HeLa-Zellen 1:3-5, bei NIH3T3-Zellen 1:3-5 und bei CHO-Zellen 1:5-10.

### 2.2.6.2 Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen

*FuGENE<sup>TM</sup>6 vermittelte Transfektion:*

Um Rekombinationsanalysen in eukaryotischen Zellen durchführen zu können, mußten Substrat und Rekombinase in den Zellkern gebracht werden. Das Prinzip der hier durchgeführten Transfektionsmethode beruht auf dem Einsatz des nicht-liposomalen Transfektionsreagenzes FuGENE<sup>TM</sup>6 (Roche). Hierbei werden die Nukleinsäuremoleküle mit dem im Reagenz enthaltenem Lipidgemisch komplexiert. Die Lipide verschmelzen mit der Zellmembran, so daß die DNA-Moleküle ins Cytoplasma überführt werden und schließlich den Zellkern erreichen können.

Für die Transfektion wurden Zellen in einer Rosenthal-Zählkammer gezählt und in 6-Loch-Platten gegeben (1x10<sup>5</sup> Zellen/well). Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit FuGENE<sup>TM</sup>6 nach Angabe des Herstellers, wobei sich für HeLa- und NIH3T3-Zellen eine Zelldichte von ca. 40-50%, für CHO-Zellen eine Konfluenz von 20-30% als optimal herausgestellt hat. Die Zellen wurden nach einem definierten Zeitraum (24 h – 72 h) geerntet und entsprechend den folgenden Experimenten weiterbehandelt. Für größere Transfektionsansätze wurden die Mengen entsprechend modifiziert.

*Elektroporation:*

Eine weitere in dieser Arbeit angewandte Transfektionsmethode ist das Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen durch Elektroporation. Hierbei werden die Zellen kurzfristig einer elektrischen Spannung ausgesetzt und dadurch für die DNA-Moleküle permeabilisiert. Im einzelnen wurden folgende Schritte durchgeführt:

Die Zellen wurden 24 h vor der Elektroporation geteilt und auf 10 cm-Platten so ausplattiert, daß sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von ca. 60-80% erreichten. Unmittelbar vor der Elektroporation wurden die Zellen trypsiniert und für 5 min bei 1.200 rpm im 15 ml Falcon Röhrchen abzentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit 5 ml PBS wurden die Zellen erneut abzentrifugiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit RPMI-Medium (ohne Phenolrot und ohne L-Glutamin) und anschließender Zentrifugation. Pro Elektroporationsansatz wurden die Zellen einer Schale in 800 µl RPMI-Medium aufgenommen und mit 20 µg der zu transfizierenden DNA gemischt. Diese Suspension wurde schließlich in eine Elektroporationsküvette (4 mm; Peqlab) gegeben und im Elektroporator (GenePulser<sup>TM</sup>; Biorad) einer Spannung von 0.28 kV, bei einer Kapazität von 960 µFd ausgesetzt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen, je nach Bedarf, auf die entsprechenden Platten verteilt und in DMEM gehalten.

**2.2.6.3 Bestimmung der Transfektionseffizienz**

In dieser Arbeit wurde die Transfektionseffizienz von transient in die Zellen transfizierten Plasmiden durch drei unterschiedliche Färbemethoden bestimmt. Diese Methoden beruhen auf der Expression eines Proteins, das vom jeweils transfiziertem Vektor codiert und in den Zellen exprimiert wird. Das Protein sendet schließlich selbst Lichtsignale einer bestimmten Wellenlänge aus oder setzt ein Substrat um, das so zu einer Anfärbung der Zellen führt.

*X-Gal Färbung:*

Um Transfektionseffizienzen zu bestimmen, wurde das Plasmid pCH110 (Pharmacia) in eukaryotische Zellen transfiziert. Später wurde eine X-Gal Färbung durchgeführt. Diese Färbung erfolgte nach Fixierung der Zellen mit 0,5% Glutaraldehyd durch Zugabe der Färbungslösung (5 mM  $K_4Fe(CN_6) \cdot 3H_2O$ , 5 mM  $K_3Fe(CN_6)$ , 2 mM  $MgCl_2$ , 4 mg/ml X-Gal in PBS) und anschließender Inkubation für 7-8 h bei 37°C. Die Anzahl der blaugefärbten Zellen wurde mikroskopisch ermittelt. Hierzu wurden Raster mit mehreren Feldern (Eppendorf CELLocate Coverslips – 175  $\mu m$ ) auf 3 verschiedene Stellen innerhalb einer Zellkulturplatte gelegt, und der prozentuale Mittelwert der blaugefärbten Zellen ermittelt. Bei Bedarf wurde vor der Färbung die endogene  $\beta$ -Galaktosidase durch eine Inkubation der Zellen bei 56°C (30 min) inhibiert.

*Anfärbung der alkalischen Phosphatase:*

Da in dieser Arbeit häufig Co-Transfektionsexperimente durchgeführt worden sind, sollte auch die Effizienz dieser Co-Transfektionen ermittelt werden. Hierzu wurde zusammen mit pCH110 der Vektor pHD2AP (Kellendonk et al., 1996) in Säugetierzellen transfiziert. Dieser Vektor trägt das Gen für die plazentale alkalische Phosphatase (pAP). Dieses Enzym ist zur Spaltung von Phosphatestern befähigt. Die Umsetzung bestimmter Reagenzien kann zu einer Färbereaktion führen, die sich in diesem Fall auf die pAP exprimierenden Zellen niederschlug. Nach 48 h wurde zunächst eine X-Gal Färbung (siehe oben) und direkt im Anschluß die Anfärbung der alkalische Phosphatase exprimierenden Zellen mit Fast Red Tablets (Boehringer Mannheim), nach Angaben des Herstellers, durchgeführt. Diese Methode führte zu einer Rotfärbung der Phosphatase exprimierenden Zellen. Blau- und rotgefärbte Zellen wurden mikroskopisch ausgezählt.

*FACS-Analyse:*

Der Vektor pEGFP-C1 (Clontech; in dieser Arbeit als pEGFP bezeichnet) codiert für ein grün fluoreszierendes Protein (*Enhanced Green Fluorescent Protein*). Zellen, die diesen

Vektor aufgenommen haben, können durch ein FACS-Gerät (*Fluorescent Activated Cell Scanner*) detektiert werden. Dazu wurden die Zellen von der Platte geerntet, pelletiert und in PBS aufgenommen. Die resuspendierten Zellen wurden schließlich im Gerät FACSCalibur mit dem Programm CELLQuest (Becton & Dickinson) analysiert.

### **2.2.7 Herstellung von Zelllinien mit stabil ins Genom integrierten DNA-Sequenzen**

Um Zelllinien zu erhalten, die ein bestimmtes DNA-Fragment stabil ins Genom integriert haben, muß dieses Fragment mit einem Selektionsmarker ausgestattet sein. Hierfür bieten sich z.B. Antibiotika-Resistenzgene an. Das in dieser Arbeit verwendete Substratplasmid pCH-RNRZ trägt ein Gen für Neomycin-Resistenz, ein anderer, in dieser Arbeit benutzter Substratvektor (pTRE-RLHRLZ) das Gen für Hygromycin-Resistenz. Prinzipiell transfiziert man den mit einem geeignetem Restriktionsenzym linearisierten Vektor in die Zellen und gibt nach 48 h das entsprechende Antibiotikum ins Wachstumsmedium. Die Zellen werden zuvor geteilt und auf 96-Loch-Platten unter serieller Verdünnung (1:2 bis 1:10) ausplattiert. Nach zwei bis drei Wochen sollten die ersten Klone mit illegitim integrierten DNA-Molekülen mikroskopisch sichtbar werden. Vor der Selektion muß allerdings eine 'Kill-Craft' Bestimmung für das Selektionsreagenz durchgeführt werden. Hierbei wird eine Titration des Antibiotikums mit der zu transfizierenden Zelllinie durchgeführt. Als später für die Selektion verwendete Konzentration wird diejenige eingesetzt, die sich in der Titration nach einem Zeitraum von ein bis zwei Wochen als 100% letal herausgestellt hat. Durch eine vor der Transfektion durchgeführte Linearisierung der Vektoren wird die Integrationswahrscheinlichkeit um den Faktor  $10^3$  erhöht. In dieser Arbeit wurden CHO-AA8 Tet-Off Zellen mit dem durch SapI linearisiertem Plasmid pTRE-RLHRLZ stabil transfiziert und unter Selektionsdruck durch Hygromycin (350 µg/ml) vermehrt.

## 2.2.8 Charakterisierung der stabilen Zelllinien

### 2.2.8.1 PCR-Analysen

Um zu überprüfen, ob die transfizierten Zellen das Substratplasmid stabil ins Genom integriert haben, wurden verschiedene Analysemethoden angewendet. Zunächst wurde die DNA aus den Zellen isoliert (2.2.10.1). Über geeignete PCR-Analysen wurde dann überprüft, ob die wichtigsten Elemente des Vektors aus der genomischen DNA amplifiziert werden konnten. Hierbei wurden zum Teil die für die Klonierung der Vektoren durchgeführten Reaktionen angesetzt. Weitere PCR-Untersuchungen (z.B. zur Überprüfung der Promotor-Region oder des Polyadenylierungssignals) wurden durchgeführt, werden hier aber nicht detailliert dargestellt. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden aus einem Agarosegel extrahiert und beidsträngig sequenziert.

### 2.2.8.2 Southern Blot Analyse

PCR-positive Zellklone wurden mit Hilfe einer Southern Blot Analyse auf die Vollständigkeit der Rekombinationskassette, bzw. auf die Anzahl der integrierten Kopien hin untersucht. Zunächst wurden 15 µg der genomischen DNA (10 µg  $\cong$  10<sup>6</sup> Kopien) mit geeigneten Restriktionsenzymen fragmentiert, auf eine Membran übertragen und immobilisiert. Mit einer geeigneten radioaktiv markierten DNA-Sonde, die komplementär zur Vektor-DNA, aber nicht zur genomischen DNA ist, können die integrierten Plasmidmoleküle nachgewiesen werden. Um die Anzahl der Kopien zu bestimmen, wurde ein Enzym gewählt, das das Substrat an nur einer Position schneidet. Da die nächstgelegene Schnittstelle außerhalb des Vektors, also im Genom positioniert ist, zeigen zwei verschieden lange DNA-Fragmente zwei unterschiedliche Integrationsorte an. Desweiteren können durch eine prominente Bande, die der Einheitsgröße des Plasmids entspricht, *in tandem* Integrationsereignisse im selben

Lokus nachgewiesen werden. Für diese Analysen wurde die genomische DNA aus den CHO-AA8 Tet-Off Zellen mit PstI verdaut. Um die Vollständigkeit der Rekombinationskassette zu überprüfen, wurde die DNA mit einem Enzym fragmentiert, das mindestens zweimal innerhalb der Vektorsequenz schneidet, wobei die Schnittstellen die Rekombinationskassette flankieren sollen. In CHO-AA8 Tet-Off Zellen wurde das Enzym BamHI verwendet. Als radioaktiv markierte Sonde wurde für die Analysen der Zellen ein 242 bp großes Fragment aus pTRE-RLHRLZ verwendet, das am N-terminalen Ende des lacZ-Gens liegt und mit der HindIII-Schnittstelle beginnt. Diese wurde unter Verwendung der Primer P-LacZ1 (5'GATAAAGCTTGCCGTAGATAAACAGGCT3') und P-ZSondeanti2 (5'ATCGATCTCGCCATACAGCGCGTTG 3') durch PCR hergestellt.

Die genomische DNA wurde mit 150 U des jeweiligen Restriktionsenzym in einem Gesamtansatz von 50-70 µl fragmentiert. Bei zu geringen DNA-Konzentrationen wurde die DNA vor dem Verdau mit EtOH gefällt und in einem geringeren Volumen aufgenommen. Die Inkubationsdauer betrug  $\geq 14$  h. Anschließend erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der DNA über ein Agarosegel (0,8%). Durch UV-Licht wurde nach Ethidiumbromidfärbung des Gels die Effizienz des Restriktionsverbaus überprüft. Es folgte eine Depurinierung der DNA durch 15 minütiges Schütteln des Gels in 0.25 M HCl. Nach einem Waschschrift in H<sub>2</sub>O folgte die Denaturierung der DNA in Transferpuffer (0.4 M NaOH; 0.6 M NaCl) für 1 h. Der alkalische Transfer der DNA auf eine Nylonmembran (GeneScreen *Plus*, von NEN) erfolgte über Nacht. Die Membran wurde nun 30 min neutralisiert (0.5 M Tris-HCl, pH 7.5; 1 M NaCl) und anschließend bei 80°C für 1 h gebacken. In diesem Zustand konnte die Membran entweder gelagert oder nach 30 sec schütteln in 2x SSC für die Prähybridisierung weiterverwendet werden. Hierzu wurde sie 3 h in einer Glasröhre in Prähybridisierungslösung (10% Dextransulfat, 1% SDS, 50 mM Tris pH 7.5, 1 M NaCl) bei 65°C inkubiert. Zu dieser Lösung wurden zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen der Probe 500 µl durch Kochen denaturierte, kompetitierende Heringssperma-DNA (5 mg/ml) zugegeben. Nach der Prähybridisierung wurde die ebenfalls bei 95°C zur Denaturierung aufgekochte,

radioaktive Probe hinzugefügt und über Nacht bei 65°C inkubiert. Die radioaktive Sonde wurde mittels des Megaprime Labeling Kits von Takara hergestellt. Dazu wurden ca. 50 ng der spezifischen DNA als Template eingesetzt. Kurze Oligonukleotide (Hexamere) dienten als Primer, so daß die Taq-Polymerase die fehlenden Nukleotide verknüpfen konnte. Zur Markierung der Sonde wurde das radioaktive  $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (Amersham; Pharmacia) verwendet. Nicht eingebaute Nukleotide wurden über eine Sephadex-Säule (MicroSpin<sup>TM</sup> S-200HR Columns, Amersham, Pharmacia) abgetrennt. Am nächsten Tag wurde die Membran mit mehreren Waschlösungen unterschiedlicher Stringenz gewaschen, um unspezifisch an die Membran gebundene, radioaktiv markierte DNA-Fragmente zu entfernen und so das Hintergrundsignal zu verringern. Ein erster Waschschrift erfolgte mit 2x SSC/0,1% SDS für 15 min, ein zweiter mit 1x SSC/0,1% SDS und ein dritter Schritt mit 0,5x SSC/0,1% SDS, für jeweils 15 min. Der letzte Schritt wurde je nach Bedarf wiederholt. Die abschließende Analyse erfolgte über Autoradiographie mit Hilfe des Phosphorimagers und Röntgenfilmen.

### **2.2.9 Nachweis der $\gamma\delta$ Resolvase Expression über Western Blot Analyse**

Die Expression der  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate in eukaryotischen Zellen wurde über Immunoblotting (Western Blot) nachgewiesen. Zunächst wurden Lysate von transient transfizierten Zellen durch 5 minütiges Kochen der geernteten Zellen in Probenpuffer (3x SDS Sample Buffer, NEB; 2% Mercaptoethanol, Sigma) und anschließender Zentrifugation (5 min; 13.000 rpm) präpariert. In einem denaturierendem, 12,5%-igem SDS Polyacrylamidgel (ohne Urea) wurden die im Überstand enthaltenen, zellulären Proteine der Größe nach bei 30 mA aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose Membran (Immobilon P, Millipore) über Nacht bei 14 V und 4°C transferiert. Die Membran wurde mit 1%-iger Blockier-Lösung geblockt und mit polyklonalen Maus-Antikörpern gegen Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase (bereitgestellt von Nigel Grindley) bei einer Verdünnung von 1:3.000 inkubiert. Nach Waschen und erneutem

Blocken der Membran wurde diese mit einem sekundären, Peroxidase-konjugiertem Anti-Maus-Antikörper inkubiert, so daß die Resolvase über Autoradiographie detektiert werden konnte. Als Kontrolle wurden 5 ng gereinigte Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase (bereitgestellt von Peter Dröge) eingesetzt.

Dieser Nachweis erfolgte mit dem BM Chemiluminescence Western Blotting Kit (Mouse/Rabbit) von Boehringer Mannheim nach Angaben des Herstellers.

Das Proteingel wurde außerdem nach dem Transfer durch Coomassie-Blau angefärbt, um zu kontrollieren, ob die Proteine übers gesamte Gel gleichmäßig transferiert worden sind.

Das Proteingel wurde aus folgenden Komponenten zusammengesetzt:

<u>Sammelgel (5%):</u>	S-Puffer (0,5% SDS; 0,625 M TRIS/HCl pH 6.8)	0,75 ml
	Bis-acrylamid, 30% (Serva)	0,50 ml
	H <sub>2</sub> O	1,90 ml
	APS, 10% (Sigma)	30 $\mu$ l
	Tetramethylethylendiamin (TEMED; Sigma)	7 $\mu$ l
<u>Trenngel (12,5%):</u>	S-Puffer (0,5% SDS; 1,88 M TRIS/HCl, pH 8.8)	3,30 ml
	Bis-acrylamid, 30% (Serva)	5,40 ml
	H <sub>2</sub> O	4,20 ml
	APS, 10% (Sigma)	130 $\mu$ l
	Tetramethylethylendiamin (TEMED; Sigma)	15 $\mu$ l

Die Lösungen und Puffer wurden folgendermaßen angesetzt:

<u>Proteingel-Laufpuffer:</u>	TRIS	7,5 g
	Glycin	35,5 g
	Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	2,5 g
	H <sub>2</sub> O bidest.	ad 2,5 l

<u>Proteinfärbelösung:</u>	Coomassie Brilliant Blau R 250	2,0 g
	Coomassie Brilliant Blau G 250	0,5 g
	EtOH	425 ml
	MetOH	50 ml
	Eisessig	100 ml
	H <sub>2</sub> O bidest.	425 ml
<u>Entfärbungslösung:</u>	EtOH	450 ml
	Eisessig	100 ml
	H <sub>2</sub> O bidest.	450 ml

### 2.2.10 Präparation von Nukleinsäuren aus eukaryotischen Zellen

Die durch  $\gamma\delta$  Resolvase katalysierte Rekombination in eukaryotischen Zellen wurde auf DNA-Ebene durch PCR-Analysen und Southern Blot Experimente nachgewiesen. Hierzu mußten die Nukleinsäuren entsprechend aufgereinigt werden. Um genomische und episomale DNA-Moleküle zu isolieren wurden zwei verschiedenen Methoden angewandt.

#### 2.2.10.1 Präparation genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

DNA-Moleküle wurden mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kits von QIAGEN aus eukaryotischen Zellen isoliert. Hierbei wurden  $1 \times 10^6 - 2 \times 10^7$  Zellen mit PBS von den Kulturschalen gelöst, pelletiert und alkalisch lysiert. Dabei wurden sie einer Proteasebehandlung zum Abbau DNA-bindender Proteine, DNasen und RNasen unterzogen. Wie auch bei der DNA-Präparation aus Bakterienzellen wurde die DNA über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die Prozedur erfolgte nach dem '*Blood and Body Fluid*'- Protokoll des Herstellers. Abweichend vom Protokoll wurde die mit

EB-Puffer versetzte Säule vor der Elution für 15 min bei 56°C inkubiert, um die Löslichkeit der DNA zu erhöhen.

#### **2.2.10.2 Hirt-Extrakt**

Diese Methode der DNA-Extraktion aus eukaryotischen Zellen wurde angewandt, um möglichst nur die episomale Plasmid-DNA aus transient transfizierten Zellen zu isolieren (Hirt, 1967; Chen und Hsu, 1984). Hierzu wurden die Zellen drei mal mit PBS gewaschen und dann durch einen Lysis-Puffer, bestehend aus 1% SDS, 10 mM EDTA und 10 mM TRIS, pH 7.6 lysiert. Das Lysat wurde mit NaCl auf eine Endkonzentration von 1 M NaCl versetzt, und 1 h auf Eis gestellt. Nach 20 min Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde der Überstand mit Proteinase K (0,2 mg/ml; 1 h bei 37°C) behandelt, mit Phenol und Chloroform aufgereinigt und gefällt. Nach einem Waschschrift mit 70% Ethanol konnte die DNA für die weiteren Experimente verwendet werden.

#### **2.2.11 Nachweis sequenz-spezifischer Rekombination durch $\gamma\delta$ Resolvase in eukaryotischen Zellen**

Die durch  $\gamma\delta$  Resolvase katalysierte, sequenz-spezifische Rekombination kann durch verschiedene Analysen nachgewiesen werden. Der direkteste Nachweis kann auf DNA-Ebene erbracht werden. Ein indirekter Rekombinationsnachweis kann über ein Reporter-gen-System erfolgen, indem man die Expression eines, erst infolge eines Rekombinationsereignisses an- bzw. ausgeschalteten Gens untersucht.

### 2.2.11.1 Rekombinationsanalyse auf DNA-Ebene

Ein stabil ins zelluläre Genom integriertes DNA-Substratmolekül mit den Zielsequenzen für eine sequenz-spezifische Rekombinase kann auf mehreren Wegen auf ein stattgefundenes Rekombinationsereignis hin untersucht werden. Sowohl Deletions- als auch Inversionsreaktionen können über PCR (2.2.1.2) nachgewiesen werden. Mit der sehr sensitiven PCR können bei geeigneter Primerwahl sehr geringe Mengen an rekombinierten DNA-Molekülen nachgewiesen werden. Das amplifizierte DNA-Produkt kann aus einem Agarosegel eluiert und anschließend durch eine Sequenzanalyse auf die Korrektheit des rekombinierten Produktes hin überprüft werden.

Ein weiterer Rekombinationsnachweis kann über einen Southern Blot (2.2.8.2) erbracht werden. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß die Menge des Rekombinationsproduktes quantifiziert und so die Rekombinationseffizienz bestimmt werden kann, sie erfordert aber größere DNA-Mengen als die PCR.

#### A) Nachweis durch PCR-Analyse:

Die genomische DNA wurde mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kits aus eukaryotischen Zellen isoliert (2.2.10.1). Für die PCR-Analysen wurden, wenn nicht gesondert erwähnt, 500 ng der genomischen DNA (in maximal 5 µl des Eluats) in einem Gesamtvolumen von 50 µl eingesetzt.

#### *Rekombinationsnachweis auf episomalen DNA-Substraten:*

Der Nachweis von durch  $\gamma\delta$  Resolvase katalysierten Deletionsreaktionen auf episomalen DNA-Substraten in eukaryotischen Zelllinien erfolgte mit den Oligonukleotiden P-pCHSeq und P-lacZanti2, beginnend mit einem Denaturierungsschritt (94°C, 5 min), gefolgt 34 Zyklen von Denaturierung (94°C, 1 min), Primerbindung (61°C, 1 min) und DNA-Synthese (72°C, 2 min) sowie einem abschließendem Syntheseschritt (72°C, 5 min).

Für den Nachweis von Inversionsreaktionen auf episomalen Deletionssubstraten wurden die Primer P-SV40prä und P-Neo1 verwendet. Beginnend mit einem Denaturierungsschritt (94°C, 5 min) wurden für diesen Nachweis 30 Zyklen von Denaturierung (94°C, 1 min), Primerbindung (60°C, 1 min) und DNA-Synthese (72°C, 90 sec), gefolgt von einem abschließendem Syntheseschritt (72°C, 5 min) durchgeführt. Deletionsreaktionen auf dem episomalen Inversionssubstrat pCH-RZRinv wurden unter Verwendung der Primer P-SV40prä und P-pCH110anti nachgewiesen. Beginnend mit einem Denaturierungsschritt (94°C, 5 min) wurden 32 Zyklen von Denaturierung (94°C, 45 sec), Primerbindung (60°C, 45 sec) und DNA-Synthese (72°C, 1 min), gefolgt von einem abschließendem Syntheseschritt (72°C, 5 min) durchgeführt.

*Rekombinationsnachweis auf genomischen DNA-Substraten:*

Die in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Analysen zum Nachweis der Deletion auf genomischen Substraten in stabilen CHO-AA8 Tet-Off Substrat-Zelllinien erfolgten unter Verwendung der Oligonukleotide P-TREMCS und P-lacZanti2. Hierbei wurden nach einem Denaturierungsschritt (94°C, 5 min) 35 Zyklen von Denaturierung (94°C, 45 sec), Primerbindung (61°C, 45 sec) und DNA-Synthese (72°C, 90 sec), gefolgt von einem abschließendem Syntheseschritt (72°C, 5 min) durchgeführt.

Inversionsreaktionen wurden mit den Primern P-pCHSeqanti und P-Hyganti durch einen Denaturierungsschritt (94°C, 5 min) sowie 34 Zyklen von Denaturierung (94°C, 45 sec), Primerbindung (58°C, 45 sec) und DNA-Synthese (72°C, 80 sec), gefolgt von einem abschließendem Syntheseschritt nachgewiesen.

*Funktionalitätsanalyse von Pseudo-subsite I Sequenzen:*

Die Funktionalität der in pCH-S<sub>h20</sub>NR\*Z verwendeten, humanen, zur *subsite I* homologen Sequenz wurde durch PCR-Analysen nachgewiesen. Das Substrat wurde zusammen mit pPGKγδ102NLS in CHO- und HeLa-Zellen co-transfiziert. Nach 24 h wurde die DNA isoliert und mit den Primern P-SV40prä sowie P-pCHSeqanti in einer ersten, und den Primern P-pCHSeq sowie P-pCHSeqanti in einer zweiten PCR (Nested-

PCR) analysiert. Die erste Reaktion begann mit einem Denaturierungsschritt (94°C, 5 min), gefolgt von 42 Zyklen von Denaturierung (94°C, 1 min), Primerbindung (56°C, 1 min) und DNA-Synthese (72°C, 1 min) sowie einem abschließendem Syntheseschritt (72°C, 5 min). Für die folgende, zweite PCR wurde die in einer andeutungsweise sichtbaren Bande enthaltene DNA aus einem Agarosegel eluiert und in 20 µl Elutionspuffer aufgenommen. Als Template wurden 5 µl des Eluats eingesetzt. Die Reaktion begann mit einem Denaturierungsschritt (94°C, 5 min), gefolgt von 30 Zyklen von Denaturierung (94°C, 45 sec), Primerbindung (56°C, 45 sec) und DNA-Synthese (72°C, 45 sec) sowie einem abschließendem Syntheseschritt (72°C, 5 min).

Das Substrat pCH-S<sub>h</sub>NR\*Z wurde unter Verwendung der Oligonukleotide P-SV40prä und P-lacZanti2 bzw. P-pCHSeq und P-pCHSeqanti, jeweils beginnend mit einem Denaturierungsschritt (94°C, 5 min), gefolgt von 32 Zyklen von Denaturierung (94°C, 1 min), Primerbindung (60°C, 1 min) und DNA-Synthese (72°C, 1 min) sowie einem abschließendem Syntheseschritt (72°C, 5 min) auf seine Funktionalität hin getestet.

Die in den Rekombinationsanalysen verwendeten Oligonukleotide sind nachfolgend aufgelistet:

P-pCHSeq: 5' CTCTGAGCTATTCCAGAAGTAG 3'  
 P-lacZanti2: 5' CAAAAATAATTCGCGTCTGGCCTTCCTGTAGCCAGCTTTC 3'  
 P-SV40prä: 5' GTTAAGCCAGTATACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCATG 3'  
 P-Neo1: 5' GATAAGATCTAGCATGATTGAACAAGATGGATT 3'  
 P-pCH110anti: 5' CCCCTACCCAATTCCTTTTTG 3'  
 P-TREMCS: 5' GGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGA 3'  
 P-pCHSeqanti: 5' CAGAAGGCATCAGTCGGCTTGCG 3'  
 P-Hyganti: 5' GATAGCTAGCTCAGTTAGCCTCCCCATCTCCCGATCCC 3'

#### B) Nachweis über Southern Blot Analysen:

Durch Rekombination (Inversion, Deletion) verlagern sich einzelne DNA-Abschnitte. Dadurch verändert sich das Restriktionsmuster der DNA. Wählt man ein geeignetes Restriktionsenzym, kann man nach Fragmentierung der genomischen DNA mit Hilfe

einer radioaktiven Sonde, die im rekombinierten DNA-Bereich hybridisiert, dieses veränderte Muster über Autoradiographie nachweisen. In dieser Arbeit wurden Southern Blot Analysen zum Nachweis der Rekombination in stabilen CHO-AA8 Tet-Off Substratzelllinien durchgeführt. Hierbei wurde die genomische DNA mit dem Restriktionsenzym BamHI fragmentiert. Die Hybridisierung erfolgte mit der in 2.2.8.2 beschriebenen Sonde.

### **2.2.11.2 Indirekter Rekombinationsnachweis durch Reporteragen-Analysen**

Der Rekombinationsnachweis durch die Analyse der Expression eines Proteins ist wie die RT-PCR ein indirektes Nachweisverfahren. Wird durch eine RT-PCR nur die Transkription eines Gens überprüft, so kann hier die Expression des Gens bzw. die Aktivität des exprimierten Proteins nachgewiesen werden. Für diese Art von Untersuchungen können verschiedene Reportergene eingesetzt werden. In diesem Fall fand das lacZ-Gen, das für die  $\beta$ -Galaktosidase codiert, Verwendung. Die Expression dieses Enzyms wurde mit Hilfe zweier unterschiedlicher Testsysteme nachgewiesen.

#### A) X-Gal Färbung:

Wird in eukaryotischen Zellen infolge eines Rekombinationsereignisses das lacZ-Gen exprimiert, so kann die in den Zellen synthetisierte  $\beta$ -Galaktosidase über eine Blaufärbung der Zellen durch Spaltung von X-Gal nachgewiesen werden. Die X-Gal Färbung erfolgte nach der in 2.2.6.3 beschriebenen Methode.

#### B) Bestimmung der relativen $\beta$ -Galaktosidase Aktivität:

Die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase kann auch durch eine Messung der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität nachgewiesen werden. Dieser Test wurde mit Hilfe des Galacto Light Kits (Tropix, Perkin Elmer) nach Angaben des Herstellers, allerdings mit auf 33% reduzierten Mengen durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen zunächst durch einen

Lysis-Puffer (100 mM Kaliumphosphat, pH 7.8, 0,2% Triton X100, 0,5 mM Dithiothreitol) lysiert und abzentrifugiert. Die im Überstand enthaltene  $\beta$ -Galaktosidase wurde anschließend mit dem Chemilumineszenz Substrat Galacton Plus vermischt. Während der einstündigen Inkubationszeit wurde das Substrat durch die Galaktosidase gespalten. Das entstandene Spaltungsprodukt setzt fluoreszierendes Licht frei. Durch die Injektion des Accelerators Sapphire-II<sup>TM</sup> wurde die Spaltungsreaktion terminiert und die freigesetzten Lichteinheiten verstärkt. Diese relativen Lichteinheiten (RLUs) wurden im Luminometer Lumat LB9501 (Berthold) gemessen und auf RLU/ $\mu$ g Protein im Zellysat normiert. Die im Zellysat enthaltenen Proteinmengen wurden mit Hilfe des BIO-RAD Protein Assay Kit nach Angaben des Herstellers photometrisch und unter Verwendung einer mit BSA ermittelten Protein-Eichkurve bestimmt.

### 2.2.12 Statistik

Um Aussagen über die Signifikanz von Differenzen zwischen den verschiedenen getesteten Konstrukten machen zu können, bedarf es einer statistischen Betrachtung der in den indirekten Rekombinationsnachweisen gewonnenen Daten.

Die relative Rekombinationseffizienz wurde aufgrund der im Luminometer ermittelten Meßwerte der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten aus den Transfektionsansätzen T folgendermaßen berechnet:

$$A = \frac{m_1 + m_2 + m_3 + \dots + m_x}{r_1 + r_2 + r_3 + \dots + r_x}$$

mit  $m_1$  bis  $m_x$  = Meßwerte 1-x aller Transfektionsansätze der zu analysierenden DNA;  
und  $r_1$  bis  $r_x$  = Meßwerte 1-x der Referenz (Positivkontrolle; z.B. pCH-RZ).

Die statistische Signifikanz der einzelnen Messungen wurde mittels des t-Testes berechnet. Die Aktivitätsabweichungen zweier verschiedener Klone wurden in einem

zweiseitigen t-Test gepaart mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% überprüft. Die Anzahl der Freiheitsgrade (FG) richtet sich hierbei nach der jeweiligen Anzahl der Testreihen  $n$  und beträgt  $n-1$ . Um die statistische Signifikanz einer Differenz nachzuweisen, wurde der erhaltene  $t_{(n-1; 0.05)}$ -Wert mit dem für die entsprechende Anzahl von FG und der entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeit angegebenen Wert aus der Tabelle für die Quantile der t-Verteilung (Bosch, 1976) verglichen. War der statistisch ermittelte t-Wert größer als der tabellarisch angegebene Wert, so war statistische Signifikanz gegeben.

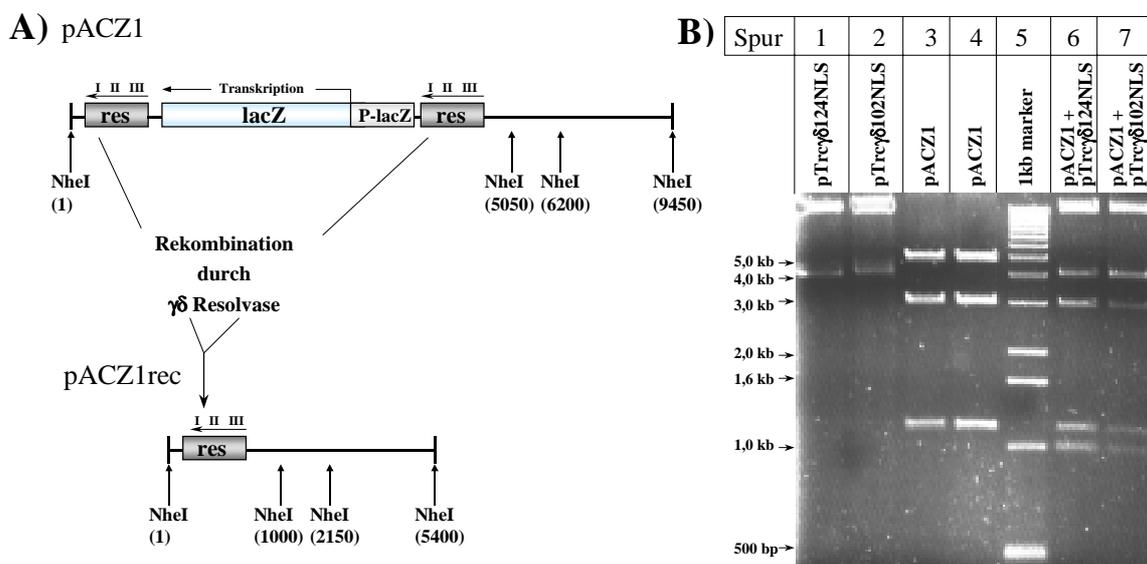
### III. ERGEBNISSE

#### 3.1 Funktionalitätsanalyse der $\gamma\delta$ Resolvase Mutanten in *Escherichia coli*

In dieser Arbeit sollte die durch  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate katalysierte Rekombination auf episomalen und auf genomischen DNA-Substraten in eukaryotischen Zellen untersucht werden. Um die  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten  $\gamma\delta^{\text{E124Q}}$  und  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124Q}}$  sowie die  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate mit NLS auf ihre Funktionalität hin zu testen, wurde das entsprechend modifizierte  $\gamma\delta$  Resolvase Gen in den prokaryotischen Expressionsvektor pTrc99a kloniert und in *E. coli* BMH8117<sup>recA</sup> transformiert. Anschließend wurde das Substratplasmid pACZ1 (bereitgestellt von Peter Dröge) in diese Zellen transformiert. Das Plasmid trägt ein  $\beta$ -Galaktosidase Gen (lacZ) mit vorgeschaltetem lacZ-Promotor. Dieses Element wird von zwei gleich orientierten *res* Sequenzen flankiert (Abbildung 3.1 A). Da infolge einer Rekombination das lacZ-Gen heraus deletiert wird, sollten Bakterien mit rekombiniertem DNA-Produkt auf X-Gal haltigen Agarplatten weiße Kolonien bilden. Nach serieller Transformation von Expressionsvektor und Substratplasmid sind auf den Agarplatten fast ausschließlich weiße Kolonien gewachsen. Aus diesen wurde stichprobenhaft Plasmid-DNA präpariert und über einen Restriktionsverdau mit NheI auf Rekombinationsereignisse hin analysiert.

