

**Interaktion zwischen dem CCAAT/*Enhancer Binding* Protein  $\beta$   
(C/EBP $\beta$ ) und dem Tumorsuppressorprotein p53**

**- Funktion von p53 im humanen Endometrium -**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg**

vorgelegt von

Tanja Schneider-Merck  
aus Hamburg

Hamburg  
2005

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. W. DEPERT  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Professor Dr. W. SCHÄFER  
Tag der Disputation: 29. April 2005

Hamburg, den 06. April 2005



Professor Dr. Arno Frühwald  
Dekan

Die vorliegende Arbeit wurde am „IHF Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung“ an der Universität Hamburg sowie am „Endokrinologikum Hamburg“ durchgeführt.

1. Dissertationsgutachter: Prof. Dr. W. Deppert (Heinrich-Pette-Institut)
2. Dissertationsgutachter: Prof. Dr. W. Schäfer (Biozentrum Klein Flottbek)

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b>C/EBPs (CCAAT/enhancer binding proteins) .....</b>	<b>4</b>
2.1.1	Struktur von C/EBPs .....	4
2.1.2	Funktion und physiologische Bedeutung von C/EBPs.....	5
2.1.3	C/EBP $\beta$ .....	6
2.1.3.1	Struktur von C/EBP $\beta$ .....	6
2.1.3.2	Funktion und physiologische Bedeutung von C/EBP $\beta$ .....	8
<b>2.2</b>	<b>Der Tumorsuppressor p53.....</b>	<b>9</b>
2.2.1	Einführung .....	9
2.2.2	Struktur von p53 .....	9
2.2.2.1	Der Aminoterminus von p53 .....	10
2.2.2.2	Die Kerndomäne von p53.....	11
2.2.2.3	Der Carboxyterminus von p53 .....	12
2.2.3	Regulation und Stabilisierung des p53-Proteins.....	13
2.2.3.1	Die p53-Mdm-2-Schleife.....	13
2.2.3.2	Modifikationen von p53 .....	15
2.2.3.3	Lokalisation von p53 .....	16
2.2.4	Funktion von p53.....	17
2.2.4.1	Der Zellzyklus .....	17
2.2.4.2	Apoptose.....	19
2.2.4.3	p53 als Repressor.....	20
2.2.4.4	p53 in der Differenzierung .....	21
2.2.5	p53-Mutanten .....	22
<b>2.3</b>	<b>Der menschliche Uterus .....</b>	<b>23</b>
2.3.1	Aufbau .....	23
2.3.2	Der menschliche Uterus im Menstruationszyklus.....	24
2.3.2.1	Die proliferative Phase .....	26
2.3.2.2	Die sekretorische Phase.....	26
2.3.2.3	Die Menstruationsphase .....	26
2.3.3	Die Dezidualisierung <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> .....	27
2.3.4	Marker der Dezidualisierung.....	29
<b>2.4</b>	<b>C/EBP<math>\beta</math> und p53 im Endometrium.....</b>	<b>31</b>
<b>2.5</b>	<b>Ziel der Arbeit.....</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellkultur.....</b>	<b>36</b>
3.1.1	Isolierung und Kultivierung von Primärzellen aus uterinem Gewebe .....	36
3.1.1.1	Präparation endometrialer Stromazellen (ESZ).....	36
3.1.1.2	Stimulierung endometrialer Stromazellen (ESZ) .....	37
3.1.2	Kultivierung von Zelllinien .....	37
3.1.2.1	COS-7 .....	37
3.1.2.2	Saos-2 .....	38
3.1.2.3	Behandlung der Zelllinien .....	38
3.1.3	Transiente Transfektion.....	38
3.1.3.1	Transfektion mit der Kalziumphosphat-Kopräzipitationsmethode .....	42
3.1.3.2	Transfektion mit der <i>Lipofectamine</i> -Methode.....	43
3.1.3.3	Transfektion mit der <i>Dotap</i> -Methode.....	43

3.1.3.4	Klonierung von pEF-Konstrukten .....	44
3.1.3.4.1	pEF1 $\alpha$ .....	44
3.1.3.4.2	pEF/hp53 .....	44
3.1.3.4.3	pEF/LAP/FLAG .....	44
3.1.3.5	Luziferase-Assay .....	45
3.1.4	Immunfluoreszenz .....	45
<b>3.2</b>	<b>Bakterien .....</b>	<b>46</b>
3.2.1	Transformation und Aufzucht von Bakterien .....	47
3.2.2	Plasmid-Minipräparation .....	47
3.2.3	Plasmid-Midipräparation .....	47
<b>3.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>48</b>
3.3.1	RNA-Isolierung .....	48
3.3.2	Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA .....	48
3.3.3	cDNA-Synthese/reverse Transkription .....	48
3.3.4	PCR ( <i>polymerase chain reaction</i> ) .....	49
3.3.5	Southern Blot .....	51
3.3.5.1	Agarose-Gelelektrophorese und Transfer .....	51
3.3.5.2	Markierung von Oligonukleotid-Sonden .....	52
3.3.6	Färbung von DNA-Gelen .....	53
3.3.7	Aufreinigung von DNA-Fragmenten .....	53
3.3.8	Sequenzierung von DNA .....	53
<b>3.4</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden .....</b>	<b>54</b>
3.4.1	Proteinisolierung .....	54
3.4.1.1	Isolierung von Gesamtzellproteinen .....	55
3.4.1.2	Isolierung von Kern- und Zytosolproteinen .....	55
3.4.1.3	Bestimmung der Proteinkonzentration (Lowry) .....	56
3.4.2	<i>Western Blot</i> .....	56
3.4.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	56
3.4.2.2	Proteintransfer .....	57
3.4.2.3	Immundetektion .....	58
3.4.3	<i>Western Blot</i> mit NuPAGE <sup>®</sup> (Invitrogen) .....	58
3.4.3.1	Neutrale-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (NuPAGE <sup>®</sup> ; Invitrogen) .....	58
3.4.3.2	Proteintransfer .....	59
3.4.3.3	Immundetektion .....	59
3.4.4	<i>Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay</i> (EMSA) .....	60
3.4.4.1	Herstellung von doppelsträngigen Oligonukleotiden .....	60
3.4.4.2	Radioaktiver <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA) .....	61
3.4.4.2.1	Markierung der Sonden mit ( $\gamma$ - <sup>32</sup> P)-ATP durch T4-Polynukleotidkinase .....	61
3.4.4.2.2	Bindungsreaktion .....	62
3.4.4.3	Nicht-radioaktiver <i>Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay</i> (EMSA) .....	62
3.4.4.4	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Schägger & von Jagow, 1987). .....	62
3.4.5	Antikörper .....	63
3.4.5.1	Primäre Antikörper .....	63
3.4.5.2	Sekundäre Antikörper .....	64
<b>3.5</b>	<b>Methoden zur Charakterisierung einer Interaktion von C/EBP<math>\beta</math> und p53 <i>in vivo</i> .....</b>	<b>65</b>
3.5.1	<i>Mammalian Two-Hybrid Assay</i> .....	65
3.5.1.1	Klonierung von <i>Mammalian Two-Hybrid</i> –Konstrukten .....	65

3.5.1.1.1	pLexA/poly II .....	65
3.5.1.1.2	pLex/hp53wt/ <i>FLAG</i> .....	66
3.5.1.1.3	pLex/hp53.M22,23/ <i>FLAG</i> .....	66
3.5.1.1.4	pLex/hp53ΔT4-RR/ <i>FLAG</i> .....	67
3.5.1.1.5	pLex/hp53.M22,23ΔT4-RR/ <i>FLAG</i> .....	67
3.5.1.1.6	pLex/hp53ΔTAD/ <i>FLAG</i> .....	67
3.5.1.1.7	pLex/hp53ΔTADΔT4-RR/ <i>FLAG</i> .....	68
3.5.1.1.8	pLex/hp53ΔTADΔDBD/ <i>FLAG</i> .....	68
3.5.1.1.9	pLex/hp53.RR/ <i>FLAG</i> .....	68
3.5.1.1.10	pAB/VP16 .....	69
3.5.1.1.11	pVP16/hp53ΔTAD/ <i>FLAG</i> .....	69
3.5.1.1.12	pVP16/LAP-TAD/NLS .....	69
3.5.1.1.13	pVP16/LIP-DBD .....	70
3.5.1.1.14	pLexA/-36rPRL/luc 3 .....	70
3.5.1.2	Transfektion eines <i>Mammalian Two-Hybrid Assays</i> .....	70
3.5.2	Koimmunpräzipitation.....	71
<b>3.6</b>	<b>RNAi-Methode zur Untersuchung der Rolle von p53 im menschlichen Endometrium .....</b>	<b>72</b>
3.6.1	Methode der RNA <i>interference</i> (RNAi).....	72
3.6.2	Herstellung der siRNA-Oligonukleotide.....	72
3.6.3	Markierung der siRNA-Oligonukleotide.....	74
3.6.4	Transfektion von endometrialen Stromazellen (ESZ) mit Cy3-markierten siRNA-Oligonukleotiden.....	74
3.6.5	Transfektion von ESZ mit siRNA-Oligonukleotiden und gleichzeitige Stimulation mit 8-Br-cAMP.....	75
3.6.6	Überprüfung des siRNA-Transfektionseffektes durch <i>Western Blot</i> .....	75
<b>4</b>	<b><i>Ergebnisse</i>.....</b>	<b>76</b>
<b>4.1</b>	<b>Transfektionen zur Analyse einer Interaktion von p53 und C/EBPβ .....</b>	<b>76</b>
4.1.1	Repression der C/EBPβ-abhängigen Transaktivierung durch p53.....	76
4.1.2	Repression der p53-abhängigen Transaktivierung durch C/EBPβ.....	78
4.1.3	Überprüfung der p53-abhängigen Transrepression von Promotoren .....	79
4.1.4	Gegenseitige Transrepression von C/EBPβ und p53 ist unabhängig von p300/CBP .....	80
4.1.5	Wildtyp-Konformation von p53 ist entscheidend für die transkriptionelle Repression von C/EBPβ .....	81
<b>4.2</b>	<b>Überprüfung einer gegenseitigen Proteinreduzierung von exogenem C/EBPβ und p53 .....</b>	<b>83</b>
4.2.1	Effekt von transfiziertem p53 auf die Proteinexpression von exogenem C/EBPβ und <i>vice versa</i> .....	83
4.2.2	Effekt des Proteasom-Inhibitors MG-132 auf die gegenseitige Proteinreduktion .....	86
4.2.3	Überprüfung unlöslicher Komplexe von C/EBPβ und p53.....	88
<b>4.3</b>	<b>EMSA-Studien zur Analyse einer Interaktion von C/EBPβ und p53.....</b>	<b>90</b>
4.3.1	Einfluss von p53 auf die DNA-Bindung von C/EBPβ <i>in vitro</i> .....	90
4.3.2	Einfluss von C/EBPβ auf die DNA-Bindung von p53 <i>in vitro</i> .....	93
<b>4.4</b>	<b>Untersuchungen zum Nachweis einer Interaktion von C/EBPβ und p53 <i>in vivo</i>.....</b>	<b>97</b>
4.4.1	Der <i>Mammalian Two-Hybrid Assay</i> .....	97

4.4.1.1	Klonierung von <i>Mammalian Two-Hybrid</i> Konstrukten .....	97
4.4.1.2	Überprüfung einer Interaktion von C/EBP $\beta$ und p53 <i>in vivo</i> durch einen <i>Mammalian Two-Hybrid</i> Assay.....	99
4.4.2	Koimmunpräzipitation mit transfizierten Saos-2-Zellen.....	101
<b>4.5</b>	<b>Ergebnisse zur Charakterisierung einer Interaktion zwischen C/EBP<math>\beta</math> und p53 .....</b>	<b>103</b>
<b>4.6</b>	<b>Untersuchungen zur Funktion von p53 im humanen Endometrium .....</b>	<b>104</b>
4.6.1	Kultivierung von endometrialen Stromazellen (ESZ).....	104
4.6.2	Zeitverlauf der p53-Expression in dezidualen ESZ.....	105
4.6.3	Nachweis von endogenem p53-Protein in ESZ durch Immunfluoreszenz .....	106
4.6.4	Expression von p53 und p53-Zielgenen im Dezidualisierungsprozess von ESZ.....	107
4.6.5	Koimmunpräzipitation mit ESZ .....	111
4.6.6	Lokalisationsnachweis von endogenem C/EBP $\beta$ und p53 in ESZ durch konfokale Immunfluoreszenz .....	113
4.6.7	Einfluss eines p53- <i>Knock down</i> auf den Dezidualisierungsprozess.....	114
4.6.7.1	Vergleich verschiedener siRNA-Transfektionsmethoden durch Immunfluoreszenz .....	114
4.6.7.2	p53- <i>Knock down</i> in siRNA-behandelten ESZ.....	116
<b>4.7</b>	<b>Ergebnisse der Untersuchungen einer möglichen Funktion von p53 im Dezidualisierungsprozess von ESZ .....</b>	<b>118</b>
<b>5</b>	<b><i>Diskussion</i>.....</b>	<b>119</b>
<b>5.1</b>	<b>Interaktion von C/EBP<math>\beta</math> und p53.....</b>	<b>119</b>
5.1.1	Gegenseitige Inhibierung der DNA-Bindungsfähigkeit von C/EBP $\beta$ und p53 .....	120
5.1.2	Gegenseitige Transrepression von C/EBP $\beta$ und p53 .....	122
5.1.3	Gegenseitige Proteinreduktion von C/EBP $\beta$ und p53 .....	123
5.1.4	Charakterisierung der interagierenden Domänen von C/EBP $\beta$ und p53... ..	126
<b>5.2</b>	<b>Rolle von p53 im Dezidualisierungsprozess .....</b>	<b>129</b>
<b>5.3</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>132</b>
<b>6</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i>.....</b>	<b>134</b>
<b>7</b>	<b><i>Abkürzungen und Glossar</i>.....</b>	<b>156</b>
<b>8</b>	<b><i>Danksagung</i>.....</b>	<b>160</b>

# 1 Zusammenfassung

Die Funktionalität und Entwicklung eines Organismus und seiner Organe wird durch ein komplexes Zusammenspiel von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Zelltod gewährleistet. Die an diesen Vorgängen beteiligten Faktoren unterliegen vielfältigen Regulationen, die einen reibungslosen Ablauf des biologischen Systems ermöglichen. Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Faktoren können die jeweilige Regulierung beeinflussen und zu einer Veränderung der entsprechenden Funktion führen.

