

Aus der Abteilung für Tumorstudiologie des Heinrich-Pette-Instituts
für Experimentelle Virologie und Immunologie
Direktor: Prof. Dr. W. Deppert

Analyse der Expression von Mutanten p53 in normalen und Tumorzellen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von
Karine David
aus Hamburg

Hamburg 2000

Angenommen von dem Fachbereich der Universität Hamburg am

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Dekan:

Referent:

Korreferent:

Diese Arbeit wurde im Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. W. Deppert, Abteilung Tumorstudiologie, durchgeführt.

Ich möchte an dieser Stelle Prof. Dr. W. W. Deppert für die Möglichkeit, dieses Thema zu bearbeiten und die anregenden Diskussionen danken.

Ich danke allen Mitgliedern der Abteilung, aber ganz besonders Christian, Olli, Katja, Nils und Christine für die stete Hilfsbereitschaft und Diskussionfreudigkeit, Götz für die Einweisung in die Geheimnisse der FACS-Analysen und Gabor für die Geduld bei Blot-Interpretationen.

Außerdem danke ich Ella, Tilo, Thorsten, Steffi, Lars, Tini, Niko, Jorge und Friedemann für den Spaß den ich in der Zeit hatte.

Für die Hilfe beim Lay-out bedanke ich mich herzlich bei meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Tumorsuppressor p53	2
1.1.1	Geschichte.....	2
1.1.2	Struktur von p53.....	2
1.1.3	Bindungspartner von p53.....	4
1.1.4	p53 Funktion und dessen Regulation.....	5
1.1.5	p53 Mutationen.....	8
1.1.6	p53 Homologe.....	12
2	Problemstellung	13
3	Material	15
3.1	Chemikalien und Biochemikalien	15
3.1.1	Material für die Bakterienkultur.....	15
3.1.2	Material für die Mammaliazellkultur.....	15
3.1.3	Material für DNA-analytische Methoden.....	16
3.1.4	Material für proteinanalytische Methoden.....	16
3.1.5	Elektronische Geräte und EDV.....	17
3.2	Enzyme	17
3.3	Puffer und Lösungen	18
3.4	Bakterienstämme	20
3.5	Zelllinien	20
3.5.1	Mauszelllinien.....	20
3.5.2	Rattenzelllinien.....	20
3.5.3	Humane Zelllinien.....	21
3.5.4	Affenzelllinien.....	21
3.6	Antikörper	21
3.7	Nukleinsäuren	22

3.7.1	Plasmide.....	22
3.7.2	Oligonukleotide.....	23
4	Methoden	24
4.1	DNA-analytische Methoden	24
4.1.1	Bestimmung von DNA Konzentration.....	24
4.1.2	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	24
4.1.3	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	24
4.1.4	Elution von DNA Fragmenten aus Agarosegelen.....	25
4.1.5	Reinigung und Konzentrierung von DNA Lösungen.....	25
4.1.5.1	Phenolextraktion.....	25
4.1.5.2	Ethanol-fällung von DNA.....	26
4.1.6	Vorbereitung der DNA für die Ligation.....	26
4.1.7	Ligation von DNA Fragmenten.....	27
4.1.7.1	Vorbehandlung von nicht kompatiblen DNA Enden für die Ligation mit Hilfe von Oligonukleotiden.....	27
4.1.7.2	Behandlung überhängender DNA Enden mit T4 DNA Polymerase.....	27
4.1.7.3	Behandlung überhängender DNA Enden mit Klenow DNA Polymerase....	27
4.1.7.4	Ligation von DNA Fragmenten.....	28
4.1.8	Isolierung kleiner DNA Mengen durch Plasmid Minipräparation.....	28
4.1.9	Isolierung großer Mengen reiner DNA durch Plasmid Maxipräparation....	29
4.1.10	Isolierung von genomischer DNA aus Zellen.....	29
4.1.11	DNA Amplifikation durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	30
4.1.12	DNA Sequenzierung.....	30
4.1.13	Denaturierende DNA Sequenzgele.....	31
4.2	Proteinanalytische Methoden	32
4.2.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	32
4.2.2	Immunpräzipitation von Proteinen aus Gesamtzellysaten.....	32
4.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	33

4.2.4	Nachweis radioaktiv markierter Proteine durch Fluorographie.....	33
4.2.5	Nachweis von Proteinen im Western Blot.....	34
4.2.6	Detektion der Proteine mittels Chemolumineszenzreaktion (ECL).....	34
4.2.7	<i>In vitro</i> Transkription.....	35
4.2.8	<i>In vitro</i> Translation.....	35
4.3	Zellkulturtechniken	36
4.3.1	Bakterienzellkultur.....	36
4.3.1.1	Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen.....	36
4.3.1.2	Transformation von Bakterien mit Plasmid DNA.....	36
4.3.2	Mammaliazellkultur.....	36
4.3.2.1	Kultivierung von Zellen.....	36
4.3.2.2	Passagieren von Zellen.....	37
4.3.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	37
4.3.2.4	Ernte von eukaryontischen adhärennten Zellen.....	37
4.3.2.5	Erstellen von Wachstumskurven.....	38
4.3.2.6	DNA Transfektion in Säugetierzellen.....	38
4.3.2.6.1	Transfektion nach der Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode.....	38
4.3.2.6.2	Transfektion mit DOTAP Reagenz (Boehringer Mannheim).....	39
4.3.2.6.3	Transfektion mit Superfect (Qiagen).....	39
4.3.2.6.4	Transfektion mit dem "Mammalian Transfection Kit" (Stratagene).....	39
4.3.2.6.5	Transfektion mit Transfast (Promega).....	39
4.3.2.6.6	Kotransfektion von Zellen.....	39
4.3.3	Etablierung DNA-rekombinanter Zelllinien.....	40
4.3.4	Indirekte Immunfluoreszenz.....	40
4.3.5	Zellzyklusanalyse.....	41

5	Ergebnisse	43
5.1	Etablierung und Charakterisierung von 10-1 Zellen mit exogenem p53	43
5.1.1	Klonierung der p53 cDNAs und Überprüfung der Konstrukte.....	43
5.1.2	Transiente Transfektion von 10-1 Zellen mit den Vektorkonstrukten.....	47
5.1.3	Stabile Transfektion der 10-1 Zellen mit den p53 Konstrukten.....	48
5.1.4	PCR Analyse der mit p53 Konstrukten transfizierten 10-1 Zellen.....	49
5.1.5	Behandlung der mit p53 stabil transfizierten Zellen mit 5'-Aza-Cytidin.....	51
5.2	Etablierung und Charakterisierung von HeLa, Saos, TC7 und FR3 Zellen mit exogenem p53	52
5.2.1	Überprüfung der Zelllinien auf das Vorhandensein von p53, pRb und von SV40 T-Ag Proteinen.....	52
5.2.2	Transiente Transfektion von HeLa , Saos, TC7-17kT und FR3 Zellen mit den Vektorkonstrukten.....	54
5.2.3	Stabile Transfektion der HeLa und Saos Zellen.....	55
5.2.3.1	Charakterisierung der p53 exprimierenden Zelllinien und Nachweis des Proteins.....	55
5.2.3.2	Morphologie und Wachstumsverhalten in Zellkultur.....	56
5.2.3.3	Zellzyklusanalysen der etablierten Zelllinien.....	58
5.2.3.4	Bestimmung der p53 Lokalisation in den etablierten Zelllinien.....	58
5.2.4	Stabile Transfektion der FR3 Zellen.....	59
5.2.4.1	Etablierung und Charakterisierung der p53 exprimierenden FR3 Klone.....	60
5.2.4.2	Morphologie und Wachstumsverhalten in Zellkultur.....	61
5.2.4.3	Zellzyklusanalysen der FR3 Klone.....	62
5.2.4.4	Bestimmung der p53 Lokalisation in den FR3 Klonen.....	62
6	Diskussion	64
7	Zusammenfassung	72
8	Literaturverzeichnis	73

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Schematische Darstellung des humanen p53 Proteins
- Abbildung 2 Übersicht der verwendeten Plasmide
- Abbildung 3 Agarosegelelektrophorese der Plasmid DNA
- Abbildung 4 Agarosegelelektrophorese der aus der *in vitro* Transkription gewonnenen RNA
- Abbildung 5 Fluorographie der *in vitro* translatierten Proteine
- Abbildung 6 Immunfluoreszenzaufnahmen der mit p53 transient transfizierten 10-1 Zellen
- Abbildung 7 Western Blot Analyse von Gesamtzellysaten der stabil transfizierten 10-1 Zellen
- Abbildung 8 PCR Analyse der 10-1 Klone
- Abbildung 9 Immunfluoreszenzaufnahmen der mit 5'-Aza-Cytidin behandelten 10-1 Zellen
- Abbildung 10 Western Blot Analyse der pRb Expression der verschiedenen Zelllinien
- Abbildung 11 Western Blot Analyse der Expression der verschiedenen SV40 Tumorantigene
- Abbildung 12 Western Blot Analyse der p53 Expression der verschiedenen Zelllinien
- Abbildung 13 Immunfluoreszenzaufnahmen der mit p53 transient transfizierten Zellen
- Abbildung 14 A Western Blot Analyse der etablierten Hela Zelllinien mit den monoklonalen Antikörpern 240 und 248
- Abbildung 14 B Western Blot Analyse der etablierten Hela Zelllinien mit dem monoklonalen Antikörper 421
- Abbildung 15 Western Blot Analyse der etablierten Saos Zelllinien mit den monoklonalen Antikörpern 240 und 248
- Abbildung 16 A Wachstumskurven der etablierten Hela Zelllinien
- Abbildung 16 B Wachstumskurven der etablierten Saos Zelllinien
- Abbildung 17 Immunfluoreszenzaufnahmen zum Vergleich der p53 Lokalisation in transient und stabil transfizierten Saos Zellen
- Abbildung 18 Western Blot Analyse der FR3 Klone

-
- Abbildung 19 Wachstumskurven der etablierten FR3 Klone
- Abbildung 20 Immunfluoreszenzaufnahmen zum Vergleich der p53 Lokalisation in transient und stabil transfizierten FR3 Zellen

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Ursprungsvektoren der verwendeten murinen cDNAs, Ort der Mutationen, Mutationsereignis auf genetischer und auf Proteinebene, verwendete Restriktionsenzyme, sowie die Vektoren, in die die cDNAs kloniert wurden
Tabelle 2	Lokalisation des p53 Proteins in 10-1 Zellen
Tabelle 3	Etablierung der mit p53 transfizierten Zellklone
Tabelle 4	Lokalisation des p53 Proteins in den transient transfizierten Zellen
Tabelle 5	Zellzyklusanalyse der Hela und Saos Zellen
Tabelle 6	Lokalisation des p53 Proteins in den stabil transfizierten Zellen
Tabelle 7	Etablierung der mit p53 transfizierten FR3 Klone
Tabelle 8	Zellzyklusanalyse der FR3 Klone
Tabelle 9	Lokalisation des p53 Proteins in den stabil transfizierten FR3 Zellen

Abkürzungen

A	Adenin
A	Ampere
Ad	Adenovirus
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca	circa
cdk	Cyclin abhängige Kinase (cyclin dependent kinase)
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cip1	cdk Interaktionsprotein
cm	Zentimeter
dd	bidest
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DMEM	"Dulbecco's Modified Eagle's Medium"
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dnase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Mischung aus dATP, dCTP, dGTP, dTTP
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoldiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	Durchflußcytometer
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanit
G	Guanin
g	Gramm
h	Stunde
hCMV	humanes Cytomegalovirus
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
HPV	Humanes Papillomavirus
hsp70	Hitzeschockprotein 70
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobuline
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IP	Immunpräzipitation
k	Kilo
kb	Kilobasen
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LT	großes Tumorantigen von SV40 (Large T antigen)
μ	mikro
m	milli
m	Meter
M	molar
mdm2	"mouse double minute"2 (-Gen oder -Protein)
min	Minute
mRNA	"messenger" Ribonukleinsäure
mtp53	Mutanten-p53

MW	Molekulargewicht
n	nano
NP40	Nonidet P40
OD	optische Dichte
p	piko
PAS	Protein A-Sepharose
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Oxoniumionen-Konzentration
PPO	2,5-Diphenyloxazol
pRb	Retinoblastomagenprodukt
Pu	Purinbase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Py	Pyrimidinbase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPA	replication protein A
RT	Raumtemperatur
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
sek	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig
st	kleines Tumorantigen von SV40 (Small T antigen)
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin
T-Ag	Sammelbegriff für die SV40-Tumorantigene LT, st und 17kT
Taq	Thermus aquaticus
TBP	TATA box Bindeprotein
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylen-diamin
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tsp53	temperatursensitives p53
u	Einheit (Unit)
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumenanteil
v/v	Volumen pro Volumen
waf-1	"wtp53 activated fragment" 1
WB	"Western Blot"
wtp53	Wildtyp-p53
w/v	Gewicht pro Volumen
17kT	17kD-Tumorantigen von SV40

1 Einleitung

Tumorerkrankungen stellen die zweithäufigste Todesursache in den Ländern der westlichen Welt dar. Als Tumor, Geschwulst oder Neoplasie bezeichnet man die umschriebene Volumenzunahme eines Gewebes, unabhängig vom Grund der Entstehung. Die Dignität eines Tumors läßt sich anhand dieser Begriffe jedoch nicht ableiten.

Im engeren Sinne versteht man unter einem Tumor eine abnorme Gewebsmasse, die auf eine autonome, progressive und überschießende Proliferation körpereigener Zellen zurückgeht, sich weder strukturell noch funktionell in das Normalgewebe eingliedert und auch dann noch weiterwächst, wenn das auslösende Agens nicht mehr vorhanden ist (Riede/Schäfer, 1995).

Experimentell lassen sich Tumore durch chemische und physikalische Noxen und durch Infektion mit bestimmten Viren auslösen und stellen somit das Ergebnis einer fehlerhaften Reaktion auf eine solche Schädigungen dar.

Die meisten Tumore entstehen aus Zellen, in denen aufgrund somatischer Mutationen wachstumstimulierende Protoonkogene (gr. oncos: Tumor), oft auch Entwicklungskontrollgene inadäquat aktiviert werden. Eine andere Möglichkeit ist die Inaktivierung wachstumsinhibierender Tumorsuppressorgene, auch Antionkogene genannt, oder Differenzierungsgene durch Punktmutationen, Deletionen oder Aberrationen. Die meisten Tumoren leiten sich von einer Körperzelle ab und sind folglich monoklonal.

Die Tumorigenese und Proliferation eines malignen Tumors ist ein mehrstufiger Prozeß, in dessen Verlauf es zu einer Akkumulation von somatischen Mutationen in verschiedenen Genen kommt (Bishop, 1991); meist in Genen, die die Zellproliferation beeinflussen.

Protoonkogene und Tumorsuppressorgene spielen Schlüsselrollen in der Signaltransduktion, der Zelladhäsion, in der Zellzykluskontrolle, der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität und der Apoptose. Die strenge Kontrolle dieser Gene ist in Tumorzellen aufgehoben.

Protoonkogene werden normalerweise nur in Phasen embryologischer, regenerativer oder adaptiven Wachstums exprimiert. Die Mutation eines Protoonkogens kann zur Bildung von Onkoproteinen mit transformierendem Potential führen. Eine solche Mutation kann dominant eine Zelltransformation auslösen, eine Mutation eines Tumorsuppressors ist hingegen ein rezessiver Prozeß (Levine, 1993). Um zu einem tumorigenen Phänotyp zu führen, müssen hier in der Regel beide Allele eines Gens inaktiviert oder zumindest in ihrer Funktion beeinträchtigt sein.

Die Untersuchung von Tumorsuppressorproteinen ist sowohl zum besseren Verständnis von Regulationsmechanismen in der normalen Zelle, als auch zur Aufklärung der Vorgänge bei der Karzinogenese äußerst wichtig. Die Entwicklung neuer Therapie- strategien auf genetischer Ebene setzt ebenfalls eine genaue Kenntnis dieser Proteine voraus.

1.1 Der Tumorsuppressor p53

1.1.1 Geschichte

Die am besten untersuchten Tumorsuppressorproteine sind das Retinoblastomagen- produkt (pRb) und das p53 Protein.

Das Tumorsuppressorprotein p53 wurde 1979 in SV40-transformierten Zellen durch seine Komplexbildung mit dem großen Tumorantigen des SV40 Virus entdeckt (Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine 1979). Es ist ein Phosphoprotein, das in Vertebraten und Mollusken nachgewiesen werden konnte (Jenkins *et al.* , 1988; Soussy, 1996). p53 ist in mehr als 60% aller humanen Tumore mutiert, deletiert oder rearrangiert. Die Tumorsuppressorfunktion des p53 Proteins manifestiert sich auch beim Li-Fraumeni-Syndrom. Die hohe Anfälligkeit dieser Patienten in jungen Jahren Tumore zu entwickeln, konnte auf eine Mutation eines p53 Allels in der Keimbahn zurückgeführt werden (Malkin *et al.* , 1990). Die Patienten entwickeln frühzeitig Tumore, in denen auch das zweite p53 Allel funktionslos geworden ist. Der Verlust der Heterozygotität ist für Tumorsuppressoren typisch.

1.1.2 Struktur von p53

Das p53 Gen ist beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (Isobe *et al.* , 1986) lokalisiert, weist eine Größe von 20 kb auf und beinhaltet 11 Exons, wobei das erste nicht translatiert wird, jedoch scheint es eine wichtige Rolle bei der Regulation der Translation inne zu haben. Das p53 Gen kodiert für ein Protein von 393 Aminosäuren, welches einem Molekulargewicht von 43,5 kDa entspricht. In der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese läuft es auf der Höhe eines 53 kDa schweren Proteins, welches zur Namensgebung führte. Bei der Maus befindet sich das Gen auf dem Chromosom 11 (Czosnek *et al.* , 1984), hat eine Größe von 12,5 kb und kodiert für ein 390 Aminosäuren langes Protein.

In den bisher untersuchten Spezies weist das p53 Protein eine hohe Sequenzhomologie (bis zu 40% Übereinstimmung zwischen humanem und Xenopus p53) auf. Es verfügt außerdem über fünf hochkonservierte Abschnitte, die eine Sequenzhomologie von bis zu 90% zwischen den verschiedenen Spezies aufweisen (Soussi *et al.*, 1990).

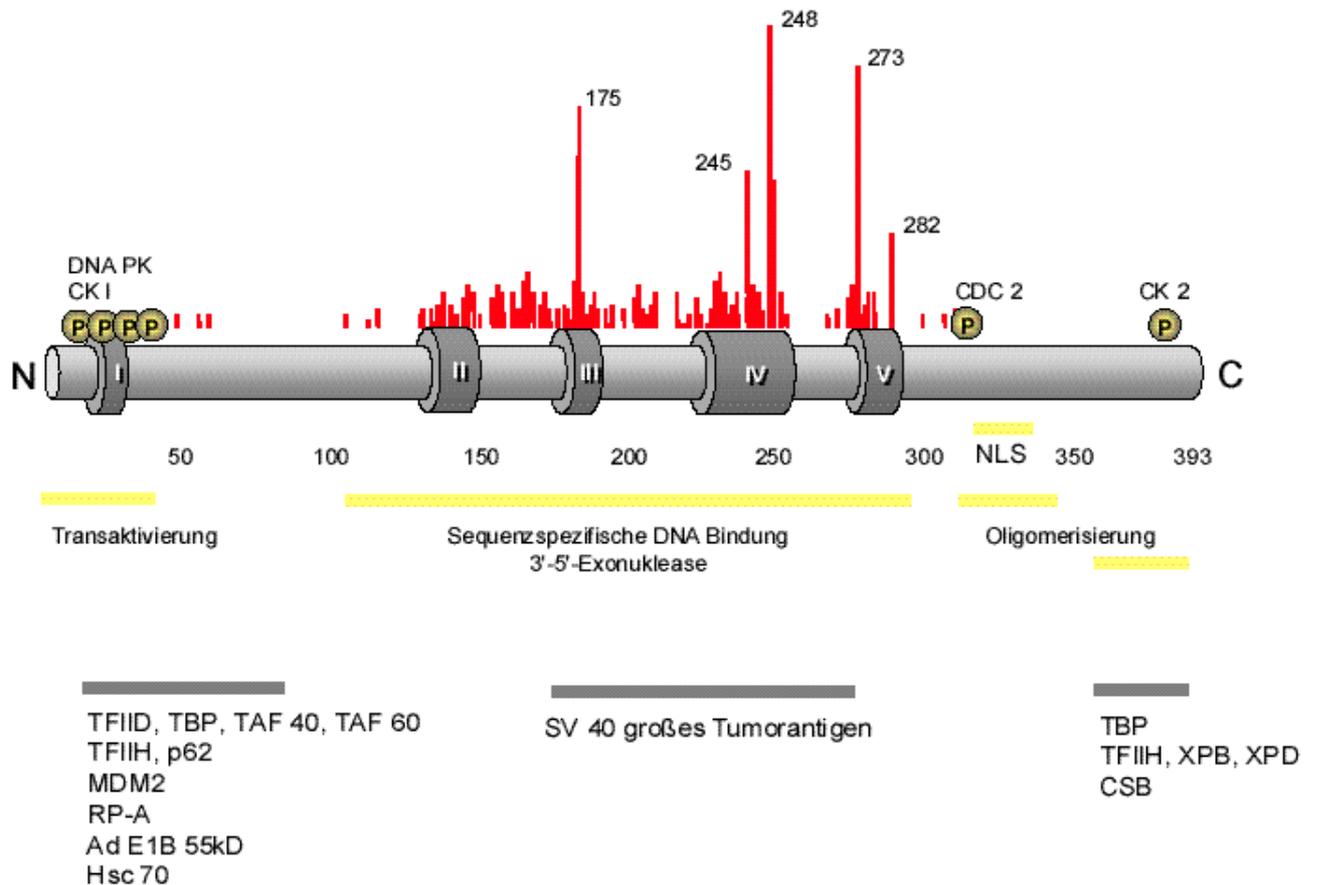


Abbildung 1 Schematische der strukturellen und funktionellen Domänen Darstellung des humanen p53 Proteins

I - V: evolutionär hochkonservierte Domänen des Proteins
 Vertikale Linien: in humanen Tumoren mutierte Aminosäurereste
 Numerierte Linien: Sogenannte "hot-spot" Mutationen
 P: Phosphorylierungsstellen des Proteins
 NLS: Kernlokalisationsignal.
 Die funktionellen Domänen sind unter dem Protein dargestellt. Ganz unten findet man die Bindungspartner des Proteins.
 Die Abbildung wurde freundlicherweise von N. Albrechtsen zur Verfügung gestellt und nachträglich verändert.

Das p53 Protein läßt sich biochemisch in drei Domänen einteilen.

Die ersten 42 N-terminalen Aminosäuren bilden die Transaktivator-domäne des Proteins, in dem sich eine Vielzahl von sauren Aminosäuren befinden. Über diese Domäne transaktiviert p53 spezifisch Zielgene, wie zum Beispiel *p21*, *mdm2* und *gadd 45*. Die hydrophobe, zentrale "Core"-Domäne erstreckt sich von der Aminosäure 102 bis 292, ist besonders prolinreich und beinhaltet vier der fünf hochkonservierten Domänen des Proteins. Dieser zentrale Bereich besteht aus zwei α -Helices und einer β -Faltblattstruktur und wird durch ein Zinkatom komplexiert (Cho *et al.*, 1994). Er ist für die korrekte Faltung des Proteins und somit auch für dessen Aktivität verantwortlich, zu der die sequenzspezifische DNA Bindung gehört.

Ein Vergleich der verschiedenen p53 Konsensussequenzen ergab, daß diese teilweise nur sehr geringe Homologien aufweisen. Als sehr allgemeines Konsensusmotiv für die sequenzspezifische DNA Bindung von Wildtyp p53 konnte die Sequenz mit der Nukleotidfolge PuPuPuC (A/T)(T/A)GPyPyPy -0-13bp-PuPuPuC (A/T)(T/A)GPyPyPy identifiziert werden (El Deiry *et al.*, 1992; Funk *et al.*, 1992). Der palindrome Charakter der Konsensussequenz läßt vermuten, daß nicht primär die Sequenz, sondern die Sekundärstruktur der DNA in der Promoterregion das Bindemotiv für p53 ist. So bindet es an Konsensusmotive die in der Doppelhelixform vorliegen, sowie an Nicht B-DNA Strukturen (Kim *et al.*, 1997).

Des Weiteren übt die "Core"-Domäne die enzymatische Aktivität der 3'-5'-Exonuklease aus (Mummenbrauer *et al.*, 1996), die unter verschiedenen Bedingungen gegensätzlich zur sequenzspezifischen DNA Bindung reguliert wird (Janus *et al.*, 1999).

Der basische C-Terminus umfaßt die Aminosäuren 293 bis 393 und beinhaltet die unspezifischen DNA und RNA Bindungsregionen (Foord *et al.*, 1991; Oberosler *et al.*, 1993; Steinmeyer and Deppert, 1988), die drei Kernlokalisierungssignale (Shaulsky *et al.*, 1990), sowie die DNA/RNA Rehybridisierungsdomäne (Bakalkin *et al.*, 1994). p53 liegt als Homotetramer in der Zelle vor. Für dessen Oligomerisierung werden die Aminosäuren 324-355 benötigt. Die letzten 30 Aminosäuren besitzen negativ regulatorische Eigenschaften auf die sequenzspezifische DNA Bindung der "Core"-Domäne (Hupp *et al.*, 1993).

1.1.3 Bindungspartner von p53

Zu den zellulären Bindungspartnern von p53 gehört das Onkoprotein mdm2 (mouse double minute) (Otto und Deppert, 1993; Fakharzadeh *et al.*, 1991; Barak and Oren, 1992; Juven *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1993). Durch seine Bindung an den N-Terminus von p53 (Brown *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1993; Picksley *et al.*, 1994) schaltet es

dessen Transaktivatorfunktion aus (Momand *et al.*, 1992) und führt p53 der extrem schnellen Degradation durch den ubiquitinabhängigen Abbauweg der Proteasomen zu. Da p53 seinerseits mdm2 transaktiviert, handelt es sich um einen negativen Rückkopplungsmechanismus. Die Art der Interaktion zwischen p53 und mdm2, sowie Modifikationen, wie z.B. der Phosphorylierungsstatus sind für die Stabilität von p53 in der Zelle verantwortlich (Vousden *et al.*, 1998). Auf diese Weise kann eine Überexpression von mdm2 eine tumorogene Entwicklung bewirken.

Das p53 Protein komplexiert mit einer Reihe viraler Proteine. Das 55kDa/E1B Protein der Adenoviren (Sarnow *et al.*, 1982), das X-Protein des Hepatitis B Virus (Truant *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1994), die Epstein-Barr-Virus Proteine EBNA-5 und BZLF1 (Szekely *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1994) und das große Tumorentigen (LT) des Simian Virus 40 (SV40) binden an das p53 Protein und führen so zur Ausbildung von funktionell inaktiven Tetrameren. LT schaltet weiterhin die Transaktivatorfunktion von p53 (Segawa *et al.*, 1993) und die Exonukleaseaktivität (Janus *et al.*, 1999) aus. Bei den humanen Papillomaviren 16 und 18 komplexiert das E6 Protein mit p53 (Werness *et al.*, 1990) und leitet über eine trimere Komplexbildung mit dem zellulären Protein E6-AP seine ubiquitinabhängige Proteolyse ein, wodurch p53 in den Zellen nicht mehr akkumulieren kann (Li and Coffino, 1996).

1.1.4 p53 Funktion und dessen Regulation

p53 "knock-out" Mäuse können sich zwar entwickeln, zeigen aber Aberrationen in der Embryonalentwicklung (Armstrong *et al.*, 1995; Sah *et al.*, 1995). Wildtyp p53 transaktiviert spezifisch die Genexpression verschiedener Gene (s.o.). *thyl*, ein in T-Lymphozyten und im Gehirn exprimiertes Differenzierungsgen trägt ein p53-responsives Element (Zambetti and Levine, 1993). Nach der Modellvorstellung von Zambetti und Levine wird die Genexpression von p53 responsiven Elementen tragenden Genen positiv beeinflusst; von Genen, die kein derartiges Element aufweisen, wird sie hingegen reprimiert. Nach dieser Vorstellung wären die vorwiegend reprimierten Gene wachstumsfördernd, die aktivierten Gene an Differenzierung und Wachstumsarrest beteiligt.

Wildtyp p53 Protein wird von normalen Zellen nur in sehr geringen Mengen von 1000 bis 10000 Molekülen pro Zelle exprimiert (Oren, 1981; Patschinsky and Deppert, 1990), die Halbwertszeit des Proteins beträgt 5 bis 20 min. Beim Übergang von der G1 in die S Phase ist die p53 mRNA Expression maximal (Reich and Levine, 1984; Rogel, et al 1985), die p53 Proteinexpression erreicht hingegen direkt in der S Phase

ihr Maximum (Mosner and Deppert, 1994).

p53 ist direkt an der DNA Rekombination, Replikation und Reparatur beteiligt. So interagiert es beispielsweise mit der DNA Polymerase *in vitro* (Kuhn *et al.*, 1999) und *in vivo* (Dornreiter, persönliche Mitteilung), einem Protein, das die DNA Synthese am diskontinuierlichen Strang katalysiert. Von DNA Polymerasen eingebaute nicht komplementäre Basen werden von Exonukleasen wieder abgebaut. Im Gegensatz zu den DNA Polymerasen α und β , die eine intrinsische Exonukleaseaktivität aufweisen, besitzen die DNA Polymerasen γ und δ keine derartige Aktivität (Wang *et al.*, 1991). Die Exonukleaseaktivität von p53 könnte hier eine entscheidende Rolle als "Proof-reader" spielen (Janus *et al.*, 1999). Des Weiteren erkennt und bindet p53 DNA Bruchstellen und Basenfehlpaarungen (Lee *et al.*, 1995; Reed *et al.*, 1995), wobei es für verschiedene Fehlpaarungen unterschiedliche Affinität aufweist (Dudenhöffer *et al.*, 1998). Es wurde außerdem gezeigt, daß das Fehlen von p53 die zelluläre DNA Reparatur beeinträchtigt (Ford and Hanawalt, 1995; Havre *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1995). Die homologe DNA Rekombination wird durch p53 inhibiert (Wiesmüller *et al.*, 1996).