In Abbildung 3.1 B) ist ein Agarosegel eines *in vivo* Rekombinationsnachweises für die  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate  $\gamma\delta^{\text{E124Q-NLS}}$  und  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124Q-NLS}}$  gezeigt. Als Kontrollen wurden in den Spuren 1 und 2 die Expressionsvektoren pTrc $\gamma\delta$ 124NLS und pTrc $\gamma\delta$ 102NLS, in den Spuren 3 und 4 das Ausgangssubstrat pACZ1 aufgetragen. Die DNA aus den Zellen, die zuerst mit pTrc $\gamma\delta$ 124NLS bzw. pTrc $\gamma\delta$ 102NLS und anschließend mit pACZ1 transformiert worden sind, ist in den Spuren 6 und 7 zu sehen. Anhand des Bandenmusters kann man erkennen, daß nahezu 100% des Substrates rekombiniert

wurden. Die in den Spuren 3 und 4 vorhandene 5,05 kb große Bande aus nicht rekombinierter Substrat-DNA ist in den Spuren 6 und 7 nicht mehr nachweisbar. Stattdessen taucht in diesen Spuren eine 1,0 kb große Bande auf, die der Größe des erwarteten Rekombinationsproduktes entspricht. Die Differenz von 4,05 kb entspricht der Länge des deletierten DNA-Fragmentes, das das lacZ-Gen und eine Kopie der *res* Sequenz enthält.



**Abbildung 3.1: *In vivo* Rekombinationsanalyse zum Nachweis der Funktionalität der  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate  $\gamma\delta^{E124QNLS}$  und  $\gamma\delta^{E102Y,E124QNLS}$  in *Escherichia coli*.**

A) Schematische Darstellung des Plasmids pACZ1 vor und nach der Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase. Gezeigt sind die grundlegenden DNA-Elemente und die Positionen der NheI-Restriktionsschnittstellen (Pfeile). Durch die Rekombination wird das lacZ-Gen mit Promotor und einer kompletten *res* Sequenz (4050bp) deletiert. Dieses Fragment ist im Agarosegel nicht mehr nachweisbar, da es in *E.coli* nicht repliziert werden kann.

B) Isolierte DNA aus *E. coli* BMH8117<sup>recA</sup> nach NheI-Restriktion (0,8% Agarosegel): In den Spuren 1 und 2 sind die prokaryotischen Expressionsvektoren für die  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate  $\gamma\delta^{E124QNLS}$  und  $\gamma\delta^{E102Y,E124QNLS}$  aufgetragen. Diese Vektoren enthalten keine NheI-Restriktionsschnittstellen. In den Spuren 3 und 4 ist das Substratplasmid pACZ1 aufgetragen. In den Spuren 6 und 7 ist die aus *E. coli* isolierte DNA nach serieller Transformation des Expressionsvektors und anschließend des Substratplasmides aufgetragen. Die Größe der DNA-Banden des Größenmarkers sind angegeben.

In den für die anderen  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate durchgeführten Funktionalitätsanalysen zeigte sich dasselbe Ergebnis.

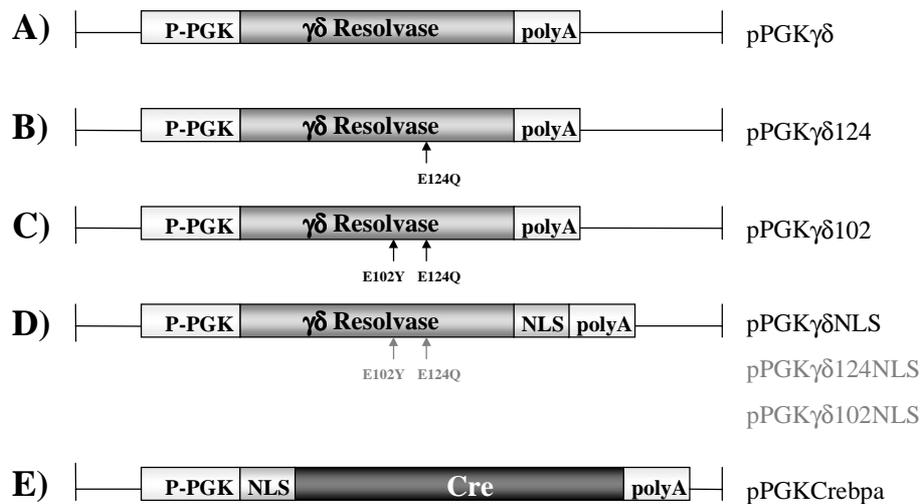
### ***3.2 Expression von $\gamma\delta$ Resolvase in eukaryotischen Zelllinien***

Um in den Säugetierzellen eine starke Expression der  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate zu gewährleisten, wurden eukaryotische Expressionsvektoren konstruiert. Hierzu wurde der Promotor des Phosphoglycerat-Kinase I Gens (P-PGK) bzw. der Promoter des Cytomegalovirus (P-CMV) vor das entsprechende Resolvase Gen geschaltet. Diese Vektoren wurden transient in die Zellen transfiziert. Schließlich wurde die Expression der Resolvase Gene über Western Blot Analysen nachgewiesen.

#### **3.2.1 Herstellung der eukaryotischen Expressionsvektoren für $\gamma\delta$ Resolvase Derivate**

Die für die entsprechenden Rekombinasen codierenden Gene wurden in den eukaryotischen Expressionsvektoren unter Kontrolle des PGK-Promotors gestellt, der natürlicherweise die Expression der Phosphoglycerat-Kinase I in der Maus reguliert (Adra et al., 1987). Außerdem wurde von jeder getesteten Rekombinase ein Derivat mit nuklearer Lokalisationssequenz des großen SV40 T-Antigens (Gu et al., 1993) hergestellt, um den aktiven Transport des Enzyms in den Zellkern der transfizierten Zellen zu gewährleisten. Stromabwärts des Gens wurde die Polyadenylierungssequenz aus dem Gen für das Rinder-Wachstumshormon (bGH; Pfarr et al., 1986) positioniert. In Abbildung 3.2 sind die Expressionsvektoren schematisch dargestellt.

Zusätzlich wurden Vektoren hergestellt, in denen die Gene der  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate unter Kontrolle des ebenfalls in Eukaryoten stark exprimierenden CMV-Promotors standen.



**Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der eukaryotischen Expressionsvektoren für  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate und Cre.**

A) Vektor für Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase; B) Vektor für  $\gamma\delta^{E124Q}$ ; C) Vektor für  $\gamma\delta^{E102Y,E124Q}$ ; D) Vektor für die  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate mit C-terminaler nuklearer Lokalisationssequenz (NLS); E) Vektor für Cre mit N-terminaler NLS. Die Expression der Gene wird vom Phosphoglyceratkinase-Promotor (P-PGK) reguliert; polyA entspricht der bGH-Polyadenylierungssignalsequenz. Die Pfeile markieren die relativen Positionen der angegebenen Aminosäuresubstitutionen im Resolvase Gen.

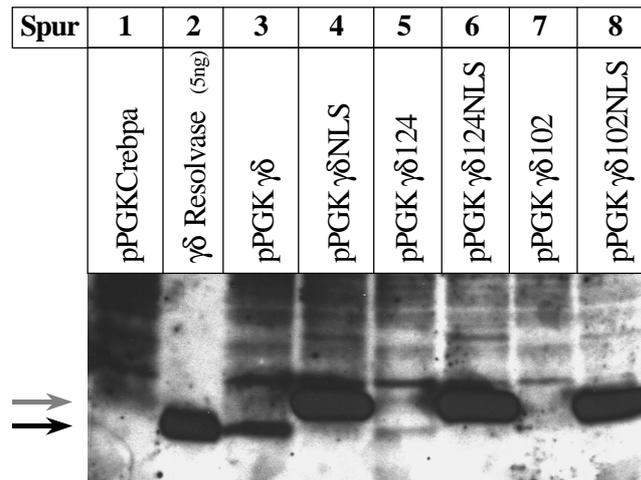
### 3.2.2 Nachweis der $\gamma\delta$ Resolvase Expression in Säugerzellen

Um die Expression nachzuweisen, wurden die Resolvase-Expressionsvektoren transient durch FuGENE<sup>TM</sup>6 in HeLa-, CHO- oder NIH3T3-Zellen transfiziert. Nach anschließender Wachstumsphase für 72 h wurden die Zellen durch Kochen in Probenpuffer lysiert. Die Proteine wurden in einem denaturierenden Polyacrylamidgel ihrer Größe nach aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend wurde die Membran mit einem gegen Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase gerichtetem polyklonalem Mausantikörperserum inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden mit Peroxidase konjugierte Anti-Maus-IgG-Antikörper eingesetzt. Die Membran wurde dann mit Hilfe von Chemilumineszenz-Substraten entwickelt, so daß die ausgesandten Lichtsignale auf einem Röntgenfilm über Autoradiographie sichtbar gemacht werden konnten. Abbildung 3.3 zeigt einen Western Blot aus CHO-Zellen, 72 h nach der

Transfektion. Als Positiv-Kontrolle wurden 5 ng gereinigte Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase eingesetzt, als Negativ-Kontrolle wurden Zellen verwendet, die mit dem Cre exprimierendem Plasmid pPGKCrebpa transfiziert worden waren.

**Abbildung 3.3: Western Blot Analyse zum Nachweis der Expression von  $\gamma\delta$  Resolvase in CHO-Zellen.**

In den Spuren 3, 5 und 7 wurden Zell-Lysate von CHO-Zellen, die mit Expressionsvektoren für  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate ohne NLS transfiziert worden sind, aufgetragen, in den Spuren 4, 6 und 8 die Varianten mit C-terminaler NLS. Spur 2 enthält 5 ng gereinigte Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase ohne NLS, in Spur 1 wurde ein Lysat von Cre exprimierenden Zellen aufgetragen. Der graue und der schwarze Pfeil markieren die Positionen der Resolvase mit und ohne NLS.



Anhand des Bandenmusters kann man erkennen, daß die Resolvase Derivate ohne NLS (Spuren 3, 5 und 7) auf derselben Höhe laufen wie die gereinigte Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase (Spur 2). Die NLS tragenden Derivate (Spuren 4, 6 und 8) sind aufgrund des höheren Molekulargewichtes langsamer durch das Polyacrylamidgel gelaufen. Es fällt auf, daß diese Banden im Vergleich wesentlich prominenter erscheinen. Dieses Ergebnis zeigte sich in allen getesteten Zelllinien. In weiteren Analysen hat sich herausgestellt, daß die Intensität der Signale mit zunehmender Dauer der Wachstumsphase nach der Transfektion (24 h; 48 h; 72 h) leicht zunimmt (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Tatsache wurden auch die meisten Rekombinationsanalysen 72 h nach Transfektion der Resolvase-Expressionsvektoren durchgeführt.

Zusätzlich wurden Expressionsvektoren getestet, in denen die Resolvase Gene unter der Kontrolle des ebenfalls in Säugetierzellen sehr stark exprimierenden Promotors des Cytomegalovirus (P-CMV) standen. Hier zeigte sich ein vergleichbares Expressionsmuster in Western Blot Analysen (Daten nicht gezeigt).

### ***3.3 Sequenz-spezifische Rekombination episomaler DNA-Substrate durch $\gamma\delta$ Resolvase in eukaryotischen Zellen***

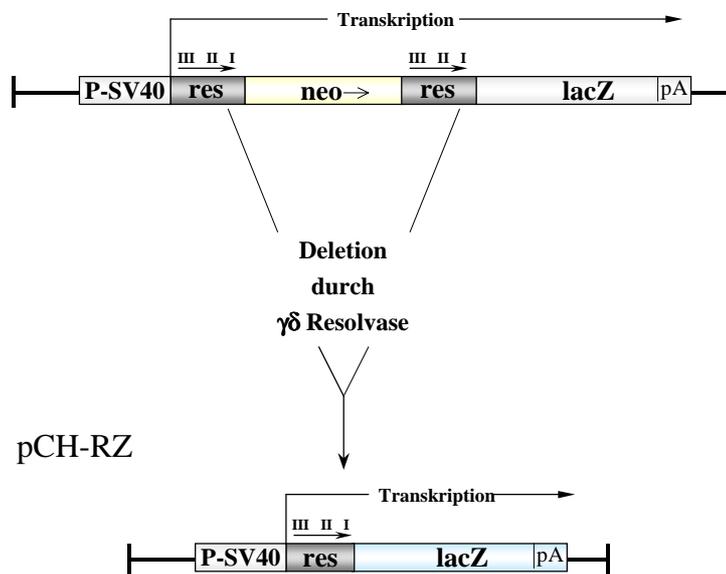
Hauptziel der Arbeit war es, das prokaryotische, sequenz-spezifische Rekombinationssystem der  $\gamma\delta$  Resolvase auf eukaryotische Zellen zu übertragen. Um die Rekombinationsaktivität in Säugetierzellen auf episomalen DNA-Substraten zu untersuchen, wurden transiente Co-Transfektionsexperimente durchgeführt. Hierbei wurden im molaren Verhältnis von 1:3 Substratplasmide zusammen mit den Expressionsvektoren für ein  $\gamma\delta$  Resolvase Derivat in Säugetierzellen gebracht. Die Transfektion erfolgte mittels des nicht-liposomalen Transfektionsreagenzes FuGENE™6. Nach einer Inkubation für 72 h wurde die DNA isoliert und über PCR analysiert. Zusätzlich wurde die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase als indirektes Maß für die Rekombinationseffizienz gemessen.

In einem zusätzlichen Experiment wurde die Effizienz der Co-Transfektion ermittelt. Dafür wurde das Plasmid pCH110 zusammen mit dem Plasmid pHD2AP in die Zellen transfiziert. Durch eine X-Gal Färbung und anschließender Rotfärbung der alkalischen Phosphatase konnte gezeigt werden, daß ca. 30-40% der Zellen transfiziert worden sind, von denen >90% beide Plasmide enthielten.

#### **3.3.1 Rekombination durch $\gamma\delta$ Resolvase auf Standard-substratvektoren (*res x res*) in CHO-Zellen**

Für die folgenden transienten Co-Transfektionsexperimente wurde das SV40-Substratplasmid pCH-RNRZ verwendet. Das Plasmid besteht aus der Rekombinationskassette *res-neo-res*, einem stromaufwärts gelegenen SV40-Promotor sowie einem stromabwärts gelegenen lacZ-Gen (Abbildung 3.4).

A) pCH-RNRZ



B) pCH-RNRZ

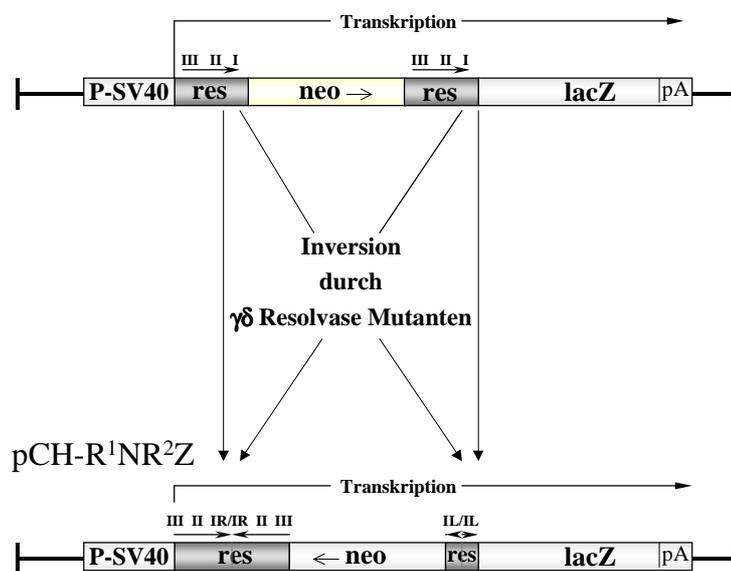


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Substrat- und Produktvektoren für den Nachweis der Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase auf episomalen DNA-Sequenzen in eukaryotischen Zellen.

A) Deletionsreaktion. Das Substratplasmid pCH-RNRZ, bestehend aus dem SV40-Promotor (P-SV40), einem von zwei gleich orientierten *res* Sequenzen (*res*) flankiertem Neomycin-Resistenzgen (*neo*) und dem Gen für  $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ*), wird infolge der  $\gamma\delta$  Resolvase katalysierten Rekombination deletiert. Es entsteht das Produkt pCH-RZ, mit nur einer *res* Sequenz zwischen dem Promotor und dem *lacZ*-Gen, so daß dieses nun transkribiert bzw. exprimiert werden kann. B) Inversionsreaktion. Treffen die an den *subsites* I gebundenen Dimere der  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten zufällig aufeinander, kann ein einfacher synaptischer Komplex ausgebildet werden. Die Rekombination des Substrates pCH-RNRZ kann in diesem Fall auch zu einer Inversion des Substrates führen. Hierbei entsteht das Produkt pCH-R¹NR²Z mit invertiertem Neomycin-Resistenzgen.

Infolge eines Rekombinationsereignisses kann eine über PCR nachweisbare Deletion des Neomycin-Resistenzgens sowie einer kompletten *res* Sequenz erfolgen. Das *lacZ*-Gen kann dann durch den SV40-Promotor transkribiert bzw. exprimiert werden

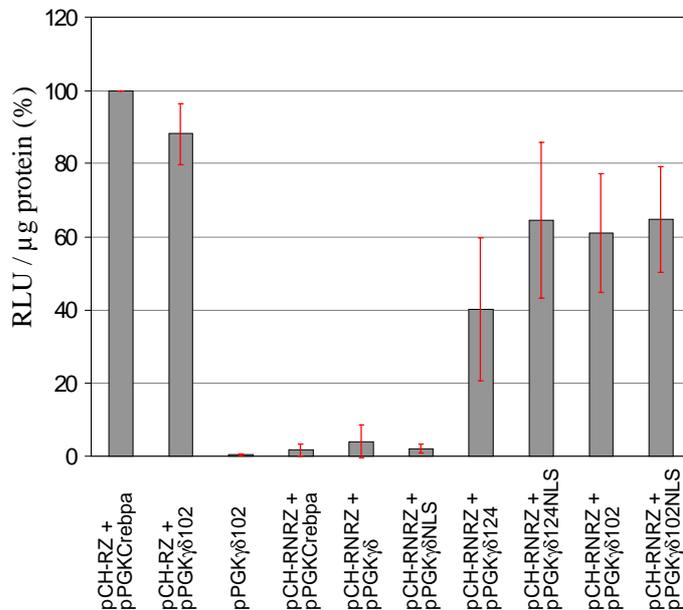
(Abbildung 3.4 A). Die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase kann als indirekter Rekombinationsnachweis in Form einer X-Gal Färbung oder durch Messung der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität gemessen, und damit auch als indirektes Maß für die Rekombinationseffizienz gewertet werden. Außerdem können durch  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten katalysierte Inversionsereignisse stattfinden, die ebenfalls über PCR-Analysen nachweisbar sind (Abbildung 3.4 B).

### **3.3.1.1 Indirekter Rekombinationsnachweis über die Messung der relativen $\beta$ -Galaktosidase Aktivität**

Zunächst wurden CHO-Zellen transient mit pCH-RNRZ und den Expressionsvektoren für die  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate co-transfiziert. Nach 72 h wurde die relative  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität bestimmt. Die infolge eines Deletionsereignisses stattfindende Expression der  $\beta$ -Galaktosidase wurde über einen Chemilumineszenztest nachgewiesen. Nach Umsetzung eines Substrates freigesetzte Lichteinheiten wurden im Luminometer gemessen und auf den Proteingehalt des Zellysates normiert.

In Abbildung 3.5 ist das Ergebnis von jeweils vier bis sechs als Duplett oder Triplet durchgeführten Co-Transfektionsexperimenten gezeigt. Als Positivkontrollen wurden das Rekombinationsprodukt pCH-RZ zusammen mit den Expressionsvektoren pPGKCrebpa oder pPGK $\gamma\delta$ 102 in die Zellen transfiziert. Hierbei wurde die mit pPGKCrebpa ermittelte  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität als 100%-Wert gesetzt. In den Negativkontrollen (pPGK $\gamma\delta$ 102 bzw. pCH-RNRZ zusammen mit pPGKCrebpa) wurde das Protein nicht exprimiert. In den Transfektionsansätzen, in denen das Substrat pCH-RNRZ zusammen mit pPGK $\gamma\delta$  verwendet wurde, war eine nur sehr geringe Expression des lacZ-Gens zu beobachten. Die Werte hoben sich nicht signifikant von denen der Negativkontrollen ab. Nach Co-Transfektionen von pCH-RNRZ zusammen mit dem Expressionsvektor für eine der  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten konnten hingegen relative  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten von bis zu 80%, bezogen auf die Positivkontrolle, gemessen

werden. Dementsprechend muß eine hohe Anzahl von Substratmolekülen rekombiniert worden sein.



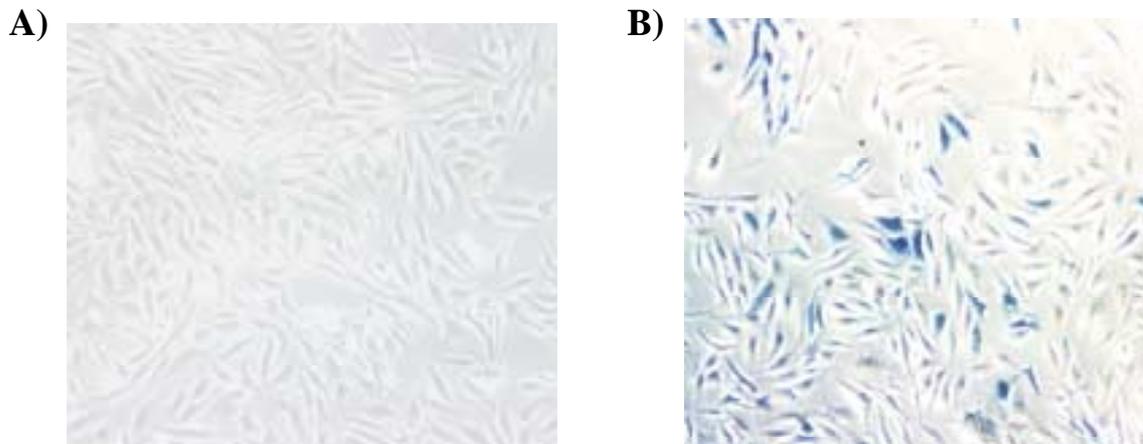
**Abbildung 3.5: Indirekte Rekombinationsanalyse auf episomalen Resolvase-Standardsubstraten durch Messung der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität.**

Nach Rekombination von pCH-RNRZ durch die verschiedenen  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate in CHO-Zellen wurde die  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität gemessen. Es wurden jeweils vier bis sechs separate Transfektionsexperimente mit jeweils zwei bis vier Ansätzen durchgeführt. Die Werte wurden auf den Gesamtproteingehalt der eingesetzten Zellen normiert. Die Balken zeigen die Mittelwerte aus den entsprechenden Messungen, die vertikalen Linien innerhalb der Balken die zugehörigen Standardabweichungen.

In Co-Transfektionsexperimenten mit divergierenden Mischungsverhältnissen (Substrat:Expressionsvektor = 1:5, 1:10) konnten die Ergebnisse bestätigt werden, wie auch in  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitätsmessungen, in denen höhere Verdünnungen der Zellysate eingesetzt worden sind (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.1.2 Rekombinationsnachweis über X-Gal Färbung

Unterstützend zur oben aufgeführten Messung der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität wurde die Expression des lacZ-Gens auch colorimetrisch bestimmt. Die Zellen wurden 72 h nach der Co-Transfektion durch X-Gal blau gefärbt und mikroskopisch ausgezählt (Abbildung 3.6). Hierbei konnten die Ergebnisse aus den Messungen der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität tendenziell bestätigt werden. In Tabelle 3.1 sind die Mittelwerte zweier repräsentativer Experimente aufgeführt. Man kann der Tabelle entnehmen, daß



**Abbildung 3.6: Mikroskopischer Ausschnitt von X-Gal gefärbten eukaryotischen Zellen zum Nachweis der lacZ-Expression nach Rekombination des Substrates pCH-RNRZ durch  $\gamma\delta$  Resolvase.** Eukaryotische Zellen wurden mit dem Rekombinationssubstrat pCH-RNRZ und einem Expressionsvektor für  $\gamma\delta$  Resolvase co-transfiziert und 72 h später durch X-Gal blau gefärbt. Die Transfektion erfolgte durch Lipofektion mit FuGENE<sup>TM</sup>6. A) Mock transfizierte Zellen werden durch X-Gal nicht angefärbt. B) Zellen, die mit pCH-RNRZ und dem Expressionsvektor pPGK $\gamma\delta$ 102NLS co-transfiziert worden sind, exprimieren nach der Rekombination des Substrates das lacZ-Gen. Die synthetisierte  $\beta$ -Galaktosidase kann durch X-Gal nachgewiesen werden und resultiert in eine Blaufärbung der Zellen.

**Tabelle 3.1**

**Relative Anzahl blau gefärbter Zellen nach Deletion von pCH-RNRZ durch  $\gamma\delta$  Resolvase**

Co-transfizierte Plasmide	Mittelwert: Gefärbte Zellen (%)	Standardabweichung (%)
(-)	0	0
pCH-RZ + pPGK $\gamma\delta$ 102NLS	100,00	0
pCH-RNRZ + pPGKCrebpa	4,97	6,05
pCH-RNRZ + pPGK $\gamma\delta$	1,91	2,60
pCH-RNRZ + pPGK $\gamma\delta$ NLS	21,47	14,46
pCH-RNRZ + pPGK $\gamma\delta$ 124NLS	42,46	2,63
pCH-RNRZ + pPGK $\gamma\delta$ 102NLS	69,20	37,90

Die Zellen wurden 72 h nach Co-Transfektion mit den angegebenen Plasmiden durch X-Gal gefärbt. Die nach einer Rekombination exprimierte  $\beta$ -Galaktosidase führt zu einer Blaufärbung der Zellen. Der prozentuale Anteil der blauen Zellen wurde mikroskopisch ausgezählt.

nach Co-Transfektionen mit pPGK $\gamma\delta$  ebenso wenige Zellen blau gefärbt waren wie in der Negativkontrolle mit pPGKCrebpa; nach Co-Transfektionen mit den Expressionsvektoren für die NLS tragenden Resolvase Mutanten konnte hingegen eine signifikant höhere Anzahl blauer Zellen beobachtet werden. Es zeigte sich auch hier, daß mit der Doppelmutante  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLs}}$  die höchste Rekombinationseffizienz erreicht werden konnte.

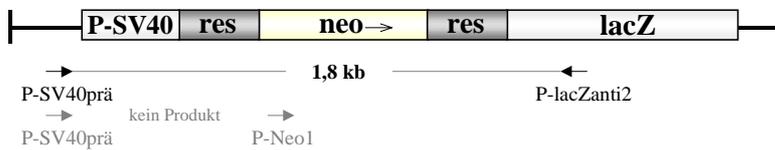
### 3.3.1.3 Deletions- und Inversionsnachweis mittels PCR

Nach Co-Transfektionsexperimenten in CHO-Zellen konnte auch ein direkter Rekombinationsnachweis auf DNA-Ebene erbracht werden. 72 h nach der Lipofektion wurden die Zellen geerntet und die DNA aus diesen isoliert. Unter Verwendung der Primer p-SV40prä sowie p-lacZanti2 (siehe Abbildung 3.7 A) wurde eine kompetitive PCR durchgeführt. Aus dem Ausgangssubstrat konnte ein ca. 1,8 kb großes DNA-Fragment amplifiziert werden. Das durch ein  $\gamma\delta$  Resolvase Derivat entstandene Deletionsprodukt ist um ca. 1,0 kb kürzer und konnte durch eine Bande mit einer Größe von ca. 800 bp detektiert werden. In Abbildung 3.7 B) ist eine solche PCR gezeigt (Spuren 6-9). Man kann erkennen, daß  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLs}}$  die Deletion des Substrates katalysieren konnte (Spur 8), während die Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase mit einer nur so geringen Effizienz zu rekombinieren in der Lage war, daß bei dem leichten Hintergrundsignal keine signifikante Deletionsbande nachgewiesen werden konnte (Spur 7). In Spur 9 wurde als Template für die Positivkontrolle das rekombinierte Plasmid pCH-RZ eingesetzt. Mit den Primern p-SV40prä und p-Neo1 konnte auch die Inversion des Substrates durch  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLs}}$ , die zur Amplifikation eines ca. 1,5 kb großen Fragmentes führte, detektiert werden (Spur 5). Ein solches Inversionsereignis konnte mit Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase nicht nachgewiesen werden (Spur 4).

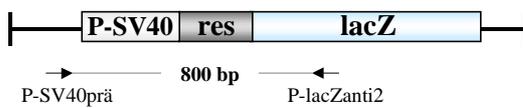
Auf dem Substrat pCH-RZR<sub>inv</sub> mit zwei kompletten, invertierten *res* Sequenzen, die das lacZ-Gen flankieren, konnten zudem Deletionsereignisse durch  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLs}}$

A)

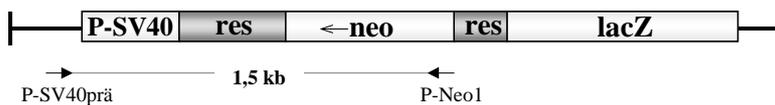
pCH-RNRZ (Substrat)



pCH-RZ (Deletionsprodukt)

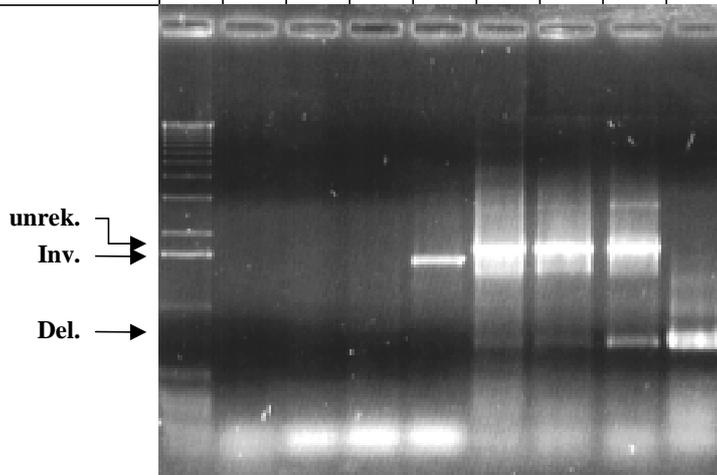


pCH-R<sup>1</sup>NR<sup>2</sup>Z (Inversionsprodukt)



B)

Spur	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Marker	+	-	-	-	-	-	-	-	-
pCH-RNRZ	-	-	+	+	+	+	+	+	-
pCH-RZ	-	-	-	-	-	-	-	-	+
pPGK $\gamma$ NLS	-	-	-	+	-	-	+	-	-
pPGK $\gamma$ 102NLS	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Primer p-SV40prä	-	+	+	+	+	+	+	+	+
p-Neo1	-	+	+	+	+	-	-	-	-
p-PCHSeqanti	-	+	-	-	-	+	+	+	+



**Abbildung 3.7: PCR-Analysen zum Nachweis der Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase auf episomalen Substraten in CHO-Zellen**

A) Schematische Darstellung der in den PCR-Analysen eingesetzten DNA's. Durch die Primer P-SV40prä und P-lacZanti2 kann mit dem Substrat pCH-RNRZ als Template ein 1,8 kb großes Fragment amplifiziert werden, mit dem Deletionsprodukt pCH-RZ ein 800 bp großes DNA-Molekül. Mit den Primern P-SV40prä und P-Neo1 kann nur mit dem Inversionsprodukt pCH-R<sup>1</sup>NR<sup>2</sup>Z als Matrize ein 1,5 kb großes Fragment amplifiziert werden.

B) Die DNA von transient co-transfizierten CHO-Zellen wurde isoliert und über eine PCR-Analyse auf Rekombinationsereignisse hin untersucht. In den Spuren 6-9 ist eine PCR-Analyse zur Detektion von Deletionsreaktionen gezeigt. Das Ausgangssubstrat führt zur Amplifikation eines ca. 1,8 kb großen DNA-Fragmentes; durch das Rekombinationsprodukt pCH-RZ entsteht eine 800 bp große Bande (Spur 9). In den Spuren 2-5 ist eine PCR-Analyse zur Detektion von Inversionsereignissen gezeigt. Aufgrund der Primerwahl kann nur im Falle einer Inversion ein DNA-Fragment mit einer Größe von ca. 1,5 kb amplifiziert werden. Das Substrat hingegen kann nicht als Template fungieren.

nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Für diese Analyse wurden der vor dem SV40-Promotor gelegene Primer P-SV40prä sowie ein hinter der zweiten *res* Sequenz lokalisierter Primer p-PCHanti verwendet. Eine Rekombinationsaktivität der Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase konnte auf diesem Substrat mittels PCR nicht detektiert werden.

Die erwartete DNA-Sequenz der PCR-Produkte konnte in allen Analysen durch Sequenzierung bestätigt werden.

### 3.3.2 Rekombinationsnachweis auf episomalen Substraten mit isolierten *subsites* I (*subI* x *subI*) in CHO-Zellen

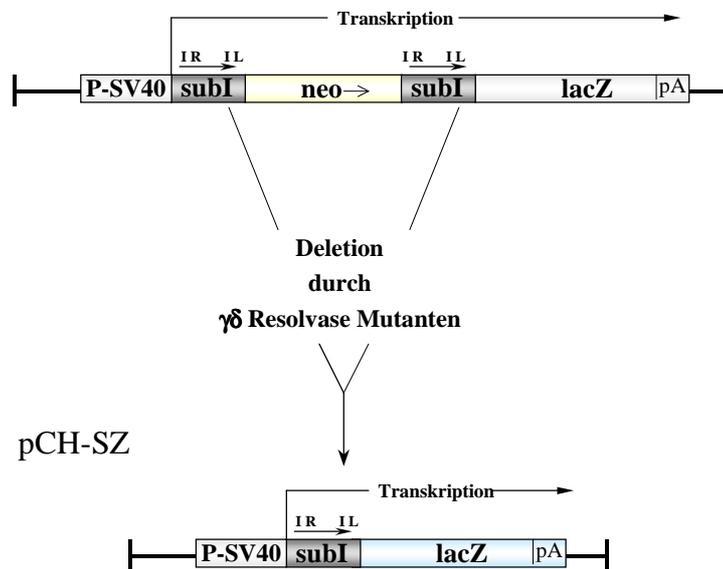
Für eine gezielte Integration einer bestimmten DNA-Sequenz in das Genom eines Organismus kann man natürlicherweise in diesem Genom vorkommende DNA-Sequenzen, die zu den Rekombinationssequenzen homolog sind, verwenden. Für die  $\gamma\delta$  Resolvase konnten kryptische *subsite* I Sequenzen (Pseudo-*subsites* I) gefunden werden (siehe Abschnitt 3.6). Voraussetzung für die Nutzung einer solchen Pseudo-*subsite* I ist allerdings, daß ein  $\gamma\delta$  Resolvase Derivat in der Lage ist, solche Substrate in Eukaryoten zu rekombinieren.

*In vitro* und in *E. coli* konnte gezeigt werden, daß  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124Q}}$  Substrate rekombinieren kann, die anstelle der kompletten *res* Sequenzen zwei gleich orientierte, isolierte *subsites* I enthalten, allerdings mit geringerer Effizienz. Zudem konnten durch  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124Q}}$  Inversionsereignisse auf diesem Substrat nachgewiesen werden. Die Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase sowie  $\gamma\delta^{\text{E124Q}}$  konnten ein solches Substrat hingegen nicht rekombinieren (Boocock, pers. Mitteilung).