In vielen Differenzierungsprozessen ist das CCAAT/*enhancer binding* Protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) von entscheidender Bedeutung. C/EBP $\beta$  ist ein Transkriptionsfaktor, der in zwei Protein-Isoformen existieren kann: einem transkriptionell aktiven Protein, LAP (*liver-enriched activatory protein*) und einem inhibitorischen Protein, LIP (*liver-enriched inhibitory protein*), dem die Transaktivierungsdomäne (TAD) fehlt. In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe konnte eine erhöhte, cAMP-abhängige Expression von C/EBP $\beta$  in differenzierenden endometrialen Stromazellen (ESZ) nachgewiesen werden (Pohnke et al., 1999). Diese Differenzierung wird auch als Dezidualisierung bezeichnet und dient zur Vorbereitung des Endometriums auf die Einnistung (Implantation) des Embryos. Ein Charakteristikum von differenzierenden ESZ ist die Sekretion von Prolaktin, einem Markerprotein der Dezidualisierung. *In vitro* kann der Dezidualisierungsprozess durch Behandlung von ESZ mit Hormonen oder cAMP-Analoga induziert werden. Dies führt u.a. zu einer Hochregulierung von C/EBP $\beta$  und bewirkt eine anhaltende Aktivierung des dezidualen Prolaktin (dPRL)-Promotors (Pohnke et al., 1999). Da die Aktivierung des dPRL-Promotors strikt mit dem Dezidualisierungsprozess verknüpft ist, wird die Induktion dieses Promotors untersucht, um relevante Transkriptionsfaktoren im Differenzierungsprozess von ESZ zu identifizieren. Dabei wurde das Tumorsuppressorprotein p53 isoliert, das ebenfalls als ein Transkriptionsfaktor bekannt ist. In Abhängigkeit von genotoxischem Stress wird es aktiviert und reguliert die Expression von Proteinen, die in Prozessen des Zellzyklus, der DNA-Reparatur oder der Apoptose involviert sind.

In früheren Transfektionsstudien mit ESZ wurde gezeigt, dass p53 in der Lage ist, eine C/EBP $\beta$ -abhängige Aktivierung des dPRL-Promotors zu inhibieren (Pohnke et al., 2004).

Eine Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 konnte in einem GST-Pulldown Assay *in vitro* nachgewiesen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte einerseits eine Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 näher charakterisiert und andererseits eine Rolle von p53 im Dezidualisierungsprozess von endometrialen Stromazellen (ESZ) untersucht werden.

Eine *in vivo* Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 konnte erstmals durch Koimmunpräzipitationen sowohl in transfizierten Saos-2-Zellen als auch in cAMP-behandelten ESZ nachgewiesen werden. Die Resultate deuten auf eine Vermittlung der Interaktion über die C-Termini von C/EBP $\beta$  und p53 hin. Eine gegenseitige Inhibierung der transkriptionellen Aktivität von C/EBP $\beta$  und p53 wurde in Transfektionsstudien mit Saos-2-Zellen beobachtet. Es zeigte sich, dass nicht nur p53 eine C/EBP $\beta$ -vermittelte Aktivierung eines C/EBP-*responsives* Reportergenkonstruktes inhibierte, sondern auch *vice versa*, dass eine p53-induzierte Transaktivierung eines p53-*responsiven* Reportergenkonstruktes durch beide C/EBP $\beta$ -Isoformen, LAP und LIP, reprimiert wurde. Die Verwendung von p53-Mutanten, die entweder Punktmutationen in der Transaktivierungsdomäne (TAD) oder der DNA-Bindungsdomäne (DBD) sowie Deletionen der TAD oder des C-Terminus (beinhaltet die Tetramerisierungsdomäne und die regulatorische Region) aufweisen, haben gezeigt, dass nur Wildtyp-p53 in der Lage ist, eine Transrepression von LAP zu bewirken. Eine Kompetition um den limitierenden Kofaktor p300/CBP konnte als zu Grunde liegender Mechanismus der gegenseitigen Transrepression ausgeschlossen werden. Eine mögliche Erklärung könnte eine deutliche Reduktion von C/EBP $\beta$ -Proteinspiegeln in Anwesenheit von transfiziertem p53 und eine Reduzierung des p53-Proteins durch überexprimiertes C/EBP $\beta$  sein. Diese gegenseitige Proteinreduktion konnte auch durch den Zusatz eines Proteasom-Inhibitors (MG-132) nicht aufgehoben werden. Vermutlich sind die C-terminalen Domänen beider Faktoren in diesem Prozess involviert.

In EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*)-Studien mit Kernextrakten aus Saos-2-Zellen, die endogenes C/EBP $\beta$  aufweisen, konnte eine schwache Reduzierung der DNA-Bindungsfähigkeit von C/EBP $\beta$  in Gegenwart von transfiziertem Wildtyp-p53 gezeigt werden. Weitere EMSA-Experimente bestätigten allerdings auch eine Reduktion der p53-DNA-Bindungsfähigkeit in Anwesenheit von exogenem C/EBP $\beta$  mit Kernextrakten aus COS-7-Zellen, die endogenes p53 besitzen. Im letzteren Fall zeigte sich darüber hinaus,

dass in Gegenwart eines spezifischen C/EBP $\beta$ -Antikörpers die Bildung eines indirekten *Supershifts* zu beobachten war, was auf eine Interaktion von C/EBP $\beta$  mit DNA-gebundenem p53 hindeutet.

Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals eine Korrelation zwischen einer erhöhten p53-Proteinexpression und dem cAMP-induzierten Dezidualisierungsprozess von ESZ nachgewiesen werden. In einem Zeitverlaufsexperiment wurde gezeigt, dass p53 dabei nicht akut, sondern erst innerhalb von 2 bis 4 Tagen im Kern akkumuliert und auch nach 12 Tagen noch erhöht ist. Zur Überprüfung einer Relevanz von p53 im Dezidualisierungsprozess ist es in dieser Arbeit erstmals gelungen, die RNA *interference* (RNAi)-Methode an humanen ESZ erfolgreich anzuwenden und das p53-Protein in cAMP-behandelten Zellen bis zu 6 Tagen herunterzuregulieren.

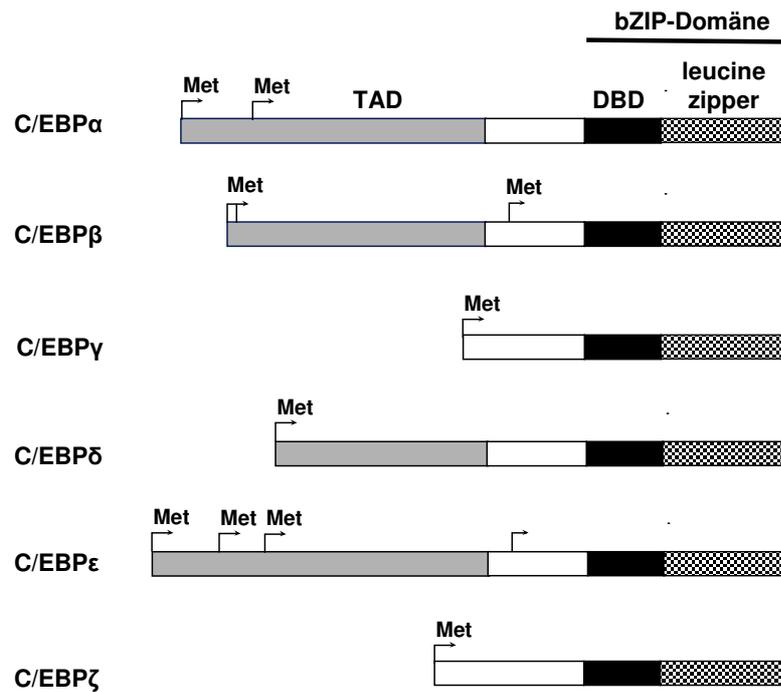
## 2 Einleitung

Die Entwicklung des menschlichen Organismus beruht auf einem komplexen Zusammenspiel von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und dem Zelltod. Die beteiligten Faktoren, die diese Vorgänge vermitteln, unterliegen vielfältigen Wechselwirkungen und gewährleisten dadurch eine optimale Funktionalität des biologischen Systems.

### 2.1 C/EBPs (*CCAAT/enhancer binding proteins*)

#### 2.1.1 Struktur von C/EBPs

Die *CCAAT/enhancer binding proteins* (C/EBPs) gehören zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die für eine normale zelluläre Differenzierung und Funktion verschiedener Gewebe von entscheidender Bedeutung sind (Lekström-Himes & Xanthopoulos, 1998; Takiguchi, 1998). Bisher konnten sechs C/EBP-Isoformen in Säugerzellen isoliert und charakterisiert werden, die aufgrund ihrer chronologischen Entdeckung als C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , C/EBP $\gamma$ , C/EBP $\delta$ , C/EBP $\epsilon$  und C/EBP $\zeta$  bezeichnet werden (Cao et al., 1991), allerdings auch unter alternativen Namen bekannt sind (Ramji & Foka, 2002). Ihnen gemeinsam ist eine am C-Terminus gelegene hoch konservierte *basic region/leucine zipper* (bZIP) Domäne (Landschulz et al., 1988). Diese charakteristische Domäne besteht aus einer 5'-gelegenen basischen Region (*basic region*), die entscheidend für die sequenz-spezifische DNA-Bindung ist und einer 3'-gelegenen amphiphatischen Domäne mit einem Motiv aus sieben Leuzin-Resten (*leucine zipper*). Diese Domäne vermittelt die Homo- und Heterodimerisierung der einzelnen Isoformen untereinander oder mit anderen bZIP-Transkriptionsfaktoren (Hattori et al., 2003; Hurst, 1995). Die DNA-Bindung der C/EBPs erfolgt über ihre basische Region an palindromische Sequenzen, wobei eine Konsensussequenz mit RTTGCGYAAY (R = A oder G; Y = C oder T) als optimale C/EBP-Bindungsstelle ermittelt wurde (Osada et al., 1997). Eine Voraussetzung für die DNA-Bindung ist die C/EBP-Dimerisierung (Landschulz, 1989), wobei die Spezifität der Bindung über eine Region zwischen der *basic region* und dem *leucine zipper* vermittelt wird (Johnson, 1993).



**Abbildung 2.1: Schematische Darstellung von Mitgliedern der C/EBP-Familie**

Isoformen der CCAAT/enhancer binding proteins (C/EBPs) mit ihren entsprechenden Translationsstartstellen (Met, Methionin). TAD, Transaktivierungsdomäne; bZIP, basic region/leucine zipper; DBD, DNA-Bindungsdomäne.

Der aminoternale Bereich von C/EBP-Proteinen enthält neben der Transaktivierungsdomäne (TAD) auch inhibitorische Domänen, die eine transkriptionelle Aktivität negativ beeinflussen können (Tang & Koeffler, 2001). Der Aminoterminus ist nicht stark konserviert und weist deutliche Unterschiede in den Aminosäuresequenzen innerhalb der C/EBP-Familie auf. C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$  und C/EBP $\epsilon$  werden in mehreren Protein-Isoformen translatiert, wobei identische bZIP-Domänen entstehen, aber verschiedene trunkeerte Transaktivierungsdomänen (siehe Abb. 2.1) mit unterschiedlichen transkriptionellen Aktivierungspotenzialen. C/EBP $\gamma$  und C/EBP $\zeta$  dagegen enthalten keine aminoternale Domäne (Ossipow et al., 1993; Yamanaka et al., 1997).

### 2.1.2 Funktion und physiologische Bedeutung von C/EBPs

Die spezifische Funktion der C/EBPs ist abhängig von der räumlichen und zeitlichen Kontrolle ihrer Genexpression, ihrem Transkriptionspotenzial sowie der Homo- und Heterodimerisierung mit Mitgliedern der eigenen Familie oder mit anderen Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren, die entweder *leucine zipper*-Domänen oder Strukturen wie Helix-Loop-Helix- oder Zinkfinger-Motive aufweisen. Diese Wechselwirkungen können zum einen aktivatorisch sein, resultierend aus einer

transaktivierenden Kooperation von C/EBPs mit Faktoren, wie z.B. dem Retinoblastoma (Rb)-Protein (Chen et al., 1996), p300/CBP (*CREB binding protein*) (Mink et al., 1997) oder dem Progesteron-Rezeptor (PR) (Christian et al., 2002a). Zum anderen können die Wechselwirkungen auch inhibitorisch sein, indem die DNA-Bindungs-fähigkeit der von den C/EBPs gebundenen Proteine erniedrigt wird, wie im Falle des Östrogen-Rezeptors (ER) (Stein & Yang, 1995) oder des Glukokortikoid-Rezeptors (GR) (Boruk et al., 1998).