Nach zellulären Stresssituationen, wie z.B. UV- oder γ -Strahlung, Hypoxie, Nukleotidmangel oder Behandlung mit anderen genotoxischen Agentien steigt die Wildtyp p53 Expression im Zellkern deutlich an (Kastan *et al.*, 1989; Fritsche *et al.*, 1993; Livingstone *et al.*, 1992). Dies führt zu einem Wachstumsarrest der Zelle in der G1 Phase des Zellzyklus. Je nach Ausmaß der Schädigung wird die DNA repariert oder der programmierte Zelltod, die Apoptose, wird eingeleitet. Durch diesen Schutzmechanismus wird die Weitergabe von geschädigter DNA auf die Tochterzellen verhindert. Diesen Eigenschaften verdankt p53 die Bezeichnung "Wächter des Genoms" (Lane, 1992).

Ob es nach DNA Schädigung letztlich zur Apoptose oder zum Zellzyklusarrest kommt, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Der p53 Menge kommt dabei eine entscheidene Bedeutung zu. Eine hohe p53 Expression führt Zellen in die Apoptose, wohingegen ein antiapoptotischer Effekt von geringen Mengen an Wildtyp p53 in nicht transformierten, immortalisierten Mausfibroblasten gezeigt werden konnte (Lassus *et al.*, 1996). Ferner scheinen der zelluläre Hintergrund und exogene Stimuli, wie z.B. das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren diesen Prozeß zu beeinflussen (Canman *et al.*, 1995; Haupt *et al.*, 1996; Midgley *et al.*, 1995; Yonish-Rouach *et al.*, 1991; Yonish-Rouach *et al.*, 1993).

Die Akkumulation von p53 führt zu einer Transaktivierung des cdk ("Cyclin-Depen-

dent-Kinase") Inhibitors p21^{Waf1/Cip1} (El-Deiry *et al.*, 1993; Harper *et al.*, 1993; Xiong *et al.*, 1993), welcher durch direkte Bindung u.a. an Cyclin D/cdk 4 und Cyclin E/cdk2 die Phosphorylierung von pRb verhindert (Dowdy *et al.*, 1993; Ewen *et al.*, 1993; Hinds *et al.*, 1992). Das 105 kDa große nukleäre Phosphoprotein Rb bindet im aktiven, dephosphorylierten Zustand an den Transkriptionsfaktor E2F. Dieser bindet in freier Form, also nicht in Verbindung mit Rb, an Promotoren der Thymidinkinase, Dihydrofolatreduktase, DNAPol, cdc 2-Kinase und PCNA ("Proliferating Cell Nuclear Antigen"), deren Genprodukte für den Eintritt in die S Phase benötigt werden. Es kommt also über diesen Weg zu einem p53 abhängigen Zellzyklusarrest in der G1 Phase. PCNA, der auxilliäre Faktor der DNA Polymerase, wird auch direkt durch p21^{Waf1/Cip1} komplexiert, wodurch es zu einer Inhibition der PCNA abhängigen DNA Replikation kommt (Waga *et al.*, 1994). Die PCNA abhängige DNA Reparatur (Li *et al.*, 1994) bleibt hingegen unbeeinflusst. Parallel zur Transaktivierung von p21^{Waf1/Cip1} wird das p22/PRG1 Gen transaktiviert, dessen genaue Funktion noch nicht ausreichend geklärt ist (Schäfer *et al.*, 1998).

Außerdem transaktiviert p53 das GADD45 ("Growth Arrest DNA Damage"45)-Gen, für dessen Genprodukt eine Beteiligung an der Exzisionsreparatur geschädigter DNA gezeigt wurde (Kastan *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1994). Es ist ebenfalls in der Lage, über Inhibition von PCNA den Zellzyklus in G1 anzuhalten.

Durch die transkriptionelle Aktivierung von 14-3-3 (Hermeking *et al.*, 1997), welches vermutlich die Phosphorylierung von CDC 2 durch Inhibition dessen Phosphatase verhindert (Muslin *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 1997), ist p53 in der Lage den Zellzyklus am G2/M Übergang anzuhalten (Agarwal *et al.*, 1995; Paules *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 1997; Stewart *et al.*, 1995). Auch in der Meiose kann p53 als "checkpoint" wirken (Cross *et al.*, 1995).

p53 ist des weiteren in der Lage, nach dessen Akkumulation die Zelle in die Apoptose zu führen (Clarke *et al.*, 1993; Lowe *et al.*, 1993; Ryan *et al.*, 1993; Shaw *et al.*, 1992; Yonish-Rouach *et al.*, 1991). Dies geschieht durch die Erhöhung der Expression des Apoptose stimulierenden Faktors Bax, einem dominant-negativen Inhibitor von Bcl-2, einem Apoptoseinhibitor (Miyashita *et al.*, 1994; Miyashita and Reed, 1995). p53 kann auch direkt die Transkription von Bcl2 reprimieren (White, 1996). Die Überexpression von Bcl-2 und Adenovirus E1B 19K kann die p53 induzierte Apoptose verhindern (Sabbatini *et al.*, 1995). Ferner ist p53 in der Lage, über einen nicht transkriptionsabhängigen Mechanismus die Zellen in die Apoptose zu führen (Haupt *et al.*, 1995).

1.1.5 p53 Mutationen

Mutationen von p53 führen zu Funktionsänderungen ("gain of function") oder zu dessen Inaktivierung ("loss of function"). Am häufigsten kommt es zu "missense" Punktmutationen, die in über 250 Codons nachgewiesen werden konnten. In dieser Hinsicht unterscheidet sich p53 maßgeblich von anderen Tumorsuppressorgenen, wie *Rb*, *APC* und *p16^{MTS-1}*, die hauptsächlich durch Deletion oder "nonsense" Mutationen inaktiviert werden oder von Onkogenen der *ras* Familie, wo Mutationen nur in einer kleinen Anzahl von Codons nachgewiesen werden konnten (Hainaut *et al.*, 1998). Die meisten Mutationen im p53 Gen sind in den evolutionär hochkonservierten Regionen II - V zu finden (Caron de Fromentel and Soussi, 1992; Hollstein *et al.*, 1991; Soussi *et al.*, 1994). Einige treten besonders häufig auf; man bezeichnet sie als "hot spot" Mutationen (Levine *et al.*, 1991) (siehe auch Abbildung 1). Die von diesen Mutationen betroffenen Aminosäuren, sind an der direkten Interaktion von p53 mit der DNA beteiligt.

Neben diesen DNA Bindungsmutanten gibt es sogenannte Konformationsmutanten, deren veränderte Aminosäuresequenz eine Änderung der Tertiärstruktur des p53 Proteins zur Folge hat. Dieses nimmt die sogenannte Mutantenkonformation an, welches sich in einer veränderten Reaktivität mit p53 spezifischen monoklonalen Antikörpern äußert; so exponiert Mutanten p53 das PAb 240 Epitop, welches in der wt Konformation im nativen Protein nicht zugänglich ist. Die Antikörper PAb 246 und 1620 erkennen ein zusammengesetztes Epitop von wt p53, das in der Mutantenkonformation und denaturierten Proteinen verloren geht (Milner *et al.*, 1993).

Die Veränderung der Tertiärstruktur von p53 führt zu einer Veränderung der biologischen Eigenschaften, die von der Lage der Mutation abhängen.

Die meisten Punktmutationen führen zu einem Verlust der Fähigkeit, sequenzspezifisch DNA zu binden (Bargonetti *et al.*, 1992; El-Deiry *et al.*, 1992; Kern *et al.*, 1991). Die sequenzspezifische Transaktivatorfunktion des Proteins wird dadurch aufgehoben (Kern *et al.*, 1991; Schärer and Iggo, 1992; Farmer *et al.*, 1992), welches den Verlust der tumorsupprimierenden Wirkung von p53 zur Folge hat (Pietenpol *et al.*, 1994). Einige Mutanten inaktivieren auch direkt die Transaktivatorfunktion des N-Terminus (Raycroft *et al.*, 1990; Fields and Jang, 1990), bei anderen ist die unspezifische DNA Bindungsaktivität verändert (Kern *et al.*, 1991). Der Verlust der Transaktivatorfunktion des Proteins scheint bei neoplastischen und präneoplastischen Zellen einen Selektionsvorteil zu bieten (Hainaut *et al.*, 1998).

Mutanten p53 zeichnet sich durch eine deutlich verlängerte Halbwertszeit aus (Finlay *et al.*, 1988; Hinds *et al.*, 1990; Iggo *et al.*, 1990). Da Mutanten p53 (mtp53) nicht in

der Lage ist, das *mdm2*-Gen zu transaktivieren, unterbleibt vermutlich seine Degradation (Lane and Hall, 1997). Die 3'-5'-Exonukleaseaktivität wird durch Mutationen an "hot spot" Positionen ebenfalls aufgehoben (Mummenbrauer *et al.*, 1996).

Die promotorreprimierende Funktion von Wildtyp p53 ist im Mutanten Protein oftmals eliminiert (Santhanam *et al.*, 1991; Subler *et al.*, 1992; Lechner *et al.*, 1992). So kann Mutanten p53 z.B. nicht an Transkriptionsfaktoren wie TBP binden (Seto *et al.*, 1992).

In zellulären Systemen zeichnet sich Mutanten p53 durch einen Verlust der wachstumshemmenden und tumorsupprimierenden Eigenschaften aus. Es ist nicht in der Lage, das Wachstum von Tumorzellen durch G1 Arrest zu supprimieren (Baker *et al.*, 1990; Diller *et al.*, 1990). Ebensowenig revertiert es den tumorigenen Phänotyp von Tumorzellen (Chen *et al.*, 1990; Mercer *et al.*, 1990) oder inhibiert die Immortalisierung oder Transformation von primären Fibroblasten durch zelluläre oder virale Onkogene, wie z.B. *myc* oder Adenovirus E1A (Eliyahu *et al.*, 1989; Finlay *et al.*, 1989). Mutanten p53, das mit Wildtyp p53 koexprimiert wird, kann die wachstums- und tumorsupprimierende Wirkung des Wildtypproteins inhibieren. Man hat diese Mutanten deswegen als dominant-negativ bezeichnet und ihnen die Fähigkeit zugeschrieben, mit Wildtyp p53 heterooligomere Komplexe bilden zu können, die tumorsuppressions-inaktiv sind (Milner and Medcalf, 1991; Milner *et al.*, 1991).

Über die Inaktivierung der Tumorsuppressorfunktion oder Transdominanz von Mutanten p53 lassen sich dessen Auswirkung auf Zellwachstum, Transformation und Tumorigenität nicht hinreichend erklären.

Transfektionsexperimente von Mutanten p53 in Wildtyp p53 exprimierenden Zelllinien lieferten erste Hinweise auf die Existenz von intrinsischen, aktiv onkogenen Eigenschaften der Mutanten.

Diese zeigten eine Steigerung der Tumorigenität (Shaulsky *et al.*, 1991) und ein erhöhtes Metastasierungspotential durch die Expression von Mutanten p53 (Pohl *et al.*, 1988).

Eindeutige Beweise lieferten Transfektionsexperimente in p53 negativen Zelllinien: L12 Zellen, eine schwach tumorigene Zelllinie, bei der sich im Tier anfänglich gebildete Tumore schnell zurückbildeten (Wolf *et al.*, 1984; Shaulsky *et al.*, 1991a und 1991b), zeigen nach Transfektion mit Mutanten p53 stark tumorigene Eigenschaften und entwickeln im Tier aggressive, letale Tumore (Shaulsky *et al.*, 1991). Diese Experimente zeigen, daß p53 gegenüber dem Wildtyp an Funktion gewonnen hat. Diese Eigenschaft wird auch als "gain of function" bezeichnet. Das durch Mutation verän-

derte Protein verschafft den Zellen anscheinend einen Wachstumsvorteil, der auf den Erwerb zusätzlicher wachstumsfördernder Eigenschaften zurückgeführt werden muß (Levine *et al.* , 1991; Hollstein *et al.* , 1991).

Mutanten p53 ist in der Lage das *mdr1* ("multidrug resistance")-Gen (Dittmer *et al.* , 1993; Strauss *et al.* , 1995), das Tumorzellen eine Resistenz gegenüber diversen Zytostatika vermittelt, zu transaktivieren. Des weiteren transaktiviert es den PCNA ("proliferating cell nuclear antigen")-Promotor (Deb *et al.* , 1992) und das Gen für VEGF ("vascular endothelial growth factor") (Kieser *et al.* , 1994), das eine wichtige Rolle bei der Neoangiogenese spielt.

Mutanten p53 komplexiert mit dem zellulären Hitzeschockprotein Hsp70 (Clarke *et al.* , 1988; Finlay *et al.* , 1988; Hinds *et al.* , 1987; Stürzbecher *et al.* , 1987). Die Expression des ATP Bindeproteins Hsp70 wird in der Zelle nach Hitzeschock, aber auch nach viraler Infektion eingeleitet (Kandijan und Turler, 1983). Die Lokalisation des Proteins, das sich während der S Phase im Zellkern befindet, ist zellzyklusreguliert. Bei Hsp70 handelt es sich um ein sogenanntes Chaperon, also einem zellulären Proteinfaltungskatalysator. Chaperone sind am Proteintransport durch Membranen, der Proteolyse von abnorm gefalteten Proteinen und an der Auflösung von Proteinkomplexen in der Zelle beteiligt (Hartl, 1996). Hier ist noch nicht vollständig geklärt, ob es sich um einen Funktionsgewinn von Mutanten p53 handelt, oder ob diese Komplexbildung eine Reaktion der Zelle auf ein abnorm gefaltetes p53 Protein ist.

Eine weitere Funktion von Mutanten p53 ist die spezifische Bindung an MAR ("matrix attachment region")-Elemente der DNA (Mueller *et al.* , 1996; Weißker *et al.* , 1992; Will *et al.* , 1998).

MAR-Elemente sind zwischen 250 und 3000 bp lange kernmatrixassoziierte DNA Fragmente. Sie haben einige konservierte Eigenschaften und sind in vielen Genen unterschiedlicher Spezies charakterisiert worden (Übersicht in Phi-Van *et al.* , 1990). Sie zeichnen sich durch das häufige Vorkommen von AT-Basenpaaren, insbesondere von längeren ununterbrochenen oligo-(dA) oder oligo-(dT)-Folgen ("clusters") aus (Gasser und Laemmli, 1986). Ferner besitzen sie überdurchschnittlich häufig Erkennungsmotive für ARS ("Autonom Replizierende Sequenzen") und für die Topoisomerase II. Der genaue Mechanismus für die Wechselwirkung zwischen den Proteinen der Kernmatrix und den MAR-Elementen ist noch unklar. Es konnte keine gemeinsame Konsensussequenz nachgewiesen werden, obwohl MAR-Elemente von der Kernmatrix speziesüberschreitend erkannt werden (Cockerill und Garrard, 1986). Ein Einfluß auf die Genexpression wird impliziert, da MAR-Elemente häufig in den Grenzen von aktiven Chromatindomänen, insbesondere in direkter Nähe von regulatorischen Elemen-

ten, wie zum Beispiel Promotoren oder "Enhancern" liegen (Gasser und Laemmli, 1986). Ebenfalls wird eine Funktion der MAR-Elemente bei der Initiation der DNA Replikation und bei Vorgängen der Rekombination und DNA Reparatur postuliert (Mullenders et al, 1988; Mironov, 1987).

Für Mutanten p53 aus Meth A-, T3T3- und 3t3tx-Zelllinien konnte gezeigt werden, daß sie MAR-DNA Elemente spezifisch binden, wobei die Affinität zu diesen Sequenzen um ein Vielfaches höher war als die von Wildtyp p53 (Will et al, 1998). Aufgrund der Tatsache, daß diese Elemente eine wichtige regulatorische Funktion bei der Genexpression besitzen (Bode and Maaß, 1988), könnte diese Eigenschaft von Mutanten p53 eine molekulare Basis für die spezifische Transaktivierung von anderen Genen und damit für einen Funktionsgewinn sein.

Die Vielfalt der p53 Mutationen ist sowohl von ätiopathologischer, als auch von diagnostischer Bedeutung:

Die Art der p53 Mutation kann in einigen Fällen Hinweise auf das Mutagen liefern, da einige Mutagene die p53 DNA in charakteristischer Weise schädigen. So kommt es in bis zu 80% der Fälle bei hepatozellulären Karzinomen nach hoher Aflatoxin Exposition oder Infektion mit dem Hepatitis B Virus in Codon 249 zu einem Basenaustausch von G zu T. Auch UV Licht und Vinylchloridexposition führen zu charakteristischen Basenaustauschen, die allerdings nicht codonspezifisch sind. Die Mutationen in Karzinomgeweben der Lunge zeigten bei Rauchern ein völlig anderes Bild als bei Nichtrauchern. Hier scheint dem Benzpyren eine wichtige Rolle als Mutagen zuzukommen.

Einige Mutationen sind auch gewebespezifisch. In Colon- und Mammakarzinomen konnten fast ausschließlich Basenaustausche von C nach T in den Codons 248 und 273 nachgewiesen werden. Diese Spezifität kann in einigen Fällen bei Metastasen unbekannter Herkunft Hinweise auf den Primärtumor liefern (Übersicht in Hainaut *et al.*, 1998).

Das Vorhandensein und die Art der p53 Mutation ist auch von prognostischer Bedeutung. Verschiedene Studien konnten zeigen, daß der Hauptmechanismus der Radio- und Chemotherapie die Induktion von Apoptose in den Krebszellen ist. So ist das Ansprechen von Tumoren auf die gewählte Therapie äußerst variabel, je nachdem, ob und an welcher Stelle der Tumor eine p53 Mutation trägt. Mammakarzinome sprechen beispielsweise sehr schlecht auf eine Doxorubicinbehandlung an, wenn sie eine Mutation im Codon 248 aufweisen.

Patienten mit Colonkarzinomen, die eine Mutation im Codon 248 besaßen, hatten eine wesentlich schlechtere Fünf-Jahres-Überlebensrate als Patienten mit Mutationen in anderen Codons (Übersicht in Hainaut *et al.*, 1998).

30% der Krebspatienten weisen Antikörper gegen p53 im Serum auf (Lubin et al, 1995). Das Vorhandensein solcher Antikörper bei gesunden Patienten könnte klinische Relevanz haben. Hier sind allerdings noch weitere Studien nötig.

1.1.6 p53 Homologe

Eine ähnliche Funktion wie p53 erfüllen auch andere Gene der sogenannten "p53 Familie". p73, ein dem p53 strukturell und funktionell sehr ähnliches Protein, ist in der Lage, p53 Zielgene zu transaktivieren. Die Proteine weisen jedoch einige Unterschiede auf: Die p73 Expression ist nur in neuroepithelialen Geweben nachweisbar, wohingegen p53 in fast allen Geweben nachweisbar ist. p73 ^{-/-} Mäuse weisen schwere Defizite bezüglich ihrer neuronalen und immunologischen Entwicklung auf, ferner in ihrem Verhalten. Im Gegensatz zu p53-negativen Mäusen entwickeln sie aber keine spontanen Tumore während der Embryonalentwicklung (Caput, 1998). p73 ist in der Lage, sowohl in p53-positiven, als auch p53-negativen Tumorzellen Apoptose zu induzieren. Im Gegensatz zu p53 wird es nicht durch DNA Schädigung transaktiviert (Kaelin et al, 1998). Diese Ergebnisse implizieren eine grundlegende Bedeutung von p73 in der Zellzykluskontrolle.

Das KET Protein weist starke Ähnlichkeit zu p53 und zu p73 auf, vor allem in den evolutionär hochkonservierten Regionen II, III, IV und V, welche für die sequenzspezifische DNA Bindung des Proteins verantwortlich sind. Mit einer Ausnahme sind alle DNA Bindungsregionen von p53 auch in KET zu finden. Die Funktion von KET ist noch nicht geklärt, es scheint aber eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Differenzierung von Säugetierzellen zu besitzen (Bamberger, 1998).

2 Problemstellung

Mechanismen der Krebsentstehung stehen im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses der experimentellen Krebsforschung. Die Kenntnis der molekularen Grundlagen stellt für die Entwicklung neuer Therapiekonzepte eine wesentliche Voraussetzung dar.

Die Mutation des Tumorsuppressorgens p53 ist ein entscheidender Faktor in der Karzinogenese. Mutanten p53 ist nicht mehr in der Lage, die tumorsuppressiven Eigenschaften des Proteins zu erfüllen. Die Bewahrung der genomischen Integrität durch Induktion eines Zellzyklus-Arrests (Kastan *et al.*, 1995) oder Einleitung der Apoptose (Strasser *et al.*, 1994) ist hier nicht mehr gegeben. Verschiedene Mutationen zeichnen sich zudem noch durch einen Funktionsgewinn ("Gain of function") aus. Die Auswirkungen der verschiedenen Mutationen des Gens zeigen erhebliche Unterschiede, die wiederum von Zelllinie zu Zelllinie variieren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ausgewählte p53 Mutationen im gleichen zellulären System zu vergleichen. Hierzu sollten Wachstumskurven erstellt und morphologische Unterschiede herausgearbeitet werden. Ferner sollte das Verhalten der Klone im Softagar und bei Entzug des fötalen Kälberserums aus dem Nährmedium untersucht werden. Die Auswirkungen auf den Zellzyklus, wie zum Beispiel Zellzyklusarrest und Induktion von Apoptose sollten mit Hilfe der FACS-Analyse untersucht werden. Des Weiteren war die Lokalisation von p53 von Interesse, da diese einen entscheidenden Einfluß auf dessen Funktion hat. In normal proliferierenden Zellen wird die Expression und subzelluläre Verteilung von p53 zellzyklusabhängig reguliert. Während der G1 Phase befindet sich p53 im Cytoplasma und wird zu Beginn der S Phase in den Zellkern zurücktransportiert (Shaulsky *et al.*, 1990). Möglicherweise ist hierfür eine cytoplasmatische Verankerung durch das Intermediärfilament Vimentin verantwortlich (Klotzsche *et al.*, 1998). Dies deutet auf einen genau regulierten Kerntransport und somit eine Steuerung für p53 hin (Shaulsky *et al.*, 1990). Die Untersuchung der Lokalisation von p53 mittels Immunfluoreszenz läßt folglich Rückschlüsse auf die Aktivität der jeweiligen Mutationen zu, denn sowohl die onkogenen Eigenschaften von Mutanten p53, als auch die tumorsuppressive Eigenschaft von Wildtyp p53 erfordern eine nukleäre Lokalisation des Proteins (Shaulsky *et al.*, 1991).

Die zu vergleichenden p53 Mutationen sollten in einen geeignet erscheinenden neuen Vektor kloniert werden, um Unterschiede auszuschließen, die durch die Ursprungsvektoren bedingt sein könnten. Diese Konstrukte sollten zunächst transient und später stabil in eine Zelllinie, die selbst kein p53 exprimiert, transfiziert werden. 10-1 Zellen,

eine Mausembryo-Fibroblasten-Zelllinie mit Deletionen in beiden p53 Allelen schien geeignet für diese Fragestellung zu sein.

3 Material

3.1 Chemikalien und Biochemikalien

In dieser Arbeit wurden Chemikalien der Firmen Fluka (Buchs), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) in Analysenqualität verwendet. Außerdem wurden Feinchemikalien und Materialien von folgenden Herstellern bezogen.

Produkt

Hersteller

3.1.1 Material für die Bakterienkultur

Bacto-Trypton	Difco Laboratories, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories, USA
Bacto-Agar	Difco Laboratories, USA

3.1.2 Material für die Mammaliazellkultur

Steriles, pyrogenfreies Wasser	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
"Dulbeccos modified Eagle Medium"	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
fötales Kälberserum (FCS)	Boehringer, Mannheim
100x Glutamin	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Trypsin	PAA, Cölbe
Penicillin	PAA, Cölbe
Streptomycin	PAA, Cölbe
DOTAP Transfektions Reagenz	Boehringer, Mannheim
Lipofectamine™ Reagent	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Superfect Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Mammalian Transfection Kit	Stratagene, Heidelberg
Transfast Transfection Reagent	Promega, Madison, USA
Hygromycin	Boehringer, Mannheim
G418	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein

3.1.3 Material für DNA-analytische Methoden

Chill-Out 14 TM Liquid Wax (PCR)	Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf
0,07 - 12,2 kb DNA-Marker	Boehringer, Mannheim
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Agarose	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Nucleobond-AX100, AX500, AX2000	Macherey & Nagel, Düren
Oligonukleotide	MWG Biotech, Ebersberg
BSA	New England Biolabs, Schwalbach
Kilobase, DNA-Marker	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg/Breisgau
T7 Polymerase Sequenzierkit	Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg/Breisgau
Rapid DNA Ligation Kit	Boehringer, Mannheim
Kaninchenretikulozytenlysat	Promega, Madison, USA
<i>in vitro</i> Transkriptionskit	Promega, Madison, USA
Gene-Clean II Kit	Dianova, Hamburg
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Sequenzierkit	USB
dNTPs	USB

3.1.4 Material für Protein-analytische Methoden

Gene-Clean Kit	BioRad Laboratories, München
Trasyol	Bayer, Leverkusen
Pepstatin A	Biomol, Hamburg
Leupeptin	Boehringer, Mannheim
Biorad Protein Assay	BioRad Laboratories, München
Biorad Protein Marker	BioRad Laboratories, München
Gene-Clean® Kit	BioRad Laboratories, München
Tran ³⁵ SLabel (35-S-Methionin/Cystein)	ICN, Meckenheim
BCA Protein Assay Reagent	Pierce, Weiskirchen
Protein A-Sepharose	Pharmacia Biotech Europe, Freiburg/Breisgau
Hybond-C Nitrozellulosemembran (0,45 mm)	Amersham Buchler, Braunschweig
Immobilon-P Membran	Millipore, Eschborn
Milchpulver	Wulf Reformhäuser, Hamburg

Ziege-anti-Maus IgG (H+L), konjugiert mit Peroxidase	BioRad Laboratories, München
Ziege-anti-Maus-Antikörper, biotinyliert Super Signal ULTRA	Amersham Buchler, Braunschweig Pierce, Weiskirchen

3.1.5 Elektronische Geräte und EDV

Geldokumentationsanlage	Intas, Göttingen
Vertikal Sequenzierapparatur	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Modfit	Verity
Cellquest	Becton Dickinson, Heidelberg
Konfokales Mikroskop	Leica
Durchflußcytometer (FACS)	Becton Dickinson, Heidelberg

3.2 Enzyme

Enzym	Hersteller
DNase I Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Rapid DNA Ligations Kit: T4-DNA-Ligase	
Restriktionsendonukleasen mit entsprechenden Puffer	
Taq DNA Polymerase	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
RNase (DNase frei)	Merck, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen mit entsprechenden Puffer	MBI Fermentas
Alkalische Phosphatase	New England Biolabs, Schwalbach
Klenow Polymerase	
Restriktionsendonukleasen mit entsprechenden Puffern	
T4 DNA Polymerase	
<i>in vitro</i> Transkriptionskit	Promega, Madison, USA
T3 DNA Polymerase	
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden

RNase A

Sigma, Deisenhofen

3.3 Puffer und Lösungen

Äquilibriumspuffer: 0,1% SDS; 0,1mM DTT; 20mM Tris-Acetat; pH 8,3. Bei -20°C gelagert.

Trenngelpuffer: 0,5 M Tris-HCl; 0,4% SDS; pH 8,8

DNA Probenpuffer: 0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol; 30% (w/v) Glycerin; 25 mM EDTA; pH 8,0

Lösungen für ECL-Detektion:

Reagenzien: Paracoumarinsäure (Sigma C-9008); Luminol (3-amino-phthalhydrazide) von Fluka (O-9253) oder Sigma (A-8511); H₂O₂ 30%ige Lösung; pH 8,8

Stammlösungen: 250 mM Luminol in DMSO; 90 mM Paracoumarinsäure in DMSO; 1 M Tris-HCl; pH 8,5

Herstellung der Lösungen 1 und 2:

Lösung 1: 2,5 mM Luminol; 400 mM Paracoumarinsäure; 100 mM Tris-HCl; pH 8,5

Lösung 2: 5,4 mM H₂O₂ ; 100 mM Tris-HCl; pH 8,5

Einfriermedium: 20 ml 2x DMEM; 25 ml FCS; 4 ml NaHCO₃; 6 ml DMSO oder 90% FCS; 10% DMSO. Beide Medien bei -20°C lagern.

Eindickmedium: 5%(w/v) Polyvinylalkohol 25/140; 10%(v/v) Glycerin in PBS.