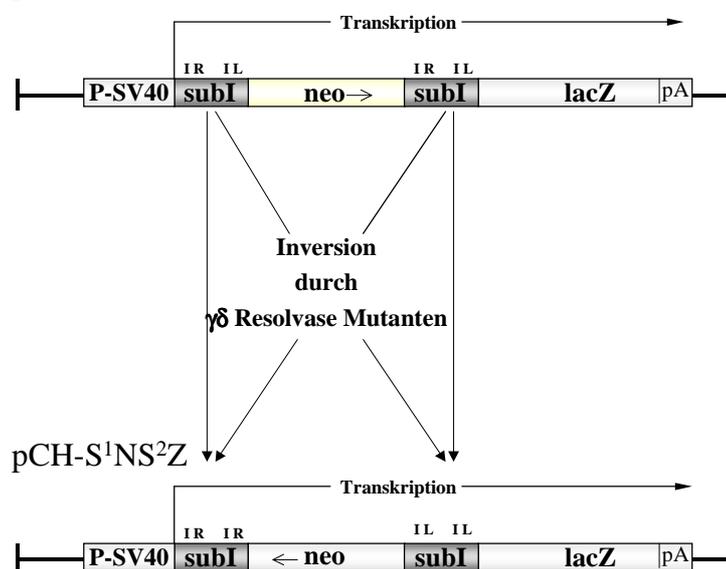
Um zu überprüfen, ob diese Ergebnisse auch auf eukaryotische Zellen übertragbar sind oder ob die Rekombination durch die  $\gamma\delta$  Resolvase Doppelmutante in eukaryotischen Zellen möglicherweise nur mit Hilfe der akzessorischen *subsites* II und III stattfinden kann, wurde ein Vektor konstruiert, der analog zum Substrat pCH-RNRZ aufgebaut ist.

Die kompletten *res* Sequenzen wurden hier allerdings jeweils durch die isolierten *subsites* I ersetzt (pCH-SNSZ; Abbildung 3.8).

### A) pCH-SNSZ



### B) pCH-SNSZ



**Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der Substrat- und Produktvektoren mit isolierten *subsites* I, für den Nachweis der Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase auf episomalen DNA-Sequenzen in eukaryotischen Zellen.**

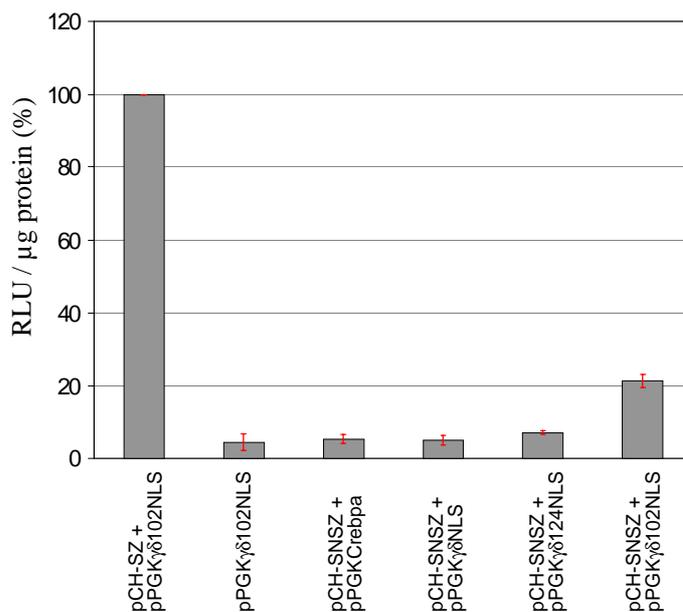
A) Deletionsreaktion. Das Substratplasmid pCH-SNSZ, besteht aus dem SV40-Promotor (P-SV40), einem von zwei gleich orientierten *isolierten subsite* I Sequenzen (*subI*) flankiertem Neomycin-Resistenzgen (*neo*) und dem Gen für  $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ*). Treffen die an den *subsites* I gebundenen Dimere der  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten zufällig aufeinander, kann ein einfacher synaptischer Komplex ausgebildet werden. Das Substrat kann deletiert werden und es entsteht das Produkt pCH-SZ, mit nur einer *subsites* I Sequenz zwischen dem Promotor und dem *lacZ*-Gen. Dieses kann nun transkribiert bzw. exprimiert werden. B) Inversionsreaktion. Die Rekombination des Substrates pCH-SNSZ kann auch zu einer Inversion führen. Hierbei entsteht das Produkt pCH-S<sup>1</sup>NS<sup>2</sup>Z mit invertiertem Neomycin-Resistenzgen.

Zur Ermittlung der Rekombinationseffizienzen wurden wie oben beschrieben (3.3.1) Co-Transfektionsexperimente durchgeführt, in denen das Substrat pCH-SNSZ

zusammen mit den Expressionsvektoren für die  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten bzw. für Cre (Negativkontrolle) durch FuGENE<sup>TM</sup>6 in CHO-Zellen gebracht wurde. Um die indirekten Rekombinationseffizienzen zu messen, wurden auch hier  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitätsmessungen nach 72 h durchgeführt. Zusätzlich wurden PCR-Analysen zum Nachweis von Deletions- und Inversionsreaktionen durchgeführt.

### 3.3.2.1 Rekombinationsnachweis durch Messung der relativen $\beta$ -Galaktosidase Aktivität

Um die Aktivität der  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate auf Substraten mit isolierten *subsites* I zu testen, wurde der Substratvektor pCH-SNSZ zusammen mit einem Expressionsvektor für ein  $\gamma\delta$  Resolvase Derivat (z.B. pPGK $\gamma\delta$ NLS) per Lipofektion in CHO-Zellen gebracht. Nach 72 h wurden die Zellysate auf die relative  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität hin analysiert. Das Ergebnis aus vier separaten Transfektionsexperimenten mit jeweils zwei parallel durchgeführten Ansätzen ist in Abbildung 3.9 gezeigt.



**Abbildung 3.9: Indirekte Rekombinationsanalyse auf *subI* x *subI* Substraten durch Messung der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität.**

In CHO-Zellen wurde das Substrat pCH-SNSZ mit isolierten *subsites* I zusammen mit einem Expressionsvektor für ein  $\gamma\delta$  Resolvase Derivat co-transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen lysiert und die relative  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität bestimmt. Die Meßwerte wurden auf den Gesamtproteingehalt der eingesetzten Zellen normiert. Die Balken stellen die Mittelwerte aus jeweils vier separaten, als Doppelansatz durchgeführten Messungen dar. Die zugehörigen Standardabweichungen sind als vertikale Linien innerhalb der Balken dargestellt.

Als Positivkontrolle wurde das in *E. coli* rekombinierte Produkt pCH-SZ zusammen mit pPGK $\gamma\delta$ 102NLS eingesetzt. Als Negativkontrollen wurden das Substrat pCH-SNSZ zusammen mit pPGKCrebpa, bzw. der Expressionsvektor pPGK $\gamma\delta$ 102NLS alleine eingesetzt. Getestet wurden hier allerdings nur die  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate mit NLS. Wie in den vorherigen Experimenten wurde die Positivkontrolle als 100%-Wert gesetzt. Im Vergleich dazu betragen die Negativkontrollen ca. 4-5%. Während sowohl die Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase als auch die Einfachmutante keine signifikante Aktivität zeigten, konnte mit  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLS}}$  eine erhöhte  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität gemessen werden. Die gemessenen Werte betragen ca. 20% von der Positivkontrolle. Dieses Ergebnis zeigt, daß  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLS}}$  zwar in der Lage ist, *subI* x *subI* Substrate zu rekombinieren, die Rekombinationseffizienz aber im Vergleich zu der auf *res* x *res* Standardsubstraten gemessenen Effizienz deutlich reduziert ist.

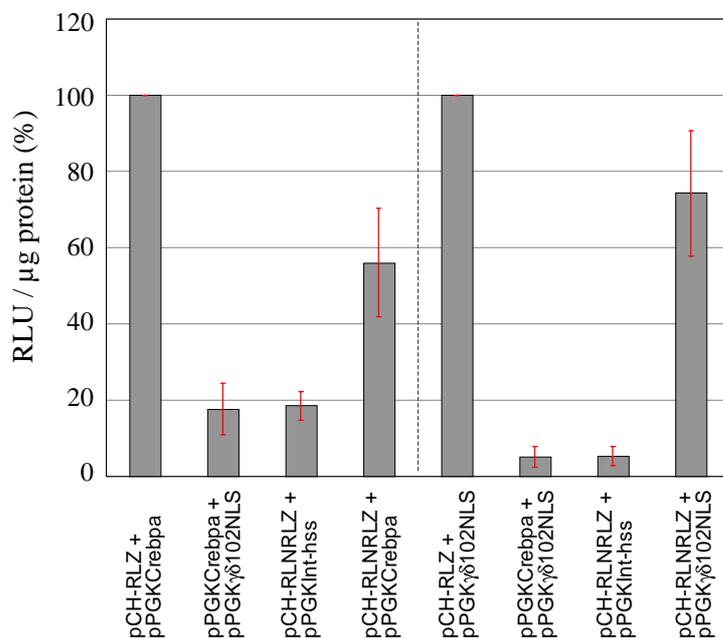
### 3.3.2.2 Deletions- und Inversionsnachweis mittels PCR

Parallel zu den Messungen der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität wurden Aliquots der transfizierten Zellen genommen, aus denen die DNA isoliert wurde. Analog zu den oben beschriebenen PCR-Analysen (3.3.1.3) wurden PCR-Reaktionen mit denselben Primern durchgeführt, um Deletions- und Inversionsreaktionen nachzuweisen. Das Ergebnis entsprach dem obigen. Ein signifikantes Deletionssignal konnte nur mit der  $\gamma\delta$  Resolvase Doppelmutante detektiert werden. Auch konnten nur mit  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLS}}$  Inversionsereignisse detektiert werden (Daten nicht gezeigt).



Durch Co-Transfektionen des Substratplasmides pCH-RLNRLZ zusammen mit dem Expressionsvektor pPGKCrebpa oder pPGK $\gamma\delta^{E102Y,E124Q}NLS$  (Verhältnis 1:3) wurden die Rekombinationseffizienzen der beiden Rekombinasen Cre und  $\gamma\delta^{E102Y,E124Q}NLS$  verglichen. Als indirektes Maß für die Rekombinationseffizienz wurde nach 48 h bzw. 72 h wiederum die relative  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität gemessen.

In Abbildung 3.11 sind die Ergebnisse aus vier unabhängigen, als Tripletts durchgeführten Transfektionsexperimenten zusammengefaßt. Als Positivkontrollen wurden die in *E. coli* 294-Cre bzw. *E. coli* DH5 $\alpha$  rekombinierten Plasmide pCH-RLZ zusammen mit dem jeweiligen Expressionsvektor pPGKCrebpa bzw. pPGK $\gamma\delta^{E102Y,E124Q}NLS$  eingesetzt. Deren relative Aktivität wurde auf 100% gesetzt. Als Negativkontrollen fungierten jeweils die Expressionsvektoren alleine, bzw. das Substratplasmid pCH-RLNRLZ zusammen mit dem Expressionsvektor pPGKInt-hss (bereitgestellt von Nicole Christ), der das Gen für eine Mutante der  $\lambda$ -Integrase trägt.



**Abbildung 3.11: Vergleich der Rekombinationseffizienzen von  $\gamma\delta^{E102Y,E124Q}NLS$  und Cre auf episomalen Substratvektoren in CHO-Zellen durch Messung der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität.**

Die Zellen wurden 48 h bzw. 72 h nach der Co-Transfektion lysiert und auf deren relative  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität hin untersucht. Die Balken stellen jeweils die Mittelwerte aus vier unabhängigen Transfektionen (Triplettsansätze) dar. Die Standardabweichungen sind als vertikale Linien innerhalb der Balken angegeben. Die Werte sind jeweils auf die entsprechende Positivkontrolle, die auf 100% gesetzt wurde, bezogen. Links sind die Meßresultate für Cre, rechts die für  $\gamma\delta^{E102Y,E124Q}NLS$  gezeigt.

Bezogen auf die entsprechenden Positivkontrollen wurden nach Co-Transfektionen von pCH-RLNRLZ zusammen mit pPGKCrebpa bzw. pPGK $\gamma\delta^{E102Y,E124Q}NLS$  jeweils relative  $\beta$ -

Galaktosidase Aktivitäten von ca. 60% gemessen. Hierbei spielte der Zeitpunkt der Analyse (48 h bzw. 72 h nach der Transfektion) keine Rolle. Ausgehend von diesen Resultaten kann man Cre und die  $\gamma\delta$  Resolvase Doppelmutante als vergleichbar effizient bezüglich ihrer Rekombinationsaktivität auf episomalen Substraten in CHO-Zellen bewerten.

Interessanterweise waren die Absolutmeßwerte der Positivkontrollen mit Cre um einen Faktor zwei bis drei geringer als die der Positivkontrollen mit  $\gamma\delta$  Resolvase.

Ein Vergleich der Rekombinationseffizienzen von Cre und der  $\gamma\delta$  Resolvase Doppelmutante wurde außerdem in HeLa-Zellen durchgeführt. In diesen menschlichen Zellen war Cre in der Lage mit einer Effizienz von >90% zu rekombinieren, während das  $\gamma\delta$  Resolvase Derivat lediglich Rekombinationseffizienzen von ca. 20% aufweisen konnte (Abbildung 3.12 B).

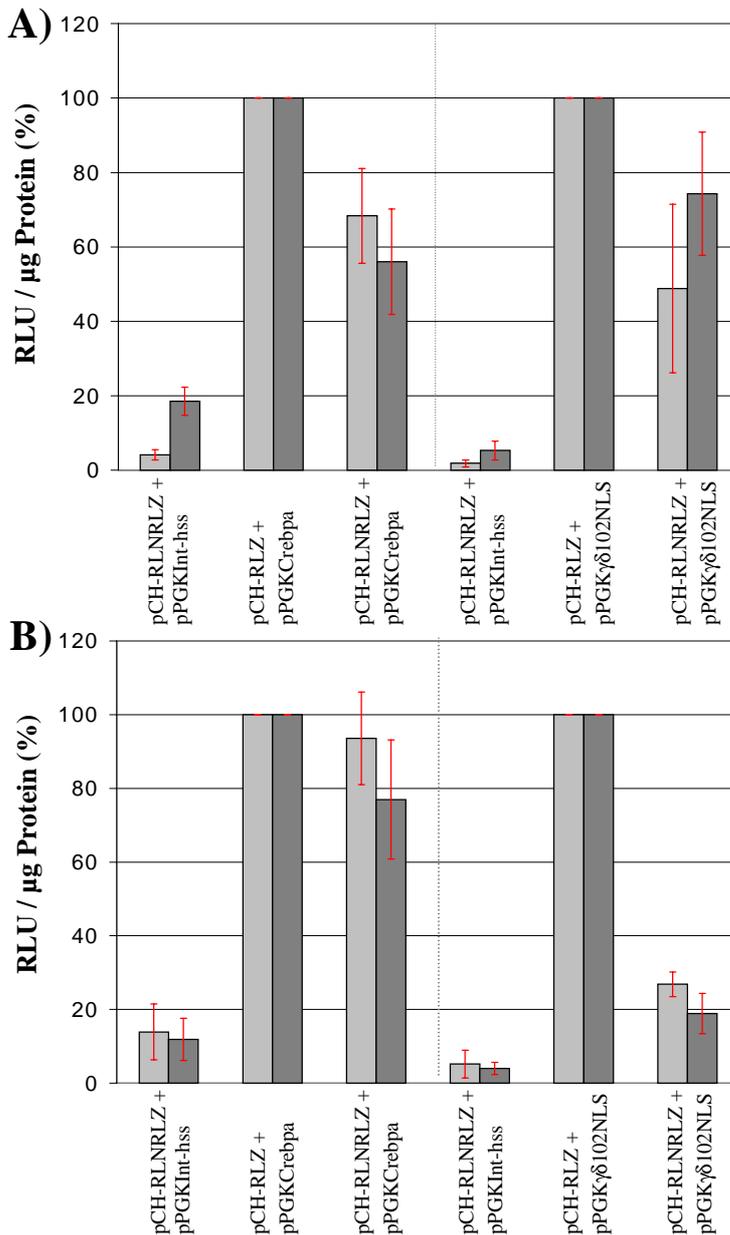
In CHO-AA8 Tet-Off Zellen (Clontech; siehe 3.4.2) rekombinierte Cre mit einer Effizienz von 70-80% auf dem episomalen Substrat, während  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLS}}$  mit einer Effizienz von 40-50% zu rekombinieren in der Lage war.

In allen getesteten Zelllinien fiel auf, daß in der Positivkontrolle mit pPGKCrebpa wesentlich weniger  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert wurde als in der Positivkontrolle mit pPGK $\gamma\delta$ 102NLS. Die Differenz betrug je nach Zelllinie 200-500%.

### **3.3.4 Einfluß der Substrat-Topologie auf die Rekombinations-effizienzen von $\gamma\delta$ Resolvase und Cre in eukaryotischen Zelllinien**

In den oben beschriebenen Rekombinationsanalysen wurden ausschließlich überspiralisierte Substratvektoren eingesetzt. Da eine solche Topologie als Cofaktor für eine effiziente Rekombination durch Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase benötigt wird, für Cre und  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLS}}$  aber nicht essentiell ist, wurden auch Co-Transfektionsexperimente mit zuvor durch XmnI linearisierten DNA-Substraten durchgeführt. Sowohl in CHO-Zellen

als auch in HeLa-Zellen zeigte sich, daß die Rekombinationseffizienzen von Cre und der  $\gamma\delta$  Resolvase Doppelmutante nicht von der Topologie des Substrates beeinflusst wurde (Abbildung 3.12).



**Abbildung 3.12: Vergleich der Rekombinationseffizienzen von  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLS}}$  und Cre auf linearisierten und superhelical gespannten, episomalen Substratvektoren in eukaryotischen Zellen durch Messung der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität.**

Die Zellen wurden mit den angegebenen Vektoren co-transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen lysiert und auf deren relative  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität hin untersucht. A) Messung der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität von transfizierten CHO-Zellen. B) Messung der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität von transfizierten HeLa-Zellen. Hellgraue Balken stellen jeweils die Mittelwerte aus drei bis fünf separaten Transfektionen (jeweils zwei parallele Ansätze) mit superhelical gespannter DNA dar, dunkelgraue Balken zeigen die Ergebnisse nach Transfektion der linearisierten Substrat-Plasmide. Die Standardabweichungen sind als vertikale Linien innerhalb der Balken angegeben. Die Werte sind jeweils auf die entsprechenden Positivkontrollen, die auf 100% gesetzt wurden, bezogen. Links sind die Meßresultate für Cre, rechts die für  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLS}}$  gezeigt.

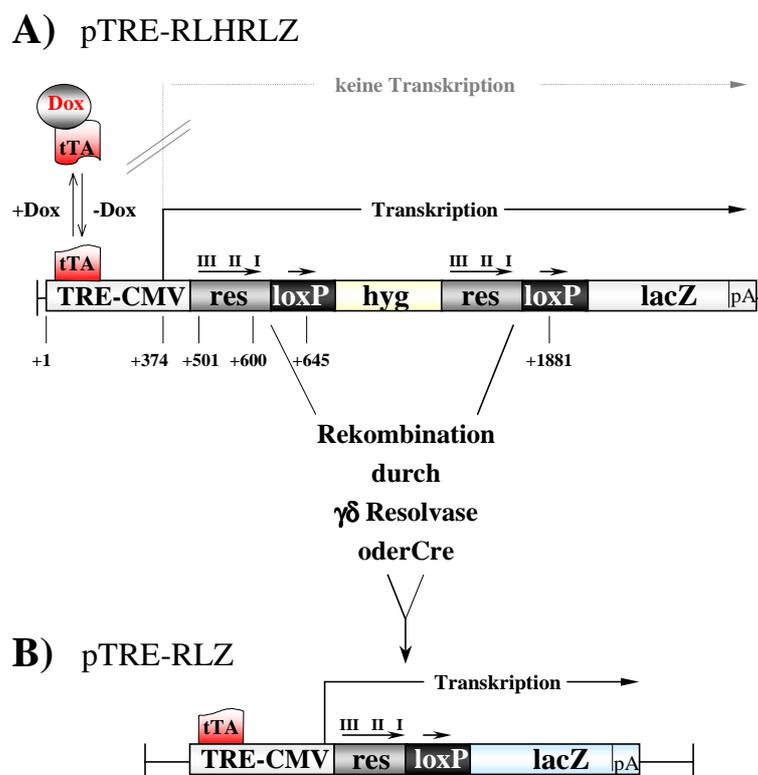
### ***3.4 $\gamma\delta$ Resolvase katalysierte Rekombination auf genomischen DNA-Substraten in eukaryotischen Zellen***

Neben dem Nachweis der Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten auf episomalen Substratmolekülen, in HeLa- und in CHO-Zellen, wurden auch Rekombinationsanalysen auf Substratmolekülen, die stabil ins Genom der Zellen integriert worden sind, durchgeführt. Hierbei wurde wiederum eine Gegenüberstellung der Rekombinationseffizienzen von  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLs}}$  und Cre durchgeführt. Desweiteren sollten mit Hilfe dieser Analysen Rückschlüsse auf den Zustand der genomischen DNA in Eukaryoten gezogen und Abhängigkeiten der Rekombinationsereignisse von der Transkriptionsaktivität innerhalb des zu rekombinierenden Bereiches aufgezeigt werden. Darüberhinaus sollte ein möglicher Einfluß von Histon-Deacetylase Inhibitoren auf die Effizienzen der beiden Rekombinasen analysiert werden. Außerdem sollte der Effekt von Topoisomerase Inhibitoren auf die durch  $\gamma\delta$  Resolvase und Cre katalysierte Rekombination untersucht werden.

#### **3.4.1 Herstellung von stabilen Substrat-Zelllinien**

Für die oben aufgeführten Untersuchungen wurden Zelllinien hergestellt, die eine oder mehrere Kopien eines Standardsubstratmoleküles für  $\gamma\delta$  Resolvase bzw. Cre stabil ins Genom integriert haben. Als Substrat wurde das in Abbildung 3.13 schematisch dargestellte Plasmid pTRE-RLHRLZ verwendet. Dieser Vektor beinhaltet einen minimalen CMV-Promotor ohne CMV-Enhancer, der durch ein Promotorelement (TRE = *Tet Responsive Element*) reguliert wird. Das TRE besteht aus sieben Kopien der *tet*-Operator Sequenz. Die Zelllinie CHO-AA8 Tet-Off (Clontech) exprimiert ein Transaktivatormolekül (tTA), das an TRE bindet und so den dahintergelegenen Promotor aktiviert. Doxycyclin, ein Derivat von Tetracyclin, bindet seinerseits an tTA

und verändert dessen Konformation in dem Maße, daß eine weitere Bindung an TRE nicht mehr möglich ist. Die Transkription wird folglich eingestellt (Gossen & Bujard, 1992). Direkt stromabwärts des Promotors befindet sich die Rekombinationskassette mit jeweils zwei *res* und *loxP* Sequenzen in gleicher Orientierung und einem von diesen Elementen flankiertem Hygromycingen, welches durch das Promotorelement exprimiert wird.



**Abbildung 3.13: Schematische Darstellung des Rekombinationssystems zur Analyse der sequenzspezifischen Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase und Cre auf genomischen Substraten in CHO-AA8 Tet-Off Zellen.**

A) Substratplasmid pTRE-RLHRLZ. Die durch den minimalen CMV-Promotor vermittelte Transkription kann über das Tetracyclin empfindliche Element (TRE) und einen Transaktivator (tTA) durch die An-/Abwesenheit von Doxycyclin (Dox) reguliert werden. Das zwischen den direkt orientierten Rekombinationssequenzen *res/loxP* gelegene Hygromycingen (*hyg*) kann in Abwesenheit von Doxycyclin exprimiert werden. Da das polyA-Signal (pA) hinter dem *lacZ*-Gen positioniert ist, läuft die Transkription durch die gesamte Rekombinationskassette und das *lacZ*-Gen. Die Nukleotidabstände der wichtigen Elemente sind angegeben (der Transkriptionsstart befindet sich an Position +374, das äußerste Nukleotid der Promotor-proximalen *subsite* III an Position +501, der *overlap*-Bereich innerhalb der *subsite* I an Position +600, das Zentrum der ersten *loxP* Sequenz an Position +645, das der zweiten an Position 1881). B) Rekombinationsprodukt pTRE-RLZ. Aufgrund der Deletion des Hygromycingens und einer *res/loxP* Sequenz kann das *lacZ*-Gen exprimiert werden.

---

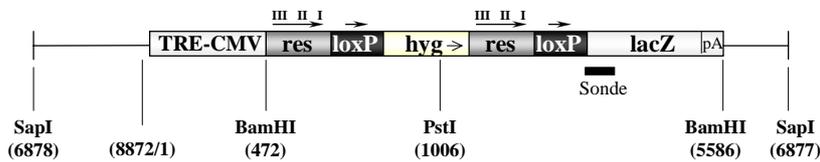
Hinter der zweiten *res/loxP* Box ist ein *lacZ*-Gen positioniert, dessen Expression nach einer Deletion der Rekombinationskassette gemessen und als indirektes Maß für die Rekombinationseffizienz gewertet werden kann.

Das Plasmid wurde durch *SapI* linearisiert und per Elektroporation in die Zellen transfiziert, wo es dann illegitim ins Genom integriert wurde. Positive Klone wurden durch Hygromycin (350 µg/ml) selektioniert und über PCR-Analysen und anschließender Sequenzierung der PCR-Produkte charakterisiert. Klone, die aufgrund der PCR-Untersuchungen die wichtigen Elemente des Vektors integriert hatten, wurden nach einer Fragmentierung der genomischen DNA durch *PstI* mit Hilfe einer Southern Blot Analyse auf die Anzahl der Integrate hin untersucht. Durch eine Southern Blot Analyse nach *BamHI*-Fragmentierung der genomischen DNA wurde schließlich sichergestellt, daß die Rekombinationskassette komplett integriert wurde (Abbildung 3.14).

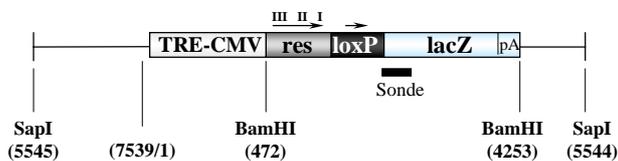
Für die nachfolgenden Analysen wurden zwei Zelllinien mit jeweils einer Kopie des Substrates, eine Zelllinie mit zwei Kopien und zwei Zelllinien mit jeweils >10 bzw. >20 Kopien (u.a. auch *in tandem* Wiederholungen des Substrates im selben Locus) ausgewählt. Die *single-copy* Zelllinien wurden mit *pPGKCrebpa* transfiziert und anschließend subkloniert. Auf diesem Weg konnten aus den ursprünglichen Substratzelllinien Zellen mit dem Rekombinationsprodukt im selben Locus gewonnen werden. Auch diese Zelllinien wurden über PCRs, Sequenzierungen und Southern Blot Analysen charakterisiert und schließlich in den nachfolgenden Experimenten als Positivkontrollen verwendet. In Tabelle 3.2 sind die in den folgenden Experimenten verwendeten Zelllinien aufgeführt.

A)

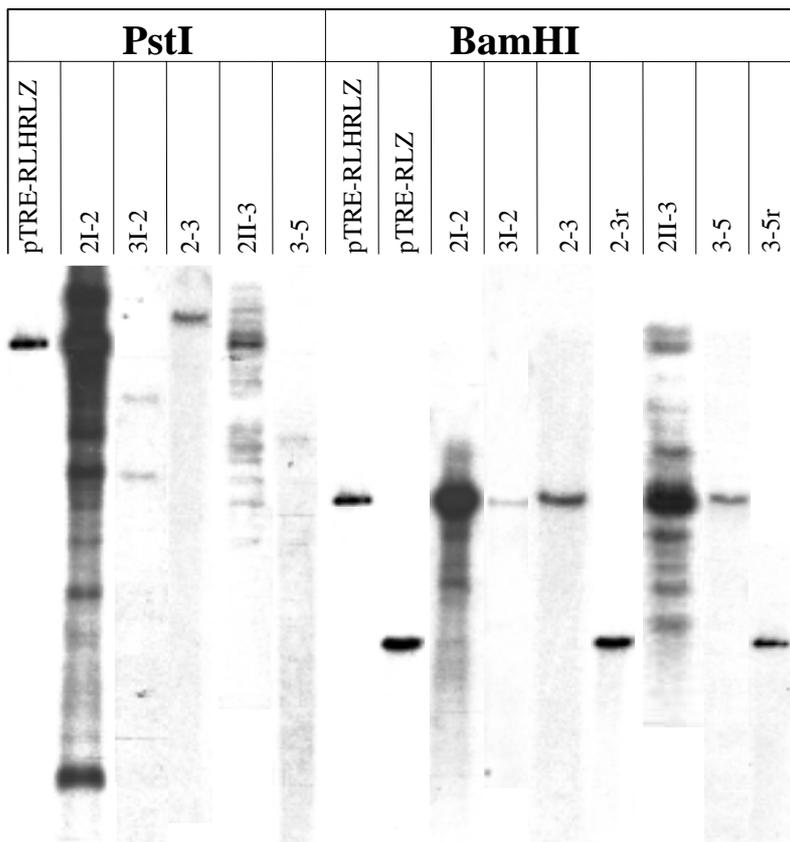
pTRE-RLHRLZ



pTRE-RLZ



B)



**Abbildung 3.14: Southern Blot Analyse zur Charakterisierung der stabilen Substrat-Zelllinien.**

A) Schematische Darstellung des Substratvektors pTRE-RLHRLZ und des Rekombinationsproduktes pTRE-RLZ. Die relativen Positionen der Restriktionschnittstellen SapI, BamHI und PstI sind angegeben. Nach Restriktion der genomischen DNA mit BamHI kann im Southern Blot eine ca. 5,1 kb große Bande durch das Substrat und eine ca. 3,9 kb große Bande durch das Produkt nachgewiesen werden. PstI schneidet das Plasmid nur einmal, so daß bei *in tandem* Integrationen eine Bande mit der Einheitslänge des Plasmides (8872 bp) nachgewiesen werden kann. Banden, die kürzer als ca. 5,9 kb sind, weisen auf ab-errante Integrationen hin. B) Southern Blot Analyse der später verwendeten Zelllinien. Anhand der Restriktion der genomischen DNA der Substratzelllinien mit PstI (links) können die Anzahl der Integrate sowie *in tandem* Integrationen ermittelt werden. Der Verdau mit BamHI (rechts) zeigt an, ob die Rekombinationskassette komplett integriert wurde. Außerdem konnte Rekombination in den subklonierten Zelllinien 2-3r und 3-5r nachgewiesen werden.

Tabelle 3.2:

Auflistung der Zelllinien mit stabil ins Genom integrierten DNA-Substraten bzw. -Produkten

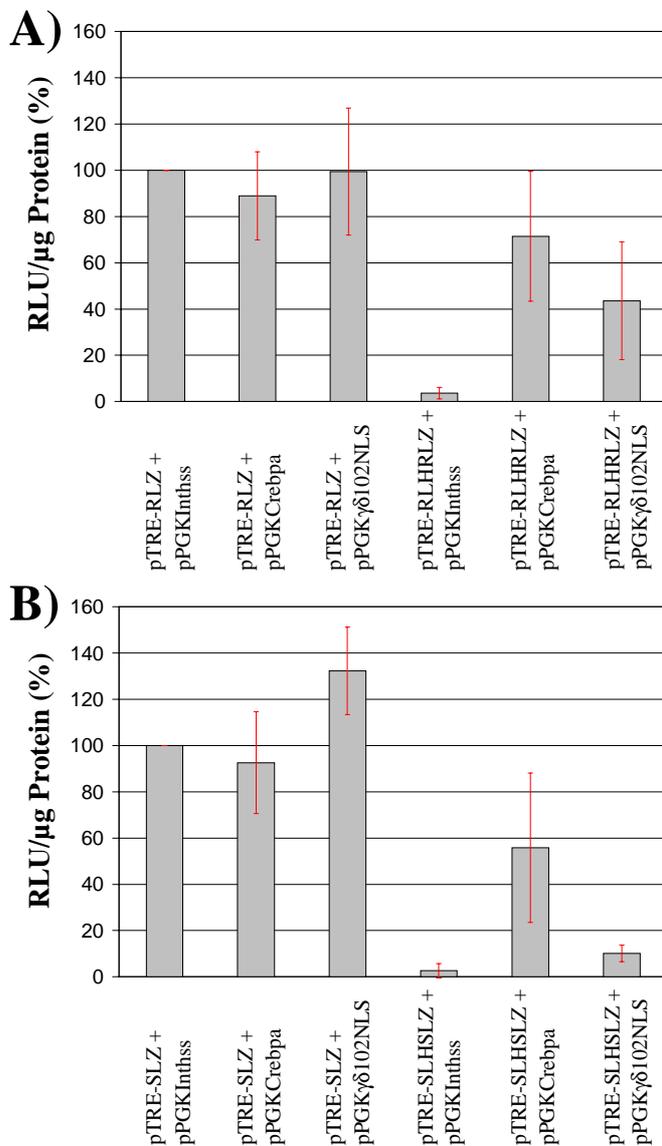
Substrat-Zelllinie	Integriertes DNA-Molekül	Integrationsorte	Kopienzahl
2-3	TRE-RLHRLZ	1	1
3-5	TRE-RLHRLZ	1	1
3I-2	TRE-RLHRLZ	2	2
2I-2	TRE-RLHRLZ + verkürzte Derivate	>20	>20 + in tandem Wiederholungen
2II-3	TRE-RLHRLZ + verkürzte Derivate	>10	>10 + in tandem Wiederholungen

Produkt-Zelllinie	Integriertes DNA-Molekül	Integrationsorte	Kopienzahl
2-3r	TRE-RLZ	1	1
3-5r	TRE-RLZ	1	1

### 3.4.2 Rekombinationsanalyse auf episomalen Tet-Off-Substraten in der Zelllinie CHO-AA8 Tet-Off

Um die Rekombinationseffizienzen von  $\gamma\delta$  Resolvase und Cre auf genomischen Substraten mit denen auf episomalen Substraten vergleichen zu können, mußten Rekombinationsanalysen mit pTRE-RLHRLZ als episomales bzw. genomisches Substrat in der Zelllinie CHO-AA8 Tet-Off durchgeführt werden. Für die Bestimmung der Rekombinationseffizienzen auf episomalen Substraten wurden Co-Transfektionen per Elektroporation durchgeführt. Anschließend wurde die Effizienz wieder über die Messung der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität abgeleitet.



**Abbildung 3.15: Indirekte Rekombinationsanalyse auf episomalen DNA-Substraten in CHO-AA8 Tet-Off Zellen durch Messung der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität.**

A) Die Zellen wurden mit dem Substratvektor pTRE-RLHRLZ zusammen mit einem Expressionsvektor für Cre,  $\gamma\delta^{E102Y,E124QNL}$  oder Int-h als Negativkontrolle co-transfiziert. Als Positivkontrolle wurde anstelle des Substrates jeweils der Produktvektor pTRE-RLZ eingesetzt. Nach 72 h wurde die relative  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität gemessen und auf den Gesamtproteingehalt der Zellen normiert. Es wurden jeweils vier bis sechs separate Transfektionsexperimente als Doppelansätze durchgeführt. Die Balken zeigen die Mittelwerte aus den entsprechenden Messungen, die vertikalen Linien innerhalb der Balken die zugehörigen Standardabweichungen. B) Rekombinationsanalyse mit dem Substrat pTRE-SLHSLZ. Das Substrat enthält anstelle der zwei kompletten *res*-Sequenzen zwei isolierte *subsites* I. Die Experimente wurden analog zu denen in A) durchgeführt. Die Balken geben die Mittelwerte aus vier bis sechs Transfektionsexperimenten mit jeweils zwei Parallelansätzen an, die vertikalen Linien innerhalb der Balken die zugehörigen Standardabweichungen.