Obwohl die C/EBP-Isoformen untereinander Ähnlichkeiten in der spezifischen DNA-Bindung und Dimerisierung aufweisen, die auf eine evolutionäre strukturelle Konservierung hindeuten, zeigen sie doch unterschiedliche Expressionsmuster und transaktivierende Eigenschaften, die eine zelluläre und funktionelle Spezifität *in vivo* zu sichern scheinen. Die Funktion und Bedeutung von C/EBPs wurde durch *Knock-out (KO)*-Mausmodelle charakterisiert (Lekström-Himes & Xanthopoulos, 1998). Dabei zeigte sich eine Beteiligung der Isoformen in verschiedenen Prozessen der Differenzierung, Proliferation und Apoptose von Adipozyten (Elberg et al., 2000; Lane et al., 1999; Tanaka et al., 1997), Hepatozyten (Diehl, 1998; Croniger et al., 1997; Michalopoulos & DeFrances, 1997), myeloiden Zellen (Poli, 1998; Verbeek et al., 1999), Nervenzellen (Cortés-Canteli et al., 2002) sowie in der Brustdrüse (Grimm & Rosen, 2003; Zahnow, 2002) und im Ovar (Sterneck et al., 1997).

Im Folgenden wird sich auf die Beschreibung des Transkriptionsfaktors C/EBP $\beta$  konzentriert, da nur diese Isoform Gegenstand der vorliegenden Arbeit war.

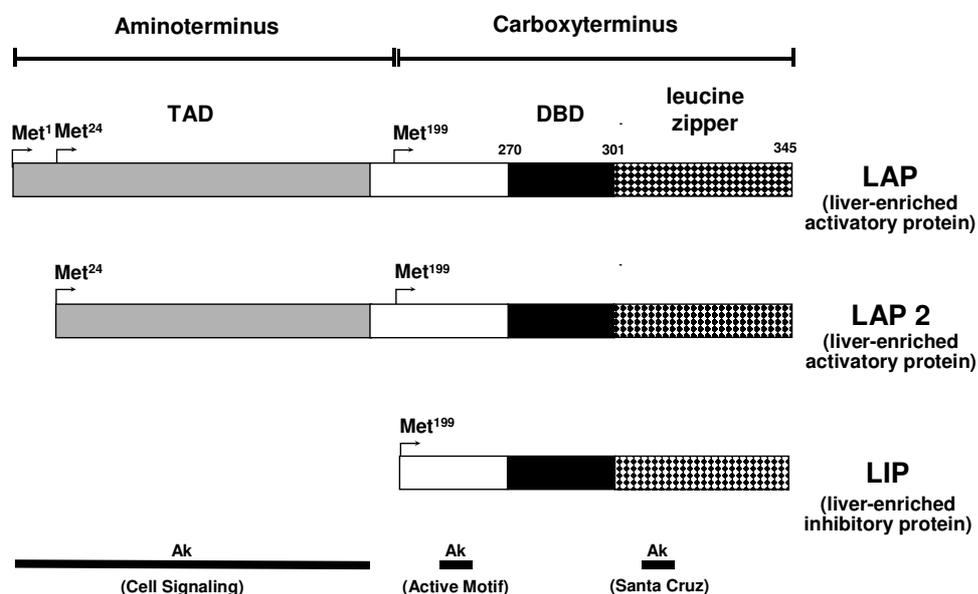
### **2.1.3 C/EBP $\beta$**

#### **2.1.3.1 Struktur von C/EBP $\beta$**

Das C/EBP $\beta$ -Gen wurde bereits aus verschiedenen Organismen wie Mensch, Maus, Ratte, Huhn und Fisch kloniert (Ramji & Foka, 2002). Beim Menschen ist es auf dem Chromosom 20 (20q13.13) lokalisiert und kodiert für ein Transkript von 1,4 kb (Hendricks-Taylor et al., 1992). Insgesamt können drei Protein-Isoformen aus einer C/EBP $\beta$ -mRNA translatiert werden. Verantwortlich dafür ist vermutlich ein sogenannter „*leaky ribosome scanning*“-Mechanismus, der alternative Translationsstartstellen nutzt (Methionin 1, 24, 199; siehe Abb. 2.1) (Descombes & Schibler, 1991; Ossipow, 1993), oder die Verfügbarkeit von Translations-Initiationfaktoren (eIF; Calkhoven et al., 2000). Andererseits können spezifische RNA-Bindungsproteine mit einer Haarnadelschleifen-Struktur am 5'-Ende der C/EBP $\beta$ -mRNA interagieren und dadurch eine erhöhte

Translation von stromabwärts gelegenen AUG-Startkodons bewirken (Timchenko et al., 2002). Des Weiteren wird eine spezifische Proteolyse durch eine Calpain-Protease als Ursache für die trunkierten C/EBP $\beta$ -Isoformen diskutiert (Baer & Johnson, 2000; Welm et al., 1999).

Die Translationsinitiation am ersten Startkodon (Met<sup>1</sup>) resultiert in einem aktivatorischen 38 kDa-Protein (siehe Abb. 2.2), welches als „LAP“ (*liver-enriched activatory protein*) bezeichnet wird. Das „LAP 2“-Protein entsteht durch Initiation am zweiten Startkodon (Met<sup>24</sup>) mit einer Größe von 35 kDa. Die Initiation am dritten Translationsstartkodon (Met<sup>199</sup>) resultiert in einem inhibitorischen 16 kDa-Protein, welches als „LIP“ (*liver-enriched inhibitory protein*) bezeichnet wird. Das LIP-Protein enthält keine Transaktivierungsdomäne, besitzt aber die für C/EBPs charakteristische bZIP-Domäne und fungiert durch Heterodimerisierung mit anderen C/EBP-Isoformen, aber auch in Form eines Homodimers, als transkriptioneller Repressor (Descombes & Schibler, 1991). Das Verhältnis von LAP zu LIP in Differenzierungs- und Proliferationsprozessen scheint dabei von entscheidender Bedeutung zu sein. Es wurde als ein modulierender Faktor in der Leberdifferenzierung (Descombes & Schibler, 1991), der Glukoseproduktion (Duong et al., 2002) und der Entwicklung der Brustdrüse (Seagroves et al., 1998) charakterisiert.



**Abbildung 2.2: Schematische Darstellung von Isoformen des C/EBP  $\beta$ -Proteins**

Verschiedene Protein-Isoformen von C/EBP $\beta$  mit ihren entsprechenden Translationsstartstellen (Met, Methionin 1, 24, 199). LAP, *liver-enriched activatory protein*; LAP 2, *liver-enriched activatory protein 2*; LIP, *liver-enriched inhibitory protein*. Die schwarzen Balken kennzeichnen die Bindungsstellen der in dieser Arbeit verwendeten C/EBP $\beta$ -Antikörper (Ak) von den Firmen Cell Signaling (CS), Santa Cruz (SC) und Active Motif (AM) (siehe auch Kapitel 3.4.5).

### 2.1.3.2 Funktion und physiologische Bedeutung von C/EBP $\beta$

C/EBP $\beta$  wurde zunächst als ein Transkriptionsfaktor entdeckt, der an der Aktivierung des IL-6-Promotors beteiligt ist. Er wird daher auch als NFIL-6 (*nuclear factor interleukin-6*) bezeichnet (Akira et al., 1990). Der Promotor des C/EBP $\beta$ -Gens wurde bereits in vielen Organismen wie Mensch, Maus, Ratte und Huhn charakterisiert (Yang et al., 2002; Lin, 2002). Die Expression von C/EBP $\beta$  wird auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene reguliert. Stimulationen mit LPS (Lipopolysaccharid), IL-6, IL-1 oder Dexamethason (synthetisches Glukokortikoid) bewirken eine erhöhte Transkription und/oder mRNA-Stabilisierung von C/EBP $\beta$  (Buck & Chojkier, 2003; Lekström-Himes & Xanthopoulos, 1998). Posttranskriptionelle Modifikationen, hauptsächlich durch Phosphorylierungen, führen zu einer Akkumulation und transkriptionellen Aktivierung von C/EBP $\beta$  im Kern. Daran beteiligt sind unter anderem die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC) sowie Phosphoinositid-3-Kinase (PI3-K) (Buck & Chojkier, 2003; Ramji & Foka, 2002; Takiguchi, 1998). Kim et al. (2002) zeigten, dass die transkriptionelle Aktivität von C/EBP $\beta$  auch durch Sumoylierung beeinflusst werden kann.

Hohe, konstitutive C/EBP $\beta$ -Expressionen wurden für die Leber, den Intestinaltrakt, die Lunge, das Fettgewebe, die Milz, die Niere und myeloide Zellen beschrieben (Lekström-Himes & Xanthopoulos, 1998; Ramji & Foka, 2002). In der weiblichen Reproduktion gewinnt die Funktion von C/EBP $\beta$  immer mehr an Bedeutung. Durch *KO*-Mausmodelle konnte nicht nur gezeigt werden, dass C/EBP $\beta$  für die Morphogenese der Milchgänge, lobuloalveoläre Proliferation und funktionelle Differenzierung der Brustdrüse essentiell ist (Robinson et al., 1998; Seagroves et al., 1998), sondern auch, dass diese Mäuse ohne C/EBP $\beta$  infertil sind. Diese Sterilität beruht auf einem Defekt in der Differenzierung von Granulosazellen, wodurch eine erfolgreiche Ovulation und eine Ausbildung des Gelbkörpers (*Corpus luteum*) verhindert werden (Sterneck et al., 1997). Bestätigt wurde diese Beobachtung durch eine Studie von Pall et al. (1997), in der durch eine lokale Inhibierung der C/EBP $\beta$ -Expression im Ovar von Wildtyp-Ratten die Ovulation gehemmt wurde.

## 2.2 Der Tumorsuppressor p53

### 2.2.1 Einführung

p53 wurde 1979 in *Simian* Virus 40 (SV40)-transformierten Zellen durch seine Komplexbildung mit dem großen Tumor-Antigen (T-Antigen) als ein zelluläres Protein identifiziert (Lane & Crawford, 1979; Linzer & Levine, 1979). Es wurde zunächst als ein Onkogen eingestuft, da es in der Lage schien, Zellen zu immortalisieren oder zu transformieren (Jenkins et al., 1984; Parada et al., 1984). Allerdings zeigte sich erst in den 80er Jahren, dass Wildtyp-p53 die Fähigkeit besitzt, ein unkontrolliertes Wachstum von Tumorzellen zu unterdrücken. Dies führte zu der Einstufung des p53-Proteins als ein Tumorsuppressor (Levine et al., 1991; Vogelstein, 2000).

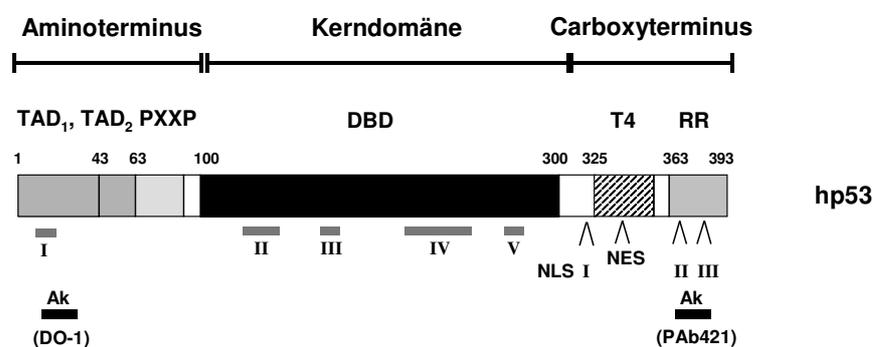
Der Tumorsuppressor p53 ist in mehr als 50 % aller humanen Tumoren mutiert, deletiert oder rearrangiert. p53-KO-Mäuse können sich zwar entwickeln, zeigen aber einige Aberrationen in der Embryonalentwicklung und nach der Geburt die Entwicklung von Neoplasien (Armstrong et al., 1995).

Nach zellulären Stresssituationen, die DNA-Schäden verursachen, wie z.B. Bestrahlung oder Chemikalien, steigt die Wildtyp-p53 Expression im Zellkern deutlich an. Dort transaktiviert es spezifisch die Expression von Genen, die zu einem Arrest des Zellzyklus führen und – je nach Ausmaß der Zellschädigung – eine Reparatur der DNA bewirken oder den programmierten Zelltod, die Apoptose, einleiten (Ko & Prives, 1996; Levine, 1997). Aufgrund dieser Schutz-Mechanismen, die zur Aufrechterhaltung der Integrität des Genoms dienen, erhielt p53 auch den Namen „Wächter des Genoms“ (Lane, 1992). Seine wichtigste Aufgabe ist es, die Weitergabe von Mutationen an Tochterzellen zu verhindern.

### 2.2.2 Struktur von p53

Das p53-Gen ist beim Menschen auf dem Chromosom 17 (17p13) lokalisiert (Isobe et al., 1986) und weist eine Größe von 20 kb auf. Es besteht aus 11 Exons und 10 Introns (Bienz et al., 1984) und wird je nach Spezies mit einer Länge von 1,8 bis 3 kb transkribiert (Soussi et al., 1990). Beim Menschen kodiert das p53-Gen für ein Protein von 393 Aminosäuren (siehe Abb. 2.3) (Levine & Momand, 1990; Wang et al., 1994), welches einem Molekulargewicht von 43,5 kDa entspricht. Aufgrund einer Anhäufung von helixbrechenden Prolinresten im Aminoterminus kommt es in der SDS-Gelelektrophorese zu einem aberranten Laufverhalten (bei 53 kDa), wodurch das Protein seinen Namen erhielt (Oren, 1985).