Ethidiumbromidstammlösung: 10 mg/ml in ddH₂O

Fixierungslösung: 50% Aceton; 40% Ethanol; 10% ddH₂O

HBSS: 173,3 mM NaCl; 5,6 mM KCl; 0,44 mM KH₂PO₄; 5mM Glucose; 4mM NaHCO₃; 25 mM HEPES; pH 7,4

2x HEBS: 274 mM NaCl; 10 mM KCl; 1,4 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O; 12 mM Glucose; 42 mM Hepes; pH 7,05

„Hank's Solution“: 137mM NaCl; 5,4mM KCl; 0,3mM Na₂HPO₄; 0,4mM KH₂PO₄; 4,2mM NaHCO₃; 1,3mM CaCl₂; 0,5mM MgCl₂; 0,6mM MgSO₄

LB Medium : 10 g Bacto-Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; pH 7,5, mit ddH₂O auf 1 L auffüllen

Lysispuffer: 120 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl; 1,5 mM MgCl₂; 10% Glycerin; 1 mM EGTA; 0,5% NP-40; 5 mM DTT; 1% Trasyolol; 50 mg/ml Leupeptin; 10% IgG-freies FCS

E1A-Lysispuffer: 50 mM Hepes; 150 mM NaCl; 0,1% NP-40; 5 µg/ml Aprotinin; 5 µg/ml

Pepstatin; 5 µg/ml Leupeptin; 125 µg/ml Prefabloc; pH 7,3

Magermilchpulver/ TBS-T (Blockierungslösung): 5% Magermilchpulver in TBS-Puffer mit 0,2% Tween-20

N2: 100 mM Tris; 900 mM KCl; 15% Ethanol; pH 6,3

N3: 100 mM Tris; 1150 mM KCl; 15% Ethanol; pH 6,3

N5: 100 mM Tris; 1000 mM KCl; 15% Ethanol; pH 8,5

1x PBS: 140 mM NaCl; 3 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 8 mM Na₂PO₄; pH 7,4

PI-Färbelösung: 50 µg/ml Propidiumiodid; 0,25 mg/ml RNaseA in PBS.

S1-Puffer: 50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 100 mg/ml RNase A; pH 8,0

S2-Puffer: 200 mM NaOH; 1% SDS

S3-Puffer: 2,8 M Kaliumacetat; pH 5,1

2x SB: 62,5 mM Tris-HCl; 2% (w/v) SDS; 0,1% (w/v) Bromphenolblau; 10% (w/v) Glycerin; 5% (w/v) β-Mercaptoethanol; pH 6,8

6x SB: 7 ml 4x Tris/SDS; 3,8 ml Glycerin; 1 g SDS; 0,93 g DTT; 1,2 mg Bromphenolblau; pH 6,8

"Schwyzer" Waschpuffer: 500 mM LiCl; 100 mM Tris-HCl; 1% NP-40; 1% β-Mercaptoethanol; pH 9,0

SDS-PAGE-Laufpuffer: 25 mM Tris; 200 mM Glycin; 1% (w/v) SDS

Sequenzgel: 6% (w/v) Acrylamid aus 40% iger Stammlösung (Gibco BRL); 6 M Harnstoff; 1x TBE

TAE Puffer: 40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA; pH 7,5

TBE Puffer: 98 mM Tris-Borat; 4 mM EDTA; pH 8,3

TBS : 20 mM Tris-HCl; 137 mM NaCl; pH 7,6

TBS-T (Waschpuffer): TBS mit 0,2% Tween 20

TE Puffer: 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0

Transferpuffer: 50 mM Tris; 192 mM Glycin; pH 8,3

"Upper Gel Stock": 0,5 M Tris-HCl; 0,4% SDS; pH 6,8

Transferpuffer für Western-Blot (nach Harlow und Lane): 48mM Tris-Base; 39mM Glycin;

0,037%(w/v) SDS; 20%(v/v) Methanol

Transformationspuffer 1: 100 mM RbCl; 50 mM MnCl₂; 10 mM CaCl₂; 30 mM K-Acetat; 15% (w/v) Glyzerin; pH 5,8

Transformationspuffer 2: 10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 10mM CaCl₂; 15% (w/v) Glyzerin; pH 6,8

4x Tris/SDS: 1,5 M Tris-HCl; 0,4% SDS; pH 6,8

3.4 Bakterienstämme

Zur Anreicherung von Plasmid DNA wurde folgender Bakterienstamm verwendet.

Echerischia coli Hb101 : F⁻, [^](gpt-proA)62, leu, supE44, ara14, galK2, lacY1, [^](mcrC-mrr), rpsL20(st^f), xyl-5, mtl-1, recA13 (Boyer and Roulland-Dussoix, 1969)

3.5 Zelllinien

3.5.1 Mauszelllinien

10-1 BALB/c Mausembryofibroblastenzelllinie mit Deletionen in beiden p53 Allelen (Harvey and Levine, 1991)

Meth A Methylcholantren-transformierte BALB/c 3T3 Mausfibroblasten (De Leo *et al.* , 1977)

3.5.2 Rattenzelllinien

Rev2 zelluläre Revertante der SV40 Wildtyp-transformierten Rattenzelllinie SV-52 (Deppert *et al.* , 1991)

F111 immortale Rattenfibroblasten (Freemann *et al.* , 1975)

FR3 Amino-terminales LT Fragment T₁₄₇ exprimierende F111 Zelllinie (Zerrahn, 1994)

FT4.5 SV40 17 kT exprimierende F111 Zelllinie (Zerrahn, 1994)

3.5.3 Humane Zelllinien

Hela humane Zelllinie aus einen Epithelkarzinom der Cervix (Gey *et al.* , 1952)

Saos humane primäre Osteosarkomzelllinie (Fogh *et al.* , 1975)

3.5.4 Affenzelllinien

TC7-17kT 17 kT exprimierender Subklon der CV 1 Zelllinie (SV40 permissive Nierenzelllinie der Afrikanischen Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*)) mit epithelialer Morphologie und subtetraploiden Chromosomensatz (Robb und Huebner 1973) (Scheidig, 1998)

3.6 Antikörper

Monoklonale anti p53 Antikörper

- PAb421 muriner monoklonaler anti p53 Antikörper gegen den C-Terminus (Harlow *et al.* , 1981b); Aszites: 1 µl für die IP; 1:5000 im WB
- PAb240 muriner monoklonaler anti p53 Antikörper gegen p53 in Mutanten Konformation (Gannon *et al.* , 1990); konzentrierter Kulturüberstand: 1:200 für die IF; 50 µl für die IP; 1:5000 im WB
- PAb246 muriner monoklonaler anti p53 Antikörper gegen p53 in Wildtyp-Konformation (Yewdell *et al.* , 1986); konzentrierter Kulturüberstand: 50 µl für die IP; 1:5000 im WB
- PAb248 muriner monoklonaler anti p53 Antikörper gegen den N-Terminus (Yewdell *et al.* , 1986); konzentrierter Kulturüberstand: 1:200 für die IF; 1:5000 im WB

Polyklonale anti p53 Seren

Anti p53 Serum aus Maus: 1:5000 im WB

Anti p53 Serum aus Kaninchen; 1:5000 im WB

Monoklonale anti SV40 Antikörper

- KT3 muriner monoklonaler Antikörper gegen den C-Terminus von SV40 LT (MacArthur und Walter, 1984); Ascites: 1:10.000 im WB
- PAb108: muriner monoklonaler Antikörper gegen den N-Terminus der SV40-T-Antigene (Gurney *et al.* , 1986); Kulturüberstand: unverdünnt für die IF
- PAb416: muriner monoklonaler Antikörper der IgG2a-Klasse gegen das SV40 T-Ag und SV40 17kT, Epitop Aminosäure 91 bis 95 (Harlow *et al.* , 1981)

PAb419 muriner monoklonaler Antikörper gegen den N-Terminus der SV40-T-Antigene (Harlow *et al.* , 1981a); konzentrierter Kulturüberstand: 20 µl für die IP, 1:5.000 im WB

Monoklonale anti Rb Antikörper

IF8 muriner monoklonaler Antikörper; Hybridomaüberstand; 1:10 im WB

Polyklonale anti Rb Seren

Anti Rb Serum aus Kaninchen, RB (C15) (St. Cruz); 1:5000 im WB

Für die Detektion von Erstantikörpern im Western Blot und Immunfluoreszenz verwendete Antikörper

Ziege-Anti-Maus-Ig, konjugiert mit Texas Red (Dianova, Hamburg); 1:200 für die IF

Ziege-Anti-Maus-Ig, konjugiert mit FITC (Dianova, Hamburg); 1:100 für die IF

Ziege-Anti-Maus-Ig, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (Bio-Rad, München); 1:7.500 im WB

Anti-Kaninchen-Ig, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (Bio-Rad, München); 1:7.500 im WB

Anti-Schaf-Ig, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (Bio-Rad, München); 1:7.500 im WB

3.7 Nukleinsäuren

3.7.1 Plasmide

Die Plasmide pCMVNeoBam und pCINeo sind schematisch auf Abbildung 2 im Ergebnisteil abgebildet.

pCMVNeoBam: Eukaryontischer Expressionsvektor mit CMV Promotor, Ampicillin- und Neomycin-Resistenz zur Etablierung stabil exprimierender Zelllinien

pCINeo: Eukaryontischer Expressionsvektor mit CMV Promotor Ampicillin- und Neomycin-Resistenz zur Etablierung stabil exprimierender Zelllinien

pHyg: Expression des Hygromycin-Resistenzgens in eukaryontischen Zellen

3.7.2 Oligonukleotide

Für das Klonieren der p53 cDNA in die pCMVNeoBam und pCINeo Vektoren wurden folgende Oligonukleotide von der Firma MWG verwendet:

Vektor 3' - 5' - AGC TTC GGG G - 3' - 5' "Insert"

Vektor 3' - 5' - GAT CCC CCG A - 3' - 5' "Insert"

Vektor 3' - 5' - GAT CCC ATG CTA CCT AGG GCC - 3' - 5' "Insert"

Vektor 3' - 5' - CTA GGT AGC ATG - 3' - 5' "Insert"

"Insert" 3' - 5' TGG CCA TGC ATG CG - 3' - 5' Vektor

"Insert" 3' - 5' - GAT CCG CAT GCA TGG CCA AGT - 3' - 5' Vektor

Für die PCR und für die Sequenzierung wurden folgende Oligonukleotide der Firma MWG verwendet:

Sequenzierprimer I: 5' - CCT TAT GAG CCA CCC GAG - 3'

Sequenzierprimer II: 5' - CAG GGC AAA GGA CTT CC - 3'

Sequenzierprimer III: 5' - CAG CTG GTG AAG ACG TGC C - 3'

4 METHODEN

4.1 DNA-analytische Methoden

4.1.1 Bestimmung der DNA Konzentration

Die Menge und Reinheit von DNA kann durch die Messung des UV-Absorptionsspektrums erfolgen. Dabei wird die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen, wobei die Absorption bei 260 nm die DNA Konzentration, die Absorption bei 280 nm eine eventuelle Proteinkontamination angibt. Saubere, nicht mit Proteinen verunreinigte DNA hat einen OD_{260nm}/OD_{280nm} Quotienten von 1,9 bis 2,2.

Die DNA wurde 1:50 in einer Quartzküvette verdünnt. Ein Referenzansatz, der nur TE Puffer enthält, wurde bei 260 nm gemessen und ein Nullabgleich durchgeführt.

Bei einer OD_{260} von 1 beträgt die Konzentration für ds-DNA 50 µg/ml, für ss-DNA 37 µg/ml und für Oligonucleotide 33 µg/ml.

Im Agarosegel können DNA Mengen durch Vergleich ihrer Fluoreszenz mit DNA Banden bekannter Masse abgeschätzt werden.

20 ng DNA sind im mit Ethidiumbromid (EtBr) gefärbten Agarosegel noch sichtbar.

4.1.2 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind in der Lage, doppelsträngige DNA an für sie spezifischen Sequenzen zu schneiden. Es werden ca. 1-2 u pro µg DNA benötigt, um diese innerhalb einer Stunde zu schneiden.

Die Restriktionsverdauansätze müssen im zehnfachen Volumen der eingesetzten Enzymmenge durchgeführt werden, damit es zu keiner Beeinträchtigung der enzymatischen Aktivität durch das von den Enzymherstellern zur Stabilisierung des Enzyms eingesetzte Glycerin kommt. Der Restriktionsverdau wurde für 2 - 4 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Der Verdau wurde anschließend im Agarosegel überprüft und die geschnittene DNA gereinigt.

4.1.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur analytischen und präparativen Auftrennung, Reinigung und Isolierung von DNA Fragmenten dient die Agarosegelelektrophorese.

Linearisierte DNA Fragmente wandern im Agarosegel umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Im elektrischen Feld wandert die DNA zum

positiven Pol. Zur Auftrennung von Plasmid DNA und DNA Fragmenten bis zu 500 bp wurden 0,8 - 1,5 %ige Agarosegele in 1x TAE Puffer verwendet. Der TAE Puffer diente auch als Laufpuffer. Die DNA wurde mit 0,1 x Volumen Probenpuffer versetzt, der als Farbstoffe Bromphenolblau und Xylen-Cyanol enthält.

Je nach Größe der erwarteten DNA Fragmente wurde als DNA Standard für Fragmente der Größe 0,2 - 1 kb ein 0,07 - 12,2 kb DNA Marker (Pharmacia) bzw. für Fragmente von 1 - 10 kb ein Lambda-Hind III Standard aufgetragen.

Der Gellauf erfolgte in einer Gelapparatur bei konstant 80 V für 1 - 2 h.

Danach wurden die Gele für 20 min in einer EtBr-Lösung (2 mg/l TAE), welches in die DNA interkaliert und fluoreszierende EtBr/DNA Komplexe bildet, geschwenkt und anschließend in Wasser gewaschen, um überschüssiges EtBr zu entfernen.

Die DNA Banden wurden im UV-Durchlicht bei 254 nm sichtbar gemacht und mit einer Geldokumentationanlage fotografiert.

4.1.4 Elution von DNA Fragmenten aus Agarosegelen (Vogelstein and Gillespie, 1979)

Die elektrophoretisch aufgetrennten DNA Fragmente wurden mit EtBr gefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die Fragmente wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die UV-Exposition sollte dabei möglichst kurz sein, um eine UV-verursachte Bildung von Thymidindimeren der DNA zu vermeiden. Zur Elution der DNA wurde das GENE CLEAN II Kit der Firma Bio 101 verwendet. Dieses "Kit" basiert auf einer von Vogelstein und Gillespie entwickelten Methode zur Bindung von DNA Fragmenten an Glasmaterialien in Gegenwart chaotroper Salze. Hierbei wurde der Gelblock durch Zugabe von 3 x Volumen 3 M NaI-Lösung und Erhitzen auf 45 - 55 °C geschmolzen. Dann wurden 5 µl/5 µg DNA Glasmilch dazugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Glasmilch/DNA Komplex bei 14000 rpm abzentrifugiert und mehrmals mit New Wash Puffer gewaschen. Nach der vollständigen Abnahme des Überstandes wurde das Pellet in 10 µl H₂O resuspendiert und durch 5-minütiges Erhitzen bei 55 °C eluiert. Die DNA wurde in ein neues Gefäß überführt und der Elutionsschritt wiederholt.

4.1.5 Reinigung und Konzentrierung von DNA Lösungen

4.1.5.1 Phenolextraktion

Bei der Phenolisierung reinigt man Nukleinsäurelösungen von Proteinverunreinigungen. Bei der Extraktion mit dem organischen Lösungsmittel

Phenol reichern sich Proteine in der Interphase an. Zu den zu reinigenden DNA Lösungen wurde jeweils das gleiche Volumen eines 25:24:1 Gemisches von Phenol (pH 7,8-8,0)/Chloroform/Isoamylalkohol gegeben. Das Chloroform denaturiert die Proteine und erleichtert die Phasentrennung. Der Isoamylalkohol verhindert das Schäumen bei der Extraktion. Die Suspension wurde gründlich gemischt und zur Phasentrennung 1 min bei RT mit 14000 rpm in einer Eppendorffzentrifuge zentrifugiert. Die DNA enthaltende wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Gefäß transferiert.

4.1.5.2 Ethanolfällung von DNA

Zur Aufkonzentrierung und Reinigung von DNA aus verdünnter Lösung wurde die Methode der Ethanolfällung eingesetzt. Der Salzgehalt der DNA Lösung wurde zunächst erhöht, durch die Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumazetat pH 6,0. Dann wurde das 2,5 fache Volumen an absolutem Ethanol zugegeben und der Ansatz 30 min bei -20°C inkubiert. Die DNA wurde durch eine 30-minütige Zentrifugation (4°C, 14000 rpm, Eppendorffzentrifuge) präzipitiert. Das überstehende Ethanol wurde abgossen und das Präzipitat mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde getrocknet und im gewünschten Volumen Puffer aufgenommen. Um saubere DNA für Transfektionen zu erhalten, wurde vor der Ethanolpräzipitation anstatt Natriumazetat NaCl mit einer Endkonzentration von 100 µM in TE Puffer zugegeben.

4.1.6 Vorbereitung der DNA für die Ligation

Um die Rezirkularisierung von kompatiblen Vektor DNA Enden zu verhindern, wurde alkalische Phosphatase (New England Biolabs) zur Dephosphorylierung des Vektors eingesetzt. Dieses Enzym katalysiert die Entfernung von 5'-Phosphatgruppen von DNA und RNA. 500 ng DNA in einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden mit 1 u alkalischer Phosphatase pro pmol DNA Enden versetzt. Die Reaktion wurde im jeweiligen Restriktionspuffer für 1 h bei 37°C durchgeführt. Zum Beenden der Reaktion wurde EDTA zugegeben (Endkonzentration 5 mM). Die Vektor DNA wurde durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mit dem GENE CLEAN II Kit eluiert.

4.1.7 Ligation von DNA Fragmenten

4.1.7.1 Vorbehandlung von nicht kompatiblen DNA Enden für die Ligation mit Hilfe von Oligonukleotiden

Mit Hilfe von Oligonukleotiden sollte die Vektor DNA mit der "Insert" DNA verbunden werden. Die komplementären Oligonukleotide mußten zuerst phosphoryliert werden. Hierzu wurden jeweils 500 pmol der benötigten Oligonukleotide mit 1 µl 10 mM ATP, 2 µl 10 x Kinase Puffer und 10 u T4 Polymerase Kinase in 20 µl H₂O aufgenommen und bei 37°C eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei 65°C inkubiert. Die Proben konnten nun bei -20°C gelagert werden.

Um die Einzelstrangnukleotide zu verbinden, wurden 500 pmol der gewünschten phosphorylierten Oligonukleotide in je 20 µl H₂O aufgenommen, miteinander vermischt und 15 min bei 65°C inkubiert. Der Ansatz wurden im Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt, über Nacht bei -20°C gelagert und anschließend der Ligation zugeführt. Hierzu wurden 10 pmol Vektor DNA, 50 pmol "Insert" DNA und jeweils 50 pmol (bzw. 100 pmol im zweiten Reaktionsansatz) der verknüpften Oligonukleotidpaare mit 1 µl 10 x Ligase Puffer und 1 µl T4 DNA Ligase in 20 µl H₂O aufgenommen und über Nacht bei 4°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für die Transformation eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

4.1.7.2 Behandlung überhängender DNA Enden mit T4 DNA Polymerase

Um nicht kompatible DNA Enden zu ligieren, wurde T4 DNA Polymerase benutzt. Sie katalysiert durch ihre 5'-3'-DNA Polymeraseaktivität und ihre 3'-5'-Exonukleaseaktivität den Verdau 3'-überhängender Enden und das Auffüllen 5'-überhängender Enden.

1 µg der zu behandelnden DNA wurde mit 5 µl 10 x T4 DNA Polymerase Puffer und 0,5 µl T4 DNA Polymerase und 5 µl dNTP (5 µmol von jedem NTP) 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend präzipitiert.

4.1.7.3 Behandlung überhängender DNA Enden mit Klenow DNA Polymerase

Die Klenow DNA Polymerase füllt überhängende DNA Enden mit Desoxyribonukleotiden auf. 1 µg der zu behandelnden DNA wurde mit 5 µl 10 x Klenow Puffer, 0,5 µl Klenow Polymerase und 5 µl dNTP (je 5 µmol) 25 min bei 60 °C inkubiert

und anschließend präzipitiert. Das Verhältnis von eingesetzter Vektor DNA zur "Insert" DNA sollte 1 : 2 betragen.

4.1.7.4 Ligation von DNA Fragmenten

Die T4 DNA Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxy-Enden in doppelsträngiger DNA oder RNA. Für die Ligation von DNA Fragmenten wurde das "Rapid DNA Ligation Kit" benutzt. Es erlaubt die Ligation von kohäsiven DNA Enden und "blunt" DNA Enden, sowie die Rezirkularisierung von linearer DNA. Die zu ligierende DNA (Vektor und "Insert") wurde in 10 µl einfach konzentriertem "DNA dilution buffer" aufgenommen. Dazu wurden 10 µl 2 x "T4 DNA ligation buffer" gegeben. Die Ligation wurde durch die Zugabe von 1 µl T4 DNA Ligase gestartet. Dieser Ansatz wurde 5 min bei RT inkubiert. Die Hälfte des Reaktionsansatzes wurde entweder sofort für die Transformation eingesetzt oder der gesamte Ansatz wurde bei -20°C gelagert.

4.1.8 Isolierung kleiner DNA Mengen durch Plasmid Minipräparation

Aus einer 1-2 ml Übernachtskultur wurde die Plasmid DNA mittels alkalischer Lyse isoliert. Zuerst wurden die Bakterien 2 min bei 3000 rpm in einer Eppendorfszentrifuge präzipitiert. Dann wurde das Bakterienpellet in 300 µl S1-Puffer und RNase A resuspendiert. Durch die Zugabe von 300 µl S2 wurden die Zellen lysiert und die Proteine denaturiert. Der Ansatz wurde 5 min bei RT inkubiert, 300 µl S3-Puffer zugegeben und sofort gemischt. Nach einem Zentrifugationsschritt (14000 rpm, 10 min, 4°C) wurde der das Plasmid enthaltende Überstand in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit 600 µl Isopropanol gemischt, um die Plasmid DNA zu fällen. Die DNA wurde durch eine 20 minütige Zentrifugation (Eppendorfszentrifuge, 14000 rpm, 4°C) präzipitiert. Das DNA Pellet wurde mit 1 ml 70% igem Ethanol gewaschen, abzentrifugiert und anschließend getrocknet. Die DNA wurde in 50 µl TE Puffer aufgenommen.

4.1.9 Isolierung großer Mengen reiner DNA durch Plasmid Maxipräparation

Zur Präparation größerer Mengen reiner DNA wurde das "Nucleobond AX 500 Kit" der Firma Macherey und Nagel verwendet. Die Methode beruht auf dem Prinzip der Anionenaustauscherchromatographie. Dabei binden die Nukleinsäuren bei niedrigen Salzkonzentrationen reversibel an eine Ionenaustauscher-Silikatmatrix. Die Salzkonzentration wird schrittweise während der folgenden Wasch- und Elutionsschritte erhöht. Die doppelsträngige Plasmid DNA eluiert bei 1350-1500 mM KCl.

Um 0,5 mg Plasmid DNA zu erhalten, wurden 500 ml Kulturen von "low copy" Plasmiden oder 100 ml von "high copy" Plasmiden angesetzt. Die plasmidtragenden *E. coli*-Kulturen wurden durch Zentrifugation (5000 rpm, 4°C, GSA-Rotor) präzipitiert und mit einer modifizierten alkalischen Lyse aufgeschlossen. Das Zellsediment wurde in 12 ml S1-Puffer resuspendiert. Dazu wurden 12 ml S2-Puffer gegeben und die Suspension vorsichtig gemischt. Die Lyse wurde für 5 min bei RT durchgeführt. Dann wurden 12 ml S3-Puffer zugegeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat 45 min bei 4°C bei hoher Geschwindigkeit (12000xg) zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit 5 ml N2 äquilibrierte AX500-Säule gegeben, mit 2 x 12 ml N3-Puffer gewaschen und mit 2 x 6 ml N5 Puffer eluiert. Die DNA-Lösung wurde mit 8,4 ml Isopropanol versetzt und die DNA durch Zentrifugation (11000 rpm, SS34, 4°C) präzipitiert. Die DNA wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Danach wurde sie in 0,5 ml TE Puffer resuspendiert.

4.1.10 Isolierung genomischer DNA aus Zellen

Zur Isolierung der genomischen DNA kam das "Qiaquick Gel Extraction Kit" der Firma Qiagen zur Anwendung. Hierzu wurde eine 10 cm Kulturschale zweimal mit PBS gewaschen, die Zellen abtrypsinisiert und anschließend in 5 ml PBS aufgenommen. Nach zweiminütigen Zentrifugieren bei 2000 rpm wurde das Präzipitat erneut in PBS gewaschen und nochmals bei 14000 rpm für 2 min zentrifugiert. Es wurden 150 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinkinase K dazugegeben und bei 55 °C im Vortexschüttler inkubiert, bis die Lösung nicht mehr viskös war. Danach wurden 200 µl AL-Puffer und 210 µl Ethanol mit dem Ansatz gevortext und auf die Qiagen-Säulen gegeben. Diese wurden 1 min bei 5000 rpm zentrifugiert und anschließend zweimal mit 500 µl AW-Puffer gewaschen (je 2 min bei 13000 rpm). Die DNA wurde zweimal mit auf 70 °C vorgewärmten AE-Puffer für je 1 min bei 8000 rpm eluiert.

4.1.11 DNA Amplifikation durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Saiki *et al.* , 1985)

Durch die PCR wird eine Amplifikation geringster DNA Mengen ermöglicht. Der zyklisch ablaufende Prozess beruht auf der komplementären Bindung und der Verlängerung zweier Oligonukleotide, die die zu amplifizierende DNA flankieren. Bei der Auswahl der PCR Oligonukleotidprimer sollte darauf geachtet werden, daß die Oligonukleotide eine mittlere Länge von 20 - 30 Nukleotiden und eine ähnliche Hybridisierungstemperatur haben. Die "Annealing" Temperatur eines Oligonukleotids kann nach folgender Formel berechnet werden: $[(A+T) \times 2] + (G+C) \times 4$.

Die Verlängerung der Oligonukleotide wird durch eine thermostabile DNA Polymerase katalysiert. Eine repetitive Abfolge von Zyklen, die DNA Denaturierung, Oligonukleotidbindung und Verlängerung der Oligonukleotide durch Polymerisation beinhalten, resultiert in einer Akkumulation des spezifischen DNA Fragments. Die Reaktionsprodukte eines Zyklus dienen als Matritze für den nächsten Reaktionszyklus. Die PCR Reaktion wurde mit den folgenden Komponenten angesetzt: 50 pmol Oligonukleotid und 10 ng Matritzen DNA in PCR Puffer, der 200 μ M dNTP's und 1,5 mM MgCl₂ enthält. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2 u Taq DNA Polymerase gestartet und der Reaktionsansatz mit 50 μ l Paraffinöl (Merck) überschichtet. Nach 35 Zyklen wurde die Reaktion mit einer fünfminütigen Inkubation bei 72 °C beendet.

Die PCR Fragmente wurden anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt.

4.1.12 DNA Sequenzierung (Sanger *et al.* , 1977)

Die Didesoxy-Sequenzierung beruht auf der nukleotidspezifischen Termination einer Enzym-katalysierten Oligonukleotid Verlängerungsreaktionen. Man führt in getrennten Gefäßen vier verschiedene Reaktionen durch, die alle Oligonukleotid, Matritzen DNA und die vier Desoxynukleotide enthalten. Jedes Gefäß enthält außerdem ein unterschiedliches Didesoxynukleotid, das die Polymerisationsreaktion unterbricht. In jedem Ansatz entsteht durch die Katalyse der T7 DNA Polymerase eine Mischung von unterschiedlichen DNA Fragmenten. Jedes trägt an seinem Ende das jeweils spezifische Didesoxynukleotid, wobei jedes davon das Vorkommen des korrespondierenden Desoxynukleotids in dieser Sequenz repräsentiert. Werden die Produkte der vier Reaktionen unter denaturierenden Bedingungen auf einem Sequenzgel ihrer Größe nach aufgetrennt, kann an ihrer Abfolge die DNA Sequenz abgelesen werden. Die Positionen der aufgetrennten Fragmente können durch die Verwendung eines radioaktiven Desoxynukleotids während der

Polymerisationsreaktion sichtbar gemacht werden.

Die Sequenzreaktion wurde mit dem "T7 DNA Sequenzierkit" (Pharmacia) durchgeführt. Hierzu wurden 2 µg Plasmid in 6 µl H₂O zur Denaturierung des Templates mit 2 µl 2 N NaOH versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 3 µl NaAc (pH 4,5), 7 µl H₂O und 60 µl Ethanol wurde die DNA 15 min auf Trockeneis präzipitiert und anschließend durch Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 14000 rpm gefällt. Das mit 70 % Ethanol gewaschene Präzipitat wurde in einem Gemisch von 10 µl H₂O, 2 µl Annealing-Puffer und 2 µl Sequenzieroligonukleotiden aufgenommen und zur Oligonukleotidbindung für 20 min bei RT inkubiert. Zur DNA Polymerisation wurden 14 µl "Oligonukleotid-Template-Gemisch", 1 µl ³⁵S-dATP (10 µCi/µl), 3 µl Labeling Mix-dATP und 2 µl T7-DNA-Polymerase (3u, verdünnt) 5 min bei RT inkubiert. Je 4,5 µl dieses Ansatzes wurden mit bei 37 °C vorinkubierten 2,5 µl des jeweiligen Didesoxynucleotids (A'-, C'-, G'-, T'-Mix-Short) gemischt. Die Termination der Polymerisation erfolgte bei 37 °C für 5 min und wurde durch Zugabe von 5 µl Formamid-Farbmarker gestoppt.

4.1.13 Denaturierende DNA Sequenzgele

Für die Auftrennung der DNA Fragmente, die bei der Sequenzreaktion entstehen, wurde ein Polyacrylamidgel mit denaturierenden Eigenschaften (6 M Harnstoff, 6% Polyacrylamid) benutzt. Dadurch wurde verhindert, daß die durch vorheriges Aufkochen denaturierten DNA Proben während des Gellaufs wieder einen DNA Doppelstrang ausbilden. Die Gellösung wurde zwischen zwei Glasplatten mit einer Dicke von 0,5 mm gegossen und nach vollständiger Polymerisation in eine Vertikal-Sequenzierapparatur eingespannt. Der Gellauf erfolgte zunächst in einem 1x TBE Puffer bei einer Leistung von 100 W für 30 min. Dann wurden die jeweils für 5 min bei 100°C denaturierten DNA Proben aufgetragen. Sie wurden für 2-4 h bei 120 W aufgetrennt. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das Gel aus der Apparatur entnommen, auf ein Whatman 3MM Filterpapier überführt und auf einem Geltrockner 2h bei 80°C getrocknet. Die DNA Banden wurden über Autoradiographie sichtbar gemacht.