Als Substrate wurden pTRE-RLHRLZ und dessen Derivat pTRE-SLHSLZ, das anstelle der kompletten *res* Sequenzen zwei isolierte *subsites* I trägt, eingesetzt. Um zu zeigen, daß die Rekombination durch die beiden Rekombinasen auch hier unabhängig von der Topologie stattfindet, wurden superhelical gespannte sowie mit SalI linearisierte Substrate verwendet. Mit linearisierten Substraten zeigte sich, daß Cre jeweils mit einer

Effizienz von ca. 70-80% rekombinieren konnte (Abbildung 3.15 A, B), während  $\gamma\delta^{E102Y,E124QNLs}$  auf dem Standardsubstrat eine Effizienz von ca. 40% erreicht hat (Abbildung 3.15 A). Auf dem Substrat pTRE-SLHSLZ konnte hingegen nur eine Rekombinationseffizienz von ca. 5% Rekombination durch die  $\gamma\delta$  Resolvase Doppelmutante nachgewiesen werden (Abbildung 3.15 B). Die Ergebnisse mit überspiralisierten Substraten waren mit den hier aufgeführten vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

Um einen möglichen Einfluß der Transfektionsmethode auf die Ergebnisse der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitätsmessungen zu überprüfen, wurden die Co-Transfektionsexperimente auch mit FuGENE<sup>TM</sup>6 durchgeführt. Hierbei konnten ebenfalls vergleichbare Werte ermittelt werden.

### **3.4.3 Rekombination durch $\gamma\delta$ Resolvase und Cre auf genomischen DNA-Substraten in CHO-AA8 Tet-Off Zellen**

In die in Tabelle 3.2 aufgeführten stabilen Substrat- und Produkt-Zelllinien wurde per Elektroporation Expressionsvektor-DNA transfiziert, so daß die zu untersuchende Rekombinase in den Zellen exprimiert werden konnte. Nach 72 h wurden  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitätsmessungen und parallel dazu PCR- sowie Southern Blot Analysen durchgeführt. Diese Untersuchungen wurden auch in Gegenwart von Doxycyclin, Camptothecin, EMD 50689, Trichostatin A und Na-Butyrat durchgeführt. Als Negativ-Kontrolle wurde der Expressionsvektor pPGKInt-hss in die Zellen transfiziert. Zusätzlich wurde durch eine parallel durchgeführte Transfektion des EGFP-exprimierenden (EGFP = *Enhanced Green Fluorescent Protein*) Vektors pEGFP (Clontech) in dieselbe Zelllinie und anschließender FACS-Analyse (*Fluoreszenz Activated Cell Scanning*) die Transfektionseffizienz, also die prozentuale Anzahl der transfizierten Zellen bestimmt. Die Meßresultate der rekombinierten Zelllinien wurden als 100%-Wert gesetzt, so daß für die entsprechenden Substratzelllinien die ungefähre

Rekombinationseffizienz, bezogen auf die Transfektionseffizienz ermittelt werden konnte.

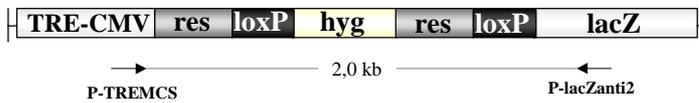
### **3.4.3.1 Vergleich der Rekombinationseffizienzen von $\gamma\delta$ Resolvase Derivaten und Cre auf genomischen DNA-Substraten**

Die Zelllinien 2-3 und 3-5 (vergleiche Tabelle 3.2) wurden mit Expressionsvektoren für  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate bzw. Cre transfiziert und nach 72 h analysiert. Exemplarisch werden nachfolgend nur die Ergebnisse aus der Zelllinie 2-3 aufgeführt. In den unter Verwendung der Primer P-TREMCS und P-pCHSeqanti (siehe Abbildung 3.16 A) durchgeführten PCR-Analysen stellte sich heraus, daß die  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate mit NLS mit einer höheren Effizienz zu rekombinieren in der Lage waren, als die Varianten ohne NLS (Abbildung 3.16 B; Spuren 4 bis 9). Desweiteren war mit der Doppelmutante  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLS}}$  die prominenteste Produktbande nachzuweisen (Spur 9), während die Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase eine so geringe Rekombinationseffizienz aufwies, daß eine nur äußerst schwache Produktbande sichtbar wurde (Spuren 4 und 5). Im Gegensatz dazu zeigte sich, daß durch Cre auf demselben genomischen DNA-Substrat ein Großteil des Substrates rekombiniert worden war (Spur 10). In Sequenzanalysen der PCR-Produkte konnte die Korrektheit der nach einem Rekombinationsereignis erwarteten DNA-Sequenzen nachgewiesen werden.

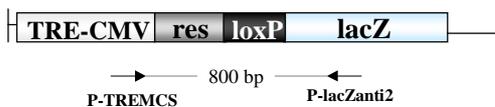
In den Untersuchungen mit der Zelllinie 3-5 konnten diese Ergebnisse reproduziert werden.

A)

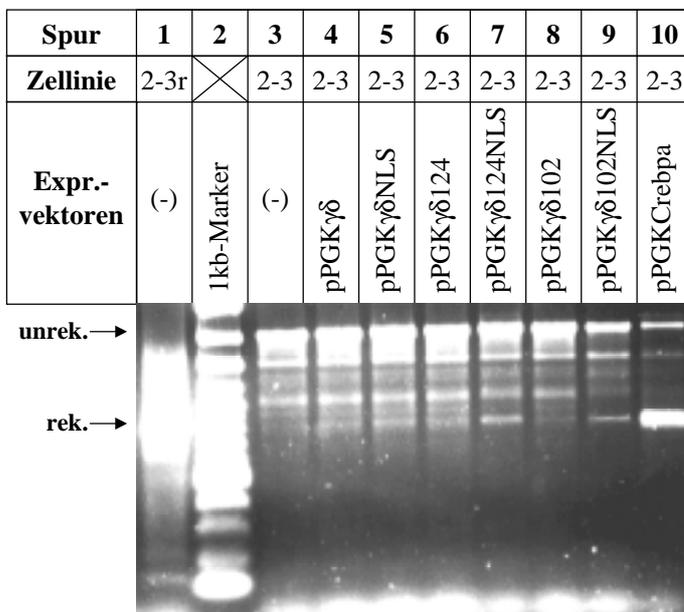
pTRE-RLHRLZ (Substrat)



pTRE-RLZ (Deletionsprodukt)



B)



**Abbildung 3.16: Nachweis der Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase und Cre auf einem genomischem Substrat in CHO-AA8 Tet-Off Zellen über PCR-Analyse.**

A) Schematische Darstellung des Substratvektors pTRE-RLHRLZ und des Rekombinationsproduktes pTRE-RLZ. Eine PCR mit den Primern P-TREMCS und P-lacZanti2 führt mit dem Substrat als Template zur Amplifikation eines ca. 2,0 kb großen DNA-Fragmentes. Durch das Rekombinationsprodukt pTRE-RLZ wird ein 800 bp großes DNA-Fragment amplifiziert. B) Die Zelllinie 2-3 wurde mit Expressionsvektoren für  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate bzw. Cre transfiziert. Nach 72 h wurde die isolierte DNA über eine kompetitive PCR mit den Primern P-TREMCS und P-lacZanti2 auf Deletionsereignisse hin überprüft. In Spur 1 ist die DNA aus der rekombinierten Produkt-Zelllinie 2-3r aufgetragen, in den Spuren 3-10 die DNA aus den mit dem jeweils angegebenen Expressionsvektor transfizierten Zellen der Substratzelllinie 2-3. Die Pfeile markieren die Höhe der amplifizierten DNA-Produkte. Das DNA-Fragment aus der unrekombinierten Ausgangs-DNA entspricht einer Länge von 2,0 kb, das Amplifikat aus dem Rekombinationsprodukt ist 800 bp lang. Die übrigen Banden sind artifizielle Nebenprodukte der PCR-Reaktion

Ein indirekter Rekombinationsnachweis erfolgte auch hier durch Messung der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität nach Transfektion der Substrat-Zelllinien mit den Expressionsvektoren für die NLS-tragenden  $\gamma\delta$  Resolvase Varianten bzw. Cre. Die rekombinierte Produkt-Zelllinie 2-3r, die ebenfalls mit dem Vektor pEGFP transfiziert worden war, wurde als Positivkontrolle herangezogen und auf 100% gesetzt. Die gemessenen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten der 2-3r Zellen, die mit den anderen Expressionsvektoren transfiziert worden sind, unterschieden sich hinsichtlich der

Aktivität nicht von den mit pEGFP transfizierten Zellen. Es zeigte sich, daß Cre mit einer Effizienz von >50% rekombinieren konnte, während die  $\gamma\delta$  Resolvase Doppelmutante nur eine Rekombinationseffizienz von <2% aufwies. Die Aktivitäten der durch die Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase oder durch die Einfachmutante rekombinierten Zelllinien unterschieden sich nicht signifikant von den Werten der Negativkontrolle (pEGFP). In Tabelle 3.3 sind exemplarisch die Ergebnisse aus der Zelllinie 2-3 zusammengefaßt.

**Tabelle 3.3:**

**Indirekte Rekombinationsanalyse auf einem genomischen *res/loxP*-Substrat durch Messung der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität.**

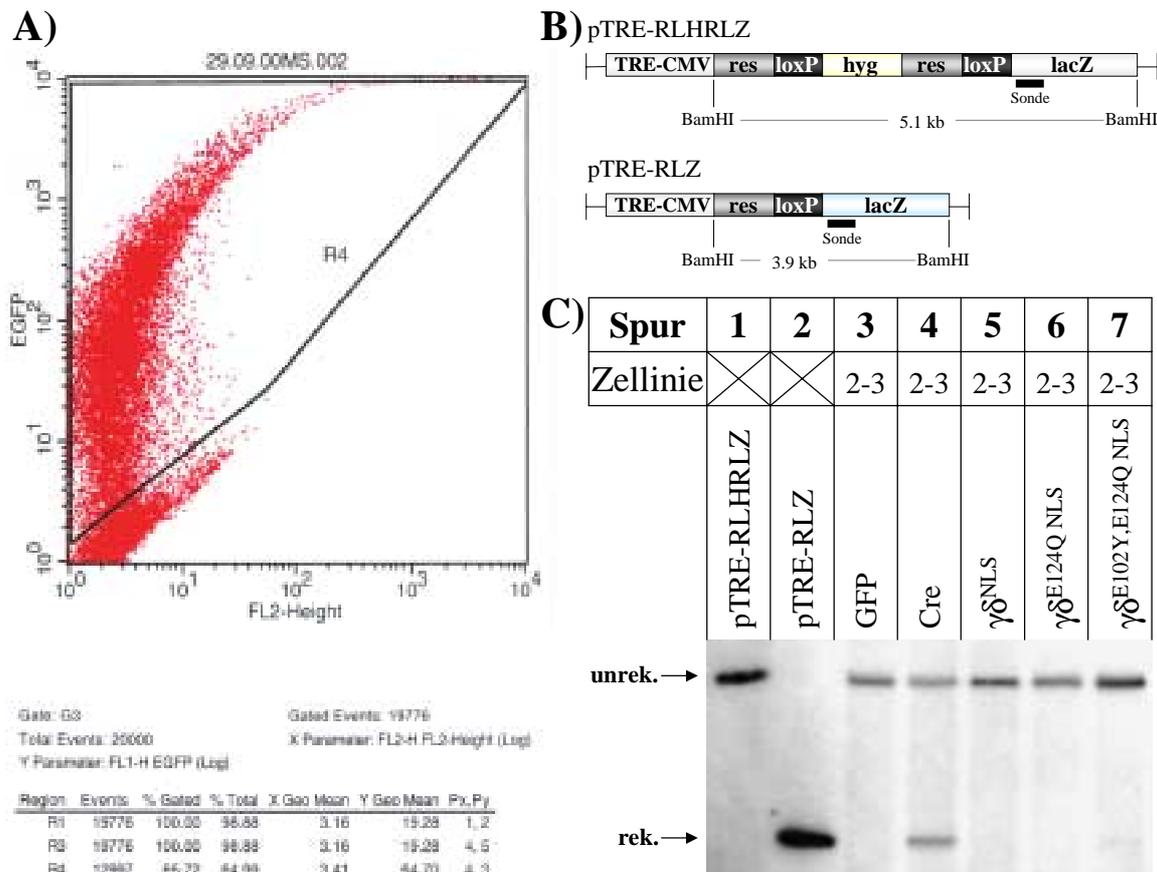
Zelllinie	Transfizierter Vektor	Relative $\beta$ -Gal Aktivität (Mittelwert)	Relative $\beta$ -Gal Aktivität (Standardabweichung)
2-3r	pEGFP	100,00%	-
2-3	pEGFP	0,48%	0,37%
2-3	pPGKCrebpa	51,73%	22,29%
2-3	pPGK $\gamma\delta$	0,38%	0,24%
2-3	pPGK $\gamma\delta$ NLS	0,48%	0,36%
2-3	pPGK $\gamma\delta$ 124	0,42%	0,08%
2-3	pPGK $\gamma\delta$ 124NLS	0,55%	0,24%
2-3	pPGK $\gamma\delta$ 102	0,60%	0,01%
2-3	pPGK $\gamma\delta$ 102NLS	1,80%	0,75%

Die stabile Substrat-Zelllinie 2-3 wurde mit Expressionsvektoren für Cre,  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate sowie für EGFP per Elektroporation transfiziert. Als Positivkontrolle fungierte die rekombinierte Produkt-Zelllinie 2-3r, die mit pEGFP transfiziert worden war. Nach 72 h wurde die auf den Gesamtproteingehalt der Zellen normierte relative  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität gemessen und in Bezug zur durch FACS-Analyse ermittelten Transfektionseffizienz relativiert. Als 100%-Wert wurde die mit pEGFP transfizierte Zelllinie 2-3r angegeben.

Die Resultate aus den Analysen mit der Zelllinie 3-5 unterschieden sich nicht signifikant von den hier gezeigten. Da von den übrigen Zelllinien keine Positivkontrollen existieren, wurden die Werte der mit pPGKCrebpa transfizierten Zellen in Relation zu den Werten,

der mit den  $\gamma\delta$  Resolvase Expressionsvektoren transfizierten Zellen gesetzt. Auch hier zeigte sich, daß Cre eine um ein Vielfaches höhere Rekombinationseffizienz aufwies, als die  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate. In den Zelllinien 2-3, 3-5, 2I-2 und 2II-3 konnten nach Rekombination durch Cre jeweils relative  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten gemessen werden, die um das 20-fache höher waren als in den Zellen, die mit pPGK $\gamma\delta$ 102NLS transfiziert worden waren. Unabhängig von der Anzahl bzw. der Lokation der genomischen DNA-Substrate innerhalb einer Zelllinie konnten also vergleichbare Rekombinationseffizienzen ermittelt werden. Lediglich in der Zelllinie 3-1 konnten nach Transfektion mit pPGKCrebpa nicht so hohe Aktivitäten gemessen werden. Die Werte betragen nur das Fünffache von den mit pPGK $\gamma\delta$ 102NLS bzw. pEGFP transfizierten Zellen.

In Southern Blot Analysen konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Die genomische DNA wurde mit BamHI fragmentiert und mit einer Sonde innerhalb des lacZ-Gens (nt 1-nt 250) hybridisiert (siehe Abbildung 3.17 B). Durch Autoradiographie konnte das unrekombinierte DNA-Substrat in Form einer ca. 5,1 kb großen Bande und das Rekombinationsprodukt in Form einer ca. 3,9 kb großen Bande sichtbar gemacht werden (Abbildung 3.17 C). Über den Phosphorimager konnte der Anteil an rekombinierter DNA im Verhältnis zum Ausgangssubstrat bestimmt werden. Dieser Wert wurde auf die durch FACS-Analyse (Abbildung 3.17 A) ermittelte Transfektionseffizienz des entsprechenden Transfektionsansatzes relativiert, so daß daraus der ungefähre Wert der tatsächlichen Rekombinationseffizienz resultierte. Es zeigte sich, daß Cre in allen getesteten Zelllinien durchschnittliche Rekombinationseffizienzen von ca. 40-80% erreichte, während  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLS}}$  nur maximal 2-3% der Substrate rekombinieren konnte (Tabelle 3.4). Der Nachweis der Rekombination durch die übrigen  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate konnte aufgrund der zu geringen Effizienz nicht über eine Southern Blot Analyse erbracht werden.



**Abbildung 3.17: Bestimmung der Rekombinationseffizienz über Southern Blot Analyse.**

In die stabilen Substrat-Zelllinien (hier: 2-3) wurden per Elektroporation Expressionsvektoren für  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate und Cre transfiziert. Als Negativ-Kontrolle wurde der Vektor pEGFP in die Zellen transfiziert. Nach 72 h wurde die genomische DNA aus den Zellen isoliert und mit BamHI verdaut. 15  $\mu\text{g}$  der fragmentierten DNA wurden elektrophoretisch über ein Agarosegel (0,8%) aufgetrennt und über Southern Blot auf Rekombinationsereignisse hin analysiert. Von der Negativ-Kontrolle wurde jeweils ein Aliquot der Zellen über FACS analysiert, um die Transfektionseffizienz des entsprechenden Experimentes zu bestimmen.

A) FACS-Analyse. Es wurden  $2 \times 10^4$  Zellen der mit pEGFP transfizierten Zelllinie 2-3 auf Fluoreszenz hin gescannt. Die in R4 enthaltenen Zellen entsprechen denen, die nach Aufnahme des Vektors pEGFP durch die EGFP-Expression ein Fluoreszenzsignal abgeben (hier 65,72%). Die außerhalb von R4 liegenden Zellen haben kein Plasmid aufgenommen.

B) Schematische Darstellung von pTRE-RLHRLZ und pTRE-RLZ. Die relativen Positionen der BamHI-Schnittstellen sowie der in den Southern Blot Analysen eingesetzten Sonde sind angezeigt. Durch pTRE-RLHRLZ wird ein 5,1 kb langes, durch pTRE-RLZ ein 3,9 kb langes Fragment detektierbar.

C) Southern Blot Analyse. Als Kontrollen wurden in den Spuren 1 und 2 jeweils ca.  $1 \times 10^6$  Kopien des Substrat- bzw. Produktvektors aufgetragen. In Spur 3 wurde die DNA der mit pEGFP transfizierten Zellen, die in B) über FACS analysiert worden sind, aufgetragen. In den Spuren 4 bis 7 sind die DNAs aus den Zellen, die mit den Expressionsvektoren für die jeweils angegebene Rekombinase transfiziert worden sind, aufgetragen. Die Position der rekombinierten bzw. unrekombinierten DNA ist durch Pfeile gekennzeichnet. Der Anteil der rekombinierten DNA an der Gesamt-DNA wurde mit Hilfe des Phosphorimagers und dem Programm TINA 2.09g ermittelt (hier Cre = 48,01%;  $\gamma\delta^{\text{E102Y, E124QNLS}}$  = 2,06%) und auf die Transfektionseffizienz (hier 65,72%) bezogen. Der daraus resultierende Wert (hier Cre = 73,05%;  $\gamma\delta^{\text{E102Y, E124QNLS}}$  = 3,13%) entspricht in etwa der tatsächlichen Rekombinationseffizienz.

Tabelle 3.4:

Rekombinationseffizienzen von  $\gamma\delta^{E102Y,E124QNLS}$  und Cre auf genomischen DNA-Substraten.

Zelllinie	Rekombinationseffizienz durch Cre (%)		Rekombinationseffizienz durch $\gamma\delta^{E102Y,E124QNLS}$ (%)	
	(Mittelwert)	(Standardabweichung)	(Mittelwert)	(Standardabweichung)
2-3	66,82 <sup>(4)</sup>	15,72	1,96 <sup>(2)</sup>	1,65
3-5	74,96 <sup>(2)</sup>	12,73	n.d.	n.d.
3I-2	42,30 <sup>(3)</sup>	22,49	2,24 <sup>(1)</sup>	-
2I-2	50,18 <sup>(1)</sup>	-	2,54 <sup>(1)</sup>	-
2II-3	83,80 <sup>(3)</sup>	42,64	2,18 <sup>(2)</sup>	1,28

Die Zelllinien wurden 72 h nach Transfektion mit den Expressionsvektoren pPGKCrebpa und pPGK $\gamma\delta^{E102Y,E124QNLS}$  über Southern Blot Analysen auf Rekombinationsereignisse hin untersucht. Der Anteil der detektierten Produktbanden an der Gesamt-DNA wurde mit Hilfe des Phosphoimagers ermittelt und auf die Transfektionseffizienz normiert. Die in Klammern angegebenen, hochgestellten Zahlen geben die Anzahl der auswertbaren Experimente an. Experimente, die aufgrund der Qualität der Southern Blot Analysen bzw. aufgrund der zu geringen Bandenintensität nicht auswertbar waren, sind mit n.d. gekennzeichnet.

In den Analysen hat sich gezeigt, daß  $\gamma\delta^{E102Y,E124QNLS}$  auf genomischen DNA-Substraten mit einer Effizienz von ca. 2-3% rekombinieren kann, während die Rekombination durch Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase fast nicht mehr nachweisbar war. Da diese Effizienz mit derjenigen vergleichbar war, die die  $\gamma\delta$  Resolvase Doppelmutante auf episomalen *subI* x *subI* Substraten erreicht hat, kann das bedeuten, daß auch auf genomischen Substraten nur auf den *subsites* I rekombiniert wird, auch wenn komplette *res* Sequenzen vorhanden sind.

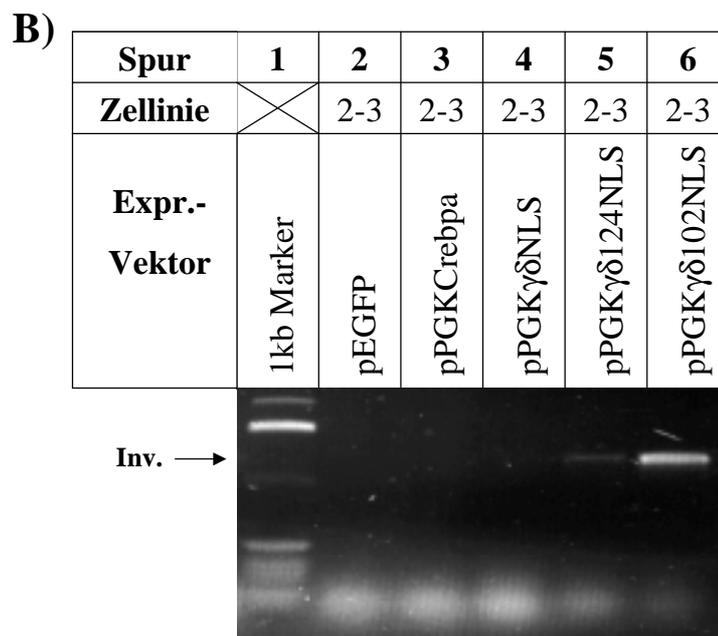
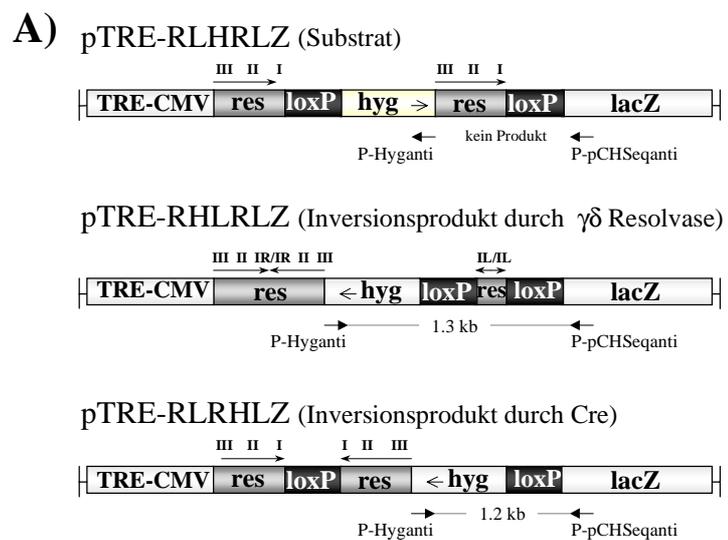
Unter diesen Umständen müßten die an den *subsites* I gebundenen Resolvase Dimere zufällig aufeinandertreffen (*random collision*) und einen einfachen synaptischen Komplex ohne Beteiligung der an den *subsites* II und III gebundenen Dimere bilden. In diesem Fall sollten auch Inversionsereignisse stattfinden. Um dies zu überprüfen, wurden 72 h nach Transfektion der Zelllinie 2-3 mit den Expressionsvektoren PCR-Analysen mit genomischer DNA für  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate durchgeführt. Unter Verwendung der Primer P-Hyganti und P-pCHSeqanti (siehe Abbildung 3.18 A) wurden

Analysen zur Detektion von Inversionsreaktionen durchgeführt. Die Primer sind so angeordnet, daß nur im Falle eines Inversionsereignisses ein ca. 1,3 kb großes Produkt amplifiziert werden kann. In Abbildung 3.18 B) ist eine solche PCR-Analyse dargestellt. Man kann erkennen, daß sowohl durch  $\gamma\delta^{E102Y,E124QNLS}$  als auch durch  $\gamma\delta^{E124QNLS}$  Inversionsreaktionen katalysiert worden sind (Spuren 5 und 6), nicht aber durch die Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase oder durch Cre (Spuren 3 und 4).

**Abbildung 3.18: PCR-Analyse zum Nachweis von Inversionsreaktionen durch  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate und Cre auf genomischen DNA-Substraten in CHO-AA8 Tet-Off Zellen.**

A) Schematische Darstellung des Substratvektors pTRE-RLHRLZ und der erwarteten Inversionsprodukte pTRE-RHLRLZ (durch  $\gamma\delta$  Resolvase) bzw. pTRE-RLRHLZ (durch Cre). Durch eine PCR mit den Primern P-Hyganti und P-pCHSeqanti kann unter Verwendung des Substrates kein Produkt amplifiziert werden. Eine Inversion durch  $\gamma\delta$  Resolvase würde zur Amplifikation eines ca. 1,3 kb großen Produktes führen; eine Inversion durch Cre zur Amplifikation eines ca. 1,2 kb großen Produktes.

B) Die Zelllinie 2-3 wurde mit Expressionsvektoren für  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate und Cre transfiziert. Nach 72 h wurde die genomische DNA auf Inversionsereignisse hin analysiert. In Spur 2 ist die DNA aus den Zellen, die mit pEGFP, in den Spuren 3-6 die DNA aus den Zellen, die mit den Expressionsvektoren für Cre bzw. die  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten transfiziert worden sind, aufgetragen. Der Pfeil markiert die Position des Inversionsproduktes nach Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase.



### 3.4.3.2 Einfluß der Transkriptionsaktivität auf die Rekombination durch $\gamma\delta$ Resolvase und Cre auf genomischen DNA-Substraten in CHO-AA8 Tet-Off Zellen

Der vor die Rekombinationskassette des DNA-Substrates geschaltete minimale CMV-Promotor ist durch ein Promotorelement (TRE) regulierbar. In Gegenwart von Doxycyclin wird die Transkription abgestellt, da spezifische Transaktivatormoleküle, die zur Aktivierung der Transkription essentiell sind, nicht mehr an die Tet-Operator Sequenzen des TRE binden können. Um einen möglichen Einfluß der Transkriptionsaktivität auf die Rekombination untersuchen zu können, wurden die Rekombinationseffizienzen von  $\gamma\delta$  Resolvase sowie Cre in An- und Abwesenheit von Doxycyclin untersucht. Zwei Wochen vor Beginn des Rekombinationsexperimentes wurde Doxycyclin (20 ng/ml) ins Nährmedium gegeben und bis zur Analyse beibehalten. Zur Ermittlung des tatsächlichen Einflusses von Doxycyclin auf die Transkription wurde das Medium für die rekombinierten Produkt-Zelllinien (2-3r und 3-5r) ebenfalls mit Doxycyclin versetzt. Nach zwei Wochen wurde die relative  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität dieser Zellen mit der Aktivität der Zellen, die nicht behandelt worden sind, verglichen. Es hat sich gezeigt, daß die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase durch die Anwesenheit von Doxycyclin um das 200- bis 300-fache gegenüber der Positivkontrolle reprimiert wurde, so daß der gemessene Wert nur noch um einen Faktor 3-5 über dem der Negativkontrolle lag. Die Rekombinationseffizienzen von den  $\gamma\delta$  Resolvase Derivaten und von Cre wurden in den transkriptionsaktiven und -inaktiven Zelllinien über Southern Blot Analysen ermittelt. Auch hier wurden die Werte auf die Transfektionseffizienz bezogen. Der Vergleich zeigte, daß eine veränderte Transkriptionsaktivität im Bereich der Rekombinationssequenzen keine Auswirkungen auf die durch Cre bzw. auf die durch  $\gamma\delta$  Resolvase katalysierte Rekombination hatte (Tabelle 3.5). Die Rekombinationseffizienzen waren in beiden Zuständen vergleichbar hoch.

Tabelle 3.5:

Rekombinationseffizienzen von  $\gamma\delta^{E102Y,E124QNLs}$  und Cre auf genomischen DNA-Substraten im transkriptionsaktivem und -inaktivem Zustand.

Zelllinie	Rekombination durch Cre (%)				Rekombination durch $\gamma\delta$ Resolvase (%)			
	- Doxycyclin		+ Doxycyclin		- Doxycyclin		+ Doxycyclin	
	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
<b>2-3</b>	66,82 <sup>(4)</sup>	15,72	74,19 <sup>(2)</sup>	19,30	1,96 <sup>(2)</sup>	1,65	2,47 <sup>(2)</sup>	0,73
<b>3-5</b>	74,96 <sup>(2)</sup>	12,73	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>3I-2</b>	42,30 <sup>(3)</sup>	22,49	39,06 <sup>(3)</sup>	39,78	2,24 <sup>(1)</sup>	-	1,27 <sup>(2)</sup>	0,78
<b>2I-2</b>	50,18 <sup>(1)</sup>	-	50,21 <sup>(1)</sup>	-	2,54 <sup>(1)</sup>	-	n.d.	n.d.
<b>2II-3</b>	83,80 <sup>(3)</sup>	42,64	76,16 <sup>(2)</sup>	43,86	2,18 <sup>(2)</sup>	1,28	2,33 <sup>(2)</sup>	0,06

Die Zelllinien wurden 14 Tage vor der Transfektion bis zur Analyse mit 20 ng/ml Doxycyclin behandelt oder blieben unbehandelt. Sie wurden 72 h nach der Transfektion mit den Expressionsvektoren pPGKCreba und pPGK $\gamma\delta$ 102NLS über Southern Blot Analysen auf Rekombinationsereignisse hin untersucht. Der Anteil der detektierten Produktbanden an der Gesamt-DNA wurde mit Hilfe des Phosphoimagers ermittelt und auf die Transfektionseffizienz normiert. Die in Klammern angegebenen, hochgestellten Zahlen geben die jeweilige Anzahl der auswertbaren Experimente an. Experimente, die aufgrund der Qualität der Southern Blot Analysen bzw. aufgrund der zu geringen Bandenintensität nicht ausgewertet werden konnten, sind mit n.d. gekennzeichnet.

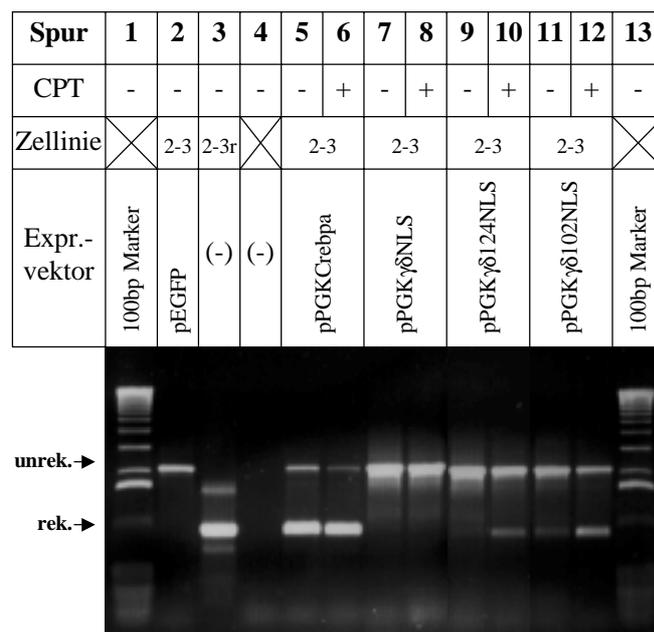
### 3.4.3.3 Einfluß von Topoisomerase Inhibitoren auf die Rekombinationseffizienzen von Cre und $\gamma\delta$ Resolvase auf genomischen DNA-Substraten in CHO-AA8 Tet-Off Zellen

In eukaryotischen Zellen gibt es zwei aufgrund ihres Reaktionsmechanismus divergierende Typen von Enzymen, die den topologischen Zustand der DNA kontrollieren; Typ I - Topoisomerasen und Typ II – Topoisomerasen (Wang, 1996). Da die Rekombination der Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase abhängig von der Topologie des Substrates ist, wurde die Rekombinationseffizienz in An- und Abwesenheit von Topoisomerase Inhibitoren untersucht. Hierzu wurden 24 h nach der Transfektion der Expressionsvektoren 50  $\mu$ M Camptothecin (CPT) ins Medium gegeben. CPT ist ein

spezifischer Topoisomerase I Inhibitor (Chris et al., 1997). Die Zellen wurden für 24 h unter diesen Bedingungen gehalten und nach weiteren 24 h ohne CPT-Behandlung analysiert. Es zeigte sich, daß die Substanz keinen großen Einfluß auf die Rekombinationseffizienzen von Cre und  $\gamma\delta$  Resolvase hatte. Die Messungen der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität ergaben in der Zelllinie 2-3 nur leicht erhöhte Werte in allen Transfektionsansätzen (außer mit pEGFP) nach CPT-Behandlung. In Tabelle 3.4 sind die Mittelwerte aus 3 separat durchgeführten Transfektionen (Duplettansätze) aufgeführt. Auch in PCR-Analysen, die analog zu den im Abschnitt 3.4.3.1 beschriebenen Untersuchungen durchgeführt worden waren, konnten in der Zelllinie 2-3 geringfügig prominentere Produktsignale nach CPT-Behandlung beobachtet werden (Abbildung 3.19; Spuren 6, 8, 10, 12).

**Abbildung 3.19: PCR-Analyse zum Nachweis der Deletion durch  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten auf genomischen DNA-Substraten in CHO-AA8 Tet-Off Zellen, mit und ohne CPT-Behandlung.**

Die Zelllinie 2-3 wurde nach Transfektion mit den jeweils angegebenen Expressionsvektoren für 24 h mit 50  $\mu$ M CPT behandelt (Spuren 6, 8, 10, 12). In den Spuren 5, 7, 9 und 11 sind die Ansätze der jeweils unbehandelten Zellen aufgetragen. Als Kontrollen wurden mit pEGFP transfizierte 2-3 Zellen (Spur 2) bzw. 2-3r Zellen (Spur 3) aufgetragen. Die PCR-Reaktionen wurden mit den Primern P-TREMCS und P-lacZanti2 durchgeführt. Die Pfeile markieren die rekombinierte bzw. nicht rekombinierte Produktbande.