Vergleiche von p53-Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies resultierten in der Entdeckung von fünf konservierten Regionen innerhalb des Proteins (siehe Abb. 2.3; graue Balken I-V), die entscheidend für die vielfältigen Funktionen von p53 sind (Soussi & May, 1996). Entsprechend seiner biochemischen Eigenschaften wird das p53-Protein in drei funktionelle Bereiche unterteilt: der Aminoterminus enthält die transkriptionelle Aktivierungsdomäne (TAD), die Kerndomäne die spezifische DNA-Bindungsdomäne (DBD) und der Carboxyterminus die Tetramerisierungsdomäne (T4) sowie die regulatorische Region (RR). Die verschiedenen Funktionen der einzelnen Domänen werden im Folgenden genauer erläutert (siehe Abb. 2.3)



**Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Tumorsuppressors p53**

Das humane Tumorsuppressorprotein p53 (hp53) besteht aus 393 Aminosäuren. Es lässt sich in drei funktionelle Bereiche untergliedern: Der Aminoterminus mit zwei Sub-Transaktivierungsdomänen (TAD<sub>1</sub>: 1 bis 42; TAD<sub>2</sub>: 43 bis 63) und einer prolinreichen Region (PXXP), die Kerndomäne mit der sequenzspezifischen DNA-Bindungsdomäne (DBD) und der Carboxyterminus mit der Tetramerisierungsdomäne (T4) und der regulatorischen Region (RR). Die Zahlenangaben beziehen sich auf die entsprechenden Aminosäuren. Die mit römischen Zahlen bezifferten grauen Balken bezeichnen konservierte Regionen des p53-Proteins (I-V). Die schwarzen Balken kennzeichnen die Bindungsstellen der in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen p53-Antikörper (Ak) (DO-1) und (PAb421) (siehe Kapitel 3.4.5). NLS, nukleäres Lokalisationssignal (I-III); NES, nukleäres Exportsignal.

### 2.2.2.1 Der Aminoterminus von p53

Der saure Aminoterminus umfasst die Aminosäuren 1 bis 99 und beinhaltet eine transkriptionelle Aktivator-domäne (TAD), die in zwei Subdomänen (TAD<sub>1</sub>: 1 bis 42; TAD<sub>2</sub>: 43 bis 63) unterteilt und für die Transaktivierung bestimmter Zielgene verantwortlich ist (Unger et al., 1992; Yakovleva et al., 2002). Die Transaktivierungsdomäne tritt mit Proteinen der basalen Transkriptionsmaschinerie in Wechselwirkung, wie z.B. dem TBP (*TATA binding protein*) oder den TAFs (*TBP associated factors*) (Buschmann et al., 2001a; Crighton et al., 2003; Ko & Prives, 1996; Uesugi & Verdine, 1999) sowie mit Koaktivatoren, z.B. CBP/p300 (Blobel, 2000; Goodman & Smolik, 2000; Grossmann, 2001). Die aminoterminal Domäne ist weiterhin

Bindungsstelle des zellulären Proto-Onkogens Mdm-2 (*murine double minute chromosome-2*) (Iwakuma & Lozano, 2003; Chen et al., 1993; Otto & Deppert, 1993), das in der Regulation des p53-Proteins eine entscheidende Rolle spielt (siehe Kapitel 2.2.3.1). Phosphorylierungen bestimmter Aminosäuren – vermittelt durch spezifische Kinasen (siehe Kapitel 2.2.3.2) - führen zu einer Veränderung der Aktivität, Stabilität und Funktion von p53 (Ashcroft et al., 1999; Buschmann et al., 2000).

Neben der transaktivatorischen Domäne existiert eine prolinreiche Region (Aminosäuren 63-91) mit fünf Wiederholungen des SH3-Bindungsmotifs PXXP. Diese Domäne spielt eine wichtige Rolle bei der p53-vermittelten Apoptose (Zhu et al., 1999) und kann mit Faktoren der Signaltransduktion interagieren (Venot et al., 1998). Der Verlust dieser Domäne führt zu einem erhöhten Mdm-2-vermittelten Abbau von p53 (Dumaz et al., 2001).

#### **2.2.2.2 Die Kerndomäne von p53**

Die hydrophobe Kernregion von p53 umfasst die Aminosäuren 102 bis 292 und enthält die Protease-resistente Zink ( $Zn^{2+}$ )-abhängige DNA-Bindungsdomäne (DBD). Sie dient der sequenz-spezifischen p53-Bindung an Konsensussequenzen in Promotorregionen von p53-Zielgenen (Levine, 1997). Die Kerndomäne bindet an zwei Kopien sich wiederholender Dekamere: 5'-RRRC(A/T)(T/A)GYYY-3' (R = A oder G; Y = C oder T) (Funk et al., 1992) und bevorzugt dabei die pentamere Halbseite eines Dekameres der Konsensussequenz (Cho et al., 1994). Neben der DNA-Sequenz ist bei der Bindung auch die räumliche Struktur der Nukleinsäure von entscheidender Bedeutung (Göhler et al., 2002; Kim et al., 1999). In Verbindung mit dem Carboxyterminus bindet die Kerndomäne an interne Segmente langer unspezifischer einzel- und doppelsträngiger DNA (Yakovleva et al.; 2001) sowie superhelikale DNA (Palecek, 2001). Die Kerndomäne besitzt zudem eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die durch den Carboxyterminus reguliert wird (Janus et al., 1999). Es sind verschiedene Korrekturlesemöglichkeiten beschrieben worden (Bakhanashvili, 2001; Melle & Nasheuer, 2002), allerdings ist die biologische Bedeutung der Exonukleaseaktivität noch unklar. Die Kerndomäne tritt neben dem großen T-Antigen des *Simian Virus 40* (Ko & Prives, 1996) auch mit anderen Proteinen in Wechselwirkung (Prives & Hall, 1999), wie z.B. mit 53BP 1 und 2 (Iwabuchi et al., 1994). Die Bedeutung der Kerndomäne für die Funktion von p53 wird bei der Analyse von mutiertem p53 in humanen Tumoren erkennbar. In über 90 % der in diesen Tumoren vorkommenden p53-Modifikationen sind *Missense*-Mutationen oder Deletionen in der sequenz-spezifischen Domäne beschrieben worden (Levine et al., 1994; Cho et al., 1994; Deppert, 1994). Eine

Klassifizierung der Mutanten erfolgt aufgrund ihrer Eigenschaften in der DNA-Bindung und ihrer kinetischen Stabilität (Friedler et al., 2003). Die bekanntesten Tumor-assoziierten „*hot-spot*“-Mutationen treten in den Aminosäure-Positionen 175, 245, 248, 249, 273 und 282 auf und liegen alle in den Bereichen der phylogenetisch konservierten Regionen (III-V; siehe Abb. 2.3). Mutationen führen entweder zu einer Konformationsänderung von p53 und/oder resultieren in einem Verlust der DNA-Bindungsfähigkeit (Cho et al., 1994; Friedler et al., 2002).

### 2.2.2.3 Der Carboxyterminus von p53

Der basische Carboxyterminus umfasst die Aminosäuren 300 bis 393 und besteht aus drei Regionen: einer flexiblen Region, einer Tetramerisierungsdomäne (T4) und einer regulatorischen Region (RR). Die 5'-gelegene Domäne enthält die flexible Region (Aminosäuren 387 bis 323), die die DNA-Bindungsdomäne mit der Tetramerisierungsdomäne (T4) verbindet. und die Tetramerisierungsdomäne selbst (Aminosäuren 325 bis 356) (Clöre et al., 1995; Jeffrey et al., 1995). Letztere vermittelt eine oligomere (tetramere) Bindung von p53 als ein Dimer eines Dimers (Chène, 2001; McLure & Lee, 1998). Die Bildung eines Tetramers hat Auswirkungen auf die sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53. Gegenüber einem Monomer erhöht sich beim Tetramer die Bindungsaffinität durch einen kooperativen Effekt um das 10 bis 1000-fache (Balagurumoorthy et al., 1995). Einige Protein-Protein-Interaktionen sind auf die tetramere Struktur beschränkt, wie z.B. die Bindung von Mdm-2 (Kubbutat et al., 1998a; Maki, 1999). Allerdings wurde auch berichtet, dass p53 einige Aktivitäten und Transaktivierungen als Monomer ausüben kann (Joers et al., 1998; Shaulian et al., 1993).

Die dritte Region liegt am 3'-Ende des C-Terminus und besteht aus einer Protease-sensitiven, regulatorischen Domäne (Aminosäuren 363 bis 393) (Lee et al., 1995; May & May, 1999). Diese regulatorische Region vermittelt eine unspezifische Bindung von p53 mit einzel- und doppelsträngiger sowie geschädigter DNA (Balkalkin et al., 1994; Bayle et al., 1995; Lee et al., 1995; Reed et al., 1995; Zotchev et al., 2000). Des Weiteren wurden auch Wechselwirkungen mit Faktoren der Transkriptionsmaschinerie, wie TFIID, beschrieben (Leveillard et al., 1996).

Im Carboxyterminus sind drei nukleäre Lokalisationssignale (NLS) identifiziert worden. Das NLS I (Aminosäuren 316 bis 325) zeigt eine hohe Konservierung zwischen verschiedenen Spezies und scheint das wichtigste NLS zu sein (Shaulsky et al., 1990; Rodriguez et al., 2000). Mutationen der NLS I bewirken eine vollständige Lokalisation im Zytoplasma, während Mutationen der NLS II (Aminosäuren 369 bis 375) und NLS III

(Aminosäuren 379 bis 384) eine Verteilung von p53 sowohl auf das Zytoplasma als auch in den Kern bewirken. Neben den NLS existiert im C-Terminus auch ein nukleäres Exportsignal (NES), innerhalb der Tetramerisierungsdomäne. Das NES besteht aus einer hydrophoben Leuzin-reichen Domäne (Aminosäuren 340 bis 351), die eine Kern→Zytoplasma Lokalisation vermittelt (Stommel et al., 1999). Die subzelluläre Lokalisation von p53 spielt eine entscheidende Rolle für dessen Regulation und Aktivität (siehe Kapitel 2.2.3.3).

Modifikationen im Aminoterminus und Carboxyterminus durch Ubiquitylierung, Phosphorylierung, Azetylierung oder Sumoylierung (Appella, 2001; Brooks & Gu, 2003) spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von p53 und werden im folgenden Kapitel genauer erläutert.

### **2.2.3 Regulation und Stabilisierung des p53-Proteins**

p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Reihe von Genen aktivieren oder reprimieren kann, die in Prozessen von Zellzyklus, Zellwachstum und/oder Differenzierung sowie Apoptose involviert sind. Die sequenz-spezifische DNA-Bindung ist dabei von entscheidender Bedeutung, da sie die transkriptionelle Aktivität von p53 vermittelt (Vogelstein et al., 2000). Um eine kontrollierte Proliferation von Zellen zu ermöglichen, unterliegt die Funktion von p53 als Transkriptionsfaktor einer strengen Regulation und Kontrolle (Oren, 1999).

#### **2.2.3.1 Die p53-Mdm-2-Schleife**

Wildtyp-p53 Protein wird in normal proliferativen Zellen nur in sehr geringen Mengen von etwa 1000 bis 10000 Molekülen pro Zelle exprimiert. Dies resultiert u.a. aus seiner kurzen Halbwertszeit von 5 bis 20 Minuten (Patschinsky & Deppert, 1990; Levine, 1997). Die Regulation in normal proliferierenden Zellen beruht im Wesentlichen auf der Kontrolle des Abbaus durch eine ATP-Ubiquitin-abhängige Proteolyse. Durch Ubiquitylierung, d.h. Konjugation von ein bis mehreren Ubiquitin-Molekülen am C-Terminus, wird p53 von dem 26-S-Proteasom-Komplex erkannt und abgebaut. Der Prozess der Ubiquitylierung wird durch drei Enzyme katalysiert: E1 ist ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym, E2 vermittelt die Ubiquitin-Konjugation und E3 ist eine Ubiquitin-Ligase, die eine große Gruppe von verschiedenen Proteinen darstellt (Ashcroft & Vousden, 1999; Weissmann, 2001). Eine entscheidende Rolle im Abbau von p53 spielt die Ubiquitin-Ligase Mdm-2 (Honda et al., 1997; Meulmeester et al., 2003). Das humane Protein wird auch als Hdm-2 bezeichnet. Mdm-2 ist ein Onkoprotein, das am Aminoterminus von p53 bindet und den

Abbau des p53-Proteins durch Ubiquitinylierung induziert (Fang et al., 2000; Kubbutat & Vousden, 1998b; Vousden, 2002). Eine wichtige Voraussetzung dafür ist eine tetramere Struktur von p53 (Chène, 2001). Die Konjugation der Ubiquitin-Moleküle erfolgt an sechs Lysin-Aminosäureresten in der regulatorischen Region des C-Terminus von p53 (Rodriguez et al., 2000). Die Substitution der Ubiquitin-Moleküle induziert ebenfalls eine Autoubiquitinylierung von Mdm-2, wodurch das Protein seinen eigenen Abbau einleitet. Die Bindung von Mdm-2 innerhalb der Transaktivierungsdomäne führt nicht nur zu einem schnellen Abbau, sondern resultiert gleichzeitig in einem Verlust der transkriptionellen Aktivität (Alarcon-Vargas & Ronai, 2002; Chen et al., 1995; Thut et al., 1997) und der Fähigkeit, mit anderen Proteinen zu interagieren (Wadgaonkar & Collins, 1999). So verhindert Mdm-2 z.B. die Bindung von p300/CBP und bewirkt eine Inhibierung der p53-Azetylierung (Kobet et al., 2000). Auf der anderen Seite bindet p53 an einen von zwei alternativen Mdm-2-Promotoren, den P2-Promotor, und aktiviert dessen Transkription (Barak et al., 1993; Wu et al., 1993; Zauberman et al., 1995). Dieser negative *Feedback-Loop* unterliegt einer strengen Balance, die die Funktion beider Proteine reguliert (Oren et al., 2002; Węsierska-Gądek & Horok, 2003). Deutlich wird dies durch Deletion des Mdm-2-Gens in Mäusen, die durch den Verlust von Mdm-2 eine sehr frühe embryonale Lethalität, aufgrund einer erhöhten Apoptose, aufweisen (De Rozières et al., 2000). Mutiertes p53 hat nicht die Fähigkeit, Mdm-2 zu induzieren bzw. von Mdm-2 gebunden und/oder abgebaut zu werden und es zeigt daher eine erhöhte Stabilität (Lane & Hall, 1997). Neben Mdm-2 ist auch JNK (*Jun-amino (N)-terminal kinase*) in der Lage, die Ubiquitinylierung von p53 in normalen, ungestressten Zellen zu vermitteln und den Abbau des Proteins auszulösen (Fuchs et al., 1998).