4.2 Proteinanalytische Methoden

4.2.1 Proteinbestimmung (Bradford, 1976; Spector, 1978)

Je 2 µl Aliquot des Gesamtzellextrakts wurde mit 800 µl ddH₂O in Halbmikro-Plastikküvetten verdünnt. Nach der Zugabe von 200 µl BIORAD Reagenz wurde die Probe sofort gemischt. Nach zehnminütiger Inkubationszeit bei RT wurde die Extinktion bei 595 nm gegen eine Referenz, die kein Zellextrakt enthält, gemessen. Die Proteinkonzentration wurde mittels folgender Formel bestimmt: $(OD \times 20) / \text{eingesetzte Proteinmenge} = \mu\text{g}/\mu\text{l}$

4.2.2 Immunpräzipitation von Proteinen aus Gesamtzelllysaten

Protein A ist ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 42 kDa aus dem Mikroorganismus *Staphylococcus aureus*. Protein A bindet den konstanten Teil von Immunglobulinen vieler Spezies (bei Maus an Antikörper der Klasse IgG2a). Für die Immunpräzipitation wurde ein Protein A Konjugat verwendet. Dabei sind Sepharosekügelchen kovalent an Protein A gebunden.

Zuerst mußte eine Gesamtzellextraktion erfolgen. Hierzu wurde der Zelniederschlag auf Eis aufgetaut und in etwa dem gleichen Volumen Lysispuffer 30 min auf Eis lysiert. Die Zelltrümmer wurden 20 min bei 4°C bei 14000 rpm (Eppendorfcentrifuge) pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mit der Bradfordmethode (BIORAD-Assay) ermittelt. Das Lysat wurde entweder bei -20 °C gelagert, direkt auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen oder der Immunpräzipitation zugeführt.

Das Lysat wurde je nach Antigenmenge, mit Protein A Sepharose (PAS) versetzt. Durch die Zugabe von antigenspezifischen monoklonalen Antikörper wurde die Immunpräzipitation gestartet. Sie erfolgte bei 4°C mit leichtem Schwenken für 2 h. Die PAS-Immunkomplexe wurden fünfmal mit Schwyzer-Waschpuffer, zweimal mit PBS und einmal mit 0,1 x PBS gewaschen. Alternativ wurde dreimal mit 0,5 % NP 40/PBS anstatt mit Schwyzer-Waschpuffer gewaschen. Die Protein/Antikörperkomplexe wurden durch die Zugabe des gleichen Volumens 2x SB von der PAS Matrix eluiert und 5 min bei 100°C im Heizblock denaturiert. Danach wurden die Proben entweder bei -20°C gelagert oder direkt auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

4.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese wurde mit Gelsystemen der Firma Biorad durchgeführt. In diesen Gelen hängt die Auftrennung der Proteine von der elektrischen Feldstärke, sowie dem Reibungskoeffizienten, der wiederum von der Masse und Gestalt des Proteins und der Viskosität des Mediums bestimmt wird, ab. Die Proteine wurden in einer diskontinuierlichen Elektrophorese aufgetrennt, d.h. es wurden zwei Gele übereinander gegossen; ein Sammelgel, welches die Proteine fokussiert und ein Trenngel, das die Proteine in der Reihenfolge ihrer molaren Massen trennt. Der Anteil des Acrylamids richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden Proteine. Nach dem Gießen des Trenngels wurde es mit wassergesättigtem Butanol überschichtet und bis zum vollständigen Auspolymerisieren bei Raumtemperatur inkubiert. Das überstehende wassergesättigte Butanol wurde danach abgenommen, das Trenngel auf das Sammelgel gegossen und durch Einfügen eines Kamms die Probentaschen hergestellt. Das polymerisierte Gel wurde in 1x Laufpuffer gestellt.

Handelte es sich um Gesamtzellysate wurden 40 - 100 µg Protein, zusammen mit 1/6 Vol. 6 x SB geladen, handelte es sich um Immunpräzipitate, wurden 5 - 10 µl geladen. Die Proteinproben wurden mit einem geeigneten Auftragspuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und in die Geltaschen gegeben. Der Gellauf erfolgt bei 100 V-150 V, bis die Bromphenolblaufront das untere Gelende erreicht hatte.

Die aufgetrennten Proteine konnten nun mit verschiedenen Methoden sichtbar gemacht werden.

4.2.4 Nachweis von radioaktiv markierten Proteinen durch Fluorographie

Die Strahlung, die die radioaktiv markierten Proteine im Gel aussenden, kann verstärkt werden. Dazu muß dem Gel zunächst Wasser entzogen werden. Dieser Fixierungsschritt erfolgte in konzentrierter Essigsäure für 30 min bei RT auf einem Schütteltisch. Als Fluorochrom, d.h. als Strahlungsverstärker wurde PPO (2,4,-Diphenyloxazol) eingesetzt. Durch die Strahlung wird das PPO-Molekül angeregt und emittiert Photonen. Es ist nur in konzentrierter Essigsäure (96%) löslich und wird in einer Konzentration von 10% (w/v) verwendet. Das mit konzentrierter Essigsäure vorbehandelte Gel wurde darin für 20 min geschwenkt. Durch die Zugabe von Wasser wurde das in das Gel diffundierte PPO ausgefällt. Das Gel wurde anschließend auf einem Geltrockner bei 80°C für 45 min getrocknet. Danach wurde ein Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR) aufgelegt und dieser für mindestens 12 h bei -70 °C exponiert. Nach der Entwicklung des Films werden die radioaktiven Proteine als schwarze Banden darauf sichtbar.

4.2.5 Nachweis von Proteinen im Western Blot (Burnette *et al.* , 1981)

Die Western Blot Methode dient der Bestimmung der Gesamtmenge des in der Zelle vorhandenen Antigens ("steady-state"). Bei dieser Methode werden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Membran transferiert. Die gewünschten Proteine werden durch Antikörperreaktionen auf der Membran sichtbar gemacht.

Die Immobilon-P Membran besteht aus PVDF und ist daher sehr hydrophob. Sie wurde daher vor der Benutzung kurz in Methanol geschwenkt, zweimal mit ddH₂O gewaschen und danach im Transferpuffer äquilibriert. Die aufgetrennten Proteine wurden auf die Membran mit Hilfe eines Naßblotverfahrens transferiert. Dabei wurde die in Transferpuffer äquilibrierte Membran mit dem darüberliegenden Gel mit jeweils zwei Lagen feuchten Whatman 3MM-Papier auf jeder Seite zusammengebaut. Der horizontale Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Immobilon-P Membran erfolgte in der mit Transferpuffer gefüllten BioRad Naßblotapparatur für 40 - 80 min unter Kühlung bei 100 V. Die Membran kann nach dem Blotten trocken bei 4°C gelagert werden. Sie muß dann vor den nächsten Schritten wieder mit Methanol aktiviert werden.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper an die Membran zu verhindern, wurde die Membran anschließend mit TBST-5%MP-Puffer für 1 h oder über Nacht geschwenkt. Nach diesem "Blockieren" wurde die Membran für zweimal 15 min in TBST-5%MP-Puffer gewaschen und anschließend für 1h RT oder über Nacht bei 4 °C mit dem ersten Antikörper in TBST-5%MP-Puffer inkubiert. Der antigenspezifische Antikörper band nun an das auf der Membran immobilisierte Protein. Der überschüssige Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen in TBST-Puffer für je 15 min entfernt. Der zweite, an Peroxidase gekoppelte Antikörper wurde in TBST-Puffer für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran abermals für dreimal 15 min in TBST-Puffer gewaschen.

4.2.6 Detektion der Proteine mit der Chemolumineszenzreaktion (ECL)

Das ECL System ist eine nicht radioaktive Methode, um auf einer Membran immobilisierte spezifische Antigene zu detektieren. Diese müssen dazu direkt oder indirekt an Peroxidase-markierte Antikörper gebunden sein. Das Prinzip besteht in einer Chemolumineszenzreaktion. Bei der Oxidation von Luminol in alkalischer Lösung, katalysiert durch Peroxidase/Wasserstoffperoxid, sendet das angeregte Luminolmolekül Licht einer Wellenlänge von 428 nm aus. Diese Reaktion erreicht ihr Maximum nach 5 bis 20 min mit einer Halbwertszeit von ungefähr einer Stunde.

Der mit 1x TBS-T gewaschene Filter wurde mit 10 ml der ECL-Detektionslösung (Lösung 1 und 2, 1:1 gemischt) bedeckt. Die Reaktion auf dem Filter erfolgte genau eine Minute bei RT in der Dunkelkammer. Der feuchte Filter wurde in eine Filmkassette überführt, mit Frischhaltefolie bedeckt, und ein Röntgenfilm für 10 sek aufgelegt. Dieser Film wurde sofort entwickelt und auf der Basis dieses Ergebnisses wurden weitere Expositionszeiten abgeschätzt.

4.2.7 *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription wurde mit dem Transkriptionskit der Firma Promega durchgeführt. Die DNA Fragmente waren so in den Vektor inkliniert, daß die Transkription mit der T7 RNA Polymerase die gewünschte "sense"-mRNA ergab. Es wurden 2,5 - 10 µg linearisierte Plasmid DNA mit 20 µl TSC 5 x Puffer, 5 µl 100 mM DTT, 50 U RNasin Ribonuklease Inhibitor, 1 µl NTP-Mix (je 2,5 mM) und 2 µl T7-RNA-Polymerase für 90 min bei 37 °C inkubiert. Zur Analyse wurden 2 µl der Proben auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die mRNA wurde anschließend durch Phenol Chloroform Extraktion gereinigt.

4.2.8 *In vitro* Translation

Die *in vitro* Translation fand im Kaninchenretikulozytenlysat System (Promega) statt. Es wurden jeweils 10 ng der gewünschten mRNA mit 17 µl Kaninchen-Retikulozyten-Lysat, 0,5 µl Aminosäuremix ohne Methionin und 2 µl ³⁵S-Translabel auf 25 µl H₂O aufgefüllt und für 30 min bei 30 °C inkubiert. 5 µl der Proben wurden in einem 11,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt und die synthetisierten, radioaktiv-markierten Proteine durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

4.3 Zellkulturtechniken

4.3.1 Bakterienzellkultur

4.3.1.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen (Hanahan *et al.*, 1983)

Kompetente Bakterienzellen zeichnen sich durch eine durchlässige Zellwand für DNA Moleküle aus. Die Herstellung dieser Zellen erfolgte mit der Mehrionentechnik.

Hierzu wurden 50 ml -Broth-Medium mit 0,5 ml einer Übernachtskultur (Hb 101) angeimpft und bei 37°C unter ständigem Schütteln bis zu einer OD_{550 nm} von 0,22 - 0,3 inkubiert. Die Kultur wurde in vier eiskalte 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (5000 g, 15 min, 4°C) wurde jedes Bakterienpräzipitat in 12 ml Transformationspuffer 1 (TfB 1) resuspendiert. Der Ansatz wurde 15 min auf Eis inkubiert und danach zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 4 ml Transformationspuffer 2 (TfB 2) aufgenommen, in Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -80°C gelagert.

4.3.1.2 Transformation von Bakterien mit Plasmid DNA (Kaiser und Hogness, 1960)

Die bei -70°C gelagerten kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 0,5 µg DNA (oder 10 µl des Ligationsansatzes) für 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte ein Hitzeschock für 45 sek bei 42 °C, der das Eindringen der Plasmid DNA in die Zellen erleichtern sollte. Danach wurde nach Zugabe von 900 µl LB-Medium ohne Antibiotikazusatz für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. In dieser Zeit bilden die Bakterien die plasmidkodierte Antibiotikaresistenz aus. Nach dem Abzentrifugieren bei 5000 rpm wurde das Präzipitat in 50 - 100 µl Medium resuspendiert, auf LB-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.3.2 Mammaliazellkultur

4.3.2.1 Kultivierung von Zellen

Alle Zelllinien wurden auf Gewebekulturschalen der Firma Nunc in DMEM mit 10% FCS kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 5% CO₂ und 85% Humidität bei 37°C,

soweit nicht anders angegeben.

4.3.2.2 Passagieren von Zellen

Für das Umsetzen von adhärenenten Zellen wurde das Kulturmedium abgesaugt und der Zellrasen einmal mit Trypsinlösung gewaschen. Diese Lösung wurde durch Absaugen entfernt und die Platte nochmals mit Trypsinlösung gespült. Der Ansatz wurde solange im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen von der Unterlage gelöst hatten. Die Zellen wurden mit Kulturmedium ab gespült, in einer Zentrifuge 5 min bei RT sedimentiert und in frischem Medium aufgenommen. Die Zellen wurden alle zwei Tage 1:5 oder 1:10, je nach Zelllinie, umgesetzt.

4.3.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum langfristigen Aufbewahren wurden nur Zellen eingefroren, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Diese wurden von der Gewebekulturschale abtrypsiniert und abzentrifugiert (IEC-Zentrifuge, 2000 rpm, 2 min, RT). Das Zellpräzipitat wurde in 1,5 ml Einfriermedium aufgenommen. Die Suspension wurde in ein vorgekühltes Kryoröhrchen gegeben und sofort auf Eis überführt, da das Frostschutzmittel DMSO toxisch wirkt. Die Zellen wurden zunächst in der Dampfphase, die sich über der flüssigen Phase im Stickstoffvorratsbehälter bildet, mit einer definierten Rate abgekühlt, wobei die Abkühlrate bei etwa 1°C/min lag. Alternativ dazu wurden die Röhrchen in einer Polystyrolbox eingefroren. Diese wurde 30 min bei -20°C gelagert und über Nacht in die -80°C Truhe überführt. Nach mindestens 12 h wurden die vorgekühlten Röhrchen direkt in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurde der Inhalt eines Einfrierröhrchens in 10 ml Medium gegeben, abzentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert und ausplattiert. Nach ca. 12 h wurde das überstehende Medium gewechselt.

4.3.2.4 Ernte von eukaryontischen adhärenenten Zellen

Nach Entfernen des Kulturmediums wurde der Zellrasen zweimal mit kaltem PBS gewaschen, mit Hilfe eines Gummischabers abgekratzt und die Zellsuspension in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden 10 min bei 800 rpm in einer Kühlzentrifuge (Eppendorf) präzipitiert und das Zellsediment wurde sofort der weiteren Behandlung zugeführt oder bei -80°C tiefgefroren.

4.3.2.5 Erstellen von Wachstumskurven

Um die Proliferation einer Zelllinie zu verfolgen, wurden mehrere 3,5 cm- oder 6 cm-Gewebekulturschalen parallel mit der angegebenen Zellzahl besät. An den nachfolgenden Tagen wurden von jeweils zwei Platten die Zellen abtrypsiniert und ihre Zahl mittels eines Hämocytometers (Neubauer-Zählkammer) bestimmt. Von beiden Werten wurde der Mittelwert gebildet.

4.3.2.6 DNA Transfektion in Säugetierzellen

Je nach Zelltyp wurden verschiedene Transfektionsmethoden angewendet, um rekombinante DNA in die Zellen einzubringen.

Zum einen wurden transiente Transfektionen durchgeführt, d.h. es fand keine Selektion von Zellen statt, die das Plasmid stabil in ihr Genom, bzw. extrachromosomal aufgenommen haben. Alle transfizierten Zellen wurden geerntet, und für jedes Experiment erfolgte eine neue Transfektion.

Zum anderen wurden stabile Transfektionen durchgeführt mit anschließender Selektion, um zu gewährleisten, daß nur diejenigen Zellen überleben, die das transfizierte Plasmid tragen.

Bei jeder Transfektionsmethode wurden die Zellen am Vorabend so ausgesät, daß sie zur Transfektion in subkonfluenter Dichte vorlagen. Etwa 4 h vor der Transfektion wurde das Kulturmedium durch frisches ersetzt. Bei einer transienten Transfektion sollten die Zellen zum Transfektionszeitpunkt ca. 80 % konfluent sein, bei einer stabilen ca. 50 - 60 %.

4.3.2.6.1 Transfektion nach der Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode (Graham und van der Eb, 1973)

10 µg Vektor DNA wurden mit 2,5 Vol. EtOH und 0,1 Vol. 3 M NaAc pH 5,5 bei -20°C präzipitiert, durch Zentrifugation (14000 rpm, 30 min, 4°C) präzipitiert, mit 70% EtOH gewaschen, 30 min unter der Sterilwerkbank getrocknet, in 438 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,6 gelöst und mit 62 µl 2 M CaCl₂ versetzt. Die Lösung wurde in ein 15 ml-Röhrchen überführt und unter Zuhilfenahme einer Pasteurpipette belüftet, während langsam 500 µl 2xHEBS zugetropft wurden. Dann wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Ausformung von Ca₃PO₄-DNA Präzipitaten zu erlauben, die anschließend in das überstehende Medium der Zellen gegeben wurden. Nach 6-12 h bei normalen Kulturbedingungen wurde das Medium erneuert.

Diese Methode erwies sich bei der stabilen Transfektion der 10-1 Zellen als die Effizienteste.

4.3.2.6.2 Tranfektion mit DOTAP Reagenz (Boehringer Mannheim)

Die Transfektion mit dem DOTAP Reagenz wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.3.2.6.3 Tranfektion mit Superfect (Qiagen)

Bei der Transfektion der FR3 und TC7-17kT Zellen wurde das Superfect Transfektionsreagenz verwendet. Die Transfektion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.3.2.6.4 Tranfektion mit dem Mammalian Transfection Kit (Stratagene)

Die Transfektion mit dem Mammalian Transfection Kit, welches bei den Hela und Saos Zellen zum Einsatz kam, wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.3.2.6.5 Tranfektion mit Transfast (Promega)

Die Transfektion mit Transfast wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.3.2.6.6 Kotransfektion von Zellen

TC7-17kT und FR3 Zellen sind bereits mit SV40 Tumorantigenen stabil transfiziert und mit G418 selektioniert worden. Um diese Zellen auch mit den p53 Konstrukten stabil zu transfizieren, mußte eine Kotransfektion mit einem Hygromycinresistenzgen erfolgen, um die Selektion zu ermöglichen. Dabei wurde das Superfect Reagenz benutzt. Das Hygromycinresistenzgen wurde in zehnmal geringerer Konzentration eingesetzt als das p53 Konstrukt, um zu gewährleisten, daß die selektierten Zellen beide Plasmide enthalten.

4.3.3 Etablierung von DNA rekombinanten Zelllinien

Anders als bei der transienten Transfektion wartet man hier den Einbau der eingeführten DNA in das Genom der Empfänger Zelle ab. Um dies zu erreichen, wurde das entsprechende Gen in einem Neomycinresistenzgen tragenden Vektor kloniert, beziehungsweise eine Kotransfektion mit einem Hygromycinresistenzgen durchgeführt. Circa zwei Tage nach Transfektion der Zellen nach der Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode, mit Superfect oder mit dem "Mammalian Transfection Kit" wurden die Zellen 1:10 auf 10 cm-Gewebekulturschalen ausgesät. Einen weiteren Tag später wurde die Selektion der transfizierten Zellen begonnen, indem dem Kulturmedium G418, ein Antibiotikum vom Kanamycin-Typ oder G418 und Hygromycin zugesetzt wurde. Die Konzentration der Droge richtete sich nach der jeweils transfizierten Zelllinie. Alle zwei Tage wurde das Selektionsmedium erneuert. Wenn auf den untransfizierten Kontrollschalen alle Zellen abgestorben waren, wurden die selektionierten Kolonien mit Hilfe von Klonierungszyklindern abtrypsiniert, in 24 "well"-Gewebekulturschalen transferiert und als Zelllinien etabliert.

4.3.4 Indirekte Immunfluoreszenz

Um die Transfektionseffizienz, die Proteinexpression von Zellen, und die Lokalisation von Proteinen innerhalb der Zelle zu bestimmen, ist die indirekte Immunfluoreszenz eine geeignete Methode. Die zu untersuchenden Zellen werden auf Kulturschalen ausgesät, die sterile Deckgläschen enthielten. 24 - 48 h nach Transfektion oder anderer Zellbehandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die Deckgläschen entnommen. Die Deckgläschen wurden nochmals mit PBS abgespült und für mind. 30 min in Aceton bei - 20 °C fixiert und permeabilisiert. Die Zellen können bis zu einer Woche in Aceton gelagert werden.

Die Deckgläschen wurden dann für 30 min in PBS gewaschen und anschließend auf Parafilm bei RT mit dem ersten Antigen-spezifischen Antikörper (60 µl, in PBS verdünnt) für 45 min inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen. Die nun folgenden Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt, um die Signalverstärkung durch den zweiten Antikörper nicht abzuschwächen. Der an FITC oder TR gekoppelte zweite Antikörper (60 µl, in PBS verdünnt) wurde für 45 min bei RT inkubiert. Danach wurde erneut für dreimal 10 min gewaschen und die Deckgläschen auf einem Objektträger in Eindickmedium oder Moviol eingebettet. Nach deren Aushärten (2 h bei 37°C oder über Nacht bei RT) konnten die Zellen im Fluoreszenzmikroskop analysiert werden.

4.3.5 Zellzyklusanalyse

Zur Analyse der Zellzyklusphasen wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und anschließend im Durchflußcytometer analysiert.

Die zu untersuchenden Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/10 cm Platte ausgesät, nach 16 h wie gewohnt abtrypsiniert und wie folgt fixiert: Die Zellen wurden in PBS resuspendiert und bei 2000 rpm für 6 Min bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde zweimal mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Anschließend wurde das Präzipitat in 200 µl PBS resuspendiert und in eiskaltes Ethanol getropft. Nach 30 min bei -20°C wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen, zentrifugiert und in PI Färbelösung 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die Analyse am FACS. Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen Modfit und Cellquest.

Bei den stabil transfizierten Zellen, die als Mischklone etabliert wurden, wurde die Zellzyklusanalyse mit Hilfe eines p53 spezifischen Antikörpers und anschließender Propidiumiodidfärbung durchgeführt, um die nicht p53 exprimierenden Zellen von der Analyse auszuschließen.

Die zu untersuchenden Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/10 cm Platte ausgesät, nach 16 h abtrypsiniert und wie folgt fixiert: Die Zellen wurden in PBS/EDTA resuspendiert und bei 2000 rpm für 6 min bei 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS/EDTA gewaschen und zentrifugiert. Das Zellpräzipitat wurde danach in 3 ml eiskalter PBS/EDTA/Paraformaldehyd-Lösung resuspendiert und auf Eis inkubiert. Nach einer Stunde wurden 8 ml kaltes PBS/EDTA dazugegeben und wieder abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 1 ml PBS/EDTA resuspendiert, 8 ml 80% Ethanol wurde hinzugefügt und 15 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz konnte jetzt entweder bei -20°C gelagert oder es konnte mit der Permeabilisierung der Zellen begonnen werden. Hierzu wurden die Zellen abzentrifugiert, das Präzipitat vorsichtig in 1 ml PBS/EDTA/Tween 20 resuspendiert und 15 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden 10 ml kaltes PBS/EDTA hinzugegeben und abermals zentrifugiert. Jetzt konnte mit der Färbung begonnen werden. Das Präzipitat wurde in 100 µl Primärantikörperlösung aufgenommen, die zum Absättigen der unspezifischen Bindungen mit 1 % Ziegen Serum versetzt war. Die Negativkontrolle wurde lediglich mit Ziegen Serum und nicht mit Antikörper inkubiert. Nach 30 min bei Raumtemperatur und gelegentlichem Schütteln wurden 4 ml PBS/EDTA hinzugegeben und zentrifugiert. Die nun folgenden Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt. Die Zellen wurden in 100 µl Sekundärantikörperlösung (Ziege-anti Maus FITC) mit 1 % Ziegen Serum resuspendiert und 30 min bei RT inkubiert. Dann wurden 4 ml PBS/EDTA hinzugegeben und zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 100 µl PI Färbelösung aufge-

nommen und abermals 30 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml PBS/EDTA wurden die Zellen am FACS analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen Modfit und Cellquest.

5 Ergebnisse

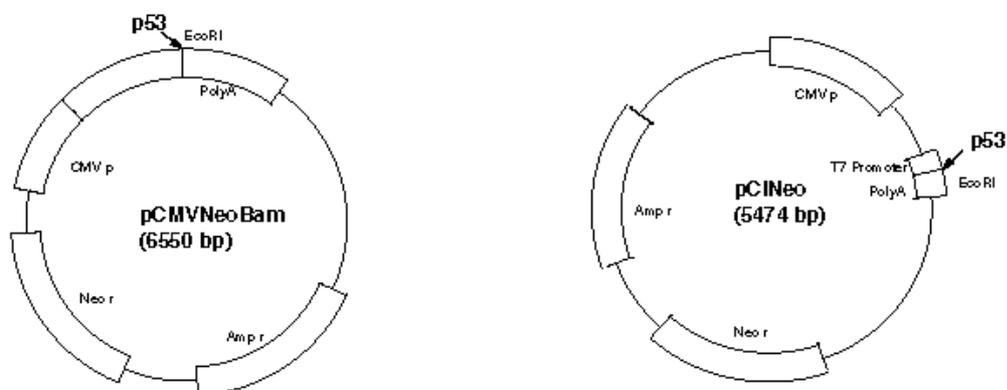
Der Tumorsuppressor p53 ist maßgeblich an der Erhaltung der genomischen Stabilität beteiligt. In 60% aller humanen Karzinome ist das p53 Gen mutiert. Mutationen des p53 Gens konnten in über 250 Codons nachgewiesen werden und haben völlig verschiedenen Auswirkungen, die sowohl von prognostischer wie auch von therapeutischer Bedeutung sind. Ziel dieser Arbeit war es, ausgewählte p53 Mutationen im selben zellulären System zu vergleichen. Hierzu wurden die p53 Mutationen ts p53, Meth A, T3T3, 3t3tx-1 und 3t3tx-50 gewählt. Die Auswirkungen der jeweiligen Mutationen auf die Zellen sollten anhand des Wachstumsverhaltens der Zellen, deren Verhalten unter FCS-Entzug und im Softagar und hinsichtlich der subzellulären p53 Lokalisation im Vergleich zu untransfizierten und mit wt p53 transfizierten Zellen untersucht werden.

5.1 Etablierung und Charakterisierung von 10-1 Zellen mit exogenem p53

5.1.1 Klonierung der p53 cDNAs und Überprüfung der Konstrukte

Voraussetzung für den Vergleich der verschiedenen p53 Mutationen war die Klonierung der verschiedenen p53 cDNAs in das gleiche Expressionsplasmid.

Hierzu wurden die p53 cDNAs aus den Ursprungsplasmiden mit Restriktionsenzymen herausgeschnitten und in Plasmide kloniert, die für die Transfektion in eukaryontische 10-1 Zellen geeignet erschienen. Diese Plasmide enthalten neben dem CMV-Promoter auch das Neomycinresistenzgen, das eine Selektion von stabil p53 exprimierenden 10-1 Zellen erlauben sollte. Das ausgewählte pCINeo Plasmid enthält zusätzlich auch den Promoter der T7-RNA Polymerase.



pCMVNeoBam Vektor

pCINeo Vektor

Abbildung 2 Übersicht der verwendeten Plasmide

cDNA	Codon	Mutationen		Ursprungs- vektor	benutzte Restriktions- enzyme	Neuer Vektor
		Nukleotide	Aminosäure- austausch			
wt	-	-	-	PBR12CMV	<i>Bam HI / Hind III</i>	pCI Neo
ts p53	135	TGC zu GTC	Cys zu Val	pLXSN	<i>Eco RI</i>	pCI Neo
Meth A	168 234	GAG zu GGG ATG zu ATC	Glu zu Gly Met zu Ile	Bluescript SK	<i>Bam HI / Hind III</i>	pCMVNeo- Bam
T3T3	230 287	TAC zu GAC GAA zu GAT	Tyr zu Asp Glu zu Asp	pGEM-11Zf	<i>Apa I / Sfi I</i>	pCI Neo
3t3tx-1	230 237	TAC zu GAC ATG zu ATT	Tyr zu Asp Met zu Ile	pGEM-11Zf	<i>Apa I / Sfi I</i>	pCI Neo
3t3tx-50	230	TAC zu GAC	Tyr zu Asp	pGEM-11Zf	<i>Apa I / Sfi I</i>	pCI Neo

Tabelle 1 Ursprungsvektoren der verwendeten murinen cDNAs, Ort der Mutationen, Mutationsereignis auf genetischer und auf Proteinebene, verwendete Restriktionsenzyme, sowie die Vektoren, in die die cDNAs hineinkloniert wurden.

Da die Vektoren und die dazugehörigen "Inserts" nicht kompatibel waren, wurden zunächst passende Oligonukleotide generiert, die die Vektoren und "Inserts" miteinander verbinden sollten. Da diese Methode zu keinem Erfolg führte, wurden die gewonnenen für p53 kodierenden DNA Fragmente "blunt-end" in die Vektoren inkloniert. Kompetente Hb101 Bakterien wurden mit den Konstrukten transformiert.