In Southern Blot Analysen allerdings zeigte sich, daß der zuvor beobachtete Effekt so gering war, daß in den auswertbaren Experimenten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Rekombinationseffizienzen ohne CPT-Behandlung beobachtet werden konnten (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.6:

Vergleich der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität von 2-3 Zellen nach Transfektion mit Expressionsvektoren für Cre und  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate mit und ohne CPT-Behandlung

Zelllinie	Transfizierter Vektor	rel. $\beta$ -Gal Aktivität	rel. $\beta$ -Gal Aktivität	rel. $\beta$ -Gal Aktivität	rel. $\beta$ -Gal Aktivität
		(Mittelwert) - CPT	(Standardabweichung) - CPT	(Mittelwert) + CPT (50 $\mu$ M)	(Standardabweichung) + CPT (50 $\mu$ M)
2-3r	pEGFP	100,00%	-	100,00%	-
2-3	pEGFP	0,48%	0,37%	0,31%	0,22%
2-3	pPGKCrebpa	51,73%	22,29%	64,66%	12,18%
2-3	pPGK $\gamma\delta$ NLS	0,48%	0,36%	0,95%	1,01%
2-3	pPGK $\gamma\delta$ 124NLS	0,55%	0,24%	1,18%	0,06%
2-3	PPGK $\gamma\delta$ 102NLS	1,80%	0,75%	3,38%	1,83%

Tabelle 3.7:

Rekombinationseffizienzen von  $\gamma\delta^{E102Y,E124Q/NLS}$  und Cre auf genomischen DNA-Substraten mit und ohne CPT-Behandlung.

Zelllinie	Rekombination durch Cre (%)				Rekombination durch $\gamma\delta$ Resolvase (%)			
	- Camptothecin		+ Camptothecin		- Camptothecin		+ Camptothecin	
	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
<b>2-3</b>	66,82 <sup>(4)</sup>	15,72	60,38 <sup>(1)</sup>	-	1,96 <sup>(2)</sup>	1,65	n.d.	n.d.
<b>3-5</b>	74,96 <sup>(2)</sup>	12,73	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.		
<b>3I-2</b>	42,30 <sup>(3)</sup>	22,49	82,35 <sup>(1)</sup>	-	2,24 <sup>(1)</sup>	-	n.d.	n.d.
<b>2I-2</b>	50,18 <sup>(1)</sup>	-	85,46 <sup>(2)</sup>	9,60	2,54 <sup>(1)</sup>	-	1,70 <sup>(1)</sup>	-
<b>2II-3</b>	83,80 <sup>(3)</sup>	42,64	63,52 <sup>(2)</sup>	0,11	2,18 <sup>(2)</sup>	1,28	n.d.	n.d.

Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit den Expressionsvektoren pPGKCrebpa bzw. pPGK $\gamma\delta$ 102NLS für 24 h mit Camptothecin (50  $\mu$ M) behandelt oder blieben unbehandelt. Sie wurden 72 h nach der Transfektion über Southern Blot Analysen auf Rekombinationsereignisse hin untersucht. Der Anteil der detektierten Produktbanden an der Gesamt-DNA wurde mit Hilfe des Phosphoimagers ermittelt und auf die Transfektionseffizienz normiert. Die in Klammern angegebenen, hochgestellten Zahlen geben die Anzahl der auswertbaren Experimente an. Experimente, die aufgrund der Qualität der Southern Blot Analysen bzw. aufgrund der zu geringen Bandenintensität nicht auswertbar waren, sind mit n.d. gekennzeichnet.

Auch eine längere Exposition der Zellen mit CPT führte zu keiner Veränderung des Rekombinationslevels. Hierbei wurden den Zellen 24 h vor der Transfektion 10  $\mu$ M CPT zugesetzt. Bis zur Analyse, die 72 h nach der Transfektion stattfand, wurde die

CPT-Menge im Medium beibehalten. Aufgrund der Cytotoxizität lag die Überlebensrate der Zellen in den Experimenten bei nur ca. 20%, so daß höhere CPT-Konzentrationen nicht eingesetzt werden konnten.

Mit dem Flavonoid EMD 50689 wurde eine weitere Substanz getestet, die neben Typ I DNA-Topoisomerasen auch die des Typs II inhibiert (Boege et al., 1996). In diesem Experiment wurde der Inhibitor 24 h nach der Transfektion ins Medium gegeben (100  $\mu$ M) und nach 24 h Inkubationszeit wieder entfernt. Bei der nach weiteren 24 h stattfindenden Analyse der Zellen durch Messung der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität konnte erneut kein Effekt auf die Rekombinationseffizienzen von Cre und  $\gamma\delta$  Resolvase festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Auch eine kombinierte Behandlung der Zellen mit CPT und EMD 50689 zeigte keine signifikante Wirkung auf die Rekombinationseffizienzen (Daten nicht gezeigt).

#### **3.4.3.4 Einfluß von Histon-Deacetylase Inhibitoren auf die Rekombinationseffizienzen von $\gamma\delta$ Resolvase und Cre auf genomischen DNA-Substraten in CHO-AA8 Tet-Off Zellen**

Das eukaryotische Genom liegt im Zellkern nicht als langgezogener, unverpackter DNA-Doppelstrang vor, sondern ist durch Histonproteine in Form des hochorganisierten Chromatins verpackt. Während der Transkription wird die Struktur aufgelockert, so daß die DNA für DNA-bindende Proteine zugänglicher wird und die RNA-Polymerase entlang der DNA wandern und diese transkribieren kann. Hierbei werden Lysinreste einiger Histonproteine acetyliert. Umgekehrt führt eine Deacetylierung der Lysinreste wieder zu einer Komprimierung der Nukleosomenstruktur. Um dies zu vermeiden und die Zugänglichkeit des genomischen DNA-Substrates für die  $\gamma\delta$  Resolvase bzw. Cre zu erhöhen, wurden Histon-Deacetylase Inhibitoren (Yoshida et al., 1995) eingesetzt. Die Anwesenheit eines solchen Inhibitors sollte in Folge der Hyperacetylierung der Histone

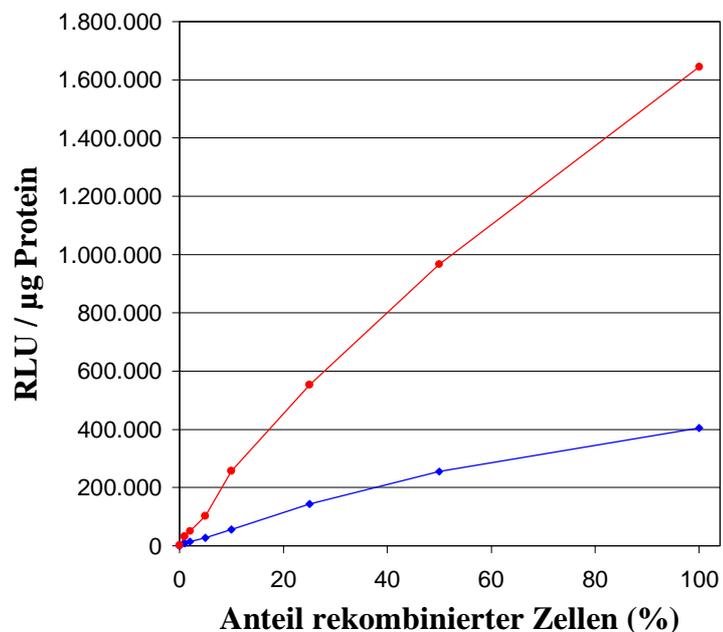
auch zu einer Erhöhung der Transkriptionsfrequenz führen (Garrison et al., 2000; Olsson et al., 1999; Bartsch et al., 1996).

Getestet wurden die Substanzen Trichostatin A (TSA) und Na-Butyrat, die jeweils 24 h nach der Transfektion des Expressionsvektors ins Medium gegeben wurden und für 24 h auf die Zellen einwirken konnten. Die Substanzen wurden durch Waschen der Zellen entfernt und nach weiteren 24 h wurden die Zellen analysiert. TSA, auch als antifungales Antibiotikum aus *Streptomyces hygroscopicus* bekannt, wurde in einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  (Chen & Townes, 1999) eingesetzt, während Butyrat in zwei verschiedenen Konzentrationen (500  $\mu\text{M}$ ; 7 mM, Cherry & Baltimore, 1999) getestet wurde.

Die Wirkung von TSA auf die Transkriptionsaktivität wurde durch einen Vergleich der gemessenen relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten der rekombinierten Zelllinien in An- und Abwesenheit dieser Substanz ermittelt. Hierbei konnte ein signifikanter Anstieg der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität um den Faktor vier in Anwesenheit von TSA gemessen werden (Abbildung 3.20).

**Abbildung 3.20: Einfluß der TSA-Behandlung auf die  $\beta$ -Galaktosidase Expression in 2-3r Zellen.**

Die Zelllinien 2-3 und 2-3r wurden für 24 h mit TSA (3  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und deren Gesamtproteingehalt bestimmt. Ausgehend von diesen Werten wurden die Lysate der beiden Zelllinien vermischt, so daß ein definierter prozentualer Anteil aus der rekombinierten Zelllinie stammte. Zuletzt wurden die relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten gemessen. Rote Punkte entsprechen den Daten der TSA-behandelten Zellen, blaue Punkte denen der unbehandelten Zellen.



Ein positiver Effekt auf die Rekombinationseffizienzen konnte jedoch durch Trichostatin A nicht beobachtet werden. In Southern Blot Analysen zeigte sich zwar in der Zelllinie 2I-2, daß die Rekombinationseffizienz der  $\gamma\delta$  Resolvase bei ca. 4,5% lag, jedoch handelte es sich hier nur um einen Einzelmeßwert (Tabelle 3.8). Weitere Experimente in dieser, aber auch in anderen Zelllinien konnten hingegen aufgrund der zu geringen Menge an Rekombinationsprodukt und der daraus resultierenden zu geringen Bandenintensität nicht ausgewertet werden. Bei der Cre katalysierten Rekombination zeigten sich ebenfalls einige Differenzen bezüglich der Effizienzen mit und ohne TSA-Behandlung. Diese waren aber zumeist in der geringen Anzahl der Experimente begründet. Eine Betrachtung der parallel durchgeführten Einzelexperimente ergab, daß in Experimenten mit hohen Rekombinationseffizienzen nach TSA-Behandlung auch hohe Effizienzen in den unbehandelten Zellen erreicht worden sind.

Tabelle 3.8:

Rekombinationseffizienzen von  $\gamma\delta^{E102Y,E124Q/NLS}$  und Cre auf genomischen DNA-Substraten mit und ohne TSA-Behandlung.

Zelllinie	Rekombination durch Cre (%)				Rekombination durch $\gamma\delta$ Resolvase (%)			
	- Trichostatin A		+ Trichostatin A		- Trichostatin A		+ Trichostatin A	
	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.	Mittelwert	Stabw.
<b>2-3</b>	66,82 <sup>(4)</sup>	15,72	90,27 <sup>(2)</sup>	1,06	1,96 <sup>(2)</sup>	1,65	n.d.	n.d.
<b>3-5</b>	74,96 <sup>(2)</sup>	12,73	67,40 <sup>(1)</sup>	-	n.d.	n.d.		
<b>3I-2</b>	42,30 <sup>(3)</sup>	22,49	65,01 <sup>(1)</sup>	-	2,24 <sup>(1)</sup>	-	n.d.	n.d.
<b>2I-2</b>	50,18 <sup>(1)</sup>	-	74,48 <sup>(2)</sup>	7,59	2,54 <sup>(1)</sup>	-	4,49 <sup>(1)</sup>	-
<b>2II-3</b>	83,80 <sup>(3)</sup>	42,64	58,78 <sup>(1)</sup>	-	2,18 <sup>(2)</sup>	1,28	n.d.	n.d.

Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit den Expressionsvektoren pPGKCreba bzw. pPGK $\gamma\delta$ 102NLS für 24 h mit Trichostatin A (3  $\mu$ M) behandelt oder blieben unbehandelt. Sie wurden 72 h nach der Transfektion über Southern Blot Analysen auf Rekombinationsereignisse hin untersucht. Der Anteil der detektierten Produktbanden an der Gesamt-DNA wurde mit Hilfe des Phosphoimagers ermittelt und auf die Transfektionseffizienz normiert. Die in Klammern angegebenen, hochgestellten Zahlen geben die Anzahl der auswertbaren Experimente an. Experimente, die aufgrund der Qualität der Southern Blot Analysen bzw. aufgrund der zu geringen Bandenintensität nicht auswertbar waren, sind mit n.d. gekennzeichnet.

Mit Na-Butyrat wurden nur Zellen der Zelllinie 2-3 behandelt. Es wurden zwei Experimente mit 7 mM und ein Experiment mit 500  $\mu$ M Na-Butyrat, analog zu den TSA-Behandlungen durchgeführt. Messungen der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität ergaben gleiche Resultate wie in den unbehandelten Zellen. Auch auf die Transkription hatte Na-Butyrat keinen Einfluß (Daten nicht gezeigt). Southern Blot Analysen wurden nicht durchgeführt.

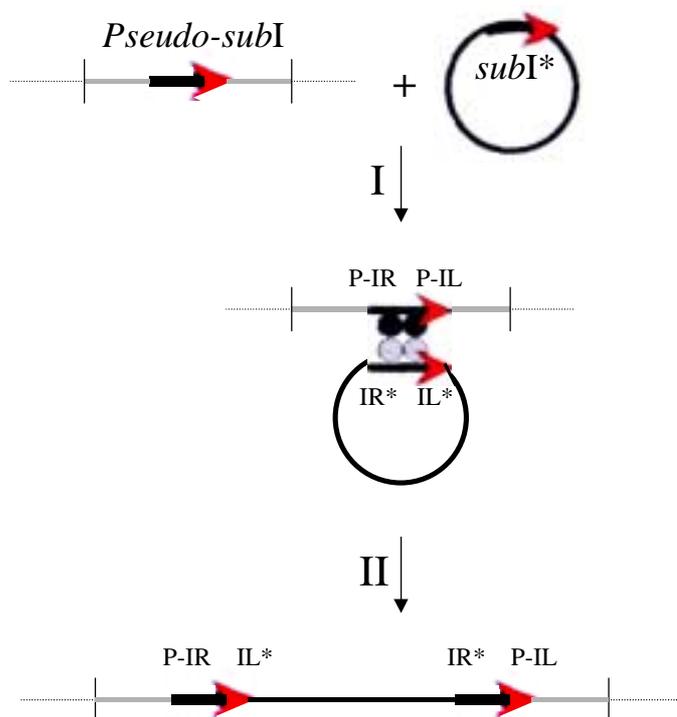
Eine Simultanbehandlung der Zellen mit den Substanzen Doxycyclin, CPT und TSA führte zu Ergebnissen, wie sie auch nach einer Behandlung mit CPT alleine gemessen werden konnten (Daten nicht gezeigt).

### ***3.5 Subsite I homologe Sequenzen im menschlichen Genom***

Episomale Substrate mit isolierten *subsites* I können durch die  $\gamma\delta$  Resolvase Doppelmutante  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNL5}}$  in CHO-Zellen mit einer Effizienz von ca. 15-20%, bezogen auf die Positivkontrolle, rekombiniert werden. Die Rekombinationsanalysen auf genomischen Substraten deuten darauf hin, daß auch hier vermutlich nur auf den *subsites* I und nicht auf den kompletten *res* Sequenzen rekombiniert wird.

Eine wichtige Technik zur Erforschung der Funktion von Genen stellt die gezielte Integration einer bestimmten DNA in einen definierten genomischen Lokus dar. Da  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124Q}}$  auch intermolekulare Rekombinationsreaktionen katalysieren kann (Arnold et al., 1999; Boocock, pers. Mitteilung), sollte eine gezielte Integration einer DNA ins Genom auch mit Hilfe des  $\gamma\delta$  Resolvase/*res* Systemes durchführbar sein. Hierfür benötigt man zunächst ein Substratplasmid mit einer einzelnen *res* bzw. *subsite* I Sequenz und der zu integrierenden DNA-Sequenz. Als Zielsequenz könnte z.B. die *res* Sequenz in der rekombinierten Zelllinie 2-3r verwendet werden, möglicherweise existieren aber auch natürlich vorkommende, *subsite* I homologe Sequenzen (Pseudo-*subsite* I), die als Ziel-DNA verwendet werden können. Sollte der *overlap*-Bereich einer solchen Pseudo-*subsite* I von der Wildtyp *overlap*-Region abweichen, müßte die im

Plasmid eingesetzte *res* bzw. *subsite* I ebenfalls modifiziert werden, so daß korrekte Basenpaarungen für die Religation eingegangen werden können. Ein zufälliges Aufeinandertreffen der an den *subsites* I gebundenen Resolvase Dimere würde zur Bildung eines einfachen synaptischen Komplexes führen. Schließlich könnte die Plasmid-DNA durch eine intermolekulare Rekombinationsreaktion in die spezifische Zielsequenz im Genom integriert werden (Abbildung 3.21).



**Abbildung 3.21: Gezielte Integration eines DNA-Moleküls ins Genom durch  $\gamma\delta$  Resolvase.**

Ein DNA-Plasmid mit einer *subsite* I Sequenz (*subI\**) kann durch eine  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124Q/NLS}}$  katalysierte, intermolekulare Rekombinationsreaktion gezielt in einen Locus des Genoms, der eine Pseudo-*subsite* I (*Pseudo-subI*) enthält, integriert werden. Hierbei muß der *overlap*-Bereich der *subsite* I dem der Pseudo-*subsite* I angepaßt sein. Durch zufälliges Aufeinandertreffen der an den *subsites* I gebundenen Resolvase Dimere entsteht ein einfacher synaptischer Komplex (I). Schließlich katalysiert die  $\gamma\delta$  Resolvase Doppelmutante eine intermolekulare Rekombination zwischen genomischer und Plasmid-DNA, so daß diese zwischen den *subsite* I Sequenzen integriert wird (II). Die Resolvase-Bindungsregionen der Pseudo-*subsite* I sind als P-IR und P-IL, die der Plasmid-*subsite* I als IL\* und IL\* bezeichnet.

Um zu überprüfen, ob Pseudo-*subsite* I Sequenzen existieren, wurde eine EMBL-Datenbanksuche nach einer humanen, zur *subsite* I homologen DNA-Sequenz durchgeführt. Ausgehend von der Consensus-Sequenz (Wells & Grindley, 1984) und den Analysen von Rimphanitchayakit und Grindley (1990) wurde nach folgender Sequenz gesucht:

5' T G T N C G N N A N N N N N N N N N N T N N C G N A C A 3'

Insgesamt wurden 404 homologe Sequenzen mit mindestens 2 Nukleotidabweichungen gefunden. Alle Sequenzen wurden auf Übereinstimmung mit der Consensus-Sequenz für die Resolvase Bindungsstellen (TGTCYNNTA; Wells & Grindley, 1984; Falvey & Grindley, 1987) und den Nukleotidsequenzen der *subsites* I, II und III, unter der Voraussetzung, daß auch die palindromischen Kombinationsmöglichkeiten funktionell sind, überprüft. Abweichungen innerhalb der Rekombinase-Bindungsstellen wurden mit den von Rimphanitchayakit und Grindley analysierten mutierten Sequenzen verglichen, um sie bezüglich ihrer Auswirkungen auf die Bindungsaffinität der  $\gamma\delta$  Resolvase einordnen zu können. Daraufhin wurden zwei Sequenzen mit den potentiell unbedeutendsten Abweichungen innerhalb der *subsite* I ausgewählt. Hierbei handelte es sich einerseits um ein Intron des TMP21-Gens auf Chromosom 14 (Genbank Accession Number AC007055) und andererseits um einen nicht exprimierten Sequenzbereich des Chromosoms 20 (Genbank Accession Number HS850H21). Die entsprechenden Nukleotidsequenzen sind in Abbildung 3.22 aufgeführt.

Mit genomischer DNA aus HeLa-Zellen als Matrize wurde durch PCR-Analysen überprüft, ob die gefundenen Sequenzen tatsächlich im menschlichen Genom vorkommen. Mit den Primern P-TMP21-1 und P-TMP21-anti1 bzw. P-SubhCh20-1 und P-SubhCh20-1anti konnten beide Sequenzen amplifiziert und sequenziert werden (Daten nicht gezeigt).

### **3.6.1 Funktionalität der zur *subsite* I homologen Nukleotidsequenz**

#### **TGTCAGATAGCTCCTTCTTTGTCGGACA**

Die Sequenz TGTCAGATAGCTCCTTCTTTGTCGGACA (*subI<sub>h</sub>*) aus dem TMP-21 Gen auf Chromosom 14 wurde in den Substratvektor pCH-RNRZ inkloniert, wobei die zum Promotor proximale *res* Sequenz durch die angegebenen Nukleotide substituiert wurde. Zudem wurde der *overlap*-Bereich der distalen *res* Sequenz von AT nach CT mutiert,



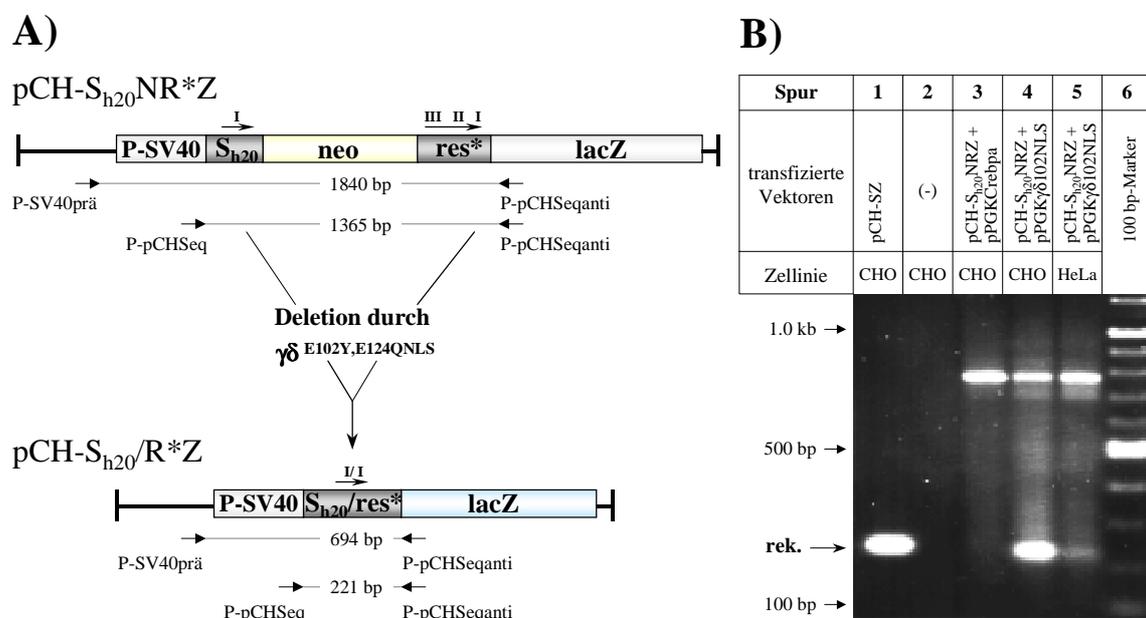
um ihn dem der Pseudo-*subsite I* Sequenz anzupassen und so die Religation zu ermöglichen. Das entstandene Plasmid pCH-S<sub>h</sub>NR\*Z wurde zusammen mit dem Expressionsvektor pPGK $\gamma\delta$ 102NLS in HeLa- und in CHO-Zellen co-transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und analysiert.

Messungen der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität ergaben keinen Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle, in der anstelle von pPGK $\gamma\delta$ 102NLS der Expressionsvektor pPGKCrebpa verwendet wurde. Auch in PCR-Analysen konnte unter Verwendung der Primer P-SV40prä und P-lacZanti2 bzw. P-pCHSeq und P-pCHSeqanti kein Rekombinationsprodukt amplifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

### **3.6.2 Funktionalität der zur *subsite I* homologen Nukleotidsequenz TGTCCTATAACTATCCAATTAACGCACA**

Analog zum oben beschriebenen Vektor pCH-S<sub>h</sub>NR\*Z wurde das Substratplasmid pCH-S<sub>h20</sub>NR\*Z konstruiert. Anstelle der zum Promotor proximalen *res* Sequenz wurde die Nukleotidfolge TGTCCTATAACTATCCAATTAACGCACA (*subI<sub>h20</sub>*) in den Vektor eingefügt. In der zweiten *res* Sequenz wurde wiederum der *overlap*-Bereich modifiziert, hier von AT nach TC. Das Substratmolekül wurde zusammen mit pPGK $\gamma\delta$ 102NLS in HeLa- sowie CHO-Zellen transfiziert. Nach 48 h wurde die DNA isoliert und über PCR analysiert. In einer ersten PCR wurde in beiden Zelllinien unter Verwendung der Primer P-SV40prä und P-pCHSeqanti eine nur äußerst leicht angedeutete, ca. 700 bp große Bande als Deletionsprodukt sichtbar. Dieses potentielle Produkt wurde aus dem Agarosegel isoliert und als Template für eine nachfolgende Nested-PCR eingesetzt. Ein PCR-Ansatz aus Zellen, die mit pCH-S<sub>h20</sub>NR\*Z und pPGKCrebpa co-transfiziert worden waren, wurde ebenfalls über das Agarosegel aufgetrennt. Da hier keine Bande dieser Größe zu erkennen war, wurde ein entsprechendes Gelfragment blind, aber großflächig herausgeschnitten. Auch hier wurde eine DNA-Extraktion durchgeführt, so daß das Eluat als Matrize für die

Negativkontrolle eingesetzt werden konnte. Die Nested-PCR wurde unter Verwendung der Oligonukleotide P-pCHSeq und P-pCHSeqanti durchgeführt. Das Resultat dieser Amplifikation ist in Abbildung 3.23 dargestellt. Sowohl aus HeLa- als auch aus CHO-Zellen konnte ein Deletionsprodukt nachgewiesen werden (Spuren 4 und 5). Die ca. 220 bp großen PCR-Produkte wurden aus dem Agarosegel eluiert und sequenziert. Die ermittelte DNA-Sequenz entsprach der Sequenz des erwarteten Rekombinationsproduktes. In der Negativkontrolle wurde hingegen nur ein PCR-Artefakt sichtbar, das in den übrigen Ansätzen ebenfalls amplifiziert worden war.



**Abbildung 3.23: Funktionalitätsnachweis des Substratplasmides pCH-S<sub>h20</sub><sup>NR\*Z</sup> in eukaryotischen Zellen durch Nested-PCR.**

A) Substratplasmid pCH-S<sub>h20</sub><sup>NR\*Z</sup> mit der zur *subsite* I homologen Sequenz S<sub>h20</sub> aus Chromosom 20 und einer im *overlap*-Bereich modifizierten *res* Sequenz (res\*). Das Rekombinationsprodukt besitzt eine Hybridsequenz, bestehend aus einer Hälfte von S<sub>h20</sub>, der modifizierten *overlap*-Region und der anderen Hälfte der Wildtyp *subsite* I Sequenz. Die Position der in den PCR-Analysen verwendeten Primer ist durch Pfeile markiert. B) Es wurden Co-Transfektionen von pCH-S<sub>h20</sub><sup>NR\*Z</sup> zusammen mit pPGK $\gamma\delta$ 102NLS bzw. pPGKCrebpa in CHO- und HeLa-Zellen durchgeführt. Nach 24 h wurde die DNA aus den Zellen isoliert und über Nested-PCR analysiert. In Spur 1 wurde das Rekombinationsprodukt pCH-SZ als Positivkontrolle in CHO-Zellen transfiziert. In Spur zwei wurde genomische DNA aus Mock transfizierten CHO-Zellen als Template eingesetzt, in Spur 3 das Substrat zusammen mit einem Expressionsvektor für Cre. Die Spuren 4 und 5 zeigen die Rekombinationsansätze aus CHO- bzw. HeLa-Zellen. Die Position des Produktamplifikates ist durch einen Pfeil markiert.

Das Ergebnis zeigt, daß die humane, auf dem Chromosom 20 lokalisierte, zur *subsite I* homologe Nukleotidsequenz TGCCTATAACTATCCAATTAACGCACA zusammen mit einer kompletten, im *overlap*-Bereich modifizierten *res* Sequenz sowie der  $\gamma\delta$  Resolvase Doppelmutante grundsätzlich funktional ist.

## IV. DISKUSSION

In dieser Arbeit konnten Rekombinationsereignisse durch die  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten  $\gamma\delta^{E124Q}$  (Arnold et al., 1999) und  $\gamma\delta^{E102Y,E124Q}$  sowie durch deren NLS-tragenden Derivate in Säugetierzellen nachgewiesen werden. In transienten Co-Transfektionsexperimenten konnte über Reporteragen-Analysen gezeigt werden, daß diese Varianten der  $\gamma\delta$  Resolvase hoch effizient auf episomalen Standardsubstraten rekombinieren können, während die Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase weitestgehend inaktiv ist. Die Rekombinationseffizienz der Doppelmutante war in CHO-Zellen mit der von Cre vergleichbar. Die Topologie der Substrate war für die Rekombination unbedeutend; linearisierte DNA-Substrate konnten mit gleicher Effizienz rekombiniert werden wie superhelical gespannte. Darüberhinaus konnte  $\gamma\delta^{E102Y,E124Q}$  auch Substrate mit isolierten *subsites* I umsetzen, wenn gleich die Rekombination durch das Fehlen der akzessorischen *subsites* II und III stark limitiert war.

Auf genomischen Substraten hingegen besaß nur die Doppelmutante der  $\gamma\delta$  Resolvase eine quantitativ auswertbare Rekombinationsaktivität. Weder durch eine Inhibition der Topoisomerasen des Typs I und II, noch durch eine Hemmung der Histon-Deacetylasen konnte die Rekombination stimuliert werden. Es zeigte sich zudem, daß auch der Transkriptionsstatus keinen Effekt auf die  $\gamma\delta$  Resolvase katalysierte Rekombination hatte. Diese Ergebnisse konnten auf allen getesteten genomischen Substraten beobachtet werden. Desweiteren konnten sowohl auf genomischen als auch auf episomalen Substraten neben den regulär durch die  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten katalysierten Deletionen auch Inversionsereignisse detektiert werden.

Im Vergleich zu den  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten war Cre in der Lage, episomale und genomische DNA-Substrate mit vergleichbarer Effizienz zu rekombinieren. Auch hier wurde die Rekombination weder durch die Transkription, noch durch die Inhibition der Topoisomerasen bzw. Histon-Deacetylasen beeinflusst.

Schließlich wurde eine humane DNA-Sequenz auf dem Chromosom 20 entdeckt, die zur *subsite* I von *res* homolog und in Verbindung mit einer in der *overlap*-Region modifizierten *res* Sequenz sowie  $\gamma\delta^{\text{E102Y.E124Q-NLS}}$  funktional ist.

#### **4.1 Die $\gamma\delta$ Resolvase Mutanten sind rekombinationsaktiv**

Analog zu den publizierten Tn3 Mutanten (Arnold et al., 1999) wurden  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten hergestellt. Zu diesem Zeitpunkt lagen noch keine *in vivo* Daten über deren Rekombinationsaktivität in *E. coli* vor. Auch *in vitro* wurde bis dahin nur die Mutante  $\gamma\delta^{\text{E124Q}}$  charakterisiert (Arnold et al., 1999). Um die Funktionalität dieser Derivate zu testen, wurden sie in prokaryotische Expressionsvektoren kloniert und in *E. coli* transformiert. Auf diesem Weg sollte auch ein möglicher negativer Einfluß einer C-terminal angehängten NLS (Kalderon et al., 1993) auf die Rekombinationskompetenz der Resolvase Derivate ausgeschlossen werden. Durch eine Blau/Weiss-Selektion konnte gezeigt werden, daß ein in diese Bakterien transformiertes Substratplasmid in den meisten Kolonien rekombiniert worden war. Stichprobenhafte Restriktionsanalysen ergaben, daß in den Bakterienklonen, in denen aufgrund der Färbung Rekombination stattgefunden hat, tatsächlich nur noch Deletionsprodukte nachzuweisen waren. Inversionsprodukte konnten nicht detektiert werden (Abbildung 3.1).

Durch die Analysen konnte gezeigt werden, daß die nach 14 h gemessene Rekombinationseffizienz auf Resolvase-Standardsubstraten in *E. coli* nicht negativ durch die Aminosäuresubstitutionen beeinflusst wurde. Auch die sieben Aminosäuren der C-terminal positionierten NLS wirkten sich nicht störend auf die Rekombination aus und behinderten offensichtlich weder die Bildung des Resolvosoms noch die des Synptosoms.

## ***4.2 $\gamma\delta$ Resolvase wird in eukaryotischen Zelllinien exprimiert***

Um das sequenz-spezifische, prokaryotische Rekombinationssystem der  $\gamma\delta$  Resolvase in Zellen höherer Organismen untersuchen bzw. anwenden zu können, mußte zunächst die Expression der Resolvase in diversen eukaryotischen Zelllinien nachgewiesen werden. Der Cre exprimierende, eukaryotische Expressionsvektor pPGKCrebpa (Fellenberg, 1998) wurde verwendet, um analoge  $\gamma\delta$  Resolvase exprimierende Vektoren herzustellen. Der hier verwendete Promotor des Phosphoglycerat-Kinase I Gens (Adra et al., 1987) erlaubt in Säugetierzellen eine starke Expression des dahinter geschalteten Gens. Stromabwärts des Resolvase-Gens wurde die Polyadenylierungssequenz des Rinder-Wachstumshormons (Pfarr et al., 1986) lokalisiert, die die notwendige Modifizierung der mRNA gewährleistet. Von allen verwendeten Resolvase-Genen wurden auch Derivate mit C-terminaler NLS (Kalderon et al., 1993) hergestellt, um den Transport des Proteins in den Zellkern zu gewährleisten. Diese nukleare Lokalisationssequenz wurde auch in pPGKCrebpa verwendet, hier allerdings am N-Terminus des Enzyms (Abbildung 3.2). Zusätzlich wurden Expressionsvektoren mit dem ebenfalls in Eukaryoten stark exprimierenden CMV-Promotor (Boshart et al., 1985) hergestellt.

In Western Blot Analysen konnte die Expression aller verwendeten  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate nachgewiesen werden (Abbildung 3.3). Überraschenderweise konnten durch NLS-tragende Varianten wesentlich stärkere Signale beobachtet werden als durch diejenigen ohne NLS. Da alle Derivate in den selben Vektorhintergrund kloniert wurden, sollte sich deren Expression nicht unterscheiden. Eine Erklärung für die signifikant unterschiedlich starken Signale könnte aber darin liegen, daß die Resolvasen mit NLS stärker vor proteolytischem Abbau geschützt sind; möglicherweise deshalb, weil sie schneller in den Zellkern transportiert werden, wo andere Bedingungen herrschen als im Cytoplasma. Aufgrund der sieben zusätzlichen Aminosäuren liefen NLS-tragende Resolvase Moleküle langsamer durch das denaturierende Polyacrylamidgel, so daß die Banden an einer geringfügig höheren Position auftauchten. Die Aminosäureaustausche E102Y bzw. E124Q haben die Expression der jeweiligen  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate nicht beeinflusst. Das Ergebnis konnte sowohl in CHO- als auch in

HeLa- und NIH3T3-Zellen bestätigt werden. Nach Transfektion der Expressionsvektoren mit CMV-Promotor konnten Banden beobachtet werden, die sich in ihrer Intensität nicht von den hier gezeigten unterschieden. Das deutet darauf hin, daß die beiden hier getesteten Promotoren eine in etwa gleich starke Expression gewährleisten.

Die Rekombinationseffizienz auf genomischen Substraten war sehr gering, daher mußte als Ursache auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß die lokale Konzentration der  $\gamma\delta$  Resolvase im Zellkern zu gering war. Über indirekte Immunfluoreszenzfärbungen sollte versucht werden, die exprimierte Resolvase zu lokalisieren, was aber aufgrund der Unspezifität der Anti- $\gamma\delta$  Resolvase-Antikörper, die auch schon im Western Blot zum Ausdruck kam, nicht gelang. Da aber in Co-Transfektionsexperimenten eine große Anzahl von Expressionsvektoren und Substratplasmiden simultan in die Zelle transfiziert wurde, und die Resolvase nur im Zellkern exprimiert werden konnte, wie auch die erst nach der Rekombination der Substrate stattgefundene Expression der  $\beta$ -Galaktosidase nur im Nukleus stattfinden konnte, ist davon auszugehen, daß die zwischenzeitlich erfolgte Rekombination ebenfalls im Zellkern katalysiert wurde. Aufgrund der hier beobachteten Rekombinationseffizienzen muß man ebenfalls davon ausgehen, daß ein hoher Prozentsatz der in die Zelle gelangten DNA-Moleküle rekombiniert worden ist. Die Resolvase sollte demnach in relativ großen Mengen im Zellkern vertreten gewesen sein. Ein Anzeichen für eine erhöhte Präsenz der NLS-tragenden Resolvase Derivate im Zellkern ist die Beobachtung, daß die Varianten mit NLS im Allgemeinen höhere Rekombinationseffizienzen aufwiesen als die Derivate ohne NLS (Abbildung 3.5). Aufgrund ihrer geringen Größe (21 kD) sollten die Derivate ohne NLS aber auch problemlos durch die 9-10 nm großen Kernporen in den Nukleus diffundieren können (Dingwall & Laskey, 1992).