Obwohl der Mechanismus der p53 Kern→Zytoplasma Lokalisation noch nicht genau geklärt ist (siehe Kapitel 2.2.3.3), scheint Mdm-2 an diesem Transport entscheidend beteiligt zu sein (Tao & Levine, 1999). Eine Überexpression von Mdm-2 bewirkt einen erhöhten Export ins Zytoplasma und resultiert in einem erhöhten Abbau von p53 (Boyd et al., 2000; Geyer et al., 2000; Lohrum et al., 2001). Studien von O'Keefe et al. (2003) bestätigten diese Beobachtungen und zeigten, dass nur zytoplasmatisches, nicht aber nukleäres p53-Protein ubiquitinyliert werden kann. Im Gegensatz dazu konnten Stommel & Wahl (2004) zeigen, dass Mdm-2 auch im Kern den Abbau von p53 vermittelt.

### 2.2.3.2 Modifikationen von p53

Für eine schnelle Verfügbarkeit in Antwort auf genotoxischen Stress unterliegt p53 einer Reihe von posttranslationellen Modifikationen, die zu einer Stabilisierung des p53-Proteins führen (Appella, 2001; Brooks & Gu, 2003). Diese Modifikationen bewirken eine Konformationsänderung des p53-Proteins und beeinflussen dessen Aktivität. Phosphorylierungsstellen im Amino- und Carboxyterminus werden durch verschiedene Kinasen modifiziert. Mehrere Serin-Aminosäurereste werden u.a. durch DNA-Protein-Kinasen, das ATM-Protein (*Ataxia telangiectasia mutated*-Protein), das ATR-Protein (*Ataxia telangiectasia related*-Protein) und die JNK phosphoryliert. MAP-(Mitogen aktivierte Protein)-Kinasen phosphorylieren Threonin-Aminosäurereste (Buschmann et al., 2001b; Thompson et al., 2004; Giaccia & Kastan, 1998; Meek, 1999; Jayaraman & Prives, 1999; Vogelstein et al., 2000). Die Phosphorylierungen führen zu einer Stabilisierung des p53-Proteins, damit zu einer Aktivierung der sequenz-spezifischen DNA-Bindung und letztendlich zu einer Transaktivierung von verschiedenen p53-Zielgenen (Ashcroft et al., 1999; Vousden, 2002; Woods & Vousden, 2001). Mundt et al. (1997) beschrieben, dass die Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase C (PKC) dem Epitop des monoklonalen Antikörpers PAb421 (Aminosäuren 371 bis 380; siehe Abb. 2.3) entsprechen und dass dessen Bindung ebenfalls zu einer Aktivierung der sequenz-spezifischen DNA-Bindung von p53 *in vitro* führt. Dennoch konnten Hoffmann et al. (1998) zeigen, dass Phosphorylierungen auch eine Inhibierung der unspezifischen DNA-Bindung bewirken. Obwohl viele Informationen über Phosphorylierungen von p53 existieren, ist doch sehr wenig über das Entfernen von Phosphatgruppen bekannt. Dephosphorylierungen werden von Phosphatasen vermittelt (Chinkers et al., 2001), wobei den Phosphatasen 1 und 2A bisher eine Rolle bei der Dephosphorylierung von p53 zugeschrieben wurde (Scheidtmann et al., 1991; Haneda et al., 2004).

Verschiedene Lysin-Aminosäurereste im C-Terminus werden durch p300/CBP oder PCAF azetyliert (Barlev et al., 2001; Grossmann et al., 2001; Prives & Manley, 2001) und scheinen bei der Vermittlung der sequenz-spezifischen DNA-Bindung von p53 von Bedeutung zu sein. Dennoch werden die genauen Auswirkungen von Azetylierungen kontrovers diskutiert. So zeigen Studien von Espinosa & Emerson (2001) beispielsweise, dass keine Modifizierung in Form von Azetylierung für eine spezifische Bindung von p53 an den p21-Promotor benötigt wird. Deazetylierungen entweder durch die Histon-Deazetylase (HDAC) (Juang et al., 2000) oder die NAD-abhängige hSir2-Deazetylase

(Vaziri et al., 2001) führen dagegen zu einer spezifischen Repression der p53-abhängigen Transaktivierung. Neueste Studien zeigen eine Deazetylierung von p53 durch die Bindung der Proteine Sir2 $\alpha$  oder PID/MTA2 (Gu et al., 2004).

Eine weitere Möglichkeit der Modifikation ist die Sumoylierung von p53 (Gotissa et al., 1999; Müller et al., 2000). Sumoylierung beruht auf einer Enzym-Kaskade, die die Kopplung von SUMO (*small ubiquitin-like modifier*)-Molekülen an Lysinreste bestimmter Zielproteine vermittelt (Hochstrasser, 2002). Die genaue Bedeutung dieser Modifizierung ist noch nicht geklärt. Studien von Rodriguez et al. (1999) ließen vermuten, dass Sumoylierung die transkriptionelle Aktivität von p53 erhöht, allerdings konnten andere Autoren (Kwek et al., 2001; Minty et al., 2000) dies nicht bestätigen und zeigten sogar eine Inhibierung der transkriptionellen Aktivität (Schmidt & Müller, 2002). Weitere Studien deuten auf eine mögliche Rolle der Sumoylierung in der p53-vermittelten Apoptose hin (Müller et al., 2000).

Des Weiteren wurden Modifikationen in Form von Glykosylierung und Ribosylierung durch PARP (Poly (ADP-ribose) Polymerase) beschrieben, die ebenfalls einen Effekt auf die Stabilität und Aktivität des p53-Proteins haben (Vaziri et al., 1997).

Eine weitere Form der p53-Stabilisierung erfolgt durch eine Inhibierung des Mdm-2 vermittelten Abbaus. Das Protein HAUSP (Herpesvirus-assoziierte Ubiquitin-spezifische Protease) katalysiert eine Deubiquitylierung des p53-Proteins und induziert auch in Anwesenheit von Mdm-2 verschiedene p53-abhängige Regulationen, wie Zellzyklusarrest oder Apoptose (Cummins & Vogelstein 2004; Li et al., 2002, 2004). Ein weiterer wichtiger Faktor, der in der Stabilisierung von p53 involviert ist, ist das Protein p14<sup>ARF</sup>. Das Protein bindet an den C-Terminus von Mdm-2 und inhibiert dadurch nicht nur dessen Fähigkeit zur Ubiquitylierung, sondern verhindert auch den Export von p53 aus dem Kern (Rodway et al., 2004; Zhang & Xiong, 2001). Die Bindung von Mdm-2 an p53 wird dadurch allerdings nicht beeinflusst und kann die Ausbildung eines tertiären Komplexes zur Folge haben (Kamijo et al., 1998; Lohrum et al., 2000).

### **2.2.3.3 Lokalisation von p53**

Neben den in Kapitel 2.3.3.2 beschriebenen Modifikationen ist eine Regulierung der subzellulären Lokalisation für die p53-Funktion von entscheidender Bedeutung. Die transkriptionelle Aktivität von p53 ist abhängig von seiner Kernlokalisation. Der Export aus dem Kern resultiert in einem Aktivitätsverlust und führt zu einem Abbau über den Proteasom-Komplex (Freedman & Levine, 1998; Myung et al., 2001). Verantwortlich

dafür ist hauptsächlich das Protein Mdm-2 (siehe Kapitel 2.2.3.1), wobei der Transport-Mechanismus noch kontrovers diskutiert wird. Brooks et al. (2004) diskutieren dabei eine Monoubiquitylierung als ein Signal des p53-Kernexportes. Der Transport von p53 ins Zytoplasma kann allerdings auch über das NES (nukleäres Exportsignal) vermittelt werden, indem dieses mit einem Exportrezeptor (CRM-1) interagiert (Stommel et al., 1999). Verschiedene Studien bestätigten, dass p53-NES-Mutanten hauptsächlich im Kern lokalisiert sind (Lohrum et al., 2001; Shirangi et al., 2002). Der Transport in den Kern wird zum einen von den NLS vermittelt (Rodriguez et al., 2000), zum anderen unterstützt eine aminoterminal Bindung von p53 an zelluläre Mikrotubuli einen Dynein-abhängigen Transport in den Kern (Giannakakou et al., 2000; Vousden & Woude, 2000).

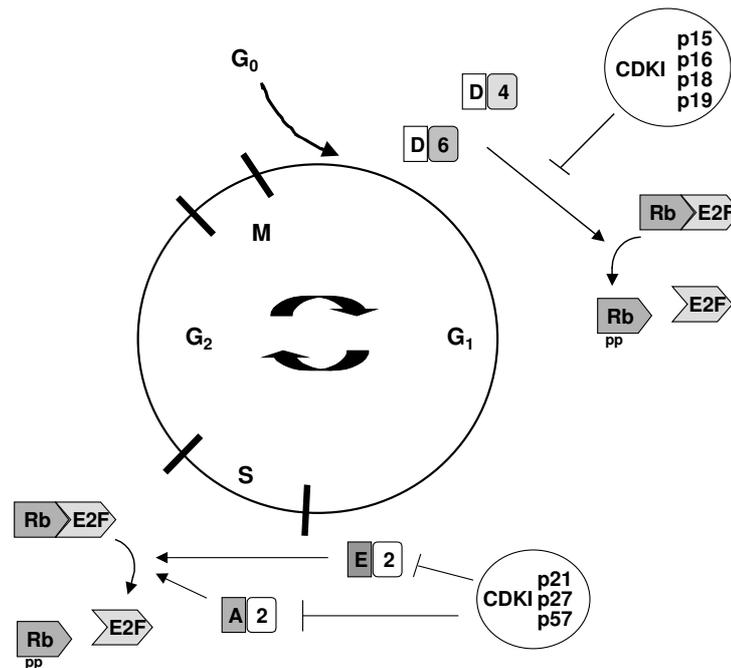
#### **2.2.4 Funktion von p53**

In Antwort auf genotoxischen Stress, wie z.B. UV-Strahlung, ionisierende Strahlung (IR) oder DNA-schädigende Substanzen, sowie Hitzeschock, Hypoxie oder Verlust von Nukleotiden, erfolgt eine akute und schnelle Erhöhung des zellulären p53-Proteinspiegels. Dies erfolgt durch posttranslationale Modifikationen (Appella & Anderson, 2001; Chao et al., 2000; Oren, 1999) (siehe Kapitel 2.2.3.2) oder aufgrund vermehrter Proteinsynthese durch Ablösen des p53-Proteins von seiner autoregulatorisch-inhibierten mRNA (Mosner et al., 1995). Die Modifikationen bewirken eine Stabilisierung und Akkumulation des p53-Proteins und führen zu einer Transaktivierung von Genen, die entweder bei der Arretierung des Zellzyklus und der DNA-Reparatur beteiligt sind oder die Induktion der Apoptose bedingen.

##### **2.2.4.1 Der Zellzyklus**

Verschiedene Regulatoren des Zellzyklus bewirken, dass Stammzellen ruhen, die Vorläuferzellen replizieren und der Austritt aus dem Zellzyklus zugunsten der Differenzierung erfolgen kann (Steinman, 2002). Der Zellzyklus ist eine Abfolge von genau regulierten Vorgängen, die in verschiedene Phasen eingeteilt werden (siehe Abb. 2.4). Die G<sub>1</sub>/S-Phase ist ein sehr kritischer Zeitpunkt für die Zellen, um den Wachstumsarrest oder die Proliferation festzulegen. Beim Übergang von der G<sub>0</sub>- über die G<sub>1</sub>- zur S-Phase werden spezifische Komplexe aktiviert, die aus einem Zyklin-Protein und einer zyklin-abhängigen Kinase (*cyclin dependent kinase*; CDK) zusammengesetzt sind. Bei den aktiven Komplexen handelt es sich in der frühen G<sub>1</sub>-Phase um ZyklinD/CDK4 oder CDK6 und in der späten G<sub>1</sub>-Phase um ZyklinE/CDK2. Diese katalysieren eine Phosphorylierung des Retinoblastoma (Rb)-Proteins und bewirken dadurch eine

Dissoziation des phosphorylierten Proteins von dem Transkriptionsfaktor E2F-1. Dieser ist nun in der Lage, die Aktivierung von Genen zu induzieren, die in der S-Phase benötigt werden. Die Aktivität der Zykline und CDKs kann durch verschiedene CDK-Inhibitoren (CDKI) beeinflusst werden, wie z.B. durch die INK4-Klasse (p15, p16, p18, p19), welche die CDK4 und CDK6 inhibieren, oder durch die KIP/CIP-Familie (p21, p27, p57), die unterschiedliche Zykline und CDKs inhibieren können (Steinman, 2002).