Mittels Plasmidminipräparation wurden der Erfolg der Ligation und die Orientierung der inklonierten cDNAs innerhalb des Plasmids überprüft. Der Verdau der Konstrukte mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* sollte die "Inserts" wieder aus den entsprechenden Vektoren ausschneiden und es sollte ein 1377 bp großes p53 cDNA Fragment entstehen. Die Kontrolle der korrekten Orientierung der "Inserts" erfolgte bei den pCI-Neo Konstrukten durch den Verdau mit dem Restriktionsenzym *XhoI* und bei dem pCMVNeoBam Konstrukt mit *XhoI* und *XbaI*. Bei korrekter Orientierung entsteht bei den pCI Neo Konstrukten ein 108 bp großes Fragment, beim pCMVNeoBam Konstrukt ein 1555 bp großes Fragment.

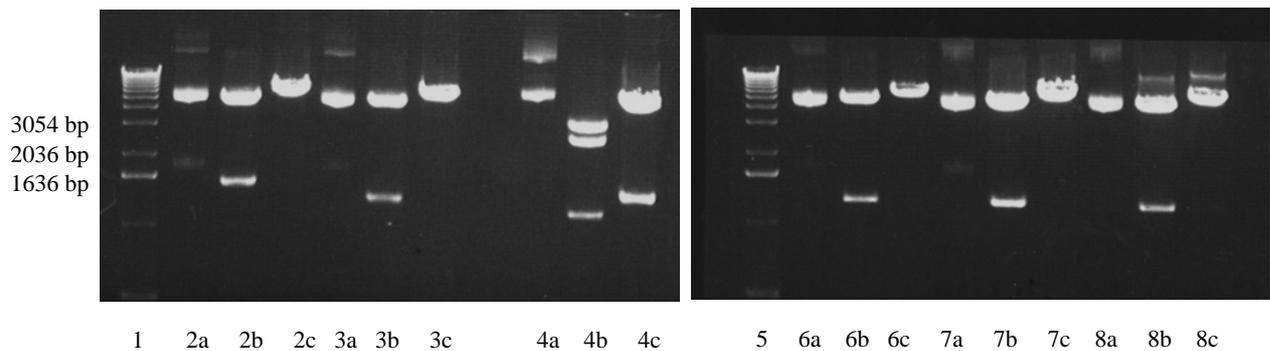


Abbildung 3 Agarosegelelektrophorese der Plasmid-DNA

Es wurde 1 µg der in der Plasmidminipräparation gewonnenen DNA in einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt.

Spur a zeigt jeweils die unverdauten DNA Präparationen, bei denen die verschiedenen topoisomeren Formen der DNA zu erkennen sind (zirkulär, relaxiert zirkulär und linear). Spur b zeigt die jeweilige Plasmid DNA mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut und Spur c zeigt die Plasmid DNA mit den Restriktionsenzymen *XhoI*, bzw. mit *XhoI* und *XbaI* verdaut.

Spur 1:	0,07 - 12,2 kb DNA Marker
Spur 2a:	wtp53pCI unverdaut
Spur 2b:	wtp53pCI mit <i>EcoRI</i> verdaut
Spur 2c:	wtp53pCI mit <i>XhoI</i> verdaut
Spur 3a:	ts p53pCI unverdaut
Spur 3b:	ts p53pCI mit <i>EcoRI</i> verdaut
Spur 3c:	ts p53pCI mit <i>XhoI</i> verdaut
Spur 4a:	Meth Ap53pCMV unverdaut
Spur 4b:	Meth Ap53pCMV mit <i>EcoRI</i> verdaut
Spur 4c:	Meth Ap53pCMV mit <i>XhoI</i> und <i>XbaI</i> verdaut

Spur 5:	0,07 - 12,2 kb DNA-Marker
Spur 6a:	T3T3p53pCI unverdaut
Spur 6b:	T3T3p53pCI mit <i>EcoRI</i> verdaut
Spur 6c:	T3T3p53pCI mit <i>XhoI</i> verdaut
Spur 7a:	3t3tx-1p53pCI unverdaut
Spur 7b:	3t3tx-1p53pCI mit <i>EcoRI</i> verdaut
Spur 7c:	3t3tx-1p53pCI mit <i>XhoI</i> verdaut
Spur 8a:	3t3tx-50p53pCI unverdaut
Spur 8b:	3t3tx-50p53pCI mit <i>EcoRI</i> verdaut
Spur 8c:	3t3tx-50p53pCI mit <i>XhoI</i> verdaut

Der Orientierungsverdau zeigte, daß alle p53 cDNAs die korrekte Größe aufweisen und in der richtigen Orientierung in die jeweiligen Plasmide inkloniert worden sind.

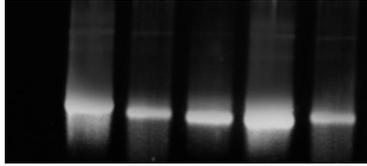
Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid DNA wurden Plasmidmaxipräparationen aus 500 ml plasmidtragenden Hb101 Bakterienkulturen durchgeführt.

Um das Arbeiten mit der korrekten DNA zu gewährleisten, wurden alle Konstrukte sequenziert. Die Sequenzen der publizierten Daten stimmten mit denen der Konstrukte überein (Sequenzen hier nicht abgebildet).

Die p53 Konstrukte wurden *in vitro* transkribiert und translatiert, um zu überprüfen, ob die p53 cDNA korrekt kloniert wurde und eine entsprechende mRNA transkribiert

wird, die *in vitro* in das p53 Protein translatiert werden kann.

Das Meth A p53 enthaltende Konstrukt konnte nicht auf diese Weise kontrolliert werden, da das pCMVNeoBam Plasmid keinen T7-Promoter enthält.

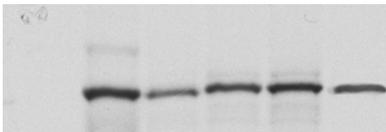


1 2 3 4 5 6

Abbildung 4 Agarosegelelektrophorese der aus der *in vitro* Transkription gewonnenen RNA

Es wurden je 2 µl der gewonnenen RNA in einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt.

Spur 1: pCINeo ohne "Insert", Negativkontrolle
 Spur 2: wtp53pCI
 Spur 3: ts p53pCI
 Spur 4: T3T3p53pCI
 Spur 5: 3t3tx-1p53pCI
 Spur 6: 3t3tx-50p53pCI



1 2 3 4 5 6

Abbildung 5 Fluorographie der *in vitro* translatierten Proteine

Es wurden je 1 µl der radioaktiv markierten Proben auf ein 12% Polyacrylamidgel geladen und mittels Fluorographie sichtbar gemacht.

Spur 1: pCINeo ohne "Insert", Negativkontrolle
 Spur 2: wtp53pCI
 Spur 3: ts p53pCI
 Spur 4: T3T3p53pCI
 Spur 5: 3t3tx-1p53pCI
 Spur 6: 3t3tx-50p53pCI

Das Ergebnis zeigt, daß das Protein in allen Konstrukten *in vitro* transkribiert und translatiert wird.

5.1.2 Transiente Transfektion von 10-1 Zellen mit den Vektorkonstrukten

Die p53 Konstrukte wurden vor der stabilen Transfektion transient in p53 negative 10-1 Zellen transfiziert, um auch *in vivo* die Funktionstüchtigkeit der Konstrukte zu überprüfen. Es wurden zuerst DOTAP und Superfect Transfektionsreagenzien miteinander verglichen. Die Zellen ließen sich mit Superfect Transfektionsreagenz besser transfizieren. Der Erfolg der Transfektion wurde mittels Immunfluoreszenz gegen p53 überprüft. Außerdem wurde die Verteilung des p53 Proteins innerhalb der Zellen untersucht.

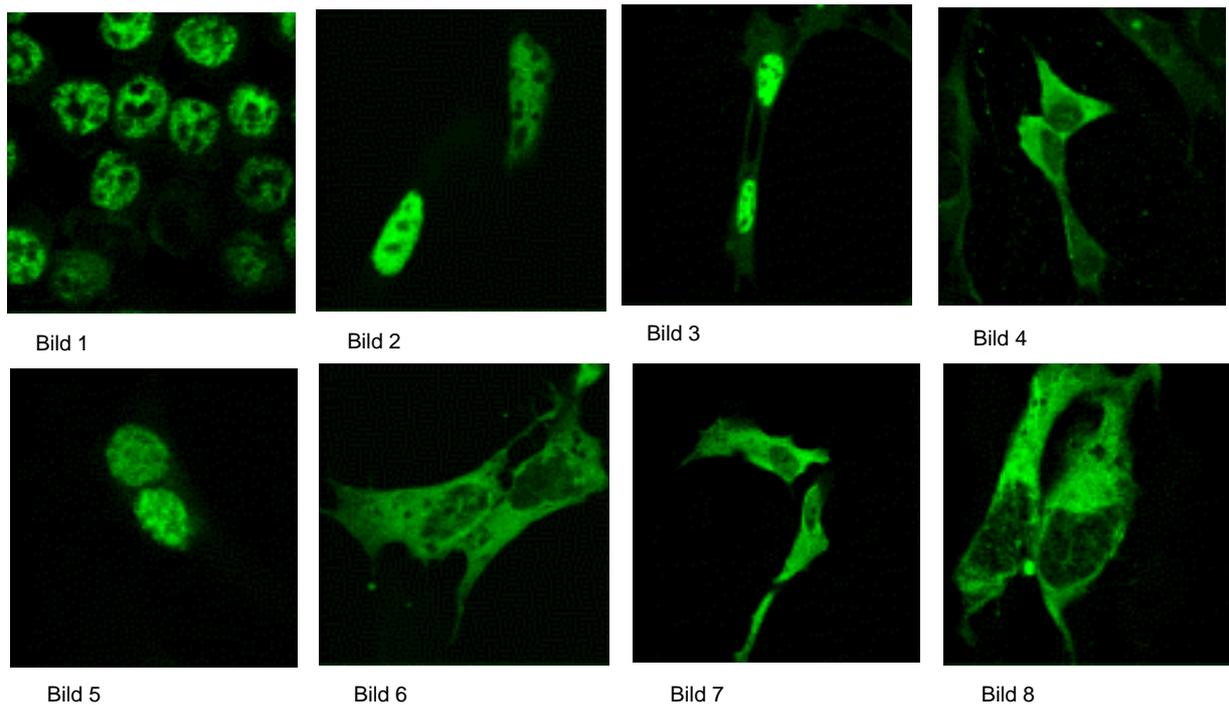


Abbildung 6 Immunfluoreszenzaufnahmen der mit p53 transient transfizierten 10-1 Zellen

Die p53 Detektion erfolgte mit dem Primärantikörper 248 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-IgG, konjugiert mit dem Farbstoff FITC

Bild 1:	Meth A Zellen, Positivkontrolle
Bild 2:	10-1, wt p53
Bild 3:	10-1, ts p53, kultiviert bei 30°C
Bild 4:	10-1, ts p53, kultiviert bei 39°C
Bild 5:	10-1, Meth Ap53
Bild 6:	10-1, T3T3p53
Bild 7:	10-1, 3t3tx-1p53
Bild 8:	10-1, 3t3tx-50p53

Die Effizienz der transienten Transfektion lag bei ca. 10%.

cDNA Konstrukt	Lokalisation
+ Kontrolle Meth A Zellen	nukleär
- Kontrolle nicht transfizierte 10-1 Zellen	-
wt	nukleär
ts 30°C	überwiegend nukleär
ts 39°C	überwiegend cytoplasmatisch
Meth A	nukleär
T3T3	überwiegend cytoplasmatisch
3t3tx-1	überwiegend cytoplasmatisch
3t3tx-50	überwiegend cytoplasmatisch

Tabelle 2 Lokalisation des p53 Proteins in den transfizierten 10-1 Zellen

In der Kontrolle, den mit wt p53 und den mit ts p53 transfizierten und bei 30°C kultivierten Zellen befand sich das p53 Protein überwiegend im Zellkern; bei allen anderen Zellen war die Lokalisation überwiegend cytoplasmatisch.

5.1.3 Stabile Transfektion der 10-1 Zellen mit den p53 Konstrukten

Da bei der transienten Transfektion die p53 cDNA nicht stabil ins Genom integriert wird, sind stabil p53 exprimierende Zelllinien notwendig, um die beobachteten Unterschiede sicher auf die jeweilige p53 Mutation zurückführen zu können.

10-1 Zellen wurden mit der "Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode" transfiziert. Die neomycinresistenten Klone wurden nach 14 - 20 Tagen isoliert, expandiert und auf ihre p53 Expression überprüft.

Die Etablierung von Zellklonen gelang jedoch nur bei den mit Meth A p53 transfizierten Zellen. Auch nach Anhebung der G418 Konzentration konnten bei den mit dem pCINeoVektor transfizierten Zellen keine Einzelklone etabliert werden, da nicht genügend Zellen abgestorben waren. Erst unter gleichzeitigem FCS-Entzug konnten auch bei den mit wt und ts p53 transfizierten Zellen Einzelklone etabliert werden. Da bei den mit T3T3, 3t3tx-1 und 3t3tx-50 p53 transfizierten Zellen keine Einzelklone etabliert werden konnten, wurden Mischkulturen, die eine heterogene Population von p53 exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen aufweisen, getestet.

Weder die etablierten Klone noch die Mischkulturen zeigten im Western Blot oder in der Immunpräzipitation mit anschließendem Western Blot eine p53 Expression. Verlängerte Expositionszeiten oder eine Detektion der p53 Proteine mit dem Erstantikörper 240 erbrachten kein anderes Ergebnis. Auch eine Immunpräzipitation der mit Methionin/Cystein metabolisch radioaktiv markierten Proteine und Langzeitexposition auf dem Phospho-Imager konnte keine nennenswerten Ergebnisse bringen. In der Immunfluoreszenz zeigten ca. 1% der Zellen positive Signale.

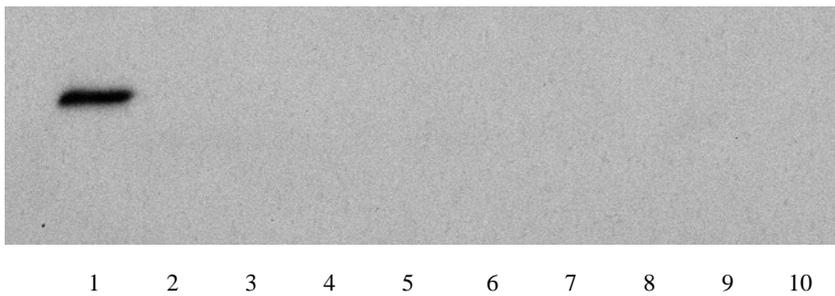


Abbildung 7 Western Blot Analyse von Gesamtzellysaten der stabil transfizierten 10-1 Zellen

Es wurden jeweils Lysate entsprechend eines Proteingehalts von 100 µg in einem 11, 5%igem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend auf eine Membran geblottet und mittels ECL visualisiert. Die Detektion der p53 Proteine fand mit dem Erstantikörper 248 und dem Zweitantikörper Anti-Maus-IgG-Peroxidase statt.

Spur 1:	Meth A Zellysat, Positivkontrolle
Spur 2:	Klon #1 wtp53
Spur 3:	Klon #3 wtp53
Spur 4:	Klon #5 wtp53
Spur 5:	Klon #6 wtp53
Spur 6:	Klon #7 wtp53
Spur 7:	Klon #10 wtp53
Spur 8:	Klon #2 ts p53
Spur 9:	Klon #3 ts p53
Spur 10:	10-1 Zellysat, untransfiziert, Negativkontrolle

Die anderen Klone und Mischklone erwiesen sich ebenfalls als negativ (hier nicht dargestellt).

cDNA Konstrukt	getestete Klone	exprimierende Klone
wtpCINeo	28	0
tspCINeo	32	0
Meth ApCMV NeoBam	21	0

Tabelle 3 Etablierung der mit p53 transfizierten Klone

5.1.4 PCR Analyse der mit p53 Konstrukten transfizierten 10-1 Zellen

Es stellte sich die Frage, ob das p53 nicht mehr oder nur in Bruchstücken im Genom der Zellen integriert war oder ob das p53 Gen nicht abgelesen werden konnte, was beispielsweise auf Inaktivierung des Promoters (z.B. durch Methylierung) zurückzuführen sein könnte.

Um zu überprüfen, ob das p53 Gen noch in den Zellen integriert ist, wurde die genomische DNA präpariert und eine PCR durchgeführt. Dazu wurden Oligonukleotide gewählt, die innerhalb des p53 Gens hybridisieren. Ist das Gen noch in der Zelle vorhanden, sollte ein PCR DNA Fragment von 400 bp entstehen.

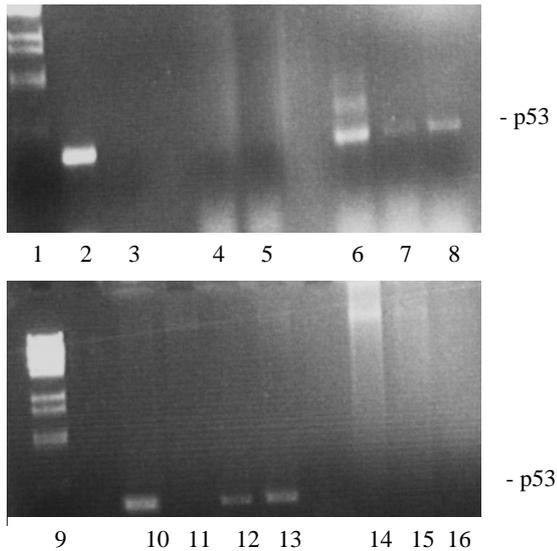


Abbildung 8 PCR Analyse der 10-1 Klone

Es wurden jeweils die Hälfte der Proben auf ein einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt.

Spur 1:	0,07 - 12,2 kb DNA Marker
Spur 2:	Positivkontrolle
Spur 3:	Negativkontrolle
Spur 4:	Klon #2 wt p53
Spur 5:	Klon #4 wt p53
Spur 6:	Klon #1 ts p53
Spur 7:	Klon #2 ts p53
Spur 8:	Klon #5 ts p53
Spur 9:	0,07 - 12,2 kb DNA Marker
Spur 10:	Klon #1 Meth A p53
Spur 11:	Klon #2 Meth A p53
Spur 12:	Klon #3 Meth A p53
Spur 13:	Klon #4 Meth A p53
Spur 14:	Klon #5 Meth A p53
Spur 15:	Klon #6 Meth A p53
Spur 16:	Klon #7 Meth A p53

Die durchgeführte PCR Analyse zeigte, daß bei einem Teil der Klone das Gen nicht mehr vorhanden war. Bei drei mit Meth A und bei drei mit ts p53 transfizierten Klone war das p53 Gen noch im Genom vorhanden.

Hieraus ließ sich schließen, daß zumindest Fragmente des p53 Gens integriert, aber nicht exprimiert wurden.

5.1.5 Behandlung der stabil transfizierten Zellen mit 5'-Azacytidin

Die vorherigen Ergebnisse zeigen, daß die Konstrukte sowohl *in vitro* als auch bei der transienten Transfektion *in vivo* transkribiert und translatiert werden, dies aber bei der stabilen Transfektion nicht möglich ist. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Methylierung des pCMV Promoters sein (Deppert, pers. Mitteilung).

Um dies zu überprüfen, wurden die Klone bei denen in der PCR das p53 Gen nachgewiesen wurde, mit verschiedenen Konzentrationen (0,5 μM , 1 μM , 3 μM , 5 μM und 10 μM) 5'-Azacytidin behandelt, einem Chemotherapeutikum, welches nicht mehr methyliert werden kann und dessen Einbau in die neusynthetisierte DNA zu ihrer Demethylierung führt. Western Blot Analysen der Zellysate der mit unterschiedlichen Konzentration von 5'-Azacytidin behandelten Klone ergaben keine p53 Expression. Die Immunfluoreszenz zeigte jedoch eine bis zu einer 5'-Azacytidin Konzentration von 3 μM ansteigende p53 Expression. Bei höherer Konzentration starben die Zellen. Das p53 Protein war ausschließlich in einigen punktförmigen Arealen im Zellkern lokalisiert.

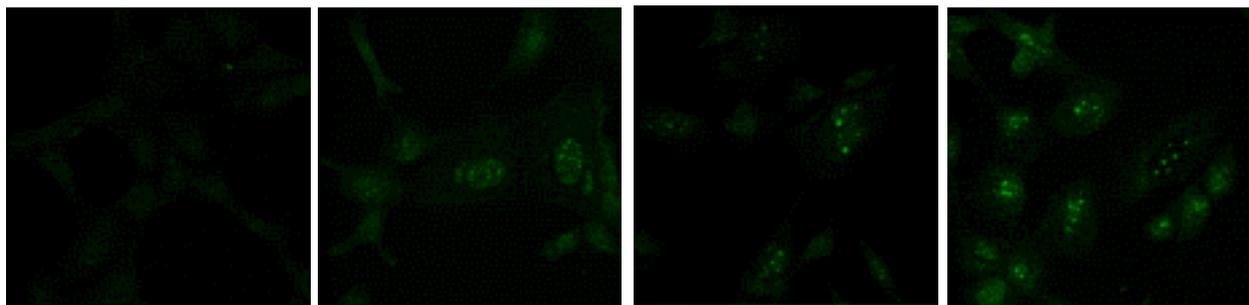


Bild 1

Bild 2

Bild 3

Bild 4

Abbildung 9 Immunfluoreszenzaufnahmen der mit 5'-Azacytidin behandelten 10-1 Zellen

Die p53 Detektion erfolgte mit dem Primärantikörper 248 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-IgG, konjugiert mit dem Farbstoff FITC

- Bild 1: 10-1, ts p53, unbehandelt
 Bild 2: 10-1, ts p53, mit 0,5 μM 5'-Azacytidin behandelt
 Bild 3: 10-1, ts p53, mit 1 μM 5'-Azacytidin behandelt
 Bild 4: 10-1, ts p53, mit 3 μM 5'-Azacytidin behandelt

Die weitere Kultivierung der Zellen zeigte, daß die Zellen vermehrt abstarben. Untransfizierte 10-1 Zellen starben zwar einige Tage nach der Behandlung mit 5'-Azacytidin vermehrt ab, erholten sich aber dann wieder. Die Zellen in denen das p53 Gen in der PCR nachgewiesen werden konnte, brauchten wesentlich länger, um wieder ihr ursprüngliches Wachstumsverhalten zu erlangen. Nach Absetzen der Behandlung war in diesen Zellen keine p53 Expression in der Immunfluoreszenz mehr nachweisbar.

5.2 Etablierung und Charakterisierung von Hela, Saos, TC7-17kT und FR3 Zellen mit exogenem p53

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, daß eine stabile p53 Expression in 10-1 Zellen mit den verwendeten Vektoren nicht möglich ist. Da für die Ausübung der p53 Funktion das pRb eine essentielle Bedeutung hat, sollte in den nun folgenden Experimenten untersucht werden, ob die Etablierung von stabil p53 exprimierenden Zelllinien möglich ist, die kein oder ein inaktives pRb haben.

Hierfür wurden Hela, Saos, TC7-17kT und FR3 Zellen gewählt.

5.2.1 Überprüfung der Zelllinien auf das Vorhandensein von p53, pRb und von SV40 T-Ag Proteinen

Diese Zelllinien wurden zuerst auf das Vorhandensein von p53, pRb und Proteinen des SV40 Virus überprüft. Vor allem bei den bereits transfizierten Zellen, kann es vorkommen, daß bei einem erneuten Auftauen und Kultivieren der Zellen die in das Genom eingebrachte DNA, in diesem Fall also das 17kT und das aminoterminalen LT Fragment T₁₄₇ des SV40 Virus, nicht mehr im Genom der Zelle integriert sind.

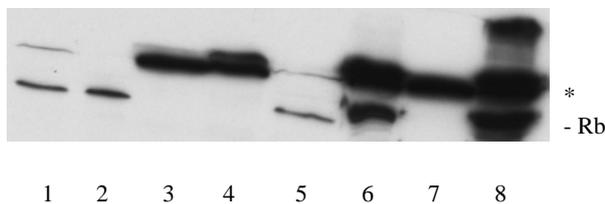


Abbildung 10 Western Blot Analyse der pRb Expression der verschiedenen Zelllinien

Es wurden jeweils Lysate der Zelllinien entsprechend eines Proteingehalts von 100 µg in einem 12%igem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend auf eine Membran geblottet und mittels ECL visualisiert. Die Detektion des Rb Proteins fand mit dem Erstantikörper IF8 und dem Zweitantikörper Anti-Maus-IgG-Peroxidase statt. Der Stern markiert eine Kreuzreaktion.

Spur 1:	10-1
Spur 2:	Meth A
Spur 3:	Saos
Spur 4:	Hela
Spur 5:	FR3
Spur 6:	TC7-17kT
Spur 7:	Saos, alte "Charge", Negativkontrolle
Spur 8:	CV1, Positivkontrolle

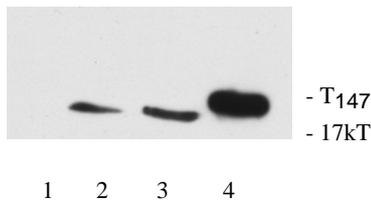


Abbildung 11 Western Blot Analyse der Expression der verschiedenen SV40 Tumorantigene der verschiedenen Zelllinien

Es wurden jeweils Zellysate entsprechend eines Proteingehalts von 100 µg in einem 12%igem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend auf eine Membran geblottet und mittels ECL visualisiert. Die Detektion der SV40 Proteine fand mit den Erstantikörpern 419 und 416 und dem Zweitantikörper Anti-Maus-IgG Peroxidase statt.

Spur 1:	Hela, Negativkontrolle
Spur 2:	TC7-17kT, alte "Charge", Positivkontrolle
Spur 3:	TC7-17kT
Spur 4:	FR3

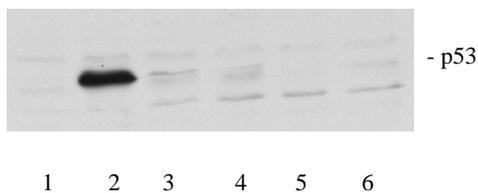


Abbildung 12 Western Blot Analyse der p53 Expression der verschiedenen Zelllinien

Es wurden jeweils Lysate entsprechend eines Proteingehalts von 100 µg in einem 12%igem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend auf eine Membran geblottet und mittels ECL visualisiert. Die Detektion des p53 Proteins fand mit dem Erstantikörper 248 und dem Zweitantikörper Anti-Maus-IgG Peroxidase statt.

Spur 1:	10-1, negativ Kontrolle
Spur 2:	Meth A, positiv Kontrolle
Spur 3:	Hela
Spur 4:	Saos
Spur 5:	FR3
Spur 6:	TC7-17kT

Die Abbildungen zeigen, daß 10-1, Meth A, FR3 und TC7-17kT Zellen pRb in nachweisbaren Mengen aufweisen. Sowohl in den Saos, als auch in den Hela Zellen konnte kein pRb nachgewiesen werden.

Die TC7-17kT Zellen enthalten das 17kT Protein und die FR3 Zellen enthalten das aminoterminalen LT Proteinfragment T₁₄₇ des SV40 Virus.

Außerdem waren alle Zelllinien, außer Meth A, p53 negativ.

Verlängerte Expositionszeiten oder eine Detektion der p53 Proteine mit dem Erstantikörper 240 erbrachten kein anderes Ergebnis.

5.2.2 Transiente Transfektion von Hela, Saos, TC7-17kT und FR3 Zellen mit den Vektorkonstrukten

Es wurde erneut die Transfektionseffizienz von DOTAP, Superfect, der Calcium-Phosphat-Präzipitationsmethode, Transfast und des "Mammalian Transfection Kit" miteinander verglichen. Die transiente Transfektion von Hela und Saos Zellen mit dem "Mammalian Transfection Kit" der Firma Stratagene ergab mit über 80% die höchste Transfektionseffizienz. Diese Methode erwies sich hingegen bei der Transfektion von FR3 und TC7-17kT Zellen als ungeeignet. Hier erbrachte das Superfect Reagenz mit einer Effizienz von ca. 30% bei den FR3 Zellen und 25 % bei den TC7-17kT Zellen die bestmögliche Effizienz.

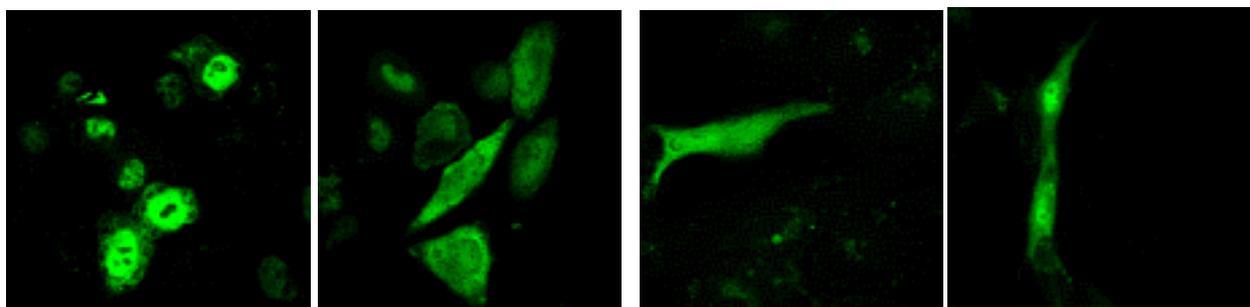


Bild 1

Bild 2

Bild 3

Bild 4

Abbildung 13 Immunfluoreszenzaufnahmen der mit p53 transient transfizierten Zellen

Die p53 Detektion erfolgte mit dem Primäntikörper 248 und dem Sekundäntikörper Ziege-anti-Maus-IgG, konjugiert mit dem Farbstoff FITC

Es wurden beispielhaft einige Bilder ausgewählt.