Über Signalsequenzen, die den aktiven Transport aus dem Zellkern katalysieren (NES = *Nuclear Export Signal*), ist weitaus weniger bekannt, jedoch konnten für bestimmte Aminosäuresequenzen Exportaktivitäten nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich vor allem um Leucin-reiche Sequenzen, die eine hydrophobe Oberfläche ausbilden

(Wen et al., 1995). Derartige Sequenzbereiche konnten im Resolvase Protein nicht gefunden werden.

### ***4.3 Episomale DNA-Substrate werden in eukaryotischen Zellen durch $\gamma\delta$ Resolvase Derivate rekombiniert***

In transienten Co-Transfektionsexperimenten wurden Expressionsvektoren für  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate zusammen mit Substratplasmiden in eukaryotische Zellen gebracht. Nach 72 h wurde die relative  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität dieser Zellen gemessen, bzw. eine X-Gal Färbung durchgeführt. Zellen mit nicht rekombinierten Substraten konnten ebenso wie Mock transfizierte Zellen keine  $\beta$ -Galaktosidase exprimieren, so daß deren gemessene  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten als Negativkontrollen fungierten. Als 100%-Werte wurden die gemessenen Aktivitäten der mit den rekombinierten Produktvektoren transfizierten Zellen herangezogen. Die Meßresultate der verschiedenen Rekombinationsansätze wurden auf den jeweiligen 100%-Wert bezogen, um so relative Aussagen bezüglich der Rekombinationseffizienzen treffen zu können.

Untersucht wurde die durch die verschiedenen  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate katalysierte Rekombination auf Standardsubstraten (*res x res*) sowie auf Substraten mit isolierten *subsites I* (*subI x subI*). Außerdem wurde die Rekombinationseffizienz der  $\gamma\delta$  Resolvase Doppelmutante  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNL5}}$  mit der von Cre verglichen. Hierzu wurde ein Substrat mit jeweils zwei in direkter Wiederholung angeordneten *res* und *loxP* Sequenzen verwendet. Ein solcher Vergleich wurde in verschiedenen Zelllinien und mit unterschiedlicher Substrat-Topologie durchgeführt. Mit Hilfe von PCR-Analysen wurde zusätzlich untersucht, ob durch die  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten auch Inversionsereignisse katalysiert worden sind.

### **4.3.1 Die Rekombinationseffizienzen der verschiedenen $\gamma\delta$ Resolvase Derivate deuten auf eine Relaxation der episomalen DNA-Substrate in eukaryotischen Zellen hin**

In transienten Co-Transfektionsexperimenten mit negativ superhelical gespannten *res x res* Substraten konnte gezeigt werden, daß die  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten in CHO-Zellen eine Rekombinationseffizienz von ca. 60%, bezogen auf die Positivkontrolle erreichten. Die gemessene relative  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität lag nach Rekombination durch die Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase nicht signifikant über der in den Negativkontrollen gemessenen. Mit NLS-tragenden Varianten konnten jeweils leicht erhöhte Werte gemessen werden (Abbildung 3.5). In zusätzlich durchgeführten X-Gal Färbungen konnten diese Ergebnisse reproduziert werden (Abbildung 3.6; Tabelle 3.1).

Da die Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase nur negativ superhelical gespannte DNA-Substrate rekombinieren kann (Reed, 1981; Krasnow & Cozzarelli, 1983), die Mutanten hingegen dadurch charakterisiert sind, daß sie auch topologisch relaxierte Substrate umsetzen können (Arnold et al., 1999; Boocock, pers. Mitteilung), ist eine Folgerung, daß die superhelical gespannten Substratplasmide nach Eintritt in die Zellen relaxiert worden sind. Dieser Prozeß kann einerseits durch Topoisomerasen katalysiert worden sein (Wang, 1996), andererseits kann dafür eine Nukleosomenformation um die Plasmid-DNA im Zellkern verantwortlich gemacht werden. Hierbei würde die negative Superhelicität durch die Windungen der DNA um die Histonproteine von einer plektonemischen zu einer tyroidalen transformiert werden. Um Anhaltspunkte hierfür zu finden, wurden Substratplasmide in die Zellen transfiziert, nach unterschiedlichen Zeitpunkten durch eine Hirt-Extraktion aus den Zellen re-isoliert und auf ein Agarosegel aufgetragen. Bereits nach wenigen Stunden konnte der größte Teil der DNA als Bande detektiert werden, die der Einheitslänge des linearisierten Plasmides entsprach. Für Nukleosomenformationen hingegen konnten in CHO-Zellen auch noch nach 72 h keine Anzeichen gefunden werden. Neben den topologischen Analysen spricht auch die Tatsache, daß schon vor der Transfektion *in vitro* linearisierte Plasmide

mit derselben Effizienz rekombiniert werden konnten, für eine topologische Relaxation der episomalen DNA-Vektoren in den Zellen (Abbildung 3.12).

Die Anwesenheit von negativ superhelicalen Überspiralisierungen der DNA-Substrate bildet für die Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung des korrekten synaptischen Komplexes (Wassermann & Cozzarelli, 1985; Benjamin & Cozzarelli, 1988). In diesem Fall werden nur Deletionsereignisse katalysiert. Über PCR-Analysen konnten aber auch durch  $\gamma\delta^{E102Y,E124Q/NLS}$  katalysierte Inversionsereignisse nachgewiesen werden (Abbildung 3.7); ein Substrat mit invertierten *res* Sequenzen konnte deletiert werden. Die Resolvase Doppelmutante war zudem in der Lage *subI* x *subI* Substrate in eukaryotischen Zellen zu rekombinieren, allerdings mit einer sehr geringen Effizienz (Abbildung 3.9). Auch hier konnten Deletions- und Inversionsereignisse detektiert werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den *in vitro* ermittelten Daten überein.

Zusammen sprechen die Resultate für die Hypothese, daß neben der regulären Synapsis auch ein simples Synaptosom durch zufälliges Aufeinandertreffen der an den *res* bzw. *subsite I* Sequenzen gebundenen Resolvase Dimere gebildet werden kann, das unabhängig von der Topologie der Substrate zur Rekombination durch  $\gamma\delta^{E102Y,E124Q}$  führen kann. Die Ergebnisse implizieren zudem eine topologische Relaxation der episomalen DNA-Plasmide in eukaryotischen Zellen. Die DNA scheint anschließend in diesem Zustand in den Zellen zu verweilen, zumindest über den Zeitraum der Transfektionsexperimente (72 h).

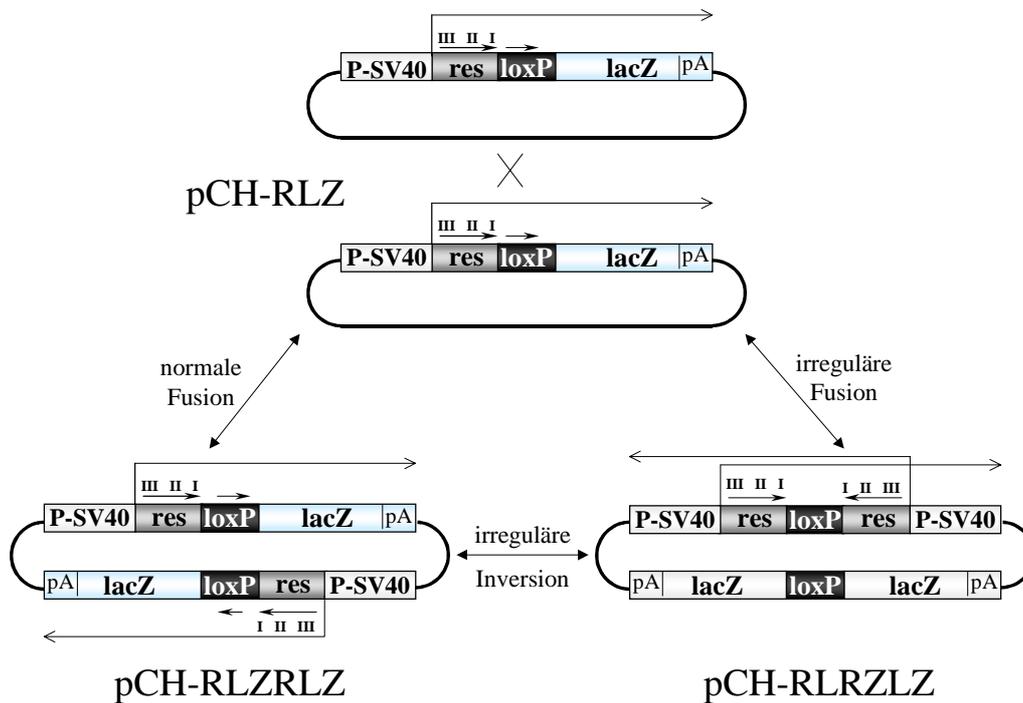
#### **4.3.2 Die Rekombinationseffizienzen von $\gamma\delta^{E102Y,E124Q/NLS}$ und Cre sind in CHO-Zellen auf episomalen Substraten vergleichbar**

Die Cre Rekombinase stellt ein weitverbreitetes Werkzeug zur Analyse der Relevanz bzw. Funktion von Genen in Tiermodellssystemen dar (Müller, 1999; Christ & Dröge, 2001). Um neben der ebenfalls oft verwendeten FLP-Rekombinase eine weitere

Alternative zu besitzen, sollte die Rekombinationseffizienz von Cre mit der von  $\gamma\delta^{E102Y,E124QNLS}$  verglichen werden. Dies wurde zunächst auf episomaler Basis durch transiente Co-Transfektionen von *res/loxP*-Substraten zusammen mit Expressionsvektoren für die Resolvase Mutante oder Cre durchgeführt. Hierbei zeigte sich, daß das Resolvase Derivat je nach Zelllinie ebenso hohe Rekombinationseffizienzen aufwies wie Cre. So wurden in CHO-Zellen jeweils über 60% des Substrates rekombiniert (Abbildung 3.11). In HeLa-Zellen hingegen war die Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase mit 20% weniger effizient, während Cre mit 90% eine noch höhere Rekombinationseffizienz erreichte als in CHO-Zellen.

Eine mögliche Ursache hierfür ist nicht bekannt. Durch Western Blot Analysen konnte allerdings ausgeschlossen werden, daß die Resolvase in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich stark exprimiert wurde. Untersuchungen zur Nukleosomenformation an der Plasmid-DNA wurden in HeLa-Zellen nicht durchgeführt. In früheren Arbeiten konnten allerdings Chromatinstrukturen an in CV-1, Cos-1, Ltk<sup>-</sup> und HeLa-Zellen transfizierten episomalen DNAs nachgewiesen werden (Cereghini & Yaniv, 1984; Jeong & Stein, 1994). Unter Umständen stellt eine Chromatinformation auf episomalen Substraten einen limitierenden Faktor für die  $\gamma\delta$  Resolvase katalysierte Rekombination dar. Möglicherweise existieren auch andere Faktoren bzw. Proteine, die sich je nach Zelllinie inhibierend oder stimulierend auf die Rekombination auswirken.

Als Positivkontrolle für die Cre vermittelte Rekombination wurde das Produkt pCH-RLZ zusammen mit pPGKCrebpa eingesetzt. Interessanterweise betrug die gemessene  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität hier nur 20-50% von dem Wert, der mit der anderen Positivkontrolle (pCH-RLZ + pPGK $\gamma\delta$ 102NLS) gemessenen wurde. Ein möglicher Erklärungsansatz besteht hier darin, daß sich die Cre Rekombinase durch Bindung an die *loxP* Sequenz störend auf die Transkription des lacZ-Gens auswirkt. Da der Effekt auf genomischer Ebene aber nicht zu beobachten war, ist die Beobachtung unter Umständen auch auf intermolekulare Rekombinationsereignisse zwischen den episomal vorliegenden Produktvektoren zurückzuführen. Dadurch könnte sich die Anzahl der  $\beta$ -Galaktosidase exprimierenden Vektoren reduzieren (Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1: Intermolekulare Rekombination durch Cre auf episomalen DNA-Substraten.**

Zwei episomale Plasmide mit jeweils einer *loxP* Sequenz (pCH-RLZ) können durch Cre fusioniert werden. Die Rekombination führt im Normalfall zu einem Produkt, in dem der SV40-Promotor, *res/loxP* und das *lacZ*-Gen in gleicher Orientierung vorliegen, also zu einer Duplikation des Vektors (pCH-RLZRLZ). Die Expression des *lacZ*-Gens wird durch diese Konfiguration nicht beeinflusst. Infolge einer irregulären Synapsis könnte durch die intermolekulare Rekombination möglicherweise auch ein Produkt entstehen, in dem das *lacZ*-Gen nicht mehr transkribiert werden kann (pCH-RLRZLZ). Dieses Produkt könnte auch infolge einer irregulären Inversion des Vektors pCH-RLZRLZ entstehen.

Insgesamt gesehen bietet das  $\gamma\delta^{E102Y,E124QNLS}/res$ -System eine gute Alternative zum Cre/*loxP*-System für die Rekombination episomaler DNA-Substrate in eukaryotischen Zellen. Eine mögliche Anwendung könnte ein solches System beispielsweise in einer zeitlich gesteuerten Modifikation diverser Vektoren *in vivo* finden, z.B. um replikationsaktivierende Sequenzen aus adenoviralen Vektoren zu deletieren. Eine weitere Anwendung wäre die kombinierte Anwendung beider Systeme. Eine temporär begrenzte Rekombination durch eine der beiden Rekombinasen könnte erreicht werden, indem man das Gen einer Rekombinase mit den Rekombinationssequenzen einer anderen flankiert. Zum gewünschten Zeitpunkt kann die Expression des zweiten

Rekombinationsenzymes z.B. durch einen induzierbaren Promotor angeschaltet werden, so daß das Gen für die erste Resolvase deletiert wird.

Durch  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124Q/NLS}}$  katalysierte Inversionsreaktionen, die sich in diesem Zusammenhang störend auswirken würden, können durch eine Modifikation der 2 bp *overlap*-Region unterbunden werden.

#### ***4.4 Sequenz-spezifische Rekombination auf genomischen DNA-Substraten***

In CHO-Zellen konnten die  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten  $\gamma\delta^{\text{E124Q}}$  und  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124Q}}$  episomale DNA-Substrate mit hoher Effizienz rekombinieren. Vergleichend dazu sollte auch die Situation auf genomischen Substraten untersucht werden. Hierzu wurden stabile Substrat-Zelllinien hergestellt, die eine oder mehrere Kopien des Substrates pTRE-RLHRLZ ins Genom integriert hatten. Als Ausgangszelllinie wurde die modifizierte CHO-AA8 Tet-Off Zelllinie von Clontech verwendet. Insgesamt wurden fünf Zelllinien zur Analyse herangezogen, so daß insgesamt mehr als 30 verschiedene Genloci auf Rekombinationsereignisse hin getestet werden konnten (Abbildung 3.14; Tabelle 3.2). Per Elektroporation wurden Expressionsvektoren für die  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate und Cre sowie für Int-h als Negativkontrolle in die Zellen transfiziert. Nach 72 h wurde die Rekombination durch Messung der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität, bzw. durch Analysen der genomischen DNA (PCR, Southern Blot) untersucht. Auf diesem Weg konnten vergleichende Analysen der durch  $\gamma\delta$  Resolvase und Cre vermittelten Rekombination innerhalb des selben Genlocus durchgeführt werden. Als Positivkontrolle fungierten Zelllinien, die *in vivo* durch Cre rekombiniert und anschließend subkloniert worden sind. Basierend auf den Vergleichen der Rekombinationseffizienzen auf episomalen und genomischen Substraten konnten Rückschlüsse auf die Chromatinstruktur und -dynamik gewonnen werden.

Die Experimente wurden auch im transkriptionsinaktiven Zustand durchgeführt. Unter Verwendung von Topoisomerase bzw. Histon-Deacetylase Inhibitoren sollte zudem der Einfluß dieser beiden Enzyme auf die Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase und Cre analysiert werden.

#### **4.4.1 Cre rekombiniert auf genomischen DNA-Substraten wesentlich effizienter als die $\gamma\delta$ Resolvase Mutanten**

Messungen der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität sowie quantitative Southern Blot Analysen haben ergeben, daß die Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase wie auch die Mutante  $\gamma\delta^{\text{E124QNLS}}$  so geringe Rekombinationseffizienzen auf genomischen DNA-Substraten aufwiesen, daß diese mit den genannten Methoden nicht quantifiziert werden konnten. Auch die  $\gamma\delta$  Resolvase Doppelmutante  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLS}}$  vermochte genomische DNA-Substrate nur mit einer maximalen Effizienz von ca. 2-5% zu rekombinieren. Die Experimente zeigten daß die NLS-tragenden Varianten besser rekombinieren konnten als die Derivate ohne NLS, was möglicherweise für eine vermehrte Präsenz im Zellkern spricht. Mit Cre hingegen konnten generell Rekombinationseffizienzen von >50% beobachtet werden (Abbildungen 3.16 und 3.17; Tabelle 3.3 und 3.4). Die Ergebnisse konnten in allen getesteten Substrat-Zelllinien reproduziert werden.

In den Positivkontrollen zeigte sich auf genomischen Substraten kein durch die exprimierte Rekombinase bedingter Unterschied bezüglich der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität.

Da sich in transienten Co-Transfektionsexperimenten gezeigt hatte, daß episomale Substrate in verschiedenen Zelllinien unterschiedlich gut rekombiniert werden konnten, mußte als mögliche Ursache für die niedrigen Rekombinationseffizienzen durch die  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten zunächst die verwendete Zelllinie sowie das Substrat selbst ausgeschlossen werden. Daher wurden mit der Ausgangszelllinie CHO-AA8 Tet-Off Co-

Transfektionsexperimente unter Verwendung der Substrate pTRE-RLHRLZ bzw. pCH-RLNRLZ durchgeführt. Cre vermochte die Substrate jeweils mit einer Effizienz von ca. 70-80% zu rekombinieren. Die Mutante  $\gamma\delta^{E102Y,E124QNL5}$  erreichte eine Effizienz von ca. 40%, bezogen auf die Positivkontrolle. Die Rekombinationseffizienz von Cre lag hier also im Rahmen der auf genomischen Substraten gemessenen Effizienz. Durch  $\gamma\delta^{E102Y,E124Q}$  hingegen konnten genomische Substrate nur um einen Faktor 10 bis 20 schlechter rekombiniert werden als episomale. Im Vergleich war Cre also in der Lage episomale Substrate in CHO-AA8 Tet-Off Zellen doppelt so gut zu rekombinieren wie  $\gamma\delta^{E102Y,E124Q}$ , genomische Substrate hingegen mit einer bis zu 40-fach höheren Effizienz (Abbildung 3.15).

#### **4.4.2 Die Chromatinstruktur verhindert die simultane Besetzung der *subsites I, II und III* und dadurch die Bildung eines regulären Synptosoms**

Einer der Hauptunterschiede zwischen prokaryotischer DNA und der DNA in eukaryotischen Zellen ist deren Verpackung. Bakterielle DNA ist nur mit wenigen Proteinen (z.B. HU-Proteine) besetzt und weist daher einen geringen Verpackungsgrad auf. In Zellen höherer Organismen liegt die DNA hingegen in Form des hochorganisierten Chromatins vor und ist dadurch stark kondensiert. Die DNA ist hier fest mit eng gebundenen Proteinen, den Histonen, aber auch mit chromosomalen Nicht-Histonproteinen assoziiert. Jeweils zwei der 4 Histone H2A, H2B, H3 und H4 bilden als Histon-Octamer ein Nukleosom, um das die DNA  $1\frac{3}{4}$ -mal gewunden ist. So wird ein Bereich von insgesamt 146 Nukleotiden abgedeckt. Zwei Nukleosomen werden jeweils durch einen 0-80 bp langen *linker*-DNA Bereich getrennt. Durchschnittlich liegen sie in Intervallen von ca. 200 bp auseinander. Durch Histone der Klasse H1 werden die Nukleosomen schließlich zu regelmäßigen Strukturen höherer Ordnung zusammengepackt. Obwohl der größte Teil der DNA in dieser Form verpackt ist,

existieren auch bestimmte Sequenzabschnitte, die nicht durch Nukleosomen besetzt sind. Erste Hinweise darauf gaben Experimente am SV40-Chromosom, das eine einzelne ca. 300 bp lange nukleosomenfreie Region besitzt, die den Startpunkt der viralen Replikation sowie der RNA-Synthese darstellt. Auch im Zellchromatin wurden solche Bereiche gefunden. Vermutlich repräsentieren sie Abschnitte, die durch sequenzspezifisch DNA-bindende Proteine besetzt sind, die an der Regulation von Genen beteiligt sind. Andererseits existieren Sequenzen, an denen Nukleosomen bevorzugt binden und besonders fest verankert sind. Beispielsweise im Bereich des Centromers liegen 15 präzise angeordnete Nukleosomen. Diese Bereiche sind vor allem durch AT-reiche Abschnitte der kleinen Furche charakterisiert, vermutlich weil durch solche Sequenzen eine Kompression der DNA, die zu deren Biegung um ein Histon-Octamer notwendig ist, erleichtert wird (aus Alberts et al., 1990; S. 586-594). Auch die TATA-Boxen sind sehr oft durch Nukleosomen verpackt (Grunstein, 1990).

Neben der Kondensierung der DNA wird auch ein weiterer Effekt erzielt; durch die Chromatinstruktur wird ein Überschuß von transkriptionsregulierenden Proteinen an Promotorregionen verhindert, was sich meist reprimierend auf die Transkription auswirkt, so daß die Zelle keinem unnötigen Energieverbrauch ausgesetzt wird (Paranjape et al., 1994). Die Transkription kann aber durch das sogenannte *Chromatin-Remodeling* reguliert werden. Hierbei wird die Chromosomenstruktur durch zwei konservierte Mechanismen verändert. Einerseits bewirkt das ATP-abhängige Chromosomen Remodeling eine Dynamik innerhalb des Chromatins (Armstrong & Emerson, 1998), andererseits können Histone post-translational durch den Acetylierungs-, Methylierungs und Phosphorylierungsstatus modifiziert werden, wodurch die Bindungseigenschaften der Moleküle an der DNA verändert werden (Davie, 1998). Einen noch größeren, allerdings auf die S-Phase der Mitose begrenzten Einfluß auf die Chromatinstruktur besitzt die Replikation der DNA. Während der Synthese der Tochterstränge muß die Doppelhelix vollständig entwunden werden. Sobald die Replikationsgabel ein Histonoctamer erreicht, wird der Nukleosomenkern in zwei Hälften getrennt, so daß die DNA-Polymerase die Tochterstränge synthetisieren kann. Erst danach falten sich die Histontetramere wieder zu einem Octamer zusammen.

Der neu entstandene DNA-Doppelstrang muß schließlich noch komplett mit neu synthetisierten Histon-Proteinen besetzt werden (aus Alberts et al., 1990; S. 609-620).

Auch aufgrund der in dieser Arbeit nachgewiesenen Rekombination läßt sich eine vorhandene Chromatindynamik belegen:

Rekombination kann auf genomischen Substraten sowohl durch Cre als auch durch  $\gamma\delta$  Resolvase katalysiert werden. Die äußeren Bindungsstellen der *subsite* I und der direkt stromabwärts gelegenen *loxP* Sequenz sind allerdings 78 bp voneinander entfernt, die Zentren 45 bp. Sollte dieser Abschnitt unter Voraussetzung einer statischen und definierten Chromatinstruktur zufällig in allen getesteten chromosomalen Lokationen der bis zu 80 bp langen *linker*-DNA zwischen zwei Histon-Octameren entsprechen, könnten beide Erkennungssequenzen durch Cre bzw.  $\gamma\delta$  Resolvase besetzt werden. Mit den an den ca. 1,25 kb entfernten Partnersequenzen gebundenen Proteinmolekülen müßten aber schließlich Nukleoproteinkomplexe höherer Ordnung, die Synaptosome, ausgebildet werden. Darauf würden sich die angrenzenden Nukleosomen störend auswirken. Ein Rekombinationsereignis wäre daher fast undenkbar. Im Fall einer vorhandenen Chromatindynamik käme es dagegen zu partiellen Auflockerungen der Nukleosomenstruktur und zusätzlich zu Verlagerungen der Histonmoleküle auf dem DNA-Doppelstrang. Diese Situation würde den Rekombinationsprozeß stark erleichtern.

Der Verpackungszustand der DNA könnte die schlechte Rekombinationseffizienz der  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten auf genomischen Substraten erklären. Während die Cre Rekombinase zwischen den beiden nur 34 bp langen *loxP* Sequenzen rekombiniert, muß die  $\gamma\delta$  Resolvase die drei *subsites* der *res* Sequenz simultan besetzen. Die *loxP* Sequenzen sind unter der Voraussetzung einer dynamischen Chromatinstruktur mehrmals innerhalb des Versuchszeitraumes von 72 h frei von Nukleosomen und so durch Cre besetz- und rekombinierbar. Der DNA-Bereich der *res* Sequenz umfaßt dagegen 114 bp, so daß die Wahrscheinlichkeit einer gleichzeitigen Bindung der Resolvase Dimere an den *subsites* I, II und III, bei einer maximalen Länge der *linker*-DNA von 80 bp zwischen zwei Nukleosomen, trotz der dynamischen

Charaktereigenschaften des Chromatins relativ gering ist. Hinzu kommt, daß die *res* Sequenz reich an AT-haltigen Sequenzen ist, die sich auch auf die kleine Furche der DNA verteilen. Diese Regionen finden sich insbesondere im Bereich der Resolvasebindungsstellen (Grindley et al., 1982; Falvey & Grindley, 1987), z.B. innerhalb der *subsite* I, wo TATA-Box ähnliche Sequenzen vorkommen. Hier könnte eine bevorzugte Bindung der Histon-Octamere erfolgen.

Aufgrund der Chromatindynamik gilt für die nur 28 bp lange *subsite* I von *res* allerdings dasselbe wie für *loxP*: Der isolierte Teilabschnitt sollte innerhalb der 72 h ebenfalls mehrmals frei von Nukleosomen sein. Unter diesen Umständen sollte man zwischen den genomischen *subsites* I eine Rekombinationseffizienz durch  $\gamma\delta^{E102Y,E124QNL5}$  erwarten, wie sie auch auf unverpackten, episomalen DNA-Substraten mit isolierten *subsites* I zu beobachten ist.

Um dies zu bestätigen, wurden Co-Transfektionsexperimente in der Zelllinie CHO-AA8 Tet-Off mit dem Substrat pTRE-SLHSLZ, das anstelle der kompletten *res* Sequenzen nur zwei isolierte *subsites* I enthält, durchgeführt. Ausgehend von den Messungen der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität, 72 h nach der Transfektion, konnte dieses Substrat durch  $\gamma\delta^{E102Y,E124QNL5}$  nur zu ca. 5% rekombiniert werden. Dieser Wert entsprach in etwa der auf genomischen Substraten ermittelten Rekombinationseffizienz. Die Einfachmutante wies auf genomischen Substraten eine nur noch über PCR nachweisbare Effizienz auf, und auch auf episomalen *subI* x *subI* Substraten (pCH-SNSZ) konnte durch  $\gamma\delta^{E124QNL5}$  in CHO-Zellen eine nur äußerst niedrige Rekombinationseffizienz beobachtet werden. *In vitro* benötigt diese Mutante ebenfalls zumindestens eine komplette *res* Sequenz für eine effiziente Rekombination (Boocock, pers. Mitteilung).

Diese Daten implizieren, daß die Verpackung der genomischen Substrate innerhalb eines Zeitraumes von 72 h trotz mehrmaliger Zellteilungen nur in einem solch geringem Maße aufgelockert wurde, daß die Rekombination nicht infolge einer regulären Synptosomenformation zwischen den sechs an den kompletten *res* Sequenzen gebundenen Dimeren katalysiert werden konnte. Stattdessen suggerieren sie eine Rekombination durch simple Synapsis, nach zufälligem Aufeinandertreffen der an den

*subsites* I gebundenen Resolvase Dimere. Infolge eines solchen Rekombinationsmechanismus werden in jedem Fall auch Inversionsereignisse katalysiert.

Um die Hypothese zu bekräftigen, wurden PCR-Analysen durchgeführt, mit denen solche Inversionsereignisse auf *res* x *res* und auf *subI* x *subI* Substraten detektiert werden konnten (Abbildung 3.18).

*In vitro* konnte gezeigt werden, daß die Methylierung von Purinen innerhalb der *res* Sequenz zu einer Inhibierung der Rekombination durch Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase führte (Falvey & Grindley, 1987). In Eukaryoten ist die Methylierung auf das Cytosin in der Sequenz CpG beschränkt (Razin & Cedar, 1984; Razin & Szyf, 1984). DNA-Methylierung kann innerhalb von Promotorbereichen zu einer Inaktivierung der Gene führen. In diesen Regionen sind dann meist mehrere oder alle Cytosinreste methyliert. Innerhalb der *res* Sequenz tauchen fünf potentielle Methylierungssequenzen auf, die die Rekombination in Säugetierzellen beeinflussen könnten, jeweils eine im Bereich der *subsites* II und III und drei in der *subsite* I Region. Sollte die Methylierung dieser Sequenzen der Grund für die geringen Rekombinationseffizienzen durch die Resolvase Derivate sein, so wäre die Wahrscheinlichkeit einer gleichzeitigen Methylierung der zwei innerhalb der *loxP* Sequenz vorhandenen CpG-Sequenzen sehr hoch. Eine Methylierung sollte dann auch zu einer Inhibition von Cre führen. Da die Rekombinationseffizienz durch Cre allerdings in keiner der getesteten Zelllinien (d.h. in >30 Genloci) reduziert ist, muß man davon ausgehen, daß die DNA in diesen Regionen nicht methyliert ist. Dafür spricht auch, daß die Rekombination durch  $\gamma\delta^{E102Y,E124Q}$  in allen getesteten Zelllinien gleich effizient war und in etwa der Rekombinationseffizienz auf episomalen *subI* x *subI* Substraten entsprach.

Der Einfluß des Methylierungsstatus wurde auch auf die V(D)J-Rekombination durch RAG1 und RAG2 untersucht. Diese nicht homologe, sequenz-spezifische Rekombination wird unter anderem auch über die Zugänglichkeit der DNA für die Rekombinationsmaschinerie reguliert (Yancopoulos & Alt, 1985; Yancopoulos et al., 1986; Alt et al., 1987). Es konnte gezeigt werden, daß sich die DNA-Methylierung auch

auf den Status der Chromatinstruktur auswirken kann (Yeivin & Razin, 1993) und hypermethylierte V(D)J-Rekombinationssubstrate nicht gut umgesetzt werden können (Cherry & Baltimore, 1999; Engler et al., 1991). Andererseits wurde beobachtet, daß bereits rekombinierte Sequenzbereiche hypomethyliert sind (Kelley et al., 1988; Goodhardt et al., 1993). Dies führte zu der Idee, daß eine Demethylierung der Rekombinationsloci zur Initiation der Rekombination führen könne. Es stellte sich allerdings heraus, daß eine Demethylierung die Rekombination nicht aktivieren konnte (Cherry et al., 2000). Im Fall der durch  $\gamma\delta$  Resolvase katalysierten Rekombination kann daher ebenfalls davon ausgegangen werden, daß die Verpackung der DNA die Zugänglichkeit der Rekombinase limitiert und nicht die DNA-Methylierung.

Für den Einsatz zur *in vivo* und *ex vivo* Manipulation eukaryotischer Genome ist dieses Rekombinationssystem als Alternative zum Cre/*loxP*-System nur bedingt tauglich. Die geringe Rekombinationseffizienz stellt hierbei das schwerwiegendste Problem dar. Die Analyse weiterer  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten kann allerdings unter Umständen zu Derivaten führen, die durch eine höhere Rekombinationsaktivität charakterisiert sind. Möglicherweise kann die Aktivität auch durch eine verbesserte Expression der Resolvase in eukaryotischen Zellen erhöht werden. In Bakterien werden für dieselbe Aminosäure andere Codons bevorzugt als in eukaryotischen Zellen. So konnte das für die Cre Rekombinase codierende Gen hinsichtlich der in einer Säugetierzelle verwendeten Codons optimiert werden (Koresawa et al., 2000).

Desweiteren muß der Rekombinationsablauf kontrollierbar sein. Die Möglichkeit, daß neben Deletionen auch Inversionsreaktionen katalysiert werden können, wirkt sich auf verschiedene Anwendungen störend aus. Dieses Problem kann aber durch eine einfache Modifikation des *overlap*-Bereiches umgangen werden. Anstelle der palindromischen Sequenz AT könnte die Nukleotidfolge AC verwendet werden. Diese Basenkombination stellte sich in *in vitro* Analysen, aber auch in *in vivo* Experimenten in *E. coli* als diejenige heraus, die von allen getesteten Kombinationen am besten rekombiniert werden konnte (Hatfull et al., 1988; Grindley, pers. Mitteilung).

Inversionsereignisse können hier aufgrund der ungleichen Basenpaarungen nicht mehr katalysiert werden.

#### **4.4.3 Die Rekombination durch Cre und $\gamma\delta$ Resolvase wird nicht durch den Transkriptionsstatus beeinflusst**

Die oben diskutierten Experimente wurden im transkriptionsaktiven Zustand der DNA durchgeführt. Der Transkriptionslevel kann sich aber auf mehrere Parameter auswirken. Für pro- und eukaryotische Systeme konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, daß sich der topologische Status von transkribierten DNA-Sequenzen infolge der Elongation durch die RNA-Polymerase verändert. Es werden negativ superhelicale Spannungen in die DNA eingeführt (Tsao et al., 1989; Brill & Sternglanz, 1988; Giaever & Wang, 1988; Wu et al., 1988). *In vitro* führen diese transkriptionsinduzierten Überspiralisierungen zu einer Rekombinationsaktivierung der  $\gamma\delta$  Resolvase auf transkribierten, topologisch relaxierten DNA-Substraten (Dröge, 1993). Während Cre unabhängig von der Topologie des Substrates rekombiniert (Abremski et al., 1983), ist die negative superhelicale Torsion der DNA für die Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase ein essentieller Cofaktor für die Rekombination (Reed, 1981; Krasnow & Cozzarelli, 1983; Kanaar & Cozzarelli, 1992). Auf die Rekombination durch die  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten wirkt sich die negative Superhelicität des Substrates stimulierend aus (Arnold et al., 1999; Boocock, pers. Mitteilung). Würde sich die Transkription in eukaryotischen Zellen in gleicher Weise auf die Topologie des Substrates auswirken wie *in vitro* gezeigt, könnte eine Inhibition der Transkription zu verringerten Rekombinationseffizienzen durch die  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten führen.

Desweiteren besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Transkription und der Chromatinverpackung der DNA. In vielen Experimenten hat sich gezeigt, daß die Transkriptionsaktivität diverser Gene durch Auflockerung der Chromatinstruktur erhöht werden konnte (Xiao et al., 1999; Chen et al., 1997; Vanden Berghe et al., 1999; Kiernan et al., 1999; Minucci et al., 1997; Bartsch et al., 1996). Transkriptionsinaktive

Bereiche sollten also stärker verpackt sein als transkribierte Sequenzen, was ebenfalls zu einer Beeinträchtigung der Rekombination führen kann.