**Abbildung 2.4: Der eukaryontische Zellzyklus und seine Kontrolle**

G<sub>0</sub>, Ruhephase; G<sub>1</sub>, Vorbereitung der DNA-Synthese; S, DNA-Synthesephase; G<sub>2</sub>, Vorbereitung der Mitosephase; M, Mitose/Zellteilung; Rb, Retinoblastoma-Protein; pp, Phosphorylierung; Zykline D, E, A (Rechtecke); CDKs, Zyklin-abhängige Kinasen 2, 4, 6 (Rechtecke mit abgerundeten Ecken) (modifiziert nach Steinman, 2002).

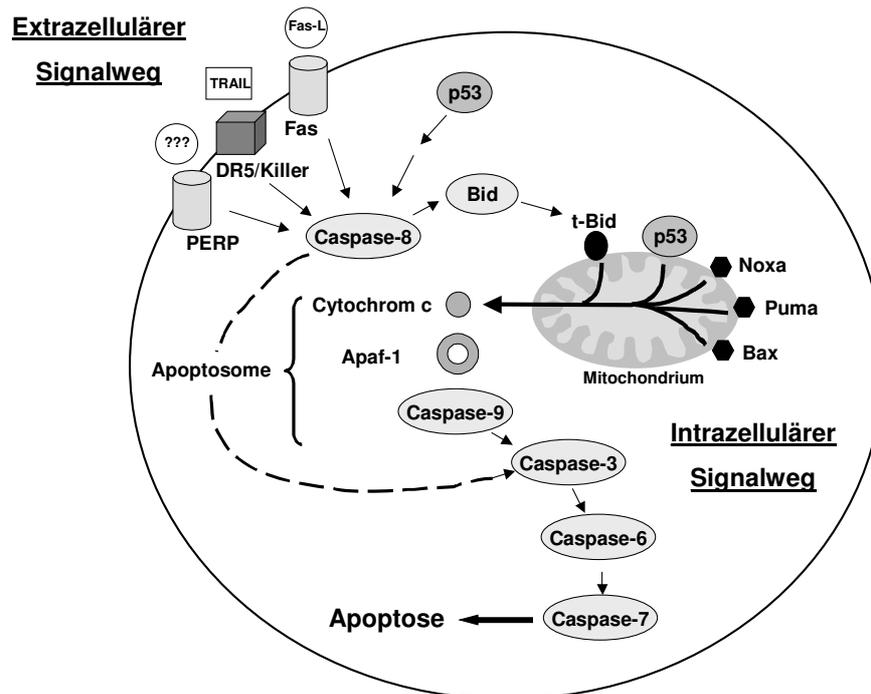
Der durch Stress vermittelte Anstieg der p53-Konzentration bewirkt die transkriptionelle Aktivierung von verschiedenen Zielgenen (Fei et al., 2002). Das p21<sup>WAF1</sup>-Protein, ein Inhibitor der CDK2 (Harada & Ogden, 2000; Vogelstein et al., 2000), bindet an die Kinase, inhibiert sowohl die Phosphorylierung von Rb als auch die Freisetzung von E2F. Dies führt zu einem Zellzyklusarrest in G<sub>1</sub> und verhindert den Übergang in die S-Phase. Der Zelle bleibt somit Zeit, DNA-Schäden zu reparieren. Die Induktion von c-Jun befähigt die Zelle in den Zellzyklus zurückzukehren (Shaulian et al., 2000). Alternativ dazu ist p53 in der Lage, durch Transaktivierung des 14-3-3σ-Gens, eines Phosphataseinhibitors, den Zellzyklus am Übergang von G<sub>2</sub>/M zu arretieren (Chan et al., 1999; Hermeking et al.,

1997; Yang et al., 1999). Während die p53-vermittelte Transaktivierung von p21<sup>WAF1</sup> in der G<sub>1</sub>-Phase zu einem Zellzyklusarrest führt, bewirkt sie nach einem G<sub>2</sub>/M-Arrest die Rückkehr in den Zellzyklus. In diesem Fall führt p21<sup>WAF1</sup> über Rb/E2F zu einer Inhibierung der transkriptionellen Aktivierung von Chk1, wodurch die Phosphorylierung von CDC25C (*cell division cycle 25C*), einer Phosphatase, verhindert wird. Die Zelle ist somit wieder in der Lage, in die Mitose einzutreten (Gottifredi et al., 2001).

Zudem transaktiviert p53 weitere Zellzyklusgene, die an Mechanismen der DNA-Reparatur beteiligt sind, u.a. GADD45 (*growth arrest and DNA damage 45*) und Zyklin G (Levine, 1997; Sengupta & Harris, 2005). Für GADD45 konnte gezeigt werden, dass es mit PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) interagiert und durch diese Bindung eine Arretierung des Zellzyklus in G<sub>1</sub> bewirkt (Smith et al., 1994). Die genaue Funktion von Zyklin G ist noch nicht geklärt. Dennoch scheint es bei der Stabilisierung des p53-Proteins eine Rolle zu spielen, indem es die Dephosphorylierung von Mdm-2 vermittelt (Chen, 2002; Okamoto et al., 2002).

#### 2.2.4.2 Apoptose

Eine Alternative zur Reparatur, insbesondere bei irreparablen Schäden, steht der Zelle in Form eines anderen Mechanismus zur Verfügung: der programmierte Zelltod (Fridman & Scott, 2003). Wann eine DNA-Schädigung letztendlich zur Apoptose oder zum Zellzyklusarrest führt, ist noch nicht genau geklärt, scheint aber von verschiedenen Faktoren abhängig zu sein (Fei et al., 2002). Hohe Mengen an p53 führen in die Apoptose, wobei p53 zwei verschiedene Wege aktivieren kann. Der extrazelluläre Mechanismus beruht auf der Aktivierung von Transmembranproteinen, wie Fas, DR5/Killer oder PERP. Der intrazelluläre Mechanismus beruht auf der Aktivierung von Mitgliedern der Bcl-2-Familie und führt zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Letztendlich vermitteln beide Mechanismen die Apoptose über eine Caspase-Kaskade (siehe Abb. 2.5). Die Bcl-2-Familie enthält verschiedene Gruppen, die sowohl anti-apoptotische Signalwege aktivieren, wie Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub>, als auch pro-apoptotische Wege vermitteln, wie Bax, Puma, Noxa und Bid. Eine Induktion der Apoptose wird über das Verhältnis zwischen Apoptose-induzierenden und Apoptose-reprimierenden Proteinen gesteuert. p53 kann dieses Verhältnis über eine transkriptionelle Aktivierung zugunsten der pro-apoptotischen Familienmitglieder verschieben (Haupt et al., 2003; Yakovlev et al., 2004).



**Abbildung 2.5: Die p53-vermittelte Apoptose**

Das Modell der p53-vermittelten Apoptose mit dem extrazellulären und intrazellulären Signalweg (modifiziert nach Haupt et al., 2003).

### 2.2.4.3 p53 als Repressor

Neben einer ganzen Reihe von Genen, die durch p53 aktiviert werden können, gibt es auch Gene, die von p53 reprimiert werden. Dabei kann man verschiedene Möglichkeiten der Repression durch p53 unterscheiden. In früheren Studien wurde eine Interaktion von p53 mit der DBD des humanen Thyroidhormon (hTR $\beta$ 1)- und Östrogen (hER $\alpha$ )-Rezeptors gezeigt (Liu et al., 1999; Yap et al., 1996). Diese Interaktion resultiert in einer Inhibierung der Bindung der Steroidhormonrezeptoren an ihre responsiven Elemente und beeinträchtigt somit deren Transaktivierungsfähigkeit. Für den GR ist ebenso eine Repression der hormonabhängigen Transaktivierung durch p53 beschrieben worden (Sengupta et al., 2000; Yu et al., 1997). In diesem Falle sind die Kerndomäne und das NLS von p53 an der Interaktion beteiligt. Die Interaktion resultiert in einer Sequestrierung beider Faktoren im Zytoplasma (Sengupta & Wasyluk, 2004).

Eine weitere Möglichkeit der Repression besteht in der Konkurrenz um Kofaktoren, wie z.B. den Koaktivator p300/CBP. Neben p53 (Avantaggiati et al., 1997; Lill et al., 1997) interagieren auch andere Transkriptionsfaktoren mit p300/CBP und werden dadurch

synergistisch in ihrer Transaktivierungsfunktion verstärkt. Eine limitierende Menge an p300/CBP könnte jedoch zu einer Konkurrenz im Zellkern führen.

Darüber hinaus wurde von Murphy et al. (1999) ein DNA-abhängiger repressorischer Mechanismus von p53 beschrieben. Sie konnten zeigen, dass die Bindung von p53 an den Map4 (*microtubule associated protein 4*)-Promotor auch in Abwesenheit von p53-Konsenselementen erfolgt. Diese Bindung wird über einen Korepressor/Histondeazetylase-Komplex vermittelt und deutet auf „negative“ p53-Bindungsstellen hin, die zu einem Verlust der transkriptionellen Aktivität führen.

Zudem ist p53 in der Lage, Promotoren von Genen des Zellwachstums zu inhibieren, wie z.B. IL-2, IL-4 und IL-6, der Insulinrezeptor und c-myc (El-Deiry, 1998). Der genaue Mechanismus ist noch nicht geklärt, allerdings scheint die C-terminale Domäne, insbesondere die regulatorische Region, eine wichtige Funktion zu haben. Die Repression beruht dabei vermutlich auf Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren. Zudem reprimiert p53 verschiedene andere Gene, wie das Anti-Apoptosegen Bcl-2, hsp (*heat shock protein*)-70, MDR (*multiple drug resistance*)-1 und Aktin (El-Deiry, 1998).

#### **2.2.4.4 p53 in der Differenzierung**

p53 ist für die Aufrechterhaltung des Genoms in normalen Zellen verantwortlich und als ein Tumorsuppressor bekannt. Zusätzlich wird seine Funktion in vielen Differenzierungsprozessen immer deutlicher. Während der Embryonalentwicklung von Mäusen zeigt p53 bis zur Mitte der Schwangerschaft eine sehr starke Expression, die dann allerdings in den meisten Geweben stark abfällt und in den differenzierten Geweben nur noch sehr schwach ist (Choi & Donehower, 1999).

p53-KO-Mäuse entwickeln sich weitestgehend normal, weisen jedoch nach der Geburt eine hohe Sterblichkeitsrate durch multiple Neoplasien auf. Aufgrund dieser Tatsache scheint p53 in seiner Rolle als Tumorsuppressor entscheidend, in der Embryonalentwicklung allerdings entbehrlich zu sein (Donehower et al., 1992). Dennoch zeigten die heterozygoten weiblichen Nachkommen aus p53+/- x p53+/- Kreuzungen eine erhöhte Fehlbildungsrate (Anencephalie) durch einen ausbleibenden Neuralrohrverschluss (Armstrong, 1995). Zudem weisen die KO-Mäuse, insbesondere die weiblichen Tiere, eine deutlich reduzierte Fertilität auf (Donehower, 1996).

In einer Reihe von hämatopoietischen Zellen korreliert ein erhöhter p53-Spiegel mit der Expression von verschiedenen Differenzierungsmarkern. Zudem kann durch Einführung von p53 in eine p53-defiziente Prä-B-Zelllinie deren Differenzierung ausgelöst werden (Almog & Rotter, 1997; Choi & Donehower, 1999). Außerdem wird die Differenzierung von Myoblasten, von Vorläuferzellen des Knochenmarks sowie von Neuronen durch dominant-negative p53-Formen inhibiert (Almog & Rotter, 1997; Mazzaro et al., 1999), was auf eine wichtige Funktion des endogenen p53 in diesen Prozessen hindeutet.

Des Weiteren konnte in immortalisierten Granulosazellen durch eine cAMP (*cyclic adenosine-3',5'-monophosphate*)-Behandlung und gleichzeitige p53-Koexpression eine Progesteronproduktion ausgelöst werden (Almog & Rotter, 1997).

Diese Eigenschaften sprechen für eine entscheidende Rolle von p53 während der Differenzierung von verschiedenen Geweben und eröffnen ein weiteres großes Gebiet, in dem die genaue Funktion des Tumorsuppressors p53 untersucht werden sollte.

### **2.2.5 p53-Mutanten**

In der heutigen Krebsforschung sind vor allem Mutationen des Wildtyp-p53-Gens von besonderem Interesse. Das p53 Tumorsuppressor-Gen weist in über 50 % aller humanen Tumoren Mutationen auf. Dies sind hauptsächlich *Missense*-Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne (DBD) (siehe Kapitel 2.3.2.2), die zu einem Verlust der spezifischen DNA-Bindung führen und dadurch die normale Funktion von p53 beeinflussen. Der Effekt der p53-Mutanten beruht meist auf einem dominant negativen Mechanismus (Sigal & Rotter, 2000; Nicholls et al., 2002). Die Heteromerisierung mit Wildtyp-p53, die über die Tetramerisierungsdomäne (T4) von p53-Proteinen vermittelt wird, führt nicht nur zu einer Inhibierung der Wildtyp-p53-Bindung an spezifische DNA-Zielsequenzen (Chène, 1998), sondern verhindert auch die Transaktivierung von p53-Zielgenen (Kern et al., 1992). p53-Mutanten, denen eine funktionelle Tetramerisierungsdomäne fehlt, zeigen dagegen keine onkogene Wirkung (Chène & Bechter, 1999). Darüber hinaus konkurrieren p53-Mutanten um mögliche Faktoren, welche für die transaktivierende Funktion von Wildtyp-p53 von Bedeutung sein können (Blagosklonny, 2000). Dies hat drastische Auswirkungen auf zahlreiche physiologische Prozesse, wie die p53-vermittelte Entwicklung und Differenzierung von verschiedenen Zelltypen (Aloni-Grinstein et al., 1993; Soddu et al., 1996; Wallingford et al., 1997), die Apoptose (Gottlieb et al. 1994), den Zellzyklus-Arrest (Aloni-Grinstein et al., 1995; Tang et al., 1998) und die Genom-Stabilität (Mekeel et al., 1997) einerseits sowie die Immortalisierung andererseits (Cao et al., 1997). Dennoch

lieferten Transfektionsexperimente von p53-Mutanten in Wildtyp-p53 exprimierenden Zelllinien erste Hinweise auf die Existenz von intrinsischen, aktiv onkogenen Eigenschaften der Mutanten durch eine deutliche Steigerung in der Tumorigenität (Shaulsky et al., 1991). Eindeutige Hinweise lieferten Transfektionsstudien mit p53-defizienten Zelllinien: Eine schwach tumorigene Zelllinie, bei der sich im Tier anfänglich gebildete Tumoren schnell zurückbildeten, zeigte nach Transfektion mit mutiertem p53 stark tumorigene Eigenschaften und entwickelten im Tier aggressive, letale Tumore (Shaulsky et al., 1991). Diese Studien zeigten, dass Mutanten-p53 gegenüber dem Wildtyp-p53 an Funktion gewonnen hat. Diese Eigenschaft wird daher auch als „gain of function“ bezeichnet.