- Bild 1: Hela, ts p53, bei 39°C kultiviert
 Bild 2: Saos, ts p53, bei 39°C kultiviert
 Bild 3: TC7-17kT, ts p53, bei 39°C kultiviert
 Bild 4: FR3, ts p53, bei 39°C kultiviert

Des weiteren wurden wieder die Lokalisation von p53 innerhalb der Zelle untersucht.

cDNA Konstrukt	Hela	Saos	TC7-17kT	FR3
wt	nukleär	nukleär	nukleär	nukleär
ts 30°C	überwiegend nukleär	überwiegend nukleär	überwiegend nukleär	überwiegend nukleär
ts 39°C	nukleär > cytoplasmatisch	nukleär < cytoplasmatisch	überwiegend cytoplasmatisch	nukleär < cytoplasmatisch
Meth A	nukleär	nukleär > cytoplasmatisch	nukleär > cytoplasmatisch	nukleär > cytoplasmatisch
T3T3	nukleär > cytoplasmatisch	nukleär < cytoplasmatisch	nukleär = cytoplasmatisch	nukleär < cytoplasmatisch
3t3tx-1	nukleär > cytoplasmatisch	nukleär < cytoplasmatisch	nukleär = cytoplasmatisch	nukleär < cytoplasmatisch
3t3tx-50	nukleär > cytoplasmatisch	nukleär < cytoplasmatisch	nukleär < cytoplasmatisch	nukleär < cytoplasmatisch

Tabelle 4

Lokalisation des p53 Proteins in den transient transfizierten Zellen

Bei allen Zelllinien, die mit wt p53 und ts p53 transfiziert und bei 30 C kultiviert wurden, befindet sich das p53 im Zellkern. Auffällig ist die wesentlich stärkere nukleäre Anhäufung von p53 in den Hela Zellen, verglichen mit den anderen Zelllinien.

5.2.3 Stabile Transfektion der Hela und Saos Zellen

Nach Ermittlung der nötigen toxischen G418 Konzentration, wurden die Zellen mit dem "Mammalian Transfection Kit" der Firma Stratagene transfiziert.

5.2.3.1 Charakterisierung der p53 exprimierenden Zelllinien und Nachweis des Proteins

Es wurden Zellkone etabliert, die eine heterogene Population von exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen darstellen und deren p53 Expression überprüft.

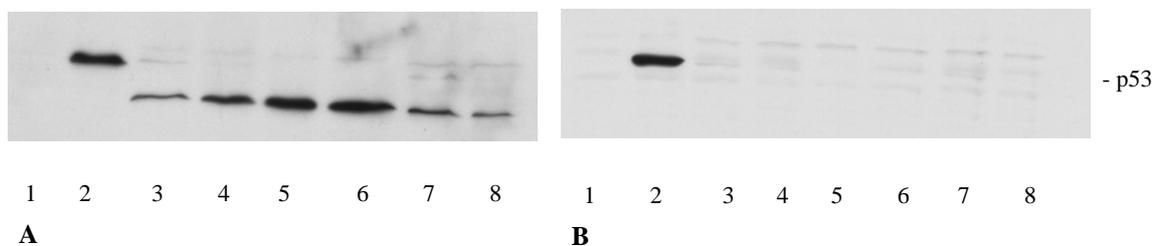


Abbildung 14 Western Blot Analyse der etablierten Hela Zelllinien mit den Erstantikörpern 240 und 248, bzw. 421

Es wurden Zellysate entsprechend eines Proteingehalts von 100 µg in einem 12%igem Polyacrylamid-gel elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend auf eine Membran geblottet und mittels ECL visualisiert.

Die Detektion der p53 Proteine fand mit dem Erstantikörpern 248 und dem Zweitantikörper Anti-Maus-IgG Peroxidase statt.

A

Spur 1:	Hela untransfiziert, Negativkontrolle
Spur 2:	Meth A, Positivkontrolle
Spur 3:	Hela wtp53
Spur 4:	Hela ts p53
Spur 5:	Hela Meth Ap53
Spur 6:	Hela T3T3p53
Spur 7:	Hela 3t3tx-1p53
Spur 8:	Hela 3t3tx-50p53

B

Die Membran aus Abbildung 14 A wurde mit dem gegen den C-Terminus des Proteins gerichteten Antikörper 421 unter identischen Bedingungen inkubiert.

Die Western Blot Analyse ergab, daß alle etablierten Hela Zelllinien p53 enthalten, dieses jedoch verkürzt ist. Bei der Inkubation mit dem Erstantikörper 421 waren alle Proben p53 negativ. Die Ergebnisse weisen darauf hin, daß es sich um ein C-terminal

deletiertes p53 Protein in allen etablierten Hela Zelllinien handelt. Von den Zelllinien exprimierten ca. 25% p53.

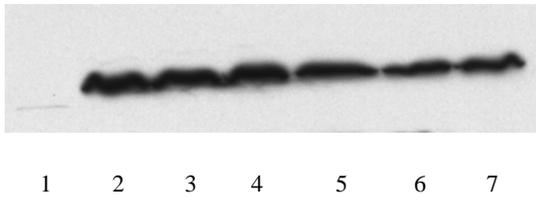


Abbildung 15 Western Blot Analyse der etablierten Saos Zelllinien mit den Erstantikörpern 240 und 248

Es wurden jeweils Zellysate entsprechend eines Proteingehalts von 100 µg in einem 12%igem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend auf eine Membran geblottet und mittels ECL visualisiert. Die Detektion des p53 Proteins fand mit dem Erstantikörper 248 und dem Zweitantikörper Anti-Maus-IgG Peroxidase statt. Verlängerte Expositionszeiten oder eine Detektion der p53 Proteine mit dem Erstantikörper 240 oder 421 erbrachten kein anderes Ergebnis.

Spur 1:	Saos wtp53
Spur 2:	Saos ts p53
Spur 3:	Saos Meth Ap53
Spur 4:	Saos T3T3p53
Spur 5:	Saos 3t3tx-1p53
Spur 6:	Saos 3t3tx-50p53
Spur 7:	Meth A, Positivkontrolle

Die Analyse zeigt, daß alle etablierten Saos Zelllinien, außer der mit wtp53 transfizierten Zelllinie p53 positiv sind und das Protein die richtige Länge aufweist. Ca. 10% der Zellen exprimierten p53.

5.2.3.2 Morphologie und Wachstumsverhalten in Zellkultur

Weder die p53 exprimierenden Hela noch die Saos Zelllinien zeigten im Vergleich zu den nicht transfizierten oder lediglich mit dem Resistenzplasmid transfizierten Ursprungszelllinien einen Unterschied bezüglich ihrer Morphologie. Zur quantitativen Beschreibung wurden von jeder Zelllinie 3×10^4 Hela Zellen und 8×10^4 Saos Zellen ausgesät und an 10 aufeinanderfolgenden Tagen die Zellzahl von je zwei Platten bestimmt.

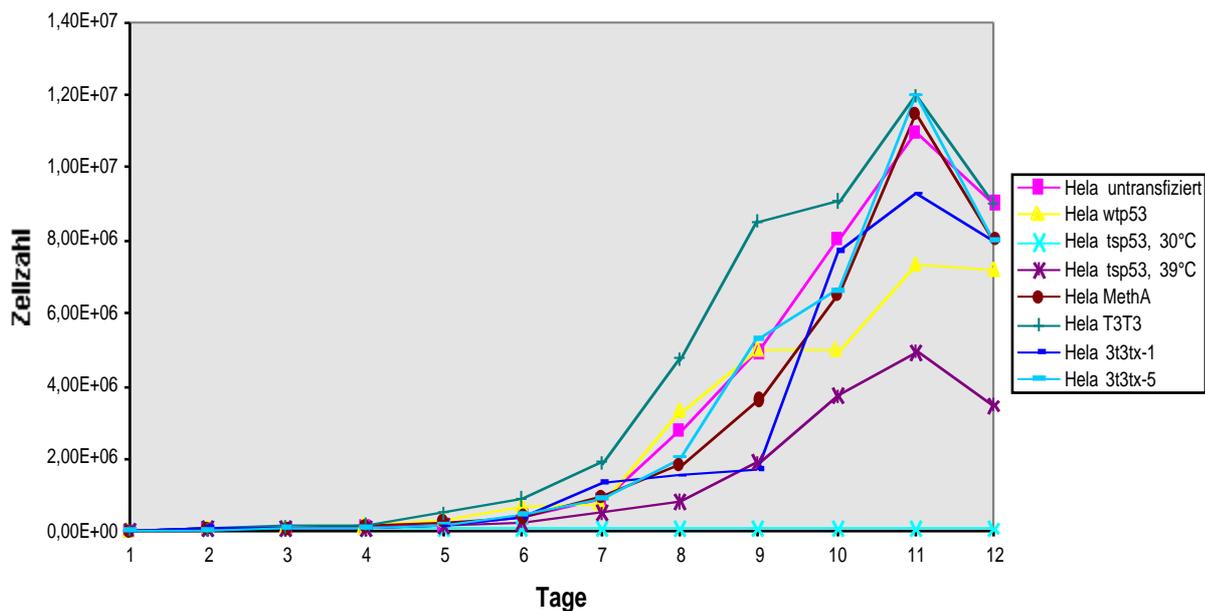


Abbildung 16 A Wachstumskurven der etablierten Hela Zelllinien

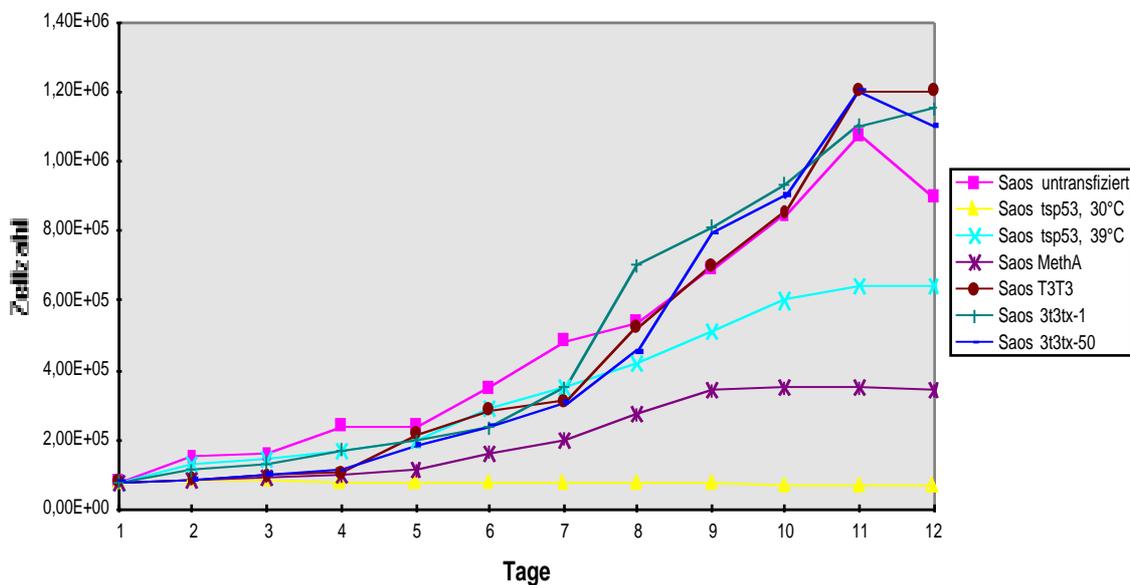


Abbildung 16 B Wachstumskurven der etablierten Saos Zelllinien

Es zeigte sich, daß die mit ts p53 transfizierten und bei 30 °C kultivierten Saos und Hela Zelllinien bereits am nächsten Tag in den Wachstumsarrest gingen. Die mit MethA p53 und mit ts p53 transfizierten und bei 39 °C kultivierten Zellen hatten etwas verlängerte Generationszeiten, die mit T3T3 p53 transfizierten Zellen hatten etwas kürzere Generationszeiten als die übrigen Zelllinien.

5.2.3.3 Zellzyklusanalysen der etablierten Zelllinien

Um die Beeinflussung bestimmter Wachstumsstadien durch die jeweiligen p53 Mutationen überprüfen zu können, wurden die Zelllinien einer Zellzyklusanalyse zugeführt. Da in den hier zu untersuchenden Zelllinien nicht alle Zellen p53 Protein exprimieren, wurden die Zellen außer mit Propidiumiodid zusätzlich mit dem p53 spezifischen Antikörper 240 und anschließend mit Ziege-anti-Maus-IgG, konjugiert mit FITC markiert, um die p53 enthaltenen Zellen selektiv beurteilen zu können. Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen Modfit und Cellquest.

cDNA Konstrukte	Hela			Saos		
	G ₀ /G ₁ Phase	S Phase	G ₂ /M Phase	G ₀ /G ₁ Phase	S Phase	G ₂ /M Phase
untransfizierte Zellen	49,2%	28,3%	22,5%	54,9%	15,3%	29,7%
wt	45,5%	17,1%	38,4%	-	-	-
ts 30°C	41,8%	14,3%	44%	46,6%	10,1%	43,4%
ts 39°C	38,1%	25,9%	35,8%	39,3%	21,9%	38,8%
Meth A	38,2%	25,2%	36,6%	52,1%	23,7%	24,1%
T3T3	43%	27,1%	29,9%	41,7%	27,7%	30,5%
3t3tx-1	41,1%	33,7%	25,3%	40,5%	24%	35,2%
3t3tx-50	42,5%	21,4%	36,1%	50,3%	21,7%	26,2%

Tabelle 5 Zellzyklusanalyse der Hela und Saos Zellen

Sowohl bei den Hela, als auch bei den Saos Zellen sieht man bei den mit ts p53 transfizierten und bei 30°C kultivierten Zelllinien einen Arrest in der G1 und in der G2 Phase. Die mit T3T3 p53 und 3t3tx-1 p53 transfizierten Zelllinien befinden sich zu einem höheren Prozentsatz in der S Phase als die anderen Zelllinien.

5.2.3.4 Bestimmung der p53 Lokalisation in den etablierten Zelllinien

Die Lokalisation des p53 Proteins wurde mittels Immunfluoreszenz bestimmt

cDNA Konstrukte	Hela Zellen	Saos Zellen	+ Kontrolle Meth A Zellen
untransfiziert	-	-	nukleär
wt	nukleär	-	-
ts 30°C	überwiegend nukleär	überwiegend nukleär	-
ts 39°C	nukleär > cytoplasmatisch	nukleär < cytoplasmatisch	-
Meth A	nukleär	nukleär > cytoplasmatisch	-
T3T3	nukleär > cytoplasmatisch	nukleär = cytoplasmatisch	-
3t3tx-1	nukleär > cytoplasmatisch	nukleär > cytoplasmatisch	-
3t3tx-50	nukleär > cytoplasmatisch	nukleär > cytoplasmatisch	-

Tabelle 6 Lokalisation des p53 Proteins in den stabil transfizierten Zellen

Die Verteilung des Proteins stimmte bei den Hela Zellen mit der Verteilung in den transient transfizierten Zellen überein. Auffällig war die geringere p53 Konzentration im Cytoplasma der Saos Zellen.

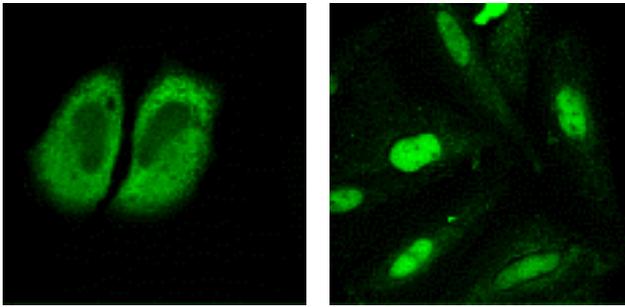


Bild 1

Bild 2

Abbildung 17 Immunfluoreszenzaufnahmen zum Vergleich der p53 Lokalisation in transient und stabil transfizierten Saos Zellen

Die p53 Detektion erfolgte mit dem Primärantikörper 248 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-IgG, konjugiert mit dem Farbstoff FITC

Es wurden beispielhaft einige Bilder ausgewählt.

Bild 1: Saos, 3t3tx-1 p53, transient transfiziert

Bild 2: Saos, 3t3tx-1 p53, stabil transfiziert

Im Vergleich zur transienten Transfektion, ist bei den stabil p53 exprimierenden Zelllinien wesentlich mehr p53 im Zellkern lokalisiert.

5.2.4 Stabile Transfektion der FR3 Zellen

Da die TC7-17kT Zellen eine äußerst schlechte Transfektionseffizienz aufwiesen, wurden lediglich die FR3 Zellen stabil transfiziert.

Das aminoterminaler LT Antigenfragment T147, welches von der FR3 Zelllinien exprimiert wird, komplexiert mit pRb. Da FR3 Zellen bereits durch retrovirale Infektion mit einem G418 resistenztragenden Konstrukt stabil transfiziert worden sind, mußte hier ein Hygromycinresistenz vermittelnder Vektor kotransfiziert werden, um die Etablierung von Klonen zu ermöglichen. Zur Transfektion wurde das Superfect Reagenz benutzt. Nach 18 Tagen wurden die Klone isoliert und expandiert.

5.2.4.1 Etablierung und Charakterisierung der p53 exprimierenden FR3 Klone

Die etablierten Klone wurden mittels Immunfluoreszenz und Western Blot Analyse bezüglich ihrer p53 Expression überprüft.

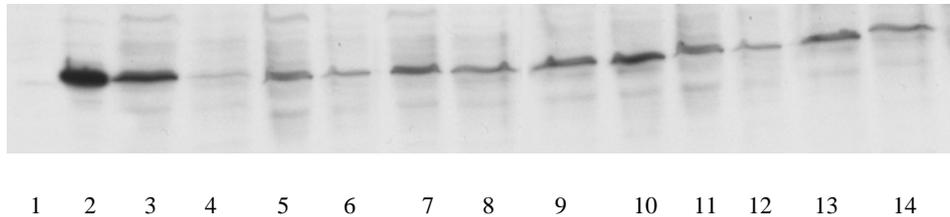


Abbildung 18 Western Blot Analyse der FR3 Klone

Es wurden jeweils Lysate entsprechend einem Proteingehalt von 100 µg auf einem 12%igem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, anschließend auf eine Membran gebロットet und mittels ECL visualisiert. Die Detektion des p53 Proteins fand mit dem Erstantikörpern 248 und dem Zweitantikörper Anti-Maus-IgG Peroxidase statt.

Spur 1:	FR3 Zellysat, untransfiziert, Negativkontrolle
Spur 2:	Meth A Zellysat, Positivkontrolle
Spur 3:	Klon #9 ts p53
Spur 4:	Klon #13 ts p53
Spur 5:	Klon #3 T3T3 p53
Spur 6:	Klon #4 T3T3 p53
Spur 7:	Klon #6 T3T3 p53
Spur 8:	Klon #11 T3T3 p53
Spur 9:	Klon #1 3t3tx-1 p53
Spur 10:	Klon #7 3t3tx-1 p53
Spur 11:	Klon #10 3t3tx-1 p53
Spur 12:	Klon #11 3t3tx-1 p53
Spur 13:	Klon #8 Meth A p53
Spur 14:	Klon #7 3t3tx-50 p53

Alle anderen Klone erwiesen sich als negativ (hier nicht dargestellt)

Die Western Blot Analysen zeigen unterschiedliche p53 Mengen der einzelnen FR3 Klone. Verlängerte Expositionszeiten oder eine Detektion der p53 Proteine mit dem Erstantikörper 240 erbrachten kein anderes Ergebnis.

p53 Konstrukt	getestete Klone	p53 exprimierende Klone
wtpCINeo	12	0
tspCINeo	27	2
Meth ApCMV NeoBam	14	1
T3T3pCINeo	13	4
3t3tx-1pCINeo	19	4
3t3tx-50pCINeo	20	1

Tabelle 7 Zusammenfassung der Ergebnisse der Etablierung der mit p53 transfizierten FR3 Klone

5.2.4.2 Morphologie und Wachstumsverhalten in Zellkultur

Die Klone wiesen bezüglich ihrer Morphologie keine Unterschiede zur untransfizierten oder nur mit dem Resistenzplasmid transfizierten Zelllinie auf.

Zur quantitativen Bestimmung wurden Wachstumskurven erstellt. Es wurden von jedem Klon 20 Platten mit 7×10^4 Zellen ausgesät und an zehn aufeinanderfolgenden Tagen die Zellzahl von je zwei Platten bestimmt.

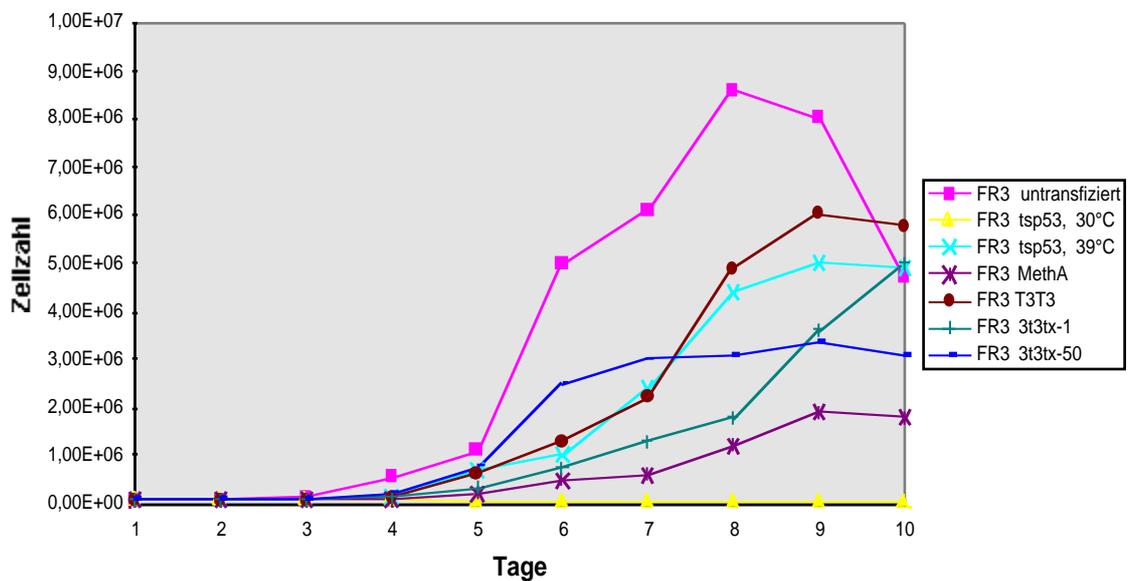


Abbildung 19 Wachstumskurven der etablierten FR3 Klone

Die bei 30°C kultivierten mit ts p53 transfizierten Zellen traten am nächsten Tag in den Wachstumsarrest. Die nicht transfizierten Zellen hatten kürzere Generationszeiten. Alle anderen transfizierten Zellen wiesen keine wesentlichen Unterschiede zueinander auf.

5.2.4.3 Zellzyklusanalysen der FR3 Klone

Da es sich bei den zu untersuchenden Zellen um Klone handelt, genügte eine Markierung mit Propidiumiodid aus, um die Beeinflussung bestimmter Wachstumsstadien beurteilen zu können.

benutzte cDNA	FR3		
	G ₀ /G ₁ Phase	S Phase	G ₂ /M Phase
untransfizierte Zellen	64,5%	23,5%	11,9%
ts 30°C	74,6%	19,3%	6,1%
ts 39°C	43,2%	33,7%	21,1%
Meth A	54,6%	27,3%	18,1%
T3T3	56,5%	20,5%	22,9%
3t3tx-1	60,7%	23,9%	15,3%
3t3tx-50	59,6%	20,2%	19,2%

Tabelle 8 Zellzyklusanalyse der FR3 Klone

Die mit ts p53 transfizierten und bei 30°C kultivierten Zellen sind überwiegend in der G₀/G₁ Phase. Die mit T3T3 p53 transfizierten Zellen haben im Vergleich zu den bisher untersuchten Zelllinien mehr Zellen in der S Phase. Im Vergleich zu den vorangegangenen Meßreihen mit den Saos und Hela Zelllinien befanden sich hier wesentlich mehr Zellen in der G₀/G₁ Phase.

5.2.4.4 Bestimmung der p53 Lokalisation in den FR3 Klonen

Die Lokalisation des p53 Proteins wurde mittels Immunfluoreszenz bestimmt

p53 Konstrukt	FR3 Zellen	+ Kontrolle Meth A Zellen
- Kontrolle nicht transfizierte Zellen	-	nukleär
wt	nukleär	-
ts 30°C	überwiegend nukleär	-
ts 39°C	nukleär > cytoplasmatisch	-
Meth A	nukleär > cytoplasmatisch	-
T3T3	nukleär = cytoplasmatisch	-
3t3tx-1	nukleär = cytoplasmatisch	-
3t3tx-50	nukleär > cytoplasmatisch	-

Tabelle 9 Lokalisation des p53 Proteins in den stabil transfizierten FR3 Zellen

Auch hier zeigten sich im Vergleich zur transienten Transfektion eine geringere p53 Lokalisation im Cytoplasma der Zellen.

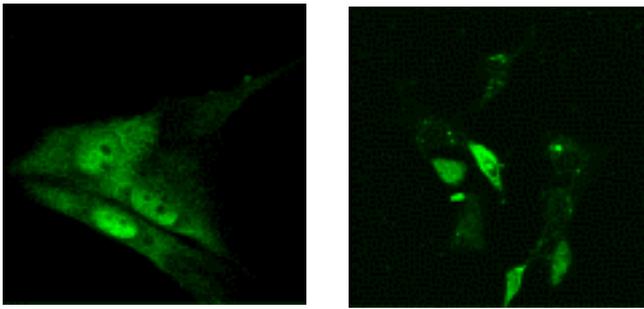


Bild 1

Bild 2

Abbildung 20 Immunfluoreszenzaufnahmen zum Vergleich der p53 Lokalisation in transient und stabil transfizierten FR3 Zellen

Die p53 Detektion erfolgte mit dem Primärantikörper 248 und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-IgG, konjugiert mit dem Farbstoff FITC

Es wurden beispielhaft einige Bilder ausgewählt.

Bild 1: FR3, 3t3tx-1 p53, transient transfiziert

Bild 2: FR3, 3t3tx-1 p53, stabil transfiziert

Im Vergleich zur transienten Transfektion, ist bei den stabilen Klonen wesentlich mehr p53 im Zellkern lokalisiert.

6 Diskussion

Dem Tumorsuppressorprotein p53 kommt eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität der Zelle zu. Diese Eigenschaft führte zu der Bezeichnung von p53 als "Wächter des Genoms" (Lane, 1992).

In zellulären Stresssituationen, wie z.B. UV- oder γ -Strahlung, Hypoxie, o.ä. steigt die p53 Proteinmenge in der Zelle deutlich an. Über Induktion des cdk-Inhibitors p21^{Waf1/Cip1} kann es zum Zellzyklusarrest kommen. Alternativ kann die Akkumulation von p53 auch den programmierten Zelltod, die sogenannte Apoptose, zur Folge haben. Beide Mechanismen verhindern die Weitergabe der fehlerhaften genetischen Information an die Tochterzellen und somit die Manifestation eines DNA Schadens, der zur Tumorentstehung führen kann. Ein weiterer Mechanismus mit dem p53 zur genomischen Integrität der Zelle beiträgt, ist die Inhibition der homologen DNA Rekombination in mitotisch wachsenden Zellen (Wiesmüller et al., 1996; Dudenhöffer *et al.*, 1998). Des Weiteren konnte gezeigt werden, daß p53 eine 3'-5' Exonukleaseaktivität besitzt (Mummenbrauer *et al.*, 1996).

In über 60% aller humanen Karzinome konnte eine Mutation des p53 Gens nachgewiesen werden. Diese kann einerseits zur Inaktivierung des Proteins ("loss of function"), andererseits auch zu einem Funktionsgewinn des mutierten Proteins ("gain of function") führen. Im Gegensatz zu anderen Tumorsuppressorgenen, die hauptsächlich durch "nonsense" Mutationen oder Deletionen inaktiviert werden, treten bei p53 hauptsächlich Punktmutationen auf, die in über 250 Codons nachgewiesen werden konnten. Diese Mutationen sind nicht zufällig verteilt, sondern finden sich mit einer signifikanten Häufung in den evolutionär hochkonservierten Regionen (siehe Abb.1). Ein wesentliches Ziel der p53 Forschung ist die Untersuchung der Ursachen und Auswirkungen der jeweiligen Mutation und der damit verbundenen Therapiemöglichkeiten. So konnte bei Mammakarzinomen, die eine Mutation im Codon 248 aufweisen, ein besonders schlechtes Ansprechen auf eine Chemotherapie mit Doxorubicin gezeigt werden (Übersicht in Hainaut *et al.*, 1998).

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion ausgewählter p53 Mutationen im gleichen zellulären System zu untersuchen.

Hierzu wurden u.a. mutierte p53 Gene, die aus minimal transformierten und aus maximal transformierten Zelllinien isoliert wurden mit dem Wildtyp verglichen.

Die Parameter einer zellulären Transformation sind phänotypische Merkmale, die die Wachstumseigenschaften einer Zelle in Relation zur Parentalzelle beschreiben. Der transformierte Phänotyp einer Zelle zeichnet sich unter anderem aus durch die Fähigkeit zur Proliferation bei verringertem Serumgehalt, den Verlust der Ausbildung geordneter Aktinkabelstrukturen während der Interphase, eine erhöhte Sättigungsdichte, die Fähigkeit zu mehrschichtigem Wachstum, beziehungsweise den Verlust der Kon-

taktinhibition, die Fähigkeit zum Wachstum in Weichagarkultur oder die Tumorigenität. In der genannten Reihenfolge wird diesen Kriterien einer zellulären Transformation eine zunehmende Stringenz zugesprochen. Tatsächlich können diese Merkmale im Einzelfall relativ unabhängig voneinander mehr oder weniger stark ausgeprägt sein (Risser and Pollak, 1974; Übersicht Martin, 1981). Entsprechend dem Ausprägungsgrad dieser Merkmale erfolgt die Klassifikation in minimal und maximal transformiert nach Risser und Pollak.