Der Transkriptionsapparat selbst könnte andererseits die Bindung der Rekombinasen an die DNA erschweren. Der stark und konstitutiv exprimierende CMV-Promotor des Substrates pTRE-RLHRLZ wird fortwährend mit RNA-Polymerasen beladen, die ihrerseits mit Transkriptionsfaktoren und dadurch auch mit Histonen interagieren (siehe Abschnitt 4.4.4). Diese Multiproteinkomplexe, wie auch eine Schleifenbildung der DNA könnten sich negativ auf die Bindung der Rekombinationsenzyme an den transkribierten Erkennungssequenzen bzw. auf die Bildung der Synptosome auswirken.

Um einen möglichen Einfluß der Transkription auf die Rekombination durch Cre und  $\gamma\delta$  Resolvase beurteilen zu können, wurden die Zellen über einen Zeitraum von zwei Wochen vor der Transfektion bis zur Isolierung der DNA aus den Zellen mit Doxycyclin behandelt. Dieses Tetracyclin-Analogen kann die Transkription des TRE-Promotors durch Konformationsänderung eines Transaktivatormoleküls selektiv hemmen (Gossen & Bujard, 1992). In Kontrollexperimenten konnte eine Inhibition der Transkription um den Faktor 200-300 beobachtet werden. In Southern Blot Analysen wurde schließlich der Einfluß des verringerten Transkriptionslevels auf die Rekombinationseffizienzen von  $\gamma\delta$  Resolvase und Cre untersucht. Es stellte sich heraus, daß die Transkription keinen Effekt auf die Rekombinationseffizienzen hatte. Sowohl Cre als auch  $\gamma\delta$  Resolvase rekombinierten mit derselben Effizienz wie im transkriptionsaktiven Zustand (Tabelle 3.5). Das bedeutet einerseits, daß die Chromatinstruktur durch die Transkription nicht in dem Maße aufgelockert wird, daß die Rekombination dadurch erleichtert wird, andererseits scheint sich die Transkriptionsmaschinerie auch nicht negativ auf die Synapsis bzw. den Strangaustausch auszuwirken.

#### **4.4.4 Die Inhibition der Histon-Deacetylase hat keinen Effekt auf die Rekombination durch Cre und $\gamma\delta$ Resolvase**

Die Transkription wird in Eukaryoten über die Zugänglichkeit der Promotorregionen reguliert. Hierbei spielt der Verpackungsgrad der DNA durch das Chromatin eine entscheidende Rolle. Histon/DNA-Interaktionen können durch ATP-abhängiges Histon-Remodeling unterbrochen werden. Hierbei werden Komplexe gebildet, in denen Untereinheiten mit ATPase- und Helicase-Aktivität zusammengefügt sind. Dadurch wird die Zugänglichkeit der DNA erhöht. Über den Mechanismus ist allerdings noch nicht viel bekannt. Postuliert wird ein reversibler, oszillierender Austausch zwischen normalen und veränderten, besser zugänglichen Nukleosomen Konformationen durch das SWI2/SNF2-System (Schnitzler et al., 1998). Das zweite System umfaßt die Modifikation von Histonproteinen durch Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung (Davie, 1998; Davie & Spencer, 1999). Die Kristallstruktur der Histone zeigt, daß es drei Motive innerhalb dieser Proteine gibt; eine Faltungsregion, eine Extensionsregion und einen konservierten basischen Schwanz (Luger & Richmond, 1998). Dieser Schwanz ist durch eine nur geringe DNA-Bindungseigenschaft charakterisiert, ist aber in der Lage mit Nachbarnukleosomen oder Nicht-Histonproteinen (HMG-14, -17; Sir3, Sir4) zu interagieren (Trieschmann et al., 1998; Luger & Richmond, 1998). Durch diese Protein-Protein-Wechselwirkungen wird der N-terminale Schwanz einer induzierten Faltung unterworfen (Hansen et al., 1998). Eine Acetylierung spezifischer Lysinreste an H2A, H2B, H3 und H4 bewirkt eine Einschränkung dieser Eigenschaft und so die Zerstörung höherer Strukturen zwischen den Nukleosomen (Spencer & Davie, 1999). Desweiteren werden Interaktionen zwischen Nukleosomen und Transkriptionsfaktoren infolge von Acetylierungen der Histone gefördert (Workman & Kingston, 1998). Diese Effekte führen schließlich zu einer erhöhten Zugänglichkeit der DNA für den Transkriptionsapparat und dadurch zu einem erhöhten Transkriptionslevel.

Im einzelnen läßt sich der Mechanismus wie folgt beschreiben: Über spezifische Transkriptionsfaktoren, die an Nukleosomen-freie Bindungsstellen der DNA binden,

werden Komplexe aus mehreren Histon-Acetyltransferasen (P300/CBP; Goldman et al., 1997) zu einem spezifischen, mit Nukleosomen besetzten Promotor geführt. Dort werden die Histone acetyliert, um Bindungsstellen für weitere Transkriptionsfaktoren oder den basalen Transkriptionskomplex verfügbar zu machen. Der basale Komplex kann letztendlich durch diese zweite Klasse von Transkriptionsfaktoren zu seiner entsprechenden Bindungsstelle befördert werden. Für eine unterschiedliche Substraterkennung sind hierbei verschiedene Varianten der Histon-Acetylasen zuständig (Luo & Dean, 1999).

Umgekehrt bildet ein Corepressor (Sin3; Rb) das Bindeglied zwischen einer Histon-Deacetylase (HDAC1) und einem DNA-bindenden Protein (Mad; E2F), das den Komplex spezifisch zu einem Promotor führt. Das Drei-Komponenten-System reprimiert auf diesem Weg die Transkription (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998). Der Transkriptionsfaktor YY1 bildet eine Ausnahme; er ist in der Lage, Transkription zu reprimieren und zu aktivieren (Shi et al., 1991) und er interagiert direkt, ohne Corepressor, mit der Histon-Deacetylase (Yang et al., 1997). In humanen Zellen sind bis dato drei Histon-Deacetylasen bekannt, die in verschiedenen Geweben gleich stark exprimiert werden und nicht durch eine Substratspezifität charakterisiert sind (Hassig et al., 1998). Durch Histon-Deacetylase Inhibitoren wie Trichostatin A (TSA) oder Na-Butyrat kann eine fortwährende Hyperacetylierung der Histone erreicht werden, die infolge der Auflockerung der Chromatinstruktur zu einer allgemeinen Erhöhung der Transkriptionsaktivität führt (Yoshida et al., 1995).

Durch eine Histonacetylierung konnte unter anderem auch die V(D)J Rekombination auf nukleosomaler DNA stimuliert werden (Cherry & Baltimore, 1999). Eine allgemeine Auflockerung der Chromatinstruktur könnte daher auch die Rekombinationsaktivität der  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten erhöhen.

Um diesen möglichen Effekt zu untersuchen, wurden Rekombinationsanalysen unter Verwendung der Histon-Deacetylase Inhibitoren Na-Butyrat und TSA (Yoshida et al., 1995) durchgeführt. Diese Substanzen wurden bereits in früheren Arbeiten erfolgreich

eingesetzt (Kiernan et al., 1999; Jin & Scotto, 1998; Minucci et al., 1997; Garrison et al., 2000; Dangond & Gullans, 1998; Xiao et al., 1999; Chen & Townes, 1999). N-Butyrat beeinflusst in hohen Konzentrationen zudem den Phosphorylierungs- sowie den Methylierungsstatus von Histonen und anderen Proteinen, aber auch die DNA-Methylierung (Yoshida et al., 1995). Wie die Acetylierung spezifischer Lysinreste führt wahrscheinlich auch die Phosphorylierung spezifischer Serin- und Threoninreste an Histonproteinen zu einer aufgelockerten Chromatinstruktur (Davie & Spencer, 1999).

Es stellte sich heraus, daß die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase in den mit TSA behandelten Zellen um den Faktor vier bis fünf erhöht war (Abbildung 3.20). Dieser Effekt kann auf eine Hyperacetylierung der Histone zurückgeführt werden. Vermutlich wurde das Chromatin um einen solchen Grad aufgelockert, der für eine Aktivierung der Transkription ausreichend war.

Die Rekombinationseffizienz der  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate blieb allerdings auf demselben niedrigen Level wie in der unbehandelten Kontrollgruppe (Tabelle 3.8). Wahrscheinlich blieben die Histone trotz der Auflockerung noch so fest mit der DNA verankert, daß sie die simultane Bindung der Resolvase Dimere oder aber die Synapsis verhindert hatten. Bezüglich der Cre katalysierten Rekombination zeigte sich ebenfalls, daß die Behandlung der Zellen mit Histon-Deacetylase Inhibitoren keinen Einfluß auf die Rekombinationseffizienz hatte.

#### **4.4.5 Die Rekombination durch $\gamma\delta$ Resolvase und Cre wird durch die Hemmung der Topoisomerasen des Types I und II nicht beeinflusst**

Eine besondere Klasse von Enzymen stellen die DNA-Topoisomerasen dar, die 1969 durch James C. Wang entdeckt wurden, und den topologischen Status der DNA regulieren. In der DNA auftretende superhelicale Spannungen werden durch

Topoisomerasen, durch Strangbruch und Wiedervereinigung der Stränge, eliminiert. Der Strangbruch erfolgt hierbei infolge der Formation eines transienten, kovalenten Phosphotyrosin/DNA-Komplexes (Wang, 1996; Osheroff, 1998; Berger, 1998). Aufgrund des Mechanismus wird zwischen zwei Familien von Topoisomerasen unterschieden. Typ I Topoisomerasen schneiden während der Katalyse nur einen DNA-Strang; Topoisomerasen des Typs I A bilden kovalente Phosphotyrosin-Bindungen am 5'-Terminus der DNA, die des Typs I B hingegen greifen das 3'-Ende an. Die eukaryotische Topoisomerase III wird hierbei der Typ I A-Subfamilie zugeordnet und besitzt eine starke Aktivität auf DNAs mit Heteroduplexstrukturen, allerdings eine nur schwache Aktivität bezüglich der Relaxation negativ superhelical gespannter DNAs. Zur Typ I B-Subfamilie zählt man die eukaryotische Topoisomerase I, die die Relaxation positiver und negativer Superhelices katalysiert (Wang, 1996; Osheroff, 1998). Im Vergleich dazu schneiden Typ II Topoisomerasen beide DNA-Stränge unter Hydrolyse von ATP (Sinden, 1994). Die eukaryotische Topoisomerase II, die ebenfalls das 5'-Ende der DNA attackiert und für die Relaxation positiver und negativer Superhelices verantwortlich ist, wird dieser Gruppe zugeordnet.

Nahezu alle Prozesse des DNA-Metabolismus bedingen topologische Veränderungen der DNA, so daß die Topoisomerasen an all diesen Transaktionen beteiligt sind (Gellert, 1981; Sinden, 1994; Wang, 1987, 1991, 1996). Beispielsweise muß die DNA während der Replikation partiell entwunden werden, was zwangsläufig zu lokalen Torsionsspannungen innerhalb der DNA führt. Infolge einer durch die Topoisomerasen katalysierten Relaxation der DNA können diese Spannungen schließlich abgebaut werden (Aveman et al., 1988; Yang et al., 1987; Wang, 1996). Eine Blockierung der Topoisomerasen I und II führte zu einer Reduktion der Replikation des SV40-Genoms um den Faktor 15-20 *in vitro* (Yang et al., 1987). Auch eine Beteiligung der Topoisomerasen I und II an der Transkription konnte in vielen Experimenten bestätigt werden (Brill et al., 1987, Merino et al., 1993; Sanzey, 1979; Smith, 1981; Pruss und Drlica, 1989). So konnte die Topoisomerase I sogar als Aktivator der Transkription identifiziert werden (Fleischmann et al., 1984; Kretzschmar et al., 1993; Rose et al., 1988). Auch konnte eine Beteiligung der DNA Topoisomerasen I und II an der

Rekombination der DNA gezeigt werden (Christman et al., 1988; Zhu und Schiestl, 1996). Die Topoisomerase II spielt zudem bei der Kondensation/Dekondensation der Chromosomen eine bedeutende Rolle (Gasser et al., 1986, Uemura et al., 1987). Möglicherweise sind eukaryotische Topoisomerasen auch durch direkte Interaktionen mit Histon-Deacetylasen in die Organisation des Chromatins eingebunden (Tsai et al., 2000). Ferner scheint die neuronale Entwicklung von Mäusen durch die Topoisomerase II $\beta$  beeinflusst zu werden, allerdings ist über die Art und Weise der Funktion in diesem Zusammenhang noch nichts bekannt (Yang et al., 2000).

Um einen möglichen Einfluß dieser Enzymfamilie auf die Cre bzw.  $\gamma\delta$  Resolvase katalysierte Rekombination in eukaryotischen Zellen analysieren zu können, wurden spezifische Topoisomerase Inhibitoren eingesetzt. *In vitro* konnte gezeigt werden, daß die eukaryotische Topoisomerase I durch Relaxation negativ superhelical gespannter Plasmide deren Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase unterbinden konnte. Hierzu war allerdings eine 17-fache Menge an Topoisomerase im Vergleich zum Substrat erforderlich (Wang & Dröge, 1996). Auch die  $\gamma\delta$  Resolvase Mutanten sind *in vitro* durch eine höhere Aktivität auf überspiralisierten Substraten charakterisiert (Boocock, pers. Mitteilung). Daher war nicht auszuschließen, daß die Topologie der genomischen DNA in Säugetierzellen, vor allem in transkribierten Bereichen, ebenfalls durch Topoisomerasen des Typs I und II derartig beeinträchtigt wird, daß die Rekombination durch  $\gamma\delta$  Resolvase benachteiligt wird. Da Topoisomerasen, wie oben erwähnt, auch direkt mit Histon-Deacetylasen interagieren und so die Chromatinstruktur beeinflussen können, könnte die Cre vermittelte Rekombination ebenfalls durch die Präsenz aktiver Topoisomerasen beeinträchtigt werden.

Zur spezifischen Inhibition der Topoisomerasen wurden zwei Substanzen eingesetzt. Camptothecin (CPT) führt durch Stabilisierung des kovalenten Enzym/DNA-Komplexes zur Hemmung der Religation und induziert auf diese Weise Einzelstrangbrüche. Hierbei erfolgt eine spezifische Bindung der Substanz an die Topoisomerase/DNA-Oberfläche, so daß das CPT mit dem kovalent gebundenem

Enzym sowie dem Nukleotid +1 interagieren kann (Takimoto et al., 1997). Gehemmt werden durch CPT nur Typ I Topoisomerasen. Eine mindestens vierstündige CPT-Behandlung von Maus F9 Teratokarzinom- und CH V79-Zellen, unmittelbar nach der Elektroporation der Zellen mit einem Plasmid, führte zu einer 4-6 fachen Stimulation der Plasmidintegration via nicht homologer Rekombination (Shcherbakova & Filatov, 2000).

Die zweite hier eingesetzte Substanzklasse umfaßt die synthetischen Flavonderivate. In dieser Arbeit wurde das Flavonoid EMD 50689 verwendet, das im Gegensatz zum CPT an freie Topoisomerase-Moleküle bindet und so deren Bindung an der DNA inhibiert (Boege et al., 1996). Gehemmt werden durch diese Substanz sowohl Typ I als auch Typ II DNA Topoisomerasen. Da allerdings bereits an die DNA gebundene Topoisomerasemoleküle nicht inhibiert werden können, wurden in zusätzlichen Experimenten die Zellen mit CPT und EMD 50689 gleichzeitig behandelt.

Die Ergebnisse zeigten, daß die Rekombination in mit EMD 50689 behandelten Zellen nicht stimuliert werden konnte. Auch die Behandlung der Zellen mit CPT ließ einen nur äußerst gering stimulierenden Effekt auf die Rekombination durch Cre und  $\gamma\delta$  Resolvase erkennen. In PCR-Analysen konnten zwar prominentere Produktbanden nachgewiesen werden (Abbildung 3.19) und auch Messungen der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität ergaben leicht erhöhte Werte (Tabelle 3.6), die Quantifizierung über Southern Blot Analysen ergab allerdings, daß die Menge an rekombinierter DNA nicht signifikant erhöht war (Tabelle 3.7). Zu einem ähnlichen Ergebnis führte die Simultanbehandlung der Zellen mit EMD 50689 und CPT. Insgesamt gesehen ist der durch die Inhibition der Topoisomerasen beobachtete stimulierende Effekt auf die  $\gamma\delta$  Resolvase katalysierte Rekombination eher vernachlässigbar. Wie die nicht-homologe Plasmidintegration könnte aber auch die sequenz-spezifische, Resolvase-katalysierte Integration eines DNA-Substrates ins Genom durch eine derartige Behandlung stimuliert werden. Die Inhibition der Topoisomerasen führt möglicherweise dazu, daß ein episomal vorliegendes Plasmid, das in eine entsprechende genomische Zielsequenz integriert werden soll, nach Eintritt in die Zelle nicht so schnell topologisch relaxiert

wird, wie es in CHO-Zellen zu beobachten war. Die verbleibende negative Superhelicität des Plasmids würde zu einer Stimulation der Rekombinationsaktivität der  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate führen.

#### **4.4.6 Die Chromatinstruktur wird durch Prozesse des DNA-Metabolismus nur bedingt aufgelockert**

Da die Organisation des Chromatins in eukaryotischen Zellen vermutlich durch das Zusammenspiel vieler Faktoren bedingt wird, wurde eine Kombinationsbehandlung der Zellen mit Topoisomerase Inhibitoren und Histon-Deacetylase Inhibitoren, in An- und Abwesenheit der Transkription durchgeführt. Auch hier zeigte sich dasselbe Ergebnis: Es war kein Effekt auf die durch Cre oder  $\gamma\delta$  Resolvase katalysierte Rekombination zu beobachten.

Schlußfolgernd muß also davon ausgegangen werden, daß die sequenz-spezifische Rekombination in eukaryotischen Zelllinien aufgrund der Verpackung der DNA stark von der Länge der Erkennungssequenzen abhängig ist. Je mehr Nukleotide die Bindungsregion umfaßt, desto geringer ist die Rekombinationseffizienz. Die Chromatinstruktur, die einer gewissen Dynamik unterworfen ist, wird zwar partiell aufgelockert, aber weder durch Histon-Deacetylase Inhibitoren noch durch Topoisomerase Inhibitoren in dem Maße, daß die Zugänglichkeit der DNA bzw. die Voraussetzungen für die Bildung des Synaptosoms durch  $\gamma\delta$  Resolvase maßgeblich verbessert werden. Die Histonproteine scheinen also im ständigen Kontakt mit der DNA zu stehen. Auch Replikations- oder Transkriptionsvorgänge führen scheinbar nicht zu einer drastischen Veränderung des Verpackungsstatus.

Mit insgesamt mehr als 30 analysierten Genlokationen muß man zudem von einer generalisierten Organisation des Chromatins ausgehen. Sollten vereinzelte unverpackte Regionen innerhalb des Genoms vorhanden sein, könnte man sie mit Hilfe dieses Testsystems detektieren.

## 4.5 *Subsite I* homologe DNA-Sequenzen im menschlichen Genom

Die statistische Wahrscheinlichkeit, eine natürliche Zielsequenz innerhalb des humanen Genoms zu finden, ist abhängig von der Anzahl der Nukleotide dieser Sequenz und beträgt  $4^n$ , wobei  $n$  der Anzahl der Basenpaare entspricht. Bei einer Länge von 34 bp war es statistisch gesehen unmöglich, eine natürliche *loxP* Sequenz im menschlichen Genom zu finden; allerdings konnten funktionale, kryptische *loxP* Sequenzen (Pseudo-*loxP*) gefunden werden (Thyagarajan et al., 2000). Auch für die  $\lambda$ -Integrase konnten rekombinationsaktive *attB* homologe Sequenzen im menschlichen Genom (*atth*) nachgewiesen werden (Lorbach 2000).

Da  $\gamma\delta^{E102Y,E124Q/NLS}$  Substrate mit isolierten *subsites I* rekombinieren kann, wurde in dieser Arbeit ein erster Versuch unternommen, Pseudo-*subsite I* Sequenzen im menschlichen Genom zu finden. Die Länge der *subsite I* beträgt 28 bp; sie ist also mit der von *loxP* vergleichbar. Einige der Positionen konnten hierbei aufgrund der Consensus-Sequenz durch mehrere Basen besetzt werden. In einer Datenbankrecherche wurden mehrere Sequenzen mit Abweichungen zur Consensus-Sequenz an mindestens vier Positionen gefunden. Zwei der Sequenzen, diejenigen mit den potentiell am wenigsten relevanten Nukleotidabweichungen, wurden für die Funktionalitätsanalyse ausgewählt.

Die erste Pseudo-*subsite I* Sequenz (*subI<sub>h</sub>*) befindet sich auf Chromosom 14 und stellt ein Exon des TMP21-Gens dar. Sie stellte sich als rekombinationsinaktiv heraus. Der *overlap*-Bereich lautete hier CT. Eine solche Sequenz limitiert die  $\gamma\delta$  Resolvase auf eine Topoisomerase-Aktivität, Rekombination kann hingegen nicht mehr katalysiert werden (Falvey et al., 1988). Zudem waren zwei Abweichungen zur Consensus-Sequenz im Bereich der Resolvase-Bindungsstellen lokalisiert, von denen sich eine im Bereich der großen Furche befindet und die Bindung der Resolvase verhindert (Abbildung 3.22; Rimphanitchayakit & Grindley, 1990). Möglicherweise sind diese Faktoren als

Ursachen für die Inaktivität der Resolvase-Doppelmutante auf diesem Substrat anzusehen.

Im Gegensatz dazu konnte die Deletion eines episomalen Substrates mit der zweiten getesteten Sequenz (*subI<sub>h20</sub>*) über Nested-PCR nachgewiesen werden (Abbildung 3.23). Bei dieser Pseudo-*subsite* I handelte es sich um eine auf dem Chromosom 20 lokalisierte Sequenz mit der Nukleotidfolge TGTCCTATAACTATCCAATTAACGCACA. Die Funktion der Sequenz ist nicht bekannt. In Bezug auf die Consensus-Sequenz war lediglich eine Abweichung im Bereich der Resolvase-Bindungsstellen zu erkennen. Diese führt zwar zu einer drastischen Abnahme der Bindungsaffinität der  $\gamma\delta$  Resolvase, allerdings ist noch eine Restaffinität von 1%, in Relation zur Wildtyp-Sequenz, gegeben (Abbildung 3.22; Rimphanitchayakit & Grindley, 1990). Die übrigen Abweichungen waren in der *core*-Region angesiedelt. Ein Vergleich mit der Wildtyp *subsite* I zeigte, daß der *overlap*-Bereich nicht AT, sondern TC lautete. Verschiedene Untersuchungen ergaben, daß eine derartige Abwandlung des *overlap*-Bereiches zu einer erheblichen Einschränkung der Rekombinationsaktivität führt. Immerhin konnte *in vitro* noch eine geringe Aktivität erreicht werden. *In vivo* war sie in *E. coli* von der Menge des *tnpR* Produktes abhängig. Bei geringen Resolvase-Mengen konnten nur 2% Rekombination beobachtet werden, mit hohen Mengen waren es 11%; erst extrem hohe Resolvase-Mengen führten schließlich zu einer 100%-igen Rekombination des Substrates (Hatfull et al., 1988; Grindley, pers. Mitteilung; Stark et al., 1991).

Vorteilhaft für einen solchen *overlap*-Bereich ist allerdings die Tatsache, daß er nicht palindromisch ist und daher auch keine Inversionsereignisse stattfinden können. Eine gezielte Integration eines DNA-Fragmentes ins menschliche Genom würde daher wesentlich gerichteter ablaufen als im Fall der Wildtyp *subsite* I Sequenz. Ein weiterer Vorteil liegt in der geringen Rekombinationseffizienz an sich begründet. Obwohl die Cre Rekombinase von großem Nutzen für die Mausgenetik ist, und schon oft mit Erfolg eingesetzt wurde, weist das System Mängel auf. In transgenen Maus-Spermatiden führte die Cre Rekombinase zu illegitimen Chromosomen-Verlagerungen, die zu Sterilität der männlichen Nachkommen führten (Schmidt et al., 2000). Als Ursache dafür können z.B.

oben erwähnte Pseudo-*loxP* Sequenzen in Betracht gezogen werden. Für eine Anwendung des Cre/*loxP*-Systemes *in vivo*, z.B. zur Kontrolle von Genaktivitäten oder für gezielte genomische Umverteilungen, muß die Rekombinase auf jeden Fall so schnell wie möglich inaktiviert werden. Die in dieser Arbeit gefundene Pseudo-*subsite I* Sequenz stellt in Verbindung mit  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNL5}}$  aufgrund der ohnehin schon sehr geringen Aktivität ein möglicherweise um ein Vielfaches geringeres Risiko solcher illegitimer Prozesse dar, und würde sich daher als gute Alternative zum Cre/*loxP*-System anbieten.

## V. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde das prokaryotische, sequenz-spezifische DNA-Rekombinationssystem der  $\gamma\delta$  Resolvase in Säugetierzellen transferiert. Mit der Mutante  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLs}}$  konnte ein auf episomalen *res x res* Substraten mit dem Cre/*loxP*-System vergleichbares System in verschiedenen Zelllinien etabliert werden. Der Vergleich der Rekombinationseffizienzen von der Wildtyp  $\gamma\delta$  Resolvase, die in eukaryotischen Zellen nahezu inaktiv ist, und der hyperaktiven Doppelmutante impliziert, daß episomal vorliegende DNA-Substrate in CHO-Zellen in relaxierter Form vorliegen müssen. Es konnte gezeigt werden, daß sie über einen Zeitraum von 72 h unverpackt bleiben.

Genomische *res x res* Substrate konnten durch  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLs}}$  hingegen nur mit einer sehr geringeren Effizienz rekombiniert werden, in etwa in dem Maße wie episomale Substrate mit isolierten *subsites* I. Dies führte zu dem Schluß, daß die Zugänglichkeit der genomischen DNA für die Resolvase oder die Bildung des Synaptosoms durch die Chromatinstruktur limitiert wird. Die Daten zeigten, daß trotz einer allgemeinen Dynamik innerhalb des Chromatins die Verpackung über einen Zeitraum von 72 h in einem konstant hohem Maße bestehen blieb. Weder durch Prozesse des DNA-Metabolismus (Replikation, Transkription) noch durch eine Inhibition der Histon-Deacetylasen und Topoisomerasen konnte die Rekombination durch Cre und  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLs}}$  beeinflusst werden. Zukünftig könnten aber mit Hilfe dieses Systems lokal begrenzte Sequenzabschnitte mit geringem Verpackungsstatus detektiert werden.

Weitere Untersuchungen bezogen sich auf genomische Sequenzen, die zur *subsite* I von *res* homolog sind; sogenannte Pseudo-*subsite* I Sequenzen. Eine dieser Sequenzen (*subI<sub>h20</sub>*) befindet sich auf Chromosom 20 und ist in geringem Maße rekombinationsaktiv. Da  $\gamma\delta^{\text{E102Y,E124QNLs}}$  *in vitro* auch intermolekulare Rekombinationsreaktionen katalysieren kann (Boocock, pers. Mitteilung), könnte das

System unter Umständen auch *in vivo* zur spezifischen Integration von Fremd-DNA ins Säugetiergenom verwendet werden.

## VI. LITERATURVERZEICHNIS

Abdel-Meguid, S.S., Grindley, N.D.F., Templeton, N.S., Steitz, T.A. (1984). Cleavage of the site-specific recombination protein, resolvase: the smaller of the two fragments binds DNA specifically. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2001-2005.

Abremski, K., Hoess, R.H., Sternberg, N. (1983). Studies on the properties of P1 site-specific recombination. *Cell* **32**, 1301-1311.

Adra, C.N., Boer, P.H., McBurney, M.W. (1987). Cloning and expression of the mouse pgk-1 gene and the nucleotide sequence of its promoter. *Gene* **60**, 65-74.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1990). *Molekularbiologie der Zelle*; 2. Auflage (übersetzt von Jaenicke, L., Cramer, M., Gilles, R., Herschel, M., Kemper, B., Lütz, C., Thiedemann, M., Vogel, S., Waffenschmidt, S.). VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, BRD

Alt, F.W., Blackwell, T.K., Yancopoulos, G.D. (1987). Development of the primary antibody repertoire. *Science* **238**, 1079-1087

Andersson et al. (1979). *Cell* **16**, 63-75.

Armstrong, J.A., Emerson, B.M. (1998). Transcription of chromatin: these are complex times. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 165-172.

Arnold, P.H., Blakke, D.G., Grindley, N.G.F., Boocock, M.R., Stark, W.M. (1999). Mutants of Tn3 resolvase which do not require accessory binding sites for recombination activity. *EMBO J.* **18**, 1407-1414.

Arthur, A., Sherratt, D.J. (1979). Dissection of the transposition process: a transposon-encoded site-specific recombination system. *Mol. Gen. Genet.* **175**, 267-274.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1995). *Current protocols in molecular biology*. Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School. John Wiley & Sons, Inc.

Aveman, K., Knippers, R., Koller, T., Sogo, J.M. (1988). Camptothecin, a specific inhibitor of type I DNA topoisomerases, induces DNA breakage at replication forks. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3026-3034.

Bartsch, J., Truss, M., Bode, J., Beato, M. (1996). Moderate increase in histone acetylation activates the mouse mammary tumor virus promoter and remodels its nucleosome structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10741-10746.

- Baumann, P., West, S.C. (1998). Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and doublestranded-break repair. *TIBS* **23**, 247-251.
- Bednarz, A.L., Boocock, M.R., Sherratt, D.J. (1990). Determinants of correct res site allignment in site-specific recombination by Tn3 resolvase. *Genes Dev.* **4**, 2366-2375.
- Benjamin, H.W., Cozzarelli, N.R. (1986). DNA-directed synapsis in recombination: slithering and random collision of sites. *Proc. Robert A. Welch Found. Conf. Chem. Res.* **29**: 107-129.
- Benjamin, H.W., Cozzarelli, N.R. (1988). Isolation and characterization of the Tn3 resolvase synaptic intermediate. *EMBO J.* **7**, 1897-1905.
- Berger, J.M. (1998). Structure of DNA topoisomerases. *Biochim et Biophys Acta* **1400**, 3-18.
- Boege, F., Straub, T., Kehr, A., Boesenberg, C., Christiansen, K., Andersen, A., Jakob, F., Köhrle, J. (1996). Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I. *J. Biol. Chem.* **271**, 2262-2270.
- Bollag, R.J., Waldman, A.S., Liskay, R.M. (1989). Homologous recombination in mammalian cells. *Annu. Rev. Gen.* **23**, 199-225.
- Boocock, M.R., Brown, J.L., Sherratt, D.J. (1986). Structural and catalytic properties of specific complexes between Tn3 resolvase and the recombination site res. *Biochem. Soc. Trans.* **14**, 214-216.
- Bosch, K. (1976). Angewandte mathematische Statistik. *Rowohlt TB*, Reinbek bei Hamburg.
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Häsler, K., Fleckenstein, B., Schaffner, W. (1985). A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human Cytomegalovirus. *Cell* **41**, 521-530.
- Brill, S.J., DiNardo, S., Voelkel-Meiman, K., Sternglanz, R. (1987) Need for DNA topoisomerase activity as a swivel for DNA replication for transcription of ribosomal RNA. *Nature* **326**, 414-416.
- Brill S.J., Sternglanz, R. (1988) Transcription-dependent DNA supercoiling in yeast DNA topoisomerase mutants. *Cell* **54**, 403-411.
- Buchholz, F., Angrand, P.O., Steward, F.A. (1996). A simple assay to determine the functionality of Cre or Flp recombination targets in genomic manipulation constructs. *Nucl. Acids Res.* **24**, 3118-3119.

Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Shot, J.M. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio Techniques* **5**, 376-379.

Campbell, A.M. (1962). Episomes. *Adv. Genet.* **11**, 101-145.

Capecchi, M.R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**, 1288-1292.

Cereghini, S., Yaniv, M. (1984). Assembly of transfected DNA into Chromatin: Structural changes in the origin-promoter-enhancer region upon replication. *EMBO J.* **3**, 1243-1253

Chen, S.S., Hsu, M.T. (1984). Evidence for Variation of supercoil densities among Simian Virus 40 nucleoprotein complexes and for higher supercoil density in replicating complexes. *J. Virol.* **51**, 14-19.

Chen, W.Y., Bailey, E.C., McCune, S.L., Dong, J.Y., Townes, T.M. (1997). Reactivation of silenced, virally transduced genes by inhibitors of histone deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5798-5803.

Chen, W.Y., Townes, T.M. (1999). Molecular mechanism for silencing virally transduced genes involves histone deacetylation and chromatin condensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 377-382.

Cherry, S.R., Baltimore, D. (1999). Chromatin remodeling directly activates V(D)J recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10788-10793.

Cherry, S.R., Beard, C., Jaenisch, R., Baltimore, D. (2000). V(D)J Recombination is not activated by the demethylation of the kappa locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8467-8472

Christ, N., Dröge, P. (1999). Alterations in the directionality of  $\lambda$  site-specific recombination catalyzed by mutant integrases *in vivo*. *J. Mol. Biol.* **288**, 825-836.

Christ, N., Dröge, P. (2001). Site-specific DNA recombination. A promising technique for revealing gene functions in eukaryotes. *B.I.F. Futura* **16**, 24-31.

Christman M.F., Dietrich, F.S., Fink, G.R., (1988). Mitotic recombination in the rDNA of *S. cerevisiae* is suppressed by the combined action of DNA topoisomerase I and II. *Cell* **55**, 413-425.

Cereghini, S., Yaniv, M. (1984). Assembly of transfected DNA into chromatin: structural changes in the origin-promoter-enhancer region upon replication. *EMBO J.* **3**, 1243-1253.

- Chou, J., Lemaux, P.G., Casadaban, M.J., Cohen, S.N. (1979). Transposition protein of Tn3: identification and characterisation of an essential repressor-controlled gene product. *Nature* **282**, 801-806.
- Dangond, F., Gullans, S.R. (1998). Differential expression of human histone deacetylase mRNAs in response to immune cell apoptosis induction by trichostatin A and butyrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 833-837.
- Davie, J.R. (1998). Covalent modifications of histones: expression from chromatin templates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 173-178.
- Davie, J.R., Spencer, V.A. (1999). Control of histone modifications. *J. Cell. Biochem. Suppl.* **32/33**, 141-148.
- Diaz, V., Rojo, F., Martinez, A.C., Alonso, J.C., Bernad, A. (1999). The prokaryotic  $\beta$ -recombinase catalyzes site-specific recombination in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 6634-6640.
- Dingwall, C., Laskey, R. (1992). The nuclear membrane. *Science* **258**, 942-947
- Dröge, P. (1993). Transcription-driven site-specific DNA recombination *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2759-2763.
- Dröge, P., Cozzarelli, N.R. (1989). Recombination of knotted substrates by Tn3 resolvase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6062-6066.
- Dymecki, S.M. (1996). FLP recombinase promotes site-specific DNA recombination in embryonic stem cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6191-6196.
- Engler, P., Haasch, D., Pinkert, C.A., Doglio, L., Glymour, M., Brinster, R., Storb, U. (1991). A strain-specific modifier on mouse chromosome 4 controls the methylation of independent transgene loci. *Cell* **65**, 939-947.
- Falvey, E., Hatfull, G.F., Grindley, N.D.F. (1988). Uncoupling of the recombination and topoisomerase activities of the  $\gamma\delta$  resolvase by a mutation at the crossover point. *Nature* **332**, 861-863.
- Falvey, E., Grindley, N.D.F. (1987). Contacts between  $\gamma\delta$  resolvase and the  $\gamma\delta$  *res* site. *EMBO J.* **6**, 815-821.
- Fellenberg, K. (1998). Optimierung von Cre-Oestrogenrezeptor-Fusionsproteinen zur lokalen Geninaktivierung in der Haut. Diplomarbeit im Fachbereich Biologie der Universität zu Köln.