Den p53-Mutanten wird auch eine Beteiligung in der Aktivierung oder Reprimierung von spezifischen Genen zugesprochen, die onkogene Effekte ausüben können. Studien von verschiedenen Arbeitsgruppen zeigten, dass p53-Mutanten in der Lage sind, bestimmte Zielgene zu aktivieren. Dazu gehören *c-myc* (Frazier et al., 1998), PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) (Deb et al., 1992), IL-6 (Margulies & Sehgal, 1993), VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Kieser et al., 1994) sowie humanes HSP-70 (*heat shock protein-70*) (Tsutsumi-Ishii et al., 1995). Eine funktionelle Transaktivierungsdomäne muss dafür allerdings vorhanden sein (Sigal & Rotter, 2000). Eine neue Studie belegt die Aktivierung des EGR1 (early growth response factor 1)-Promotor durch mutiertes p53 (Weisz et al., 2004).

## **2.3 Der menschliche Uterus**

### **2.3.1 Aufbau**

Der Uterus gliedert sich in die Bereiche Fundus, Korpus und Zervix (siehe Abb. 2.6). Strukturell wird der Uterus in drei Gewebeschichten unterteilt: die äußere Schicht, das Perimetrium (oder Serosa), die mittlere Schicht, das Myometrium und die innerste Schicht, das Endometrium. Das Perimetrium umkleidet das Myometrium und grenzt den Uterus von der Bauchhöhle ab. Den größten Gewebsanteil des Uterus stellt das Myometrium dar, eine Muskelschicht, dessen glatte Muskeln die uterinen Kontraktionen während des Menstruationszyklus und der Geburt vermitteln. Die innere Auskleidung des Uterus, das Endometrium, ist eine Schleimhautschicht, die zyklischen, morphologischen Veränderungen unterworfen ist. Das Endometrium dient der Einnistung des Embryos, ein Prozess, der auch als Implantation bezeichnet wird (Tortora & Grabowski, 1996).

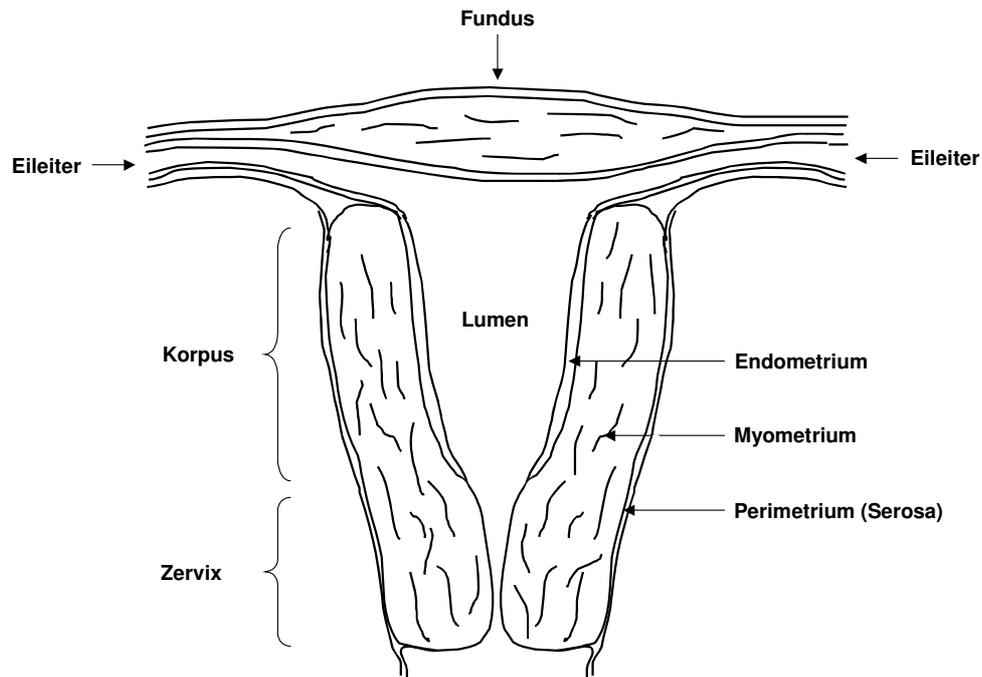
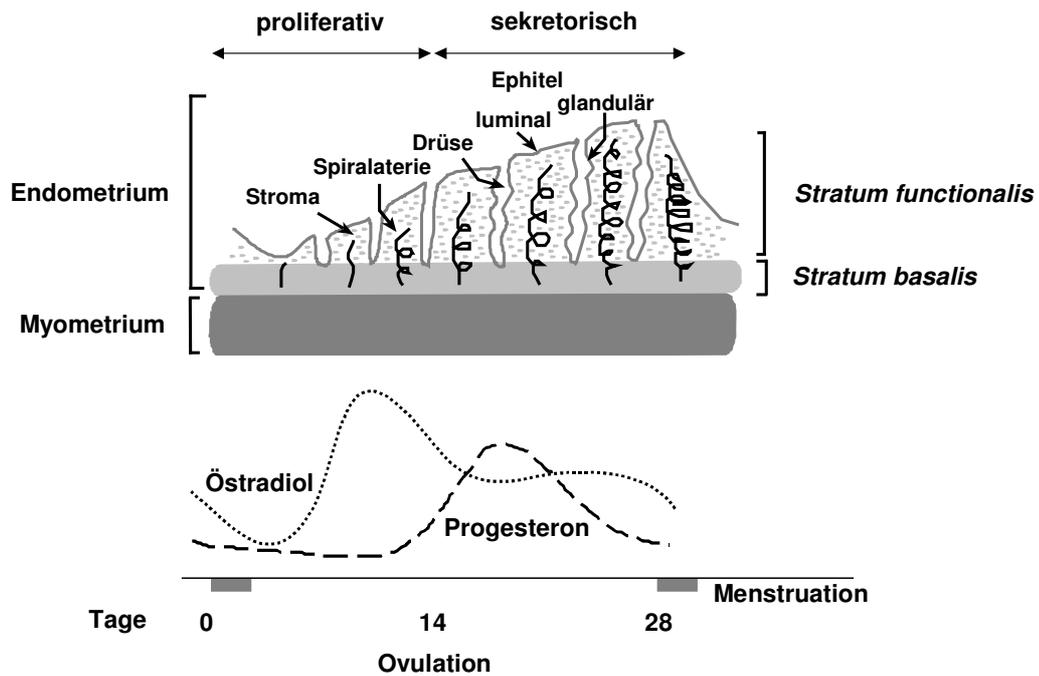


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des menschlichen Uterus (nach Tortora & Grabowski, 1996)

Der menschliche Uterus erfüllt mehrere Funktionen. Zum einen dient er der Aufnahme der Spermien und vermittelt den Transport der Spermien zu den Eileitern, zum anderen ist er der Ort der Implantation. Im Verlauf einer Schwangerschaft dient der Uterus dem Embryo als Ort der Entwicklung und bewirkt schließlich dessen Austreibung während der Geburt (Tortora & Grabowski, 1996; Porterfield, 2001).

### 2.3.2 Der menschliche Uterus im Menstruationszyklus

Während der Phase der weiblichen Reproduktionsfähigkeit, die sich beim Menschen von der Pubertät (Menarche) bis zur Menopause erstreckt, durchläuft der Uterus 400 bis 500 aufeinanderfolgende Zyklen. Jeder Zyklus dauert in der Regel 28 Tage und wird in drei Phasen unterteilt: die proliferative Phase, die sekretorische Phase und die Menstruationsphase (siehe Abb. 2.7). Im Verlauf des Menstruationszyklus durchläuft die Gebärmutter Schleimhaut, das Endometrium, einen Umwandlungsprozess zur Vorbereitung des Gewebes auf die Implantation des Embryos und den Erhalt der Schwangerschaft.



**Abbildung 2.7: Der menschliche Menstruationszyklus**

Das obere Schema zeigt einen Querschnitt des Uterus mit Endometrium und Myometrium im Verlauf des Monatszyklus. Im unteren Teil sind die Veränderungen im Plasmaspiegel von Östradiol und Progesteron dargestellt. Um den 14. Tag erfolgt die Ovulation.

Das Myometrium, die Muskelschicht des Uterus, umkleidet die innerste Schicht, das Endometrium. Letzteres ist ein sehr dynamisches Gewebe und untergliedert sich in zwei funktionelle Schichten: die äußere, dünnere *Stratum basalis* und die innere, dickere *Stratum functionalis*. Die *Functionalis* wird während der Menstruation abgeschieden. Die *Basalis* bleibt unverändert und dient zur Regeneration der *Functionalis* im nachfolgenden Zyklus. Das Endometrium besteht zu einem großen Teil aus Stromazellen (ESZ), in die Drüsengänge und Spiralarterien eingebettet sind. Diese durchziehen das endometriale Stroma bis zum Myometrium. Zum Lumen hin wird das Endometrium von einer einzellreihigen, luminalen Epithelschicht bedeckt, die Drüsen von einem einzellreihigen, glandulären Epithel. Die Bestandteile des Endometriums kommunizieren über komplexe parakrine/autokrine Mechanismen, die eine koordinierte Entwicklung und Differenzierung des Endometriums während des Menstruationszyklus und der Schwangerschaft bewirken (Leidenberger, 1998; Porterfield, 2001; Tortora & Grabowski, 1996).

### **2.3.2.1 Die proliferative Phase**

In der proliferativen Phase, auch follikuläre Phase genannt, reift ein Follikel unter dem Einfluss des hypophysären Gonadotropins, FSH (*follicle stimulating hormone*) im Ovar heran (Graaf'scher Follikel). Ovariell gebildetes Östrogen stimuliert die Regeneration und Proliferation des Endometriums sowie die Expression des Östrogenrezeptors. Gleichzeitig findet für eine spätere Progesteronwirkung eine verstärkte Expression des Progesteronrezeptors statt. Die Zellen des *Stratum basalis* zeigen eine hohe mitotische Aktivität und produzieren ein neues *Stratum functionalis*. Das Ergebnis ist eine Verdickung des Endometriums (4 bis 6 mm) und eine Ausbildung von Drüsen und Blutgefäßen (Leidenberger, 1998; Porterfield, 2001; Tortora & Grabowski, 1996).

### **2.3.2.2 Die sekretorische Phase**

Die sekretorische Phase, die auch als Lutealphase oder Gelbkörperphase bezeichnet wird, schließt sich dem zentralen Ereignis des Zyklus, der Ovulation (Eisprung), an. Nach der Ovulation (ca. 14. Tag) stimuliert Progesteron, welches von dem Gelbkörper (*Corpus luteum*) synthetisiert wird, die Umwandlung des Östrogen-beeinflussten Endometriums. Dieses zeichnet sich durch eine verstärkte Drüsensekretion (hauptsächlich Glykogen) sowie durch Wachstum und Verzweigung der Spiralarterien aus. Aufgrund dieser Eigenschaften spricht man nun vom Endometrium der sekretorischen Phase. Das Endometrium erreicht seine maximale Entwicklung um den 19. bis 22. Tag des Zyklus. Zu dieser Zeit besteht die Möglichkeit der Einnistung einer sich entwickelnden Blastozyste. Um dem 23. Tag eines 28 Tage dauernden Monatszyklus beginnt in der Umgebung der Spiralarterien unter dem Einfluss von Progesteron die Differenzierung der ESZ („Prädezidualisierung“). Dieser Dezidualisierungsprozess breitet sich über das gesamte subluminale Endometrium aus und ist ein Charakteristikum der späten Lutealphase (siehe Kapitel 2.3.3). Im Falle einer Implantation der Blastozyste entwickelt sich aus dem Endometrium die sogenannte Dezidua (Leidenberger, 1998; Porterfield, 2001; Tortora & Grabowski, 1996). Im Gegensatz zu vielen anderen Spezies, bei denen die Dezidualisierung einer Implantation folgt, differenziert sich das endometriale Stroma bei Menschen und Primaten auch in Abwesenheit einer Blastozyste, ausgelöst durch maternale Signale (Brosens et al., 2002).