Das p53 Gen der T3T3 Mauszelllinie weist Mutationen in den Codons 230 und 287 auf. Diese Zellen sind in der Lage, als Minimaltransformanten im Softagar zu wachsen (Zerrahn *et al.*, 1992). Diese Zellen, die im hohen Maße p53 exprimieren, weisen ein abnormes proliferatives Verhalten auf, obwohl das p53 Protein dieser Zellen *in vivo* mit Wildtyp p53 spezifischen Antikörpern reagiert (Milner *et al.*, 1993).

Die als Maximaltransformanten im Softagar wachsenden Zellen der spontan transformierten 3t3tx Zelllinie weisen heterozygote p53 Allele auf, wobei das eine Allel Mutationen in den Codons 230 und 237 aufweist (3t3tx-1), das andere Allel lediglich auf Codon 230 (3t3tx-50) (Übersicht in Milner *et al.*, 1993).

Die Mutation an den Codons 230 und 237 befinden sich in der hochkonservierten Domäne IV des p53 Gens (Soussi *et al.*, 1990); das Vorhandensein dieser Mutation 230 wurde vermehrt im Zusammenhang mit dem Auftreten des Burkitt Lymphoms beobachtet (Caron de Fromentel and Soussi, 1992). Die Mutation im Codon 287 liegt außerhalb der hochkonservierten Regionen, wurde aber interessanterweise in humanen Glioblastomzellen beschrieben (Übersicht in Milner *et al.*, 1993).

Das aus der Methylcholantren-transformierten Mauszelllinie BALB/c3T3 isolierte Meth A p53 Gen weist Mutationen in den Codons 168 und 234 auf, die sich in den evolutionär hochkonservierten Regionen III und IV des Gens befinden.

Für die p53 Mutanten Meth A, 3t3tx und T3T3 konnte eine unterschiedlich starke MAR-DNA-Bindungsaktivität *in vitro* gezeigt werden (Will *et al.*, 1998). Diese Eigenschaft könnte die molekulare Basis für die spezifische Transaktivierung von Genen und damit für den Funktionsgewinn ("gain of function") bestimmter Mutanten sein (siehe Einleitung). Die aus den oben beschriebenen Zelllinien isolierten p53 Mutanten sollten mit dem Wildtyp verglichen werden. Aufgrund der bereits erwähnten Wildtyp p53 Eigenschaften, wie beispielsweise der Zellzyklusarrest in der G1 oder G2 Phase, das Einleiten der Apoptose, die Exonukleaseaktivität usw. erschien es unwahrscheinlich, stabil überexprimierende Wildtyp p53 Zelllinien etablieren zu können. Aus diesem Grund wurde eine p53 Mutante gewählt, welche durch einen Aminosäureaustausch in Position 135 von Cystein zu Valin die Eigenschaft der Temperatursensitivität besitzt. Bei 30°C nimmt das Protein Wildtyp-, bei 39°C Mutantenkonformation an.

Die beschriebenen p53 cDNAs wurden in dasselbe eukaryontische Expressionsvektorsystem kloniert. Um den Einfluß der p53 Mutationen optimal untersuchen zu können, sollte zunächst ein Zellsystem etabliert werden, in dem die Funktion eines exogen exprimierten p53 Proteins nicht durch ein endogen exprimiertes p53 beeinflusst wird. Die immortalisierte Mausembryofibroblastenzelllinie 10-1 mit Deletionen in beiden p53 Allelen schien für diese Fragestellung geeignet zu sein und wurde mit den entsprechenden p53 Mutanten transfiziert. Das Einbringen der p53 Mutationen in dasselbe Zellsystem erlaubt einen optimalen Vergleich, da die beobachteten Veränderungen nicht auf einen unterschiedlichen zellulären Hintergrund oder ein unterschiedliches Expressionssystem zurückgeführt werden können.

Zellklone, die stabil Wildtyp p53 überexprimieren, sind aufgrund der biologischen Funktionen von p53 nicht zu erwarten, da erhöhte p53 Proteinmengen, wie bereits erwähnt, den Zellzyklusarrest oder Apoptose zur Folge haben können. Hingegen sollte eine Etablierung von Zellklonen, die Mutanten p53 exprimieren möglich sein, da die Wildtypfunktionen zumindest teilweise aufgehoben sind und einige Mutanten sich darüberhinaus durch einen Funktionsgewinn ("gain of function") auszeichnen, der zu einer Zunahme der Tumorigenität führt. Die Mutation führt in der Regel zu einem Selektionsvorteil der entsprechenden Zellen.

Überraschenderweise ließen sich trotz Optimierung der Transfektionsbedingungen keine stabil p53 exprimierenden 10-1 Zellen etablieren.

Die fehlende p53 Expression bei der stabilen Transfektion ist nicht auf die Vektoren zurückzuführen, da bei der *in vitro* Transkription und Translation der für die zu untersuchenden p53 Mutanten codierenden Expressionsvektoren p53 synthetisiert werden konnte. Auch in der transienten Transfektion konnte eine starke p53 Expression erreicht werden.

Da es sich nicht um eine Kotransfektion handelte, sondern das Resistenzgen und das mutierte p53 Gen auf einem Vektor kodiert waren, ist bei vorhandener Neomycinresistenz der transfizierten Zellen davon auszugehen, daß das p53 Gen in das Genom der Zellen integriert wurde.

Um zu überprüfen, ob das p53 Gen durch Rekombinationsereignisse aus dem Genom wieder eliminiert worden war, wurde eine PCR Analyse der stabil mit p53 transfizierten Zellklone durchgeführt. Hierzu wurden Oligonukleotide verwendet, die in der Mitte des p53 Gens hybridisieren. Bei fünf von 15 in der PCR getesteten Klonen konnte es in der PCR Analyse nachgewiesen werden. Bei den übrigen Klonen war es nicht mehr nachweisbar.

Da ein Drittel der getesteten Zellklone das Gen in der PCR aufwies, kann man vermuten, daß es sich hierbei nicht um eine gezielte Selektion handelte.

Es wäre zu postulieren, daß die positiven Zellen die Transkription des p53 Gens ver-

hindern. Dieses ist beispielsweise durch Methylierung des Promoters möglich.

In der Promoterregion von vielen gewebespezifischen Genen kommen gehäuft nicht-methylierte CpG Dinukleotide vor, bei denen ein Zusammenhang zwischen DNA Methylierung und Genexpression beobachtet wird (Bird, 1992). Die Genaktivierung korreliert häufig mit verminderter DNA Methylierung in der Promoterregion. Andererseits tritt bei vielen Genen mit methylierter Promotor- und Enhancerregion eine Hemmung der Transkription auf. Die DNA Bindung einiger Transkriptionsfaktoren hängt von Methylierungsmuster der DNA ab. So können beispielsweise die Transkriptionsfaktoren AP-2, c-Myc/Myn und E2F nicht an DNA binden, die ein methyliertes CpG Dinukleotid enthält, wodurch die Transkription dieser Gene verhindert wird (Hermann and Doerfler, 1989; Prendergast *et al.*, 1991; Kovessi *et al.*, 1987).

Die Zellklone, in denen in der PCR das p53 Gen nachgewiesen werden konnte, wurden im folgenden mit dem Chemotherapeutikum 5'-Azacytidin in unterschiedlicher Konzentration behandelt.

5'-Azacytidin ist ein Analogon zu Cytidin, das nicht methyliert werden kann und verhindert nach seinem Einbau in die DNA irreversibel deren Methylierung. Immunfluoreszenzanalysen dieser Behandlung zeigten eine bis zu einer Konzentration der Droge von 3 μM ansteigende, für p53-haltige Zellen ungewöhnliche Fluoreszenz (siehe Abbildung 9). Da zur Detektion von p53 der monoklonale Antikörper 248, der gegen den N-Terminus des Proteins gerichtet ist, verwendet wurde, handelt es sich hierbei tatsächlich um p53 und nicht um eine unspezifische Fluoreszenzreaktion. Bei noch höheren 5'-Azacytidin Konzentrationen starben die Zellen, 24 h nach Absetzen der Droge war keine durch p53 Expression bedingte Fluoreszenz mehr nachweisbar, da jetzt wieder eine DNA Methylierung stattfinden konnte. Die Fluoreszenzen traten ausschließlich in mehreren kleinen Foci des Zellkerns auf. Die mit p53 stabil transfizierten Zellen brauchten nach dem Absetzen der 5'-Azacytidin Behandlung wesentlich länger für das Wiedererlangen eines normalen Wachstumsverhaltens als die identisch behandelte, aber nicht transfizierte Ursprungszelllinie.

Für die punktuelle Akkumulation von p53 in diesen Zellen gibt es keine Erklärung. Zum einen wäre zu spekulieren, daß p53 unter diesen Versuchsbedingungen an spezifische Strukturen des Zellkerns bindet. Zum anderen könnte man vermuten, daß die Expression von Mutanten p53 für nicht oder nur wenig transformierte Zellen toxisch ist und diese durch Methylierungsprozesse die Mutanten p53 Expression verhindern. Durch 5'-Azacytidin Behandlung wurden diese Methylierungsreaktionen verhindert und p53 konnte in den Zellen akkumulieren. Dieser Mechanismus könnte eine Erklärung dafür sein, daß die Zellen, bedingt durch die Funktion des Proteins, überdurchschnittlich lange für das Wiedererlangen ihres normalen Wachstumsverhalten brauchten. Zur endgültigen Klärung dieser Fragestellung sind aber noch weitere Experimente

notwendig.

In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, daß die stabile Expression von wt und den hier gewählten p53 Mutanten von 10-1 Zellen supprimiert wird und unter diesen Bedingungen nicht möglich ist.

Unter der Annahme, daß Mutanten p53 in nicht oder nur wenig transformierten Zellen toxisch ist, müßte sich eine stabile p53 Expression in Zelllinien die einen stärkeren Transformationsgrad aufweisen, erreichen lassen.

In Zelllinien die kein oder ein funktionloses Retinoblastomagenprodukt haben, sollte dies möglich sein, da eine der Hauptwirkungen des Wildtyp p53 Proteins, nämlich die Induktion des Wachstumsarrest über p21^{Waf1/Cip1} und nachfolgender Aktivierung von pRb hier nicht erfolgen kann. Hela, Saos-2 und FR3 Zellen erfüllen diese Voraussetzung.

Die aus einem humanen Cervixcarcinom isolierten volltransformierten Hela Zellen exprimieren die Onkoproteine E6 und E7 der humanen "high-risk" Papillomaviren (HPV Typ 16/18). E6 interagiert mit dem zellulären E6 assoziierten Protein (E6-AP), einer Ubiquitin-Ligase und führt p53 spezifisch der ubiquitinabhängigen Proteolyse zu (Scheffner *et al.*, 1990, Slebos *et al.*, 1994; Li and Coffino, 1996). E7 komplexiert mit dem Retinoblastomagenprodukt und führt infolgedessen zu seiner Inaktivierung.

Die aus einem humanen Osteosarkom stammenden Saos-2 Zellen sind sowohl Rb, als auch p53 negativ.

Bei den FR3 Zellen handelt es sich um immortalisierte Rattenembryofibroblasten, die mit dem aminoterminalen LT Fragment T₁₄₇ des großen SV40 Tumorantigens transfiziert worden sind (Zerrahn *et al.*, 1994). Dieses Fragment komplexiert pRb.

Von den Hela und Saos Zellen wurden stabil p53 exprimierende Zelllinien etabliert, die aber bezüglich ihrer p53 Expression heterogen waren.

Von den Saos Zelllinien exprimierten mit ca. 10% wesentlich weniger Zellen p53 als die etablierten Hela Zelllinien.

Interessanterweise ließ sich bei den etablierten Hela Zelllinien eine stabil wt p53 exprimierende Zelllinie etablieren, dieses war weder bei den Saos noch bei den FR3 Zellen möglich. Allerdings wurde bei der mit wt p53 und bei allen anderen mit p53 Mutanten transfizierten Hela Zelllinien ein C-terminal deletiertes p53 exprimiert. Hier müßte in anschließenden Experimenten geklärt werden, um wieviele Aminosäuren das Protein verkürzt ist.

Da sich alle drei Kernlokalisierungssignale im C-Terminus des p53 Proteins befinden, und eine nukleäre Lokalisation für die Funktion von p53 essentiell ist (Shaulsky *et al.*, 1991), mußte zunächst geklärt werden, ob das Protein noch nukleär lokalisiert oder ob ein zumindest partieller Funktionsverlust des Proteins durch cytoplasmatische

Lokalisation zu erwarten ist. Durch Immunfluoreszenz konnte keine vermehrte cytoplasmatische Lokalisation des Proteins beobachtet werden, eher eine im Gegensatz zur transienten Transfektion geringere cytoplasmatische Lokalisation.

Eine alleinige Expression von einem C-terminal deletierten p53 könnte für diese Zellen einen Selektionvorteil bedeuten, da die spezifische Transaktivierung von bestimmten Genen auf diese Weise verhindert werden kann und die genomische Stabilität durch eine effiziente Inhibition der homologen Rekombination verbessert wird.

So konnte für die p53 Mutante 1-363her, ein Fusionsprotein aus humanem Wildtyp p53 mit Deletionen der 30 C-terminalen Aminosäuren und der humanen Östrogenbindedomäne, eine Inhibition der homologen Rekombination nachgewiesen werden, die sogar höher war als die von wt p53. Bei der p53 Mutante 1-333her, welches ebenfalls ein Fusionsprotein aus der humanen Östrogenbindedomäne und humanem Wildtyp p53 ist, aber Deletionen der 60 C-terminalen Aminosäuren aufweist, kommt es hingegen zu einem völligen Verlust dieser Eigenschaft (Dudenhöffer, 1998). Diese Mutante verfügt aber um eine um den Faktor 10 höhere 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (Janus *et al.*, 1999). Frau Dr. Dudenhöffer erreichte eine sehr gute Klonierungseffizienz der Deletionsmutante 1-363her und eine ausgesprochen schlechte Klonierungseffizienz für die Deletionsmutante 1-333her.

Um die Beeinflussung des Wachstumsverhaltens durch die jeweils transfizierte p53 Mutante auf die etablierten Zelllinien untersuchen zu können, wurden parallel zu den Wachstumskurven auch Zellzyklusanalysen angefertigt. Beide Methoden zeigten in Übereinstimmung zueinander bei den etablierten Hela und Saos Zelllinien einen Wachstumsarrest in der G1 und der G2 Phase bei den mit ts p53 transfizierten und bei 30°C kultivierten Zelllinien. Die T3T3 p53 Zelllinien wiesen leicht verkürzte Generationszeiten auf.

Die etablierten Saos Zelllinien zeichneten sich insgesamt gesehen durch längere Generationszeiten im Vergleich zu den Hela Zelllinien aus.

Die Beobachtung, daß die mit T3T3 p53 transfizierten Hela und Saos Zelllinien verkürzte Generationszeiten aufweisen, steht im Übereinstimmung mit den von Milner und Mitarbeitern gemachten Ergebnissen, die für die T3T3 Mauszelllinie, aus der das in dieser Arbeit benutzte p53 stammt, ein abnormes proliferatives Verhalten gezeigt hat, obwohl diese ein wie Wildtyp erscheinendes p53 Protein aufweist (Milner *et al.*, 1993).

Diese Ergebnisse, die ja einen gänzlich anderen zellulären Hintergrund aufweisen, lassen darauf schließen, daß dieses Wachstumsverhalten in der Tat auf diese p53 Mutation zurückzuführen ist.

Von den FR3 Zellen konnten von allen mit p53 Konstrukten transfizierten Zellen neomycinresistente Klone etabliert werden. Eine stabile p53 Expression war allerdings

nur bei wenigen Klonen nachzuweisen. So ließen sich von mit Meth A p53 und mit 3t3tx-50 p53 transfizierten Zellen nur jeweils ein sehr schwach p53 exprimierender Klon etablieren und von mit ts p53 transfizierten Zellen ein stark und ein schwach exprimierender Klon. Die Etablierung von Klonen der mit T3T3 p53 und 3t3tx-1 p53 transfizierten Zellen zeigte hingegen eine höhere Klonierungseffizienz. Ferner ließ sich kein wt p53 exprimierender Klon etablieren.

Bei den etablierten Zelllinien waren keine morphologischen Unterschiede zu beobachten. Sowohl die Zellzyklusanalysen, als auch die Wachstumskurven zeigten, wie auch bei den Hela und Saos Zelllinien, daß die mit T3T3 p53 transfizierten Zelllinien kürzere Generationszeiten aufwiesen und die mit ts p53 transfizierten und bei 30°C kultivierten Zelllinien in den Wachstumsarrest traten, wobei dieser Arrest aber überwiegend in der G1 Phase auftrat.

Die Etablierungsprobleme von stabil Meth A p53 und 3t3tx-50 p53 exprimierenden FR3 Zellen könnten zu der Vermutung führen, daß es bei einer Transfektion der FR3 Zellen mit diesen p53 Mutanten zu einer derartigen Störung der genomischen Integrität kommt, daß es nicht möglich war, lebensfähige p53 überexprimierende Klone zu etablieren.

Bei Fibroblasten von Li-Fraumeni Patienten, die bereits eine Keimbahnmutation in einem der p53 Allele tragen, führt eine weitere p53 Mutation zu einer ausgesprochenen genomischen Instabilität (Bischoff *et al.*, 1990; Bertrand *et al.*, 1997). Wird beispielsweise in diesen Zellen die p53 Mutante 175 (Arginin zu Histidin) exprimiert, so führt dies zu einer weiteren Destabilisierung, die sich in Aneuploidien, subtetraploiden Chromosomensätzen und Metaphasekernen mit bis zu 100 Chromosomen äußert (Liu *et al.*, 1996).

Diese Ergebnisse zeigen, daß in weitgehend normalen Zellen eine Expression von Mutanten p53 offensichtlich nicht erlaubt wird, obwohl der Grund hierfür noch nicht bekannt ist. Eine hohe Expression von Mutanten p53 läßt sich in diesen Zellen genauso schlecht erreichen wie die von Wildtyp p53. Aus dem Gesagten läßt sich schließen, daß eine hohe Expression von Mutanten p53 erst bei Vorliegen anderer genetischer Alterationen möglich ist. Hieraus ergibt sich, daß eine alleinige Mutation des p53 Gens folglich nicht als Ursache für die Entwicklung von Karzinomen angesehen werden kann. Wäre dies der Fall, sollte eine Etablierung von stabil Mutanten p53 exprimierenden Zelllinien problemlos möglich sein.

Auch anderen Arbeitsgruppen, so z.B. Burkart und Mitarbeitern, gelang nur eine minimale wt und Mutanten p53 Expression in Transfektionsexperimenten, obwohl die Expressionsplasmide über einem starken heterologen Promoter verfügten. Die Hypothese, daß T-Antigen die Expression von p53 fördert, konnte bestätigt werden. Auch in dieser Arbeitsgruppe gelang eine höhere p53 Expression bei den mit dem aminotermini-

nalene LT Fragment T₁₄₇ des großen SV40 Tumorantigens transfizierten FR3 Zellen, diese war allerdings deutlich geringer als die Expression von p53 zusammen mit dem gesamten großen Tumorantigen. Diese wesentlich bessere p53 Expression läßt sich durch die Funktion von T-Ag erklären. Es komplexiert p53 und schaltet sowohl dessen Transaktivatorfunktion (Bargonetti *et al.*, 1992; Farmer *et al.*, 1992; Segawa *et al.*, 1993) und dessen Fähigkeit zur Inhibition der homologen Rekombination aus (Wiesmüller *et al.*, 1996). Diese Beobachtung steht im Einklang mit den hier präsentierten Ergebnissen.

Des weiteren spricht viel dafür, daß eine Störung im Rb Stoffwechsel die Manifestation von p53 Mutationen begünstigt. Welche Faktoren noch zur Akkumulation von Mutanten p53 beitragen, bedarf weiterer Forschung.

Die These, daß die Mutation des p53 Gens nicht der erste Schritt der Tumorigenese ist, wird weiterhin durch die Beobachtung gestützt, daß Li-Fraumeni-Patienten, die eine Mutation eines p53 Allels aufweisen, nicht, wie man erwarten würde, bereits einige Monate nach der Geburt an Karzinomen versterben, sondern eine "relativ" hohe Lebenserwartung haben und erst in der vierten bis fünften Lebensdekade versterben. Ferner konnte bei diesen Patienten nachgewiesen werden, daß die Halbwertszeit des Mutanten p53 Proteins mit der Halbwertszeit des Wildtyps identisch ist, bis zur Manifestation von Karzinomen. Erst dann steigt die Halbwertszeit des Mutantenprotein drastisch an. Auch der dominant-negative Effekt von Mutanten p53 ist in Fibroblasten dieser Patienten nicht gegeben, da diese über dieselben Eigenschaften wie Wildtypfibroblasten verfügen (Sedlacek *et al.*, 1998; Boyle *et al.*, 1998; Deppert, persönliche Mitteilung). Es wäre also zu fordern, daß die p53 Expression anderen Regulationsmechanismen unterliegt. Erst wenn diese ausfallen, kommt es zur Karzinomentstehung bei diesen Patienten.

Verfügt Mutanten p53 über dominant-negative Eigenschaften, so wäre eine sehr frühe Karzinomentstehung und ein gänzlich anderes Verhalten von Mutanten p53 zu fordern, als es bei diesen Patienten der Fall ist.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, daß das Mutationsspektrum bei diesen Patienten nicht von denen anderer Tumore abweicht.

Zusammengefaßt sprechen die Daten dafür, daß die Manifestation eines Tumors nicht durch eine Mutation des p53 Gens initiiert sein kann.

7 Zusammenfassung

Der Tumorsuppressor p53 trägt maßgeblich zur Erhaltung der genomischen Integrität bei. Eine Mutation im p53 Gen ist in 60% aller humanen Karzinome nachweisbar. Die Akkumulation von p53 in der Zelle führt, je nach Ausmaß der Schädigung, zum Wachstumsarrest oder zur Apoptose. Des weiteren verfügt p53 über die Fähigkeit zur Inhibition der homologen Rekombination und über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Im Gegensatz zu anderen Tumorsuppressorgenen findet man im wesentlichen Punktmutationen anstelle von Deletionen oder "non-sense" Mutationen im p53 Gen. Ferner konnten p53 Mutationen in über 250 Codons nachgewiesen werden. Mutationen von p53 führen zu Funktionsänderungen ("gain of function") oder zu dessen Inaktivierungen ("loss of function").

Der Ort der p53 Mutation ist von besonderer Bedeutung. So unterscheiden sich die einzelnen Mutationen maßgeblich durch ihre Auswirkung auf die entsprechende Zelle voneinander. Ferner lassen sich, zumindest teilweise, Aussagen über Ursache der Mutation und über die Therapie des entsprechenden Karzinoms treffen. Der Charakterisierung der p53 Mutationen kommt folglich eine besondere Bedeutung zu.

Ziel dieser Arbeit war es, ausgewählte p53 Mutationen im selben zellulären System miteinander zu vergleichen. Hierzu sollte die immortalisierte Mausembryofibroblastenzelllinie 10-1 verwendet werden. Überraschenderweise gelang weder eine Etablierung stabil wt noch Mutanten p53 überexprimierender Klone. Eine punktuelle, lediglich im Zellkern nachweisbare p53 Expression wurde erst nach Behandlung der Klone mit dem Chemotherapeutikum 5'-Azacytidin, welches die Methylierung von DNA hemmt, beobachtet.

Bei der Transfektion von Zelllinien, die pRb negativ sind oder ein inaktives pRb aufweisen, gelang die Etablierung stabil p53 exprimierender Zelllinien. Hierzu wurden von Hela, Saos und von FR3 Zellen p53 exprimierende Zelllinien etabliert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß bestimmte Zellen die p53 Expression gezielt unterdrücken können. Außerdem konnte gezeigt werden, daß in Zelllinien, in denen das Retinoblastomagenprodukte inaktiv oder nicht vorhanden ist, eine stabile p53 Expression möglich ist.

Diese Daten zeigen, daß eine hohe Expression von Mutanten p53 erst bei anderen genetischen Alterationen möglich ist. Ein Defekt des pRB scheint hierbei hilfreich zu sein. Diese Ergebnisse erbringen folglich weitere Belege, daß die Mutation des Tumorsuppressorgens p53 nicht der erste und alleinige Schritt der Tumorigenese sein kann.

9. Literaturverzeichnis

- Agarwal, M. L., Agarwal, A., Taylor, W. R., and Stark, G. R. (1995). p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci Usa* 92 , 8493-8497.
- Armstrong, J. F., Kaufman, M. H., Harrison, D. J., and Clarke, A. r. (1995). High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice. *Curr Biol* 5 , 931-936
- Bakalkin, G., Yakovleva, T., Selivanova, G., Magnusson, K. P., Szekely, L., Kiseleva, E., Klein, G., Terenius, L., and Wiman, K. G. (1994). p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 , 413-417.
- Baker, S. J., Markowitz, S., Fearon, E. R., Willson-JKV, and Vogelstein, B. (1990). Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* 249 , 912-915.
- Bamberger, K., 9th p53 workshop, May, 9-13, 1998, Elounda Beach, Kreta.
- Barak, Y., and Oren, M. (1992). Enhanced binding of a 95 kDa protein to p53 in cells undergoing p53-mediated growth arrest. *Embo J* 11 , 2115-2121.
- Bargonetti, J., Reynisdottir, I., Friedman, P. N., and Prives, C. (1992). Site-specific binding of wild-type p53 to cellular DNA is inhibited by SV40 T antigen and mutant p53. *Genes Dev* 6 , 1886-1898.
- Bertrand, P., Rouillard, D., Boulet, A., Levalois, C., Soussi, T., and Lopez, B. S. (1997). Increase of spontaneous intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells expressing a mutant p53 protein. *Oncogene* 14 , 1117-1122.
- Bird, A. (1992). The essentials of DNA Methylation. *Cell* 70 , 5-8.
- Bischoff, J. R., Friedman, P. N., Marshak, D. R., Prives, C., and Beach, D. (1990). Human p53 is phosphorylated by p60-cdc2 and cyclin B-cdc2. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 87 , 4766-4770.
- Bishop, J. M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64 , 235-248.
- Boyer, H. W., Roulland-Dussoix, D. (1969). A completion analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41 , 459.
- Boyle, J. M., Mitchel E. L., Greaves, M. J., Roberts, S. A., Tricker, K., Burt, E., Varley, J. M., Birch, J. M., Scott, D. (1998). Chromosomal instability is a predominant trait of fibroblasts from Li-Fraumeni families. *Br. J. Cancer* 12 , 2181-92.

- Bode, J., and Maaß, K. (1988). Chromatin domain surrounding the human interferon-beta gene as defined by scaffold-attached regions. *Biochemistry* 27 , 4706-4711.
- Brown, D. R., Deb, S., Munoz, R. M., Subler, M. A., and Deb, S. P. (1993). The tumor suppressor and the oncoprotein simian virus 40 T antigen bind to overlapping domains on the MDM2 protein. *Mol. Cell. Biol.* 13 , 6849-6857.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 , 248-54.
- Burnette, W. N. (1981). „Western blotting“: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry* 112 , 195-203.
- Canman, C. E., Gilmer, T. M., Coutts, S. B., and Kastan, M. B. (1995). Growth factor modulation of p53-mediated growth arrest versus apoptosis. *Genes Dev.* 9 , 600-611.
- Capud, D., 9th p53 workshop, May, 9-13, 1998, Elounda Beach, Kreta.
- Caron de Fromental, C., and Soussi, T. (1992). The TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes, chromosomes and cancer* 4 , 1-15.
- Chen, J., Marechal, V., and Levine, A. J. (1993). Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol. Cell. Biol.* 13 , 4107-4114.
- Chen, P. L., Chen, Y., Bookstein, R., and Lee, W. H. (1990). Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 250 , 1576-1580.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D., and Pavletich, N. P. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: Understanding tumorigenic mutations. *Science* 265 , 346-355.
- Clarke, A. R., Purdie-C, A., Harrison, D. J., Morris, R. G., Bird, C. C., Hooper, M. L., and Wyllie, A. H. (1993). Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature* 362 , 849-852.
- Clarke, C. F., Cheng, K., Frey, A. B., Stein, R., Hinds, P. W., and Levine, A. J. (1988). Purification of complexes of nuclear oncogene p53 with rat and Escherichia coli heat shock proteins: in vitro dissociation of hsc70 and dnaK from murine p53 by ATP. *Mol. Cell. Biol.* 8 , 1206-1215.
- Cockerill, P. N., and Garrard, W. T. (1986). Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing

- topoisomerase II sites. *Cell* 44 , 273-282.
- Cross, S. M., Sanchez, C. A., Morgan, C. A., Schimke, M. K., Ramel, S., Idzerda, R. L., Raskind, W. J., and Reid, B. J. (1995). A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* 267 , 1353-1356.
- Czosnek, H. H., Bienz, B., Givol, D., Zakut-Houri, R., Pravatcheva, D. D., Ruddle, F. H., and Oren, M. (1984). The gene and the pseudogene for mouse p53 cellular tumor antigen are located on different chromosomes. *Mol Cell Biol* 4 , 1638-40.
- Deb, S., Jackson, C. T., Subler, M. A., and Martin, D. W. (1992). Modulation of cellular and viral promoters by mutant human p53 proteins found in tumor cells. *J.Virol.* 66 , 6164-6170.
- DeLeo, A. B., Shiku, H., Takthashi, T., John, m., Old, L. J. (1977). Cell surface antigens of chemically induced sarcomas of the mouse. I. Murine leukemia virus-related antigens and alloantigens on cultured fibroblasts and sarcoma cells: description of a unique antigen on BALB/c Meth A sarcoma. *J. Exp. Med.* 146 , 720-734.
- Deppert, W., Kurth, M., Graessmann, M., Graessmann, A., and Knippschild, U. (1991). Altered phosphorylation at specific sites confers a mutant phenotype to SV40 wild-type large T antigen in a flat revertant of SV40 transformed cells. *Oncogene* 6 , 1931-1938.
- Diller, L., Kassel, J., Nelson, C. E., Gryka, M. A., Litwak, G., Gebhardt, M., Bressac, B., Ozturk, M., Baker, S. J., Vogelstein, B., and Friend, S. H. (1990). p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol. Cell. Biol.* 10 , 5772-5781.
- Dittmer, D., Pati, S., Zambetti, G., Chu, S., Teresky, A. K., Moore, M., Finlay, C., and Levine, A. J. (1993). Gain of function mutations in p53. *Nature Genet.* 4 , 42-46.
- Dowdy, S. F., Hinds, P. W., Louie, K., Reed, S. I., Arnold, A., and Weinberg, R. A. (1993). Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* 73 , 499-511.
- Dudenhoefter, C., Rohaly, G., Will, K., Deppert, W., and Wiesmueller, L. (1998). Specific mismatch recognition in heteroduplex intermediates by p53 suggests a role in fidelity control of homologous recombination. *Mol Cell Biol* 18 , 5332-5342.
- Dudenhoefter, C. (1998). Mechanismen der Kontrolle der homologen Rekombination durch den Tumorsuppressor p53. Dissertation. Universität Tübingen.
- El-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Gen* 1 , 45-49.