- Fleischmann, G., Pflugfelder, G., Steiner, E.K., Javaherian, K., Howard, G.C., Wang, J.C., Elgin, S.C.R. (1984). *Drosophila* DNA topoisomerase I is associated with transcriptionally active regions of the genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 6958-6962.
- Garrison, P.M., Rogers, J.M., Brackney, W.R., Denison, M.S. (2000). Effects of histone deacetylase inhibitors on the Ah receptor gene promoter. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **374**, 161-171.
- Gasser, S.M., Laroche, T., Falquet, E., Tour, E.B., Laemmli, U.K. (1986). Metaphase chromosome structure (involvement of topoisomerase II). *J. Mol. Biol.* **188**, 613-629.
- Gellert, M. (1981) DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 879-910.
- Giaever, G.N., Wang, J.C. (1988) Supercoiling of intracellular DNA can occur in eukaryotic cells. *Cell* **55**, 849-856.
- Gill, R., Heffron, F., Dougan, G., Falkow, S. (1978). Analysis of sequences transposed by complementation of two classes of transposition-deficient mutants of Tn3. *J. Bacteriol.* **136**, 742-56.
- Gill, R.E., Heffron, F., Falkow, S. (1979). Identification of the protein encoded by the transposable element Tn3 which is required for its transposition. *Nature* **282**, 797-801.
- Goldman, M.A. (1997). Executive decision: chromatin structure and gene regulation. *Trends Genet.* **13**, 387-388.
- Goodhardt, M., Cavelier, P., Doyen, N., Kallenbach, S., Babinet, C., Rougeon, F. (1993). Methylation status of immunoglobulin kappa gene segments correlates with their recombination potential. *Eur. J. Immunol.* **23**, 1789-1795.
- Gossen, M., Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5547-5551.
- Grindley, N.D.F., Lauth, M.R., Wells, R.G., Wityk, R.J., Salvo, J.J., Reed, R.R. (1982). Transposon-mediated site-specific recombination: identification of three binding sites for resolvase at the *res* sites of  $\gamma\delta$  and Tn3. *Cell* **30**, 19-27.
- Grindley, N.D.F., Reed, R.R. (1985). Transpositional recombination in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 863-896.
- Grindley, N.D.F. (1993). Analysis of a nucleoprotein complex: The synaptosome of gamma delta resolvase. *Science* **262**, 738-740.

Grindley, N.D.F. (1994). Resolvase-mediated site-specific recombination. In: *Nucleic Acids and Molecular Biology*, (Eckstein, F., Lilley, D.M.J. Eds.), Vol. **8**, 236-267. Springer-Verlag, Berlin.

Grindley, N.D.F. (1997). Site-specific recombination: synapsis and strand exchange revealed. *Curr. Biol.* **7**(10), R608-R612.

Groth, A.C., Olivares, E.C., Thyagarajan, B., Calos, M.P. (2000). A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5995-6000.

Grunstein, M. (1990). Histone function in transcription. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **6**, 643-678.

Hall, C.V., Jacob, P.E., Ringold, G.M., Lee, F. (1983). Expression and regulation of *Escherichia Coli lacZ* gene fusions in mammalian cells. *J. Mol. Appl. Genet.* **2**, 101-109.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.

Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation of *E. coli*. In: *DNA cloning: A practical approach*. Vol. **1**, 109-136. IRL Press Oxford.

Hansen, J.C., Tse, C., Wolffe, A.P. (1998). Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye. *Biochemistry* **37**, 17637-17641.

Hassig, C.A., Tong, J.K., Fleischer, T.C., Owa, T., Grable, P.G., Ayer, D.E. (1998). A role for histone deacetylase activity in HDAC1-mediated transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3519-3524.

Hatfull, G.F., Grindley, N.D.F. (1986). Analysis of  $\gamma\delta$  resolvase mutants *in vitro*: evidence for an interaction between serine-10 of resolvase and site I of *res*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 5429-5433.

Hatfull, G.F., Salva, J.J., Falvey, E.E., Rimphanitchayakit, V., Grindley, N.D.F. (1988). Site-specific recombination by the  $\gamma\delta$  resolvase. *Transposition*, 149-181. Society for general microbiology Symposium **43**, Cambridge University Press.

Heffron, F., So, M., McCarthy, B.J. (1978). In vitro mutagenesis of a circular DNA molecule by using synthetic restriction sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 6012-6016.

Heffron, F., McCarthy, B.J., Ohtsubo, H., Ohtsubo, E. (1979). DNA sequence analysis of the transposon Tn3: three genes and three sites involved in transposition of Tn3. *Cell* **18**, 1153-1163.

- Heichman, K.A., Johnson, R.C. (1990). The Hin invertasome: protein-mediated joining of distant recombination sites at the enhancer. *Science* **249**, 511-517.
- Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J. Mol. Biol.* **26**, 365-369.
- Hoess, R.H., Abremski, K. (1985). Mechanism of strand cleavage and exchange in the Cre-lox site-specific recombination system. *J. Mol. Biol.* **181**, 351-362.
- Hughes, R.E., Hatfull, G.F., Rice, P.A., Steitz, T.A., Grindley, N.D.F. (1990). Cooperativity mutants of the  $\gamma\delta$  resolvase identify an essential interdimer interaction. *Cell* **63**, 1331-1338.
- Hughes, R.E., Rice, P.A., Steitz, T.A., Grindley, N.D.F. (1993). Protein-protein interactions directing resolvase site-specific recombination: a structure-function analysis. *EMBO J.* **12**, 1447-1458.
- Jeong, S., Stein, A. (1994). Micrococcal nuclease digestion of nuclei reveals extended nucleosome ladders having anomalous DNA lengths for chromatin assembled on non-replicating plasmids in transfected cells. *Nucl. Acids Res.* **22**, 3, 370-375.
- Jin, S., Scotto, K.W. (1998): Transcriptional regulation of the MDR1 gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF-Y. *Mol. Cell. Biol.* **18**(7), 4377-4384.
- Jiuya, H., Brown, J.L., McIlwraith, M.J., Burke, M., Sheratt, D.J., Boocock, M.R., Stark, W.M. (2000). How recombination sites come together. *Workshop on site-specific recombination and transposition 2000*.
- Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* **19**, 187-191.
- Kalderon, D., Roberts, B.L., Richardson, W.D., Smith, A.E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**, 499-509.
- Kamp, D., Kardas, E., Ritthaler, W., Sandulache, R., Schmucker, R., Stern, B. (1984). Comparative analysis of invertible DNA in Phage genomes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **49**, 301-311.
- Kanaar, R., Cozzarelli, N.R. (1992). Roles of supercoiled DNA structure in DNA transactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 369-379.

- Kellendonk, C., Tronche, F., Monaghan, A.P., Angrand, P.O., Steward, f., Schütz, G. (1996). Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486. *Nucl. Acids Res.* **24**, 1404-1411.
- Kelley, D.E., Pollok, B.A., Atchison, M.L., Perry, R.P. (1988). The coupling between enhancer activity and hypomethylation of kappa immunoglobulin genes is developmentally regulated. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 930-937.
- Kiernan, R.E., VanHulle, C., Schiltz, L., Adam, E., Xiao, H., Maudoux, F., Calomme, C., Burny, A., Nakatani, Y., Jeang, K.T., Benkirane, M., Van Lint, C. (1999). HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *EMBO J.* **18(21)**, 6106-6118.
- Kilby, N.J., Snaith, M.R., Murray, J.A. (1993). Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet.* **9**, 413-421.
- Kolot, M., Silberstein, N., Yagil, E. (1999). Site-specific recombination in mammalian cells expressing the Int recombinase of bacteriophage HK022. *Mol. Biol. Rep.* **26**, 207-213.
- Koresawa, Y., Miyagawa, S., Ikawa, M., Matsunami, K., Yamada, M., Shirakura, R., Okabe, M. (2000). Synthesis of a new Cre recombinase gene based on optimal Codon usage for mammalian systems. *J. Biochem. (Tokyo)* **127(3)**, 367-372.
- Kowalczykowski, S.S., Dixon, D.A., Eggleston, A.K., Lauder, S.D., Rehrauer, W.M. (1994): Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **58**, 401-465.
- Kozak, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **32**, 1313-1324.
- Kozak, M. (1991). Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* **266**, 19867-19870.
- Kozak, M. (1992). Regulation of translation in eukaryotic systems. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **8**, 197-225.
- Kozak, M. (1995). Adherence to the first AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2662-2666.
- Kozak, M. (1997). Recognition of AUG and alternative initiator codons is augmented by G in position +4 but is not generally affected by the nucleotides in positions +5 and +6. *EMBO J.* **16**, 2482-2492.

- Krasnow, M.A., Cozzarelli, N.R. (1983). Site-specific relaxation and recombination by the Tn3 resolvase: recognition of the DNA path between oriented *res* sites. *Cell* **32**, 1313-1324.
- Kretzschmar, M., Meisterernst, M., Roeder, R.G. (1993). Identification of human DNA topoisomerase I as a cofactor for activator-dependent transcription by RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 11508-11512.
- Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M., Rajewsky, K. (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science* **269**, 1427-1429.
- Landy, A. (1993). Mechanistic and structural complexity in the site-specific recombination pathway of Int and FLP. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**, 699-707.
- Lorbach, E., Christ, N., Schwikardi, M., Dröge, P. (2000). Site-specific recombination in human cells catalyzed by phage  $\lambda$  integrase mutants. *J. Mol. Biol.* **296**, 1175-1181.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2,8Å resolution. *Nature* **389**, 251-260.
- Luo, R.X., Dean, D.C. (1999). Chromatin remodeling and transcriptional regulation. *J. Natl. Canc. Inst.* **91**, 1288-1294.
- McCreath, K.J., Howcroft, J., Campbell, K.H.S., Colman, A., Schnieke, A.E., Kind, A.J. (2000). Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* **405**, 1066-1069.
- Merino, A., Madden, K.R., Lane, W.S., Champoux, J.J., Reinberg, D. (1993). DNA-topoisomerase I is involved in both repression and activation of transcription. *Nature* **365**, 227-232.
- Metzger, D., Feil, R. (1999). Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**, 470-476.
- Minucci, S., Horn, V., Bhattacharyya, N., Russanova, V., Ogryzko, V.V., Gabriele, L., Howard, B.H., Ozato, K. (1997). A histone deacetylase inhibitor potentiates retinoid receptor action in embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 11295-11300.
- Müller, U. (1999). Ten years of gene targeting: target mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech. Develp.* **82**, 3-21.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.

Murley, L.L., Grindley, N.D.F. (1998). Architecture of the  $\gamma\delta$  resolvase synaptosome: oriented heterodimers identify interactions essential for synapsis and recombination. *Cell* **95**, 553-562.

Nagy, A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* **26**, 99-109.

Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenmann, R.N. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**, 386-389.

Nash, H.A. (1996). Site-specific recombination: integration, excision, resolution and inversion of defined DNA segments. In: *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and molecular biology*, 2363-2376, (Neidhardt, F.C. et al. (eds.). ASM Press, Washington D.C.

Nunes-Düby, S.E., Tirumalai, R.S., Kwon, H.J., Ellenberger, T. Landy, A. (1998). Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. *Nucl. Acids. Res.* **26**, 391-406.

Oehler, S., Eismann, E.R., Krämer, H., Müller-Hill, B., The three Operators of the lac operon cooperate in repression. *EMBO J.* **9**, 973-979

Olsson, T.G.S., Silverstein, R.A., Ekwall, K., Sunnerhagen, P.(1999). Transient inhibition of histone deacetylase activity overcomes silencing in the mating-type region in fission yeast. *Curr. Genet.* **35**, 82-87.

Osheroff, N. (1998). DNA topoisomerases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1400**. 1-2

Paranjape, S.M., Kamakaka, R.T., Kadonaga, J.T. (1994). Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 265-297

Pfarr, D.S., Rieser, L.A., Woychik, R.P., Rottman F.M., Rosenberg, M., Reff, M.E. (1986). Differential effects of polyadenylation regions on gene expression in mammalian cells. *DNA* **5**, 115-122.

Pruss, G.J., Drlica, K. (1989). DNA supercoiling and procaryotic transcription. *Cell* **56**, 521-523.

Puck et al. (1958). *J. Exp. Med.* **108**, 945

Rajewsky, K., Gu, H., Kühn, R., Betz, U.A.K., Müller, W., Schwenk, F. (1996). Conditional gene targeting. *J. Clin. Invest.* **98**, 600-603.

- Razin, A., Cedar, H. (1984). DNA methylation in eukaryotic cells. *Int. Rev. Cytol.* **92**, 159-185.
- Razin, A., Szyf, M. (1984). DNA methylation patterns: Formation and function. *Biochim. Biophys. Acta.* **782**, 331-342.
- Reed, R.R., Young, R.A., Steitz, J.A., Grindley, N.D.F., Guyer, M.S. (1979). Transposition of the *Escherichia coli* insertion element generates a five-base-pair repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4882-4886.
- Reed, R.R. (1981). Transposon-mediated site-specific recombination: a defined *in vitro* system. *Cell* **25**, 713-719.
- Reed, R.R. (1981). Resolution of cointegrates between transposons  $\gamma\delta$  and Tn3 defines the recombination site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 3428-3432.
- Reed, R.R., Grindley, N.D.F. (1981) Transposon-mediated site-specific recombination *in vitro*: DNA cleavage and protein-DNA linkage at the recombination site. *Cell* **25**, 721-728.
- Reed, R.R., Shibuya, G.I., Steitz, J.A. (1982). Nucleotide sequence of  $\gamma\delta$  resolvase gene and demonstration that its gene product acts as a repressor of transcription. *Nature* **300**, 381-383.
- Reed, R.R., Moser, C.D. (1984). Resolvase-mediated recombination intermediates contain a serine residue covalently linked to DNA. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **49**, 245-249.
- Rimphanitchayakit, V., Grindley, N.D. (1990). Saturation mutagenesis of the DNA site bound by the small domain of gamma delta resolvase. *EMBO J.* **9**, 719-125.
- Rimphanitchayakit, V., Hatfull, G.F., Grindley, N.D.F. (1989). The 43 residue DNA binding domain of gamma delta resolvase binds adjacent major and minor grooves of DNA. *Nucl. Acids. Res.* **17**, 1035-1050.
- Rong, Y.S., Golic, K.G. (2000). Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science* **288**, 2013-2018.
- Rose, K.M., Szopa, J., Han, F.S., Cheng, Y.C., Richter, A., Scheer, U. (1988). Association of DNA topoisomerase I and RNA polymerase I: a possible role for topoisomerase I in ribosomal gene transcription. *Chromosoma* **96**, 411-416.
- Sadowski, P.D. (1993). Site-specific genetic recombination: hips, flips and flops. *FASEB J.* **7**, 760-767.

- Sadowski, P.D. (1995). The FLP recombinase of the 2  $\mu$ m plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **51**, 53-91.
- Salvo, J.J., Grindley, N.D.F. (1988). The  $\gamma\delta$  resolvase bends the *res* site into a recombinogenic complex. *EMBO J.* **7**, 3609-3616.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 1992: **24**, 104-108.
- Sanzey, B. (1979). Modulation of gene expression by drug affecting deoxyribonucleic acid gyrase. *J. Bacteriol.* **138**, 40-47.
- Scherer et al., (1953) *J. Exp. Med.* **97**, 695
- Schmidt, E.E., Taylor, D.S., Prigge, J.R., Barnett, S., Capecchi, M.R. (2000). Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 13702-13707.
- Schnitzler, G.R., Sif, S., Kingston, R.E. (1998). A model for chromatin remodeling by the SWI/SNF family. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **63**, 535-543.
- Shcherbakova, O.G., Filatov, M.V. (2000). Camptothecin enhances random integration of transfected DNA into the genome of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1495**, 1-3.
- Sherratt, D.J., Arthur, A., Dyson, P. (1981). Site-specific recombination. *Nature* **294**, 608-610.
- Shi, Y., Seto, E., Chang, L.S., Shenk, T. (1991). Transcriptional repression by YY1, a human GLI-Kruppel-related protein, and relief of repression by adenovirus E1A protein. *Cell* **67**, 377-388.
- Sinden, R. (1994). DNA structure and function. *Academic Press Inc.*, San Diego, USA.
- Smith, G.R. (1981). DNA-supercoiling: another level for regulating gene expression. *Cell* **24**, 599-600.
- Smith, G.R. (1988). Homologous recombination in prokaryotes. *Microbiol. Rev.* **52**, 1-28.

- Southern, P.J., Berg, P. (1982). Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.* **1**, 327-341.
- Spencer, V.A., Davie, J.R. (1999). Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene* **240**, 1-12.
- Stark, W.M., Grindley, N.D.F., Hatfull, G.F., Boocock, M.R. (1991). Resolvase-catalyzed reactions between *res* sites differing in the central dinucleotide of subsite I. *EMBO J.* **10**, 3541-3548.
- Stark, W.M., Boocock, M.R., Sherratt, D.J. (1992). Catalysis by site-specific recombinases. *Trends Genet.* **8**, 432-439.
- Suraokar, M., Bradley, A. (2000). Targeting sheep. *Nature* **405**, 1004-1005.
- Takimoto, C.H., Kieffer, L.V., Arbuck, S.G. (1997). DNA topoisomerase I inhibitors. *Cancer Chemotherapy and Biological Response* **17**, 80-113.
- Thyagarajan, B., Guimaraes, M.J., Groth, A.C., Calos, M.P. (1999). Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene* **244**, 47-54.
- Trieschmann, L., Martin, B., Bustin, M. (1998). The chromatin unfolding domain of chromosomal protein HMG-14 targets the N-terminal tail of histone H3 in nucleosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5468-5473.
- Tsai, S.C., Valkov, N., Yang, W.M., Gump, J., Sullivan, D., Seto, E., (2000). Histone deacetylase interacts directly with DNA topoisomerase II. *Nat. Genet.* **26**, 349-353.
- Tsao, Y.P., Wu, H.Y., Liu, L.F. (1989). Transcription-driven supercoiling of DNA: direct biochemical evidence from in vitro studies. *Cell* **56**, 111-118.
- Uemura, T., Ohkura, H., Adachi, Y., Morino, K., Shiozaki, K., Yanagida, M. (1987). DNA topoisomerase II is required for condensation and separation of mitotic chromosomes in *s. pombe*. *Cell* **50**, 917-925.
- Vanden Berghe, W., De Bosscher, K., Boone, E., Plaisance, S., Haegeman, G. (1999). The nuclear factor-kappaB engages CBP/p300 and histone acetyltransferase activity for transcriptional activation of the interleukin-6 gene promoter. *J. Biol. Chem.* **274**, 32091-32098.
- Volkert, F.C., Broach, J.R. (1986). Site-specific recombination promotes plasmid amplification in yeast. *Cell* **46**, 541-550.

- Wang, J.C. (1969). Degree of superhelicity of covalently closed cyclic DNA's from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **43**, 263-272.
- Wang, J.C. (1987). DNA-Topoisomerasen. In: *Erbsubstanz DNA*, 34-45. Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg.
- Wang, J.C. (1991). DNA topoisomerases: why so many? *J. Mol. Biol.* **266**, 6659-6662.
- Wang, J.C. (1996). DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 635-692.
- Wang, Z., Dröge, P. (1996). Differential control of transcription-induced DNA supercoiling by eukaryotic topoisomerases *in vitro*. *EMBO J.* **15**, 581-589.
- Wasserman, S.A., Cozzarelli, N.R. (1985). Determination of the stereostructure of the product of Tn3 resolvase by a general method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1079-1083.
- Watson, M.A., Boocock, M.R., Stark, W.M. (1996). Rate and selectivity of synapsis of *res* recombination sites by Tn3 resolvase. *J. Mol. Biol.* **257**, 317-329.
- Wells, R.G., Grindley, N.D.F. (1984). Analysis of the  $\gamma\delta$  *res* site: sites required for site-specific recombination and gene expression. *J. Mol. Biol.* **179**, 667-687.
- Wen, W., Meinkoth, J.L., Tsien, R.Y., Taylor S.S. (1995). Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**, 463-473.
- Willets, N.S., Mount, D.W. (1969). Genetic analysis of recombination-deficient mutants of *Escherichia coli* K-12 carrying *rec* mutations cotransducible with *thyA*. *J. Bacteriol.* **100**, 923-934.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., Graham, M.W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucl. Acid. Res.* **17**, 3469-3478.
- Workman, J.L., Kingston, R.E. (1998). Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 545-579.
- Wu, H.Y., Shyy, S., Wang, J.C., Liu, L.F. (1988). Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell* **53**, 433-440
- Xiao, H., Hasegawa, T., Isobe, K.I. (2000). P300 collaborates with Sp1 and Sp3 in p21<sup>waf1/cip1</sup> promoter activation induced by histone deacetylase inhibitor. *J. Biol. Chem.* **275**, 1371-1376

- Yancopoulos, G.D., Alt, F.W. (1985). Developmentally controlled and tissue-specific expression of unrearranged VH gene segments. *Cell* **40**, 271-281
- Yancopoulos, G.D., Blackwell, T.K., Suh, H., Hood, L., Alt, F.W. (1986). Introduced T cell receptor variable region gene segments recombine in pre-B cells: evidence that B and T cells use a common recombinase. *Cell* **44**, 251-259
- Yang, T.T., Cheng, L., Kain, S.R. (1996). Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucl. Acids Res.* **24**, 4592-4593.
- Yang, L., Wold, M.S., Li, J.J., Kelly, T.J., Liu, L.F. (1988). Roles of topoisomerases in simian virus 40 DNA replication *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 950-954.
- Yang, W., Steitz, T.A. (1995). Crystal structure of the site-specific recombinase  $\gamma\delta$  resolvase complexed with a 34 bp cleavage site. *Cell* **82**, 193-207.
- Yang, W., Mizuuchi, K. (1997). Site-specific recombination in plane view. *Structure* **5**, 1401-1406.
- Yang, W.M., Yao, Y.L., Sun, J.M., Davie, J.R., Seto, E. (1997). Isolation and characterization of cDNAs corresponding to an additional member of the human histone deacetylase gene family. *J. Biol. Chem.* **272**, 28001-28007.
- Yang, X., Li, W., Prescott, E.D., Burden, S.J., Wang, J.C. (2000). DNA topoisomerase II $\beta$  and neural development. *Science* **287**, 131-134.
- Yeivin, A., Razin, A. (1993) In: DNA Methylation: Molecular biology and biological significance. Herausgeber: Jost, J.P., Saluz, H.P.; Birkhauser, Basel, 523-568
- Yoshida, M., Horinouchi, S., Beppu, T. (1995). Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *BioEssays* **17**, 423-429.
- Zhu, J., Schiestl, R.H. (1996). Topoisomerase I involvement in illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1805-1812.

# ANHANG

## Nukleinsäure- und Aminosäuresequenz der in dieser Arbeit verwendeten $\gamma\delta$

### Resolvase Derivate:

#### $\gamma\delta$ Resolvase (Wildtyp):

ATG CGA CTT TTT GGT TAC GCA CGG GTA TCA ACC AGC CAG CAA TCT  
met arg leu phe gly tyr ala arg val ser thr ser gln gln ser

CTC GAT ATT CAG GTT CGG GCA CTC AAA GAC GCA GGC GTG AAA GCA  
leu asp ile gln val arg ala leu lys asp ala gly val lys ala

AAT CGC ATC TTT ACT GAC AAG GCA TCG GGC AGT TCA AGC GAT CGG  
asn arg ile phe thr asp lys ala ser gly ser ser ser asp arg

AAA GGG CTG GAC TTG CTG AGG ATG AAG GTG GAG GAA GGT GAC GTC  
lys gly leu asp leu leu arg met lys val glu glu gly asp val

ATC TTG GTG AAG AAA CTT GAC CGC CTT GGG CGC GAT ACT GCT GAC  
ile leu val lys lys leu asp arg leu gly arg asp thr ala asp

ATG ATC CAG TTA ATA AAA GAG TTT GAC GCC CAA GGT GTA TCC ATT  
met ile gln leu ile lys glu phe asp ala gln gly val ser ile

CGG TTT ATT GAT GAC GGA ATC AGT ACC GAT GGG GAG ATG GGT AAA  
arg phe ile asp asp gly ile ser thr asp gly glu met gly lys

ATG GTT GTC ACT ATT CTA TCT GCA GTG GCC CAG GCA GAA CGA CAG  
met val val thr ile leu ser ala val ala gln ala glu arg gln

AGA ATA CTA GAG CGT ACC AAT GAA GGT CGC CAA GAG GCA ATG GCA  
arg ile leu glu arg thr asn glu gly arg gln glu ala met ala

AAA GGA GTT GTT TTT GGT AGA AAA AGA AAA ATA GAT AGA GAT GCA  
lys gly val val phe gly arg lys arg lys ile asp arg asp ala

GTA TTA AAT ATG TGG CAA CAG GGG TTA GGT GCC TCA CAT ATA TCA  
val leu asn met trp gln gln gly leu gly ala ser his ile ser

AAA ACA ATG AAT ATT GCT CGT TCA ACA GTA TAT  
lys thr met asn ile ala arg ser thr val tyr

$\gamma\delta^{E124Q}$ :

ATG CGA CTT TTT GGT TAC GCA CGG GTA TCA ACC AGC CAG CAA TCT  
 met arg leu phe gly tyr ala arg val ser thr ser gln gln ser

CTC GAT ATT CAG GTT CGG GCA CTC AAA GAC GCA GGC GTG AAA GCA  
 leu asp ile gln val arg ala leu lys asp ala gly val lys ala

AAT CGC ATC TTT ACT GAC AAG GCA TCG GGC AGT TCA AGC GAT CGG  
 asn arg ile phe thr asp lys ala ser gly ser ser ser asp arg

AAA GGG CTG GAC TTG CTG AGG ATG AAG GTG GAG GAA GGT GAC GTC  
 lys gly leu asp leu leu arg met lys val glu glu gly asp val

ATC TTG GTG AAG AAA CTT GAC CGC CTT GGG CGC GAT ACT GCT GAC  
 ile leu val lys lys leu asp arg leu gly arg asp thr ala asp

ATG ATC CAG TTA ATA AAA GAG TTT GAC GCC CAA GGT GTA TCC ATT  
 met ile gln leu ile lys glu phe asp ala gln gly val ser ile

CGG TTT ATT GAT GAC GGA ATC AGT ACC GAT GGG GAG ATG GGT AAA  
 arg phe ile asp asp gly ile ser thr asp gly glu met gly lys

ATG GTT GTC ACT ATT CTA TCT GCA GTG GCC CAG GCA GAA CGA CAG  
 met val val thr ile leu ser ala val ala gln ala glu arg gln

AGA ATA CTA **CAG** CGT ACC AAT GAA GGT CGC CAA GAG GCA ATG GCA  
 arg ile leu **gln** arg thr asn glu gly arg gln glu ala met ala

AAA GGA GTT GTT TTT GGT AGA AAA AGA AAA ATA GAT AGA GAT GCA  
 lys gly val val phe gly arg lys arg lys ile asp arg asp ala

GTA TTA AAT ATG TGG CAA CAG GGG TTA GGT GCC TCA CAT ATA TCA  
 val leu asn met trp gln gln gly leu gly ala ser his ile ser

AAA ACA ATG AAT ATT GCT CGT TCA ACA GTA TAT  
 lys thr met asn ile ala arg ser thr val tyr

$\gamma\delta^{E102Y,E124Q}$ :

ATG CGA CTT TTT GGT TAC GCA CGG GTA TCA ACC AGC CAG CAA TCT  
met arg leu phe gly tyr ala arg val ser thr ser gln gln ser

CTC GAT ATT CAG GTT CGG GCA CTC AAA GAC GCA GGC GTG AAA GCA  
leu asp ile gln val arg ala leu lys asp ala gly val lys ala

AAT CGC ATC TTT ACT GAC AAG GCA TCG GGC AGT TCA AGC GAT CGG  
asn arg ile phe thr asp lys ala ser gly ser ser ser asp arg

AAA GGG CTG GAC TTG CTG AGG ATG AAG GTG GAG GAA GGT GAC GTC  
lys gly leu asp leu leu arg met lys val glu glu gly asp val

ATC TTG GTG AAG AAA CTT GAC CGC CTT GGG CGC GAT ACT GCT GAC  
ile leu val lys lys leu asp arg leu gly arg asp thr ala asp

ATG ATC CAG TTA ATA AAA GAG TTT GAC GCC CAA GGT GTA TCC ATT  
met ile gln leu ile lys glu phe asp ala gln gly val ser ile

CGG TTT ATT GAT GAC GGA ATC AGT ACC GAT GGG **TAT** ATG GGT AAA  
arg phe ile asp asp gly ile ser thr asp gly **tyr** met gly lys

ATG GTT GTC ACT ATT CTA TCT GCA GTG GCC CAG GCA GAA CGA CAG  
met val val thr ile leu ser ala val ala gln ala glu arg gln

AGA ATA CTA **CAG** CGT ACC AAT GAA GGT CGC CAA GAG GCA ATG GCA  
arg ile leu **gln** arg thr asn glu gly arg gln glu ala met ala

AAA GGA GTT GTT TTT GGT AGA AAA AGA AAA ATA GAT AGA GAT GCA  
lys gly val val phe gly arg lys arg lys ile asp arg asp ala

GTA TTA AAT ATG TGG CAA CAG GGG TTA GGT GCC TCA CAT ATA TCA  
val leu asn met trp gln gln gly leu gly ala ser his ile ser

AAA ACA ATG AAT ATT GCT CGT TCA ACA GTA TAT  
lys thr met asn ile ala arg ser thr val tyr

**Komplette Sequenz um den *subI*<sub>h20</sub>-Lokus:****(Genbank Accession Number HS850H21)**

5' GGT GCA TCA TGG GGT ACC AAA GAC TTG TCC AAG TCC TTA TTT  
TGA CCA AAG GAA AGC ATT TAA GTG TCC TCC CCC ATA AAT GGA ACT  
AGG ATT TCA TGG TAT GTG GTA AGA ATC AAC AGC AAA ATA TAC AAA  
AAG AAC TGT GAG CTA CGT GGC GTT AAG GTA TGA TCT TCC CTA TGT  
TAA TGC AGA AAA AAA TAA GCT TCA GTA ATA CAT CAA ATG **TAT GTC**  
**CTA TAA CTA TCC AAT TAA CGC ACA** AAG TGT TTA TGT GTT TGG CAC  
AGT GCT AGG CCC TAG AGA TTG AAA GCC TCG AGC CTG CTC CAG AAG  
CTC ACC AAT TAG TGG GTA AAG AGA ATA ATT ACT TCA GGG AGG TAT  
TAA GAG ATC ACA CAA ATG GGG CGG AAT GGG GAG GAA GAC AGC CTC  
CAT CAT GCC CAA TAC TTA CCT TCA CAG TTC TGA TTC 3'

# Curriculum vitae

## *Persönliche Daten*

Name	Micha Schwikardi
Anschrift	Fichtenstraße 21 58332 Schwelm
Geburtsdatum	14. Dezember 1971
Geburtsort	Schwelm
Eltern	Willi Schwikardi; Marlies Veronika Schwikardi, geb. Wenke
Familienstand	ledig
Kinder	Janina Eileen Schwikardi

## *Ausbildung*

1978-1982	Gemeinschafts-Grundschule Westfalendamm, Schwelm
1982-1991	Märkisches Gymnasium Schwelm
1991	Abitur
1991-1992	Grundwehrdienst
Oktober 1992	Immatrikulation an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main
Oktober 1994	Diplom-Vorprüfung
Januar 1997	Diplom-Hauptprüfung
Januar 1997 bis Dezember 1997	Diplomarbeit am Paul-Ehrlich-Institut in Langen bei Herrn PD Dr. J. Löwer / Frau Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz Thema: Regulation der expression der Humanen Endogenen Retrovirusfamilie HERV-K: Analyse inaktivierender Mutationen in der Umgebung der TATA-Box.
Februar 1998 bis April 2001	Promotion am Institut für Genetik der Universität zu Köln der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät bei Herrn PD Dr. P. Dröge Thema: Sequenz-spezifische DNA-Rekombination durch $\gamma\delta$ Resolvase Derivate in eukaryotischen Zellen.
seit 1997	freie wissenschaftliche Tätigkeit am Institut der Anthropologie und Humangenetik der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main bei Frau Dr. J. Hammerl, Herrn Prof. Dr. Dr. R. Protsch von Zieten Thema: KMD-Messungen an merowingischen Skeletten

Die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Februar 1998 bis März 2001 am Institut für Genetik der Universität zu Köln unter der Anleitung von Herrn Privat-Dozent Dr. P. Dröge durchgeführt.

### **Erklärung:**

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Priv.-Doz. Dr. P. Dröge betreut worden.

Köln den 11. April 2001

Micha Schwikardi

Teilpublikationen:

Lorbach, E., Christ, N., Schwikardi, M. & Dröge, P. (2000). Site-specific Recombination in Human Cells Catalyzed by Phage  $\lambda$  Integrase Mutants. *J. Mol. Biol.* **296**, 1175-1181

Schneider, F., Schwikardi, M., Muskhelishvili, G. & Dröge, P. (2000). A DNA-Binding Domain Swap Converts the Invertase Gin into a Resolvase. *J. Mol. Biol.* **295**, 767-775

Schwikardi, M. & Dröge, P. (2000). Site-specific recombination in mammalian cells catalyzed by  $\gamma\delta$  resolvase mutants: implications for the topology of episomal DNA. *FEBS Letters* **471**, 147-150

# Danksagung

Bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Peter Dröge möchte ich mich für die Stellung des Themas, ganz besonders aber für die intensive wissenschaftliche Betreuung der Arbeit und die anregenden Diskussionen bedanken.

Für ihre vielen wissenschaftlichen und praktischen Anregungen möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Elke Lorbach, Frau Dipl.-Biol. Nicole Christ und Herrn Dr. Andrew Barker bedanken. Während meiner Promotionsarbeit standen sie mir zu jedem Zeitpunkt mit Rat und Tat zur Seite.

Desweiteren bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für das hervorragende Arbeitsklima und die gute Gemeinschaft.

Herrn Prof. Benno Müller-Hill möchte ich dafür danken, daß er immer ein offenes Ohr für die während der Arbeit aufgetretenen Probleme hatte. Dafür gilt mein Dank auch Frau Dr. Brigitte Wilcken-Bergmann, Frau Dr. Brigitte Kisters-Woike und Frau Elisabeth Stratmann.

Für die Durchführung der Sequenzierungen möchte ich Simone Willms, Gudrun Zimmer, Daniela Tils, Jutta Kuhn aber ganz besonders Karin Otto danken.

Die grundlegenden zellbiologischen Techniken wurden mir von Angela Egert (techn. Assistentin) vermittelt. Für ihre immer währende Unterstützung und Hilfsbereitschaft möchte ich mich ausdrücklich bedanken.

Herbert Müller-Hartmann stellte mir HeLa- und CHO-Zellen zur Verfügung. Auch für seine wertvollen Ratschläge möchte ich ihm danken.

Herr Prof. Walter Doerfler stellte mir das Luminometer zur Messung der relativen  $\beta$ -Galaktosidase Aktivitäten sowie das Fluoreszenzmikroskop zur Verfügung; aber auch für die Begutachtung dieser Arbeit möchte ich mich herzlichst bei ihm bedanken.

Für die Verwendung diverser Labormaterialien und –Geräte möchte ich mich auch bei Frau Prof. Karin Schnetz bedanken.

Desweiteren sei allen nicht explizit erwähnten Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Prof. Müller-Hill, Prof. Rajewsky, Prof. Dörfler, Prof. Schnetz, Prof. Tarakhowsky, Prof. Tautz und Prof. Leptin für ihre Hilfsbereitschaft gedankt.

Für die Übersendung der Anti- $\gamma\delta$  Resolvase-Antikörper möchte ich mich herzlichst bei Prof. Nigel Grindley bedanken; Prof. Fritz Boege gebührt mein Dank für den Topoisomerase Inhibitor EMD 50689.

Der Arbeitsgruppe von Dr. Martin Boocock möchte ich meinen ganz besonderen Dank aussprechen. Erst die Entwicklung der Tn3 Resolvase Mutanten gab den Anstoß zur Generation entsprechender  $\gamma\delta$  Resolvase Derivate.

Last, but not least gebührt meiner Tochter Janina-Eileen, meiner Lebensgefährtin Astrid Kubitzky und meinen Eltern Marlies und Willi Schwikardi mein allerherzlichster Dank, da sie mir mit ihrer moralischen Unterstützung den Weg zur Promotion geebnet haben.