- El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75 , 817-825.
- Eliyahu, D., Goldfinger, N., Pinhasi-Kimhi, O., Shaulsky, G., Skurnik, Y., Arai, N., Rotter, V., and Oren, M. (1988). Meth A fibrosarcoma cells express two transforming mutant p53 species. *Oncogene* 3 , 313-321.
- Eliyahu, D., Michalovitz, D., Eliyahu, S., Pinhasi-Kimhi, O., and Oren, M. (1989). Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 86 , 8763-8767.
- Ewen, M. E., Sluss, H. K., Sherr, C. J., Matsushime, H., Kato, J., and Livingston, D. M. (1993). Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell* 73 , 487-497.
- Fakharzadeh, S. S., Trusko, S. P., and George, D. L. (1991). Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *Embo J* 19 , 1565-1569.
- Farmer, G., Bargonetti, J., Zhu, H., Friedman, P., Prywes, R., and Prives, C. (1992). Wild-type p53 activates transcription in vitro. *Nature* 358 , 83-86.
- Fields, S., and Jang, S. K. (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 249 , 1046-1049.
- Finlay, C. A., Hinds, P. W., and Levine, A. J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57 , 1083-1093.
- Finlay, C. A., Hinds, P. W., Tan, T. H., Eliyahu, D., Oren, M., and Levine, A. J. (1988). Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol. Cell. Biol.* 8 , 531-539.
- Fogh, J., Trempe, G. (1975). *Human Tumor cells in vitro* . Plenum Press, New York, pp 115-159,
- Foord, O. S., Bhattacharya, P., Reich, Z., and Rotter, V. (1991). A DNA binding domain is contained in the C-terminus of wild type p53 protein. *Nucleic Acids Res* 19 , 5191-5198.
- Ford, J. M., and Hanawalt, P. C. (1995). Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance. *Proc Natl Acad Sci Usa* 92 , 8876-8880.
- Fritsche, M., Haessler, C., and Brandner, G. (1993). Induction of nuclear accumulation of the

- tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* 8 , 307-318.
- Funk, W. D., Pak, D. T., Karas, R. H., Wright, W. E., and Shay, J. W. (1992). A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol. Cell. Biol.* 12 , 2866-2871.
- Gasser, S. M., Laemmli, U. K. (1986a). The organization of chromatin loops: characterization of a scaffold attachment site. *EMBO J.* 5 , 511-518
- Gasser, S. M., Laemmli, U. K. (1986b). Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell* 46 , 521-530
- Gannon, J. V., Greaves, R., Iggo, R., and Lane, D. P. (1990). Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *Embo J* 9 , 1595-1602.
- Gey, G. O., Coffman, W. D., Kubicek, M.T. (1952). *Cancer res.* 12 , 264
- Graham, F. L., and van der Eb, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52 , 456-467.
- Gurney, E. G., Tamowskyi, S., and Deppert, W. (1986). Antigenic binding sites of monoclonal antibodies specific for simian virus 40 large T antigen. *J. Virol.* 57 , 1168-1172.
- Hainaut, P., Hernandez, T., Robinson, A., Rodriguez-Tome, P., Flores, T., Hollstein, M., Harris, C. C., and Montesano, R. (1998). IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic Acids Res* 26 , 205-213.
- Hanahan, D. (1983). Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166 , 577-80.
- Harlow, E., Crawford, L. V., Pim, D. C., and Williamson, N. M. (1981). Monoclonal antibodies specific for simian virus 40 tumor antigens. *J. Virol.* 39 , 861-869.
- Harlow, E., Pim, D. C., and Crawford, L. V. (1981). Complex of simian virus 40 large-T antigen and host 53,000-molecular-weight protein in monkey cells. *J. Virol.* 37 , 564-573.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, M., Keyomarsi, K., and Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75 , 805-816.
- Harvey, D. M., and Levine, A. J. (1991). p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Genes Dev.* 5 , 2375-

- 2385.
- Haupt, Y., Barak, Y., and Oren, M. (1996). Cell type-specific inhibition of p53-mediated apoptosis by mdm2. *Embo J* 15 , 1596-1606.
- Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Vousden, K. H., and Oren, M. (1995). Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev* 9 , 2170-2183.
- Havre, P. A., Yuan, J. L., Hedrick, L., Cho, K. R., and Glazer, P. M. (1995). p53 inactivation by Hpv16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. *Cancer Res* 55 , 4420-4424.
- Hayer-Hartl, M. K., Weber, F., Hartl F. U. (1996). Mechanism of chaperonin action: GroES binding and release can drive GroEL-mediated protein folding in the absence of ATP hydrolysis. *Embo J* 15 , 6111-21
- Hermann, R., and Doerfler, W. (1991). Interference with protein binding at AP2 sites by sequence-specific methylation in the late E2A promoter of adenovirus type 2 DNA. *Febs Lett* 281 , 191-5.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingan, S., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell* 1 , 3-11.
- Hinds, P. W., Finlay, C. A., Frey, A. B., and Levine, A. J. (1987). Immunological evidence for the association of p53 with a heat shock protein, hsc70, in p53-plus-ras-transformed cell lines. *Mol. Cell. Biol.* 7 , 2863-2869.
- Hinds, P. W., Finlay, C. A., Quartin, R. S., Baker, S. J., Fearon, E. R., Vogelstein, B., and Levine, A. J. (1990). Mutant p53 cDNAs from human colorectal carcinomas can cooperate with ras in transformation of primary rat cells: a comparison of the „hot spot“ mutant phenotypes. *Cell Growth Diff.* 1 , 571-580.
- Hinds, P. W., Mittnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Reed, S. I., and Weinberg, R. A. (1992). Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* 70 , 993-1006.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253 , 49-53.
- Hupp, T. R., Meek, D. W., Midgley, C. A., and Lane, D. P. (1993). Activation of the cryptic DNA binding function of mutant forms of p53. *Nucleic Acids Res* 21 , 3167-3174.
- Iggo, R., Gatter, K., Bartek, J., Lane, D., and Harris, A. L. (1990). Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335 , 675-679.

- Isobe, M., Emanuel, B. S., Givol, D., Oren, M., and Croce, C. M. (1986). Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 320 , 84-5.
- Janus, F., Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Wiesmüller, L., Grosse, F., and Deppert, W. (1999). The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *CMLS* 55 , 12-27.
- Janus, F., Albrechtsen, N., Knippschild, U., Wiesmüller, L., Grosse, F., and Deppert, W. (1999). Different regulation of the p53 core domain activities 3'-to-5' exonuclease and sequence-specific DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* 19 , 2155-2168.
- Jenkins, J. R., Reddy-H-WStürzbecher /, E. P., Skalka, A. M., and Curran, T. (1988). The p53 oncogene / *The Oncogene Handbook*. Elsevier Science Publishers B 1988 , 403-423.
- Juven, T., Barak, Y., Zauberman, A., George, D. L., and Oren, M. (1993). Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene. *Oncogene* 8 , 3411-3416.
- Kaelin, W. G., Jr. (1998). Carcinogenesis - Another p53 Doppelganger? *Science* 281 , 57-58.
- Kaiser, A. D. and Hogness, D. S. (1960). The transformation of *Escherichia coli* with deoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage. *J. Mol. Biol.*, 2 , 392-415.
- Kandijan, E. W., Turler, h. (1983). Simian virus 40 and polyoma virus induce synthesis of heat shock proteins in permissive cells. *Mol Cell Biol* 3 , 1-8
- Kastan, M. B., Radin, A. I., Kuerbitz, S. J., Onyekwere, O., Wolkow, C. A., Civin, C. I., Stone, K. D., Woo, T., and Ravindranath-Y, e. a. (1991). Levels of p53 protein increase with maturation in human hematopoietic cells. *Cancer Res* 51 , 4279-4286.
- Kastan, M. B., Zhan, Q., El-Deiry, W. D., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B., and Fornace Jr, A. J. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71 , 587-597.
- Kastan, M. B., Canman, C. E., and Leonard, C. J. (1995). P53, cell cycle control and apoptosis: Implications for cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 14 , 3-15.
- Kern, S. E., Kinzler, K. W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C., and Vogelstein, B. (1991). Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 252 , 1708-1711.
- Kieser, A., Weich, H. A., Brandner, G., Marm, D., and Kolch, W. (1994). Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 9 , 963-969.
- Kim, E., Albrechtsen, N., and Deppert, W. (1997). DNA-conformation is an important

- determinant of sequence-specific DNA binding by tumor suppressor p53. *Oncogene 15* , 857-869.
- Klotzsche, O., Etzrodt, D., Hohenberg, H., Bohn, W., and Deppert, W. (1998). Cytoplasmic retention of mutant ts p53 is dependent on an intermediate filament protein (Vimentin) scaffold. *Oncogene 16* , 3423-3434.
- Kovesdi, I., Reichel, R. and Nevins, J. R. (1987). Role of an adenovirus E2 promoter binding factor in E1A-mediated coordinate gene control. *Proc Natl Acad Sci U S A 84* , 2180-4.
- Kuhn C, Muller F, Melle C, Nasheuer HP, Janus F, Deppert W, Grosse F (1999). Surface plasmon resonance measurements reveal stable complex formation between p53 and DNA polymerase alpha. *Oncogene 18* , 769-74
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature 227* , 680-685.
- Lane, D. P., and Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature 278* , 261-263.
- Lane, D. P. (1992). Cancer: p53, guardian of the genome. *Nature 358* , 15-16.
- Lane, D. P., and Hall, P. A. (1997). MDM2 - arbiter of p53's destruction. *Trends Biochem Sci 22* , 372-374.
- Lassus, P., Ferlin, M., Piette, J., and Hibner, U. (1996). Anti-apoptotic activity of low levels of wild-type p53. *Embo J 15* , 4566-4573.
- Lechner, M. S., Mack, D. H., Finicle, A. B., Crook, T., Vousden, K. H., and Laimins, L. A. (1992). Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *Embo J 11* , 3045-3052.
- Lee, S., Elenbaas, B., Levine, A., and Griffith, J. (1995). p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell 81* , 1013-1020.
- Levine, A. J. (1993). The tumor suppressor genes. *Ann. Rev. Biochem. 62* , 623-651.
- Levine, A. J., Momand, J., and Finlay, C. A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature 351* , 453-456.
- Li, R., Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., and Stillman, B. (1994). Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature 371* , 534-537.

- Li, X. Q., and Coffino, P. (1996). High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J Virol* 70 , 4509-4516.
- Linzer, D. I. H., and Levine, A. J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17 , 43-52.
- Liu, P. K., Kraus, E., Wu, T. A., Strong, L. C., and Tainsky, M. A. (1996). Analysis of genomic instability in Li-Fraumeni fibroblasts with germline p53 mutations. *Oncogene* 12 , 2267-2278.
- Livingstone, L. R., White, A., Sprouse, J., Livanos, E., Jacks, T., and Tlsty, T. D. (1992). Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* 70 , 923-935.
- Lowe, S. W., Schmitt, E. M., Smith, S. W., Osborne, B. A., and Jacks, T. (1993). p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362263 , 847-849.
- Lubin, R., Zalcman, G., Bouchet, L., Tredaniel, J., Legros, Y., Cazals, D., Hirsch, A., and Soussi, T. (1995). Serum p53 antibodies as early markers of lung cancer. *Nature Med* 1 , 701-702.
- MacArthur, H., and Walter, G. (1984). Monoclonal antibodies specific for the carboxy terminus of simian virus 40 large T antigen. *J. Virol.* 52 , 483-491.
- Malkin, D., Li, F. P., Strong, L. C., Fraumeni, J. F., Jr., Nelson, C. E., Kim, D. H., Kassel, J., Gryka, M. A., Bischoff, F. Z., Tainsky, M. A., and *et al.* (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms (see comments). *Science* 250 , 12333-8.
- Martin, R. G. (1981). The transformation of cell growth and transmigration of DNA synthesis by simian virus 40. *Adv. Cancer Res* 34 , 1-68.
- Mercer, W. E., Shields, M. T., Amin, M., Sauve, G. J., Appella, E., Romano, J. W., and Ullrich, S. J. (1990). Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 87 , 6166-6170.
- Midgley, C. A., Owens, B., Briscoe, C. V., Thomas, D. B., Lane, D. P., and Hall, P. A. (1995). Coupling between gamma irradiation, p53 induction and the apoptotic response depends upon cell type in vivo. *J. Cell Sci.* 108 , 1843-1848.
- Milner, J., Chan, Y. S., Medcalf, E. A., and Eckhart, W. (1993). Partially transformed T3T3

- cells express high levels of mutant p53 in the „wild-type“ immunoreactive form with defective oligomerization. *Oncogene* 8 , 2001-2008.
- Milner, J., and Medcalf, E. A. (1991). Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* 65 , 765-774.
- Milner, J., Medcalf, E. A., and Cook, A. C. (1991). Tumor suppressor p53: Analysis of wild-type and mutant p53 complexes. *Mol. Cell. Biol.* 11 , 12-19.
- Mironov, N. W. (1987). Repair in the nuclear matrix of DNA damaged by benzbyrene. *Biull Eksp Med* 104 , 486-8
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B., and Reed, J. C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9 , 1799-1805.
- Miyashita, T., and Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80 , 293-299.
- Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., and Levine, A. J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69 , 1237-1245.
- Mosner, J., and Deppert, W. (1994). p53 and mdm2 are independently expressed during cellular proliferation. *Oncogene* 9 , 3321-3328.
- Mueller, B. F., Paulsen, D., and Deppert, W. (1996). Specific binding of MAR/SAR DNA-elements by mutant p53. *Oncogene* 12 , 1941-1952.
- Mullender, L. H., van Kesteren van Leeuwen A. C., van Zeeland, A. A., Natarajan, A. T. (1988). Nuclear matrix associated DNA is preferentially repaired in normal human fibroblasts, exposed to a low dose of ultraviolet light but not in Cockayne's syndrome fibroblasts. *Nucleic Acids Res* 16 , 10607-22.
- Mummenbrauer, T., Janus, F., Mueller, B., Wiesmueller, L., Deppert, W., and Grosse, F. (1996). p53 protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell* 85 , 1089-1099.
- Oberosler, P., Hloch, P., Ramsperger, U., and Stahl, H. (1993). p53-catalyzed annealing of complementary single-stranded nucleic acids. *EMBO J.* 12 , 2389-2396.
- Otto A., and Deppert, W., (1993). Upregulation of mdm-2 expression in Meth A tumor cells tolerating wild-type p53. *Oncogene* 8 , 2591-2603.
- Patschinsky, T., and Deppert, W. (1990). Phosphorylation of p53 in primary, immortalized, and transformed Balb/c mouse cells. *Oncogene* 5 , 1071-1076.

- Paules, R. S., Levedakou, E. N., Wilson, S. J., Innes, C. L., Rhodes, N., Tlsty, T. D., Galloway, D. A., Donehower, L. A., Tainsky, M. A., and Kaufmann, W. K. (1995). Defective G2 checkpoint function in cells from individuals with familial cancer syndromes. *Cancer Res.* *55* , 1763-1773.
- Peng, C. Y., Graves, P. R., Thoma, R. S., Wu, Z., Shaw, A. S., and Piwnica-Worms, H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* *277* , 1501-1505.
- Phi-Van, L., von Kries, J. P., Ostertag, W., and Strätling, W. H. (1990). The chicken lysozyme 5' matrix attachment region increases transcription from a heterologous promoter in heterologous cells and dampens position effects on the expression of transfected genes. *Mol. Cell. Biol.* *10* , 2302-2307.
- Picksley, S. M., Vojtesek, B., Sparks, A., and Lane, D. P. (1994). Immunochemical analysis of the interaction of p53 with MDM2; fine mapping of the MDM2 binding site on p53 using synthetic peptides. *Oncogene* *9* , 2523-2529.
- Pietenpol, J. A., Tokino, T., Thiagalingam, S., El-Deiry, W. S., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1994). Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* *91* , 1998-2002.
- Pohl, J., Goldfinger, N., Radler-Pohl, A., Rotter, V., and Schirmacher, V. (1988). p53 increases experimental metastatic capacity of murine carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* *8* , 2078-2081.
- Prendergast, G. C., Lawe, D. and Ziff, E. B. (1991). Association of Myn, the murine homolog of max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. *Cell* *65* , 395-407.
- Raycroft, L., Wu, H., and Lozano, G. (1990). Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science* *249* , 1049-1051.
- Reed, M., Woelker, B., Wang, P., Wang, Y., Anderson, M. E., and Tegtmeier, P. (1995). The C-terminal domain of p53 recognizes DNA damaged by ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* *92* , 9455-9459.
- Reich, N. C., and Levine, A. J. (1984). Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells. *Nature* *308* , 199-201.
- Riede, U. n., Schäfer, H. E.(1995). Allgemeine und spezielle Pathologie. Georg Thieme Verlag, New York, 4. Auflage, 344-92.
- Risser, R., and Pollack, R. (1974). A nonselective analysis of SV40 transformation of mouse

- 3T3 cells. *Virology* 59 , 477-489.
- Robb, J. A., and Hübner, K. (1973). Effect of cell chromosome number on simian virus 40 replication. *Exp. Cell Res* 81 , 120-126.
- Rogel, A., Popliker, M., Webb, C. G., and Oren, M. (1985). p53 cellular tumor antigen: analysis of mRNA levels in normal adult tissues, embryos, and tumors. *Mol. Cell. Biol.* 5 , 2851-2855.
- Ryan, J. J., Danish, R., Gottlieb, C. A., and Clarke, M. F. (1993). Cell cycle analysis of p53-induced cell death in murine erythroleukemia cells. *Mol. Cell. Biol.* 13 , 711-719.
- Sabbatini, P., Chiou, S.-K., Rao, L., and White, E. (1995). Modulation of p53-mediated transcriptional repression and apoptosis by the adenovirus E1 β 19K protein. *Mol. Cell. Biol.* 15 , 1060-1070.
- Sah, V. P., Attardi, L. D., Mulligan, G. J., Williams, B. O., Bronson, R. T., and Jacks, T. (1995). A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly. *Nature Genet.* 10 , 175-180.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Ehrlich, H. A. and Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and. *Science*, 230 , 1350-4.
- Sanger, F., Nickler, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 74 , 5463-5467.
- Santhanam, U., Ray, A., and Sehgal, P. B. (1991). Repression of the interleukin 6 gene promoter by p53 and the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 88 , 7605-7609.
- Sarnow, P., Hearing, P., Anderson, C. W., Reich, N., and Levine, A. J. (1982). Identification and characterization of an immunologically conserved Adenovirus early region 11,000Mr protein and its association with the nuclear matrix. *J. Mol. Biol.* 162 , 565-583.
- Schaefer, H., Trauzold, A., Sebens, T., Deppert, W., Foelsch, U. R., and Schmidt, W. E. (1998). p22/PACAP response gene 1 (PRG1): A putative target gene for the tumor suppressor p53. *Ann NY Acad Sci* 865 , 27-36.
- Schärer, E., and Iggo, R. (1992). Mammalian p53 can function as a transcription factor in yeast. *Nucl. Acids Res.* 20 , 1539-1545.
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., and Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the

- degradation of p53. *Cell* 63 , 1129-1136.
- Scheidig, K. (1998). Die Rolle des SV40 17kDa Tumorantigens in der produktiven SV40 Infektion und der SV40 vermittelten Zelltransformation. Dissertation. Universität Hamburg.
- Schwartz, D., Almog, N., Peled, A., Goldfinger, N., and Rotter, V. (1997). Role of wild type p53 in the G2 phase: regulation of the gamma-irradiation-induced delay and DNA repair. *Oncogene* 15 , 2597-2607.
- Sedlacek, Z., Kodet, P., Seemanova, E., Vodvarka, P., Wilgenbus, P., Mares, J., Poustka, A., Goetz, P. (1998). Two Li-Fraumeni syndrome families with novel germline p53 mutations: loss of wild-type p53 allele in only 50% of tumours. *Br. J. Cancer* 7 , 1034-9
- Segawa, K., Minowa, A., Sugawara, K., Takano, T., and Hanaoka, F. (1993). Abrogation of p53-mediated transactivation by SV40 large T antigen. *Oncogene* 8 , 543-548.
- Segawa, K., Hokuto, I., Minowa, A., Ohshima, K., and Takano, T. (1993). Cyclin E enhances p53-mediated transactivation. *FEBS Lett* 329 , 283-286.
- Seto, E., Usheva, A., Zambetti, G. P., Momand, J., Horikoshi, N., Weinman, R., Levine, A. J., and Shenk, T. (1992). Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 , 12028-12032.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben-Ze'ev, A., and Rotter, V. (1990). Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* 10 , 6565-6577.
- Shaulsky, G., Ben-Ze'ev, A., and Rotter, V. (1990). Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle of Balb/c 3T3 cells. *Oncogene* 5 , 1707-1711.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Peled, A., and Rotter, V. (1991). Involvement of wild-type p53 in pre-B-cell differentiation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 , 8982-8986.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Tosky, M. S., Levine, A. J., and Rotter, V. (1991). Nuclear localization is essential for the activity of p53 protein. *Oncogene* 6 , 2055-2065.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., and Rotter, V. (1991). Alterations in tumor development in vivo mediated by expression of wild type or mutant p53 proteins. *Cancer Res.* 51 , 5232-5237.
- Shaw, P., Bovey, R., Tardy, S., Sahli, R., Sordat, B., and Costa, J. (1992). Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 , 4495-4499.
- Slebos, R. J. C., Lee, M. H., Plunkett, B. S., Kessis, T. D., Williams, B. O., Jacks, T., Hedrick,

- L., Kastan, M. B., and Cho, K. R. (1994). p53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* *91* , 5320-5324.
- Smith, M. L., Chen, I.-T., Zhan, Q., Bai, I., Chen, C.-Y., Gilmer, T. M., Kastan, M. B., O'Connor, P. M., and Fornace Jr., A. J. (1994). Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* *266* , 1376-1380.
- Smith, M. L., Chen, I.-T., Zhan, Q., O'Connor, P. M., and Fornace jr., A. J. (1995). Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene* *10* , 1053-1059.
- Soussi, T. (1996). The humoral response to the tumor-suppressor gene-product p53 in human cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Immunol Today* *17* , 354-356.
- Soussi, T., de Fromentel, C. C., and May, P. (1990). Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* *5* , 945-952.
- Soussi, T., Legros, Y., Lubin, R., Ory, K., and Schlichtholz, B. (1994). Multifactorial analysis of p53 alterations in human cancer: A review. *Int. J. Cancer* *57* , 1-9.
- Soussi, T. (1996). The humoral response to the tumor-suppressor gene-product p53 in human cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Immunol Today* *17* , 354-356.
- Spector, T. (1978). Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. A simple but linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0.5 to 50 microgram of protein. *Anal Biochem* *86* , 142-6.
- Steinmeyer, K., and Deppert, W. (1988). DNA binding properties of murine p53. *Oncogene* *3* , 501-507.
- Stewart, N., Hicks, G. G., Paraskevas, F., and Movat, M. (1995). Evidence to a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene* *10* , 109-115.
- Strasser, A., Harris, A. W., Jacks, T., and Cory, S. (1994). DNA damage can induce apoptosis in proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2. *Cell* *79* , 329-339.
- Strauss, B. E., Shivakumar, C., Deb, S. P., Deb, S., and Haas, M. (1995). The MDR1 downstream promoter contains sequence-specific binding sites for wild-type p53. *Biochem Biophys Res Commun* *217* , 825-831.
- Stürzbecher, H. W., Addison, C., and Jenkins, J. R. (1988). Characterization of mutant p53-hsp72/73 protein-protein complexes by transient expression in monkey COS cells. *Mol. Cell. Biol.* *8* , 3740-3747.

- Subler, M. A., Martin, D. W., and Deb, S. (1992). Inhibition of viral and cellular promoters by human wild-type p53. *J. Virol.* *66* , 4757-4762.
- Szekely, L., Selivanova, G., Magnusson, K. P., Klein, G., and Wiman, K. G. (1993). EBNA-5, an Epstein-Barrvirus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90* , 5455-9.
- Truant, R., Antunovic, J., Greenblatt, J., Prives, C., and Cromlish, J. A. (1995). Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 leads to inhibition by HBx of p53 response element-directed transactivation. *J. Virol.* *69* , 1851-1859.
- Vogelstein, B., and Gillespie, D., (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76* , 615-9.
- Vousden, K., 9th p53 workshop, May, 9-13, 1998, Elounda Beach, Kreta.
- Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., and Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* *369* , 574-578.
- Wang, T. S. (1991). Eukaryotic DNA polymerases. *Annu. Rev. Biochem.* *60* , 513-552.
- Wang, X. W., Forrester, K., Yeh, H., Feitelson, M. A., Gu, J., and Harris, C. C. (1994). Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* *91* , 2230-2234.
- Weißker, S., Müller, B., Homfeld, A., and Deppert, W. (1992). Specific and complex interactions of murine p53 with DNA. *Oncogene* *7* , 1921-1932.
- Werness, B. A., Levine, A. J., and Howley, P. M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* *248* , 76-79.
- White, E. (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* *10* , 1-15.
- Wiesmüller, L., Cammenga, J., and Deppert, W. (1996). *In vivo* assay of p53 function in homologous recombination between simian virus 40 chromosomes. *J. Virol.* *70* , 737-744.
- Will, K., Warnecke, G., Albrechtsen, N., Boulikas, T., and Deppert, W. (1998). High affinity MAR-DNA binding is a common property of murine and human mutant p53. *J. Cell. Biochem.* *69* , 260-270.
- Wolf, D., Harris, N., and Rotter, V. (1984). Reconstitution of p53 expression in a nonproducer Ab-MuLV-transformed cell line by transfection of a functional p53 gene. *Cell* *38* ,

119-126.

- Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D., and Levine, A. J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 7 , 1126-2232.
- Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366 , 701-704.
- Yewdell, J. W., Gannon, J. V., and Lane, D. P. (1986). Monoclonal antibody analysis of p53 expression in normal and transformed cells. *J. Virol.* 59 , 444-452.
- Yonish-Rouach, E., Grunwald, D., Wilder, S., Kimchi, A., May, E., Lawrence, J. J., May, P., and Oren, M. (1993). p53-mediated cell death: Relationship to cell cycle control. *Mol. Cell. Biol.* 13 , 1415-1423.
- Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., and Oren, M. (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352 , 345-347.
- Zambetti, G. P., and Levine, A. J. (1993). A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *Faseb J* 7 , 855-865.
- Zerrahn, J., Deppert, W., Weidemann, D., Patschinsky, T., Richards, F., and Milner, J. (1992). Correlation between the conformational phenotype of p53 and its subcellular location. *Oncogene* 7 , 1371-1381.
- Zerrahn, J. (1994). Kooperation transformierender Genbereiche des DNA Tumovirus Simian Virus 40 (SV40) in der SV40 induzierten Zelltransformation. Dissertation. Universität Hamburg.
- Zhang, Q., Gutsch, D., and Kenney, S. (1994). Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: implications for Epstein-Barr virus latency. *Mol Cell Biol* 14 , 1929-38.

Lebenslauf

Name Karine Iris David
geboren am 19.11.1973 in Hamburg
Nationalität Deutsch / Französisch

Schulausbildung

1980 - 1984 Grundschule Frohmestraße in Hamburg
1984 - 1988 Gymnasium Dörpsweg in Hamburg
1988 - 1993 Wolfgang - Borchert - Gymnasium in Halstenbek
Juli 1993 Abitur

Studium der Medizin und wissenschaftliche Tätigkeiten

Oktober 1993 Beginn meines Medizinstudiums
August 1995 Physikum
Februar 1996 Famulatur in einer Praxis für Allgemeinmedizin
für vier Wochen in Witzenhausen
August 1996 Erstes Staatsexamen
Februar 1997 Famulatur im Bereich der Chirurgie im Allgemeinen
Krankenhaus Wandsbek für vier Wochen in Hamburg
August 1997 Famulatur im Bereich der Inneren Medizin für fünf Wochen
in Tel Aviv / Israel
April 1999 Famulatur im Bereich der Anästhesie für vier Wochen
im Israelitischen Krankenhaus in Hamburg
August 1997 - Doktorarbeit in der Abteilung für Tumorstudiologie
Februar 1999 im Heinrich - Pette - Institut für Experimentelle Virologie und
Immunologie an der Universität Hamburg
Doktorvater: Prof. Dr. W. Deppert
August 1999 Zweites Staatsexamen
Oktober 1999 Beginn des Praktischen Jahres

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Darüberhinaus habe ich diese Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um eine Promotion beworben.