### **2.3.2.3 Die Menstruationsphase**

Falls keine Implantation stattfindet, bildet sich das *Corpus luteum* zurück (Luteolyse). Diese Rückbildung bedingt eine Erniedrigung der Östrogen- und Progesteronsekretion,

wodurch dem sekretorischen Endometrium die hormonelle Unterstützung entzogen wird. Die inadäquate Hormonversorgung führt zur Degeneration des *Stratum functionalis*. In diesem Zuge werden lokal Prostaglandine ( $\text{PGE}_2$ ) freigesetzt, wodurch ein Zusammenziehen der Spiralarterien induziert wird. Dies hat eine Nekrotisierung des *Stratum functionalis* zur Folge. Das nekrotische Endometrium wird im Bereich des *Stratum basalis* abgelöst und durch Kontraktion des Myometriums abgestoßen. Dieser Prozess wird als Menstruation oder Regel bezeichnet und beendet damit den Monatszyklus. Noch bevor die Menstruation abgeschlossen ist, beginnen die Epithelzellen der *Basalis* erneut zu proliferieren und ein neues *Stratum functionalis* aufzubauen (Leidenberger, 1998; Porterfield, 2001; Tortora & Grabowski, 1996).

### **2.3.3 Die Dezidualisierung *in vivo* und *in vitro***

Der Umwandlungsprozess bzw. die Differenzierung des Endometriums in der späten Lutealphase wird auch als Dezidualisierung bezeichnet (siehe Kapitel 2.3.2.2). Dieser Prozess ist eine Voraussetzung für die Implantation der Blastozyste und die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft. Die Implantation wird von komplexen Vorgängen kontrolliert, in denen das Ovar und die Blastozyste Substanzen, wie Steroide, Wachstumsfaktoren und Prostaglandine sezernieren. Für eine Implantation ist der erste Kontakt der Blastozyste mit dem dezidualen Endometrium von entscheidender Bedeutung. Dabei spielt das luminale Epithel eine wichtige Rolle (Brosens et al., 2002; Dey et al., 2004). Bei einer erfolgreichen Einnistung vermittelt die äußere Zellschicht der Blastozyste (Trophoblast) die Verbindung mit dem dezidualen Endometrium. Ein fortlaufender Dezidualisierungsprozess sichert dabei nicht nur die Invasion des Trophoblasten, sondern bewirkt auch eine Begrenzung der Invasivität. Darüber hinaus entwickelt sich aus dem dezidualen Endometrium die *Dezidua basalis*, der maternale Bestandteil der Plazenta (Gellersen & Brosens, 2003; Porterfield, 2001). Ein Merkmal des Dezidualisierungsprozesses ist eine morphologische Veränderung der zuvor länglichen, fibroblastenartigen Stromazellen in vergrößerte, rundliche Zellen. Das endometriale Stroma produziert dezidua-spezifische Sekretprodukte, wie z.B. Prolaktin und IGFBP-1 (Telgmann & Gellersen, 1998) (siehe Kapitel 2.3.4) sowie Komponenten der extrazellulären Matrix (z.B. Laminin) und Enzyme (z.B. Proteasen und -Inhibitoren) (Gellersen & Brosens, 2003). Neben einer Vielzahl von physiologischen Effekten, die durch Progesteron vermittelt werden, u.a. die Entlassung der reifen Oozyte aus dem Ovar oder die Brustentwicklung zur Vorbereitung auf die Milchsekretion (Graham & Clarke, 1997), weisen viele klinische und

experimentelle Studien auf eine wichtige Rolle von Progesteron im Dezidualisierungsprozess hin (Gellersen & Brosens, 2003). Die Differenzierung der ESZ beginnt um den 23. Tag des Menstruationszyklus und korreliert mit maximalen Progesteronwerten zu diesem Zeitpunkt (siehe Abb. 2.7). Daneben scheint der hohe Spiegel an Progesteron für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft von Bedeutung zu sein, indem starke Uteruskontraktionen durch Ruhigstellung des Myometriums verhindert werden. Tang et al. (1994) konnten allerdings zeigen, dass auch niedrige Progesteronwerte in der vierten Schwangerschaftswoche (0,6 ng/ml im Vergleich zu 10 ng/ml in der Lutealphase) zu einer erfolgreichen Austragung der Schwangerschaft führten. Die genaue Rolle von Progesteron zum Ende der Schwangerschaft ist noch nicht geklärt.

Immer mehr Beobachtungen weisen auf eine Auslösung des Dezidualisierungsprozesses durch eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels und eine daraus resultierende Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) hin. *In vitro* kann die Dezidualisierung von ESZ durch Behandlung mit Gonadotropinen (z.B. LH, FSH) und anderen Hormonen (z.B. Relaxin) sowie mit Prostaglandinen (PGE<sub>2</sub>) induziert werden. Die Stimulierung führt dabei zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels und hat eine anhaltende Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) zur Folge (Telgmann et al., 1997). Durch eine Stimulation mit Relaxin, CRH (*corticotrophin releasing hormone*) oder cAMP-Analoga erfolgt die Dezidualisierung *in vitro* innerhalb von 2 Tagen. Obwohl Progesteron für die Dezidualisierung *in vivo* hauptsächlich verantwortlich zu sein scheint, so ist das Hormon *in vitro* ein schlechter Stimulator. Es bewirkt eine deziduale Transformation der Zellen erst nach 12 bis 14 Tagen. Die Wirkung von Progesteron *in vitro* beruht auf einem synergistischen Effekt bei gleichzeitiger Stimulation mit Relaxin oder cAMP-Analoga (Brosens et al., 1999; Gellersen & Brosens, 2003). Der Mechanismus dieser Signalverstärkung ist noch unklar. Es wird vermutet, dass der nukleäre Progesteronrezeptor (PR), der die Hormoneffekte von Progesteron vermittelt, durch einen PKA-abhängigen Signalweg modifiziert wird, und die ESZ für einen Effekt von Progesteron sensitiviert (Brosens et al., 1999; Gellersen & Brosens, 2003).

### 2.3.4 Marker der Dezidualisierung

Im Zuge der Dezidualisierung findet, neben der morphologischen Veränderung (siehe Abb. 2.8), die Synthese einer Reihe von neuen zellulären Proteinen statt (siehe Kapitel 2.3.3).

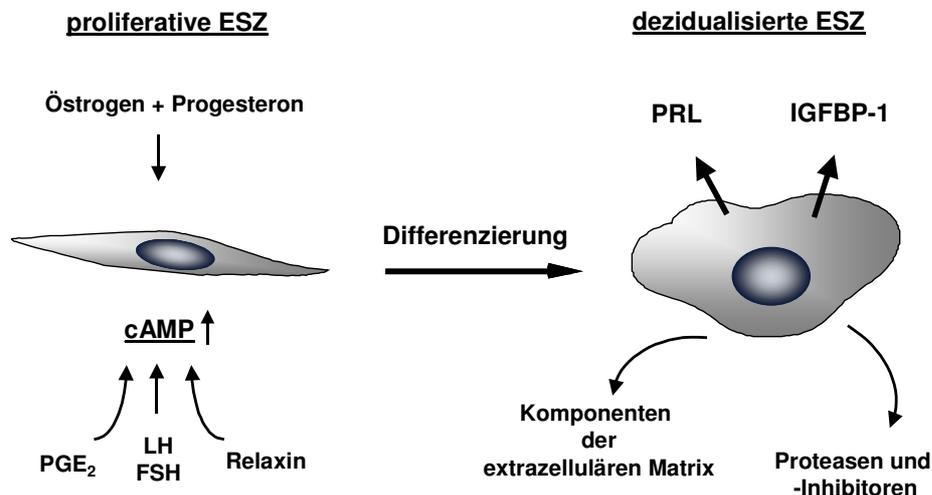


Abbildung 2.8: Schema der *in vitro* Dezidualisierung von endometrialen Stromazellen

Die Behandlung von proliferativen ESZ mit Östrogen + Progesteron oder die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch Stimulation mit Prostaglandin PGE<sub>2</sub>, Gonatropinen (LH, FSH) oder Relaxin, führen zur Differenzierung der ESZ. Die dezidualen ESZ sezernieren spezifische Produkte, wie die Dezidualisierungsmarker Prolaktin (PRL) und IGFBP-1 (*insulin-like growth factor binding protein-1*) sowie Komponenten der extrazellulären Matrix und Proteasen und -Inhibitoren (nach Telgmann & Gellersen, 1998).

Die hauptsächlichen Sekretprodukte im Dezidualisierungsprozess sind das Peptidhormon Prolaktin (PRL) und das Protein IGFBP-1 (*insulin-like growth factor binding protein-1*), die auch als Marker der Dezidualisierung bezeichnet werden (Tang et al., 1994).

IGFBP-1 ist an der Regulation des IGF (*insulin-like growth factor*)-Spiegels beteiligt und scheint eine Rolle bei der Inhibierung der Trophoblasteninvasion zu spielen (Firth & Baxter, 2002).

Die genaue Funktion des dezidualen PRL (dPRL) ist noch nicht bekannt. Die meisten physiologischen Effekte von PRL sind auf die Wirkung des peripheren PRL, das in der Hypophyse exprimiert wird, zurückzuführen. Die wohl wichtigste Funktion ist die Regulation der Brustentwicklung während der Schwangerschaft sowie die Einleitung und Aufrechterhaltung der nachfolgenden Laktation (Shimon & Melmed, 1997). Erst später wurde im humanen PRL-Gen ein alternativer Promotor identifiziert, der hauptsächlich im

Endometrium und Myometrium aktiv ist. Aufgrund der Aktivierung in dezidualen Zellen wurde er als dezidualer Prolaktin (dPRL)-Promotor beschrieben. Das dPRL-Gen unterscheidet sich vom hypophysären PRL-Gen hinsichtlich des Transkriptionstartpunktes und der Länge des daraus resultierenden Transkriptes (zusätzliches Exon 1a mit 5'-UTR). Die translatierten Proteine sind jedoch identisch (DiMattia et al., 1990; Gellersen et al., 1991).

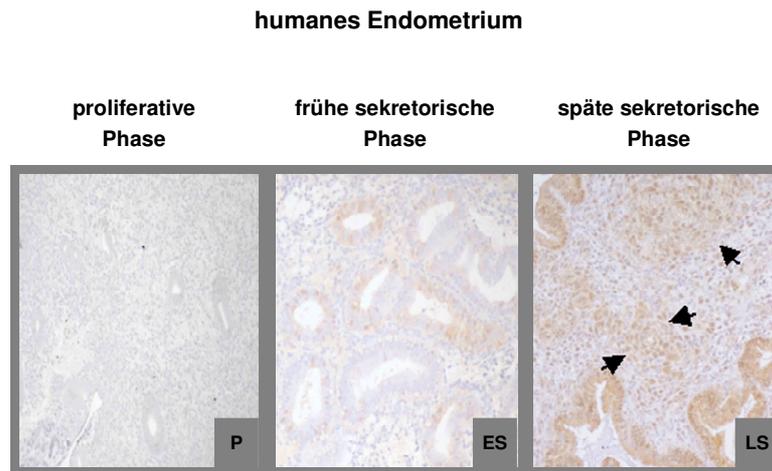
Die dPRL-Synthese beginnt in der späten Lutealphase, erhöht sich nach der Implantation und erreicht ihr Maximum in der 20. bis 25. Schwangerschaftswoche. Auffällig sind die Unterschiede der PRL-Konzentration im Blut und im Fruchtwasser, welches etwa 50 bis 100 mal mehr PRL enthält als maternales oder fötales Blutserum. Dies wird u.a. durch eine verlängerte Halbwertszeit des PRL im uterinen Gewebe (4,5 Std. gegen 15 bis 20 Minuten im Blut) erklärt. Die Funktion des dPRL im Fruchtwasser ist noch nicht geklärt worden. Neben einer osmoregulatorischen Funktion wird eine mögliche Beteiligung bei der Regulierung von Uteruskontraktionen während der Schwangerschaft (Yen, 1990) und der Entwicklung des embryonalen Immunsystems diskutiert (Ben-Jonathan et al., 1996).

Da die Aktivierung des dPRL-Promotors strikt mit dem Dezidualisierungsprozess verknüpft ist, wurde dieser Promotor in unserer Arbeitsgruppe als ein Modell verwendet, um für den Differenzierungsprozess von ESZ relevante Transkriptionsfaktoren zu identifizieren.

Frühere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe demonstrierten eine deutliche dPRL-Expression in ESZ und myometrialen Zellen (MZ) aufgrund der Stimulierung kultivierter Primärzellen mit PGE<sub>2</sub>, RLX oder cAMP (Bonhoff & Gellersen, 1996). Alle genannten Faktoren führen zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels und leiten einen PKA-vermittelten Signalweg ein (Gellersen et al., 1994). Des Weiteren konnte eine Region (dPRL -332/-270) identifiziert werden, die für eine PKA-abhängige Aktivierung des dPRL-Promotors in ESZ von entscheidender Bedeutung ist (Telgmann et al., 1997). Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch Studien von Pohnke et al. (1999), die eine verzögerte, anhaltende Aktivierung des dPRL-Promotors durch Bindung des Transkriptionsfaktors C/EBP $\beta$  an diese Region nachweisen konnten. Neben C/EBP $\beta$  führt auch der Transkriptionsfaktor FKHR (*forkhead homologue in rhabdomyosarcoma*) zu einer PKA-abhängigen Aktivierung der dPRL-Transkription (Christian et al., 2002b).

## 2.4 C/EBP $\beta$ und p53 im Endometrium

C/EBP $\beta$  ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Regulation vieler physiologischer Prozesse beteiligt ist (siehe Kapitel 2.1.3.2). Eine wichtige Rolle spielt C/EBP $\beta$  im Dezidualisierungsprozess von kultivierten, cAMP-stimulierten ESZ (Pohnke et al., 1999). *In vivo* erfolgt die C/EBP $\beta$ -Expression im Stroma in der späten Lutealphase des humanen Menstruationszyklus (siehe Abb. 2.9) (Christian et al., 2002b).



**Abbildung 2.9: Zyklus-abhängige Expression von C/EBP $\beta$  im menschlichen Endometrium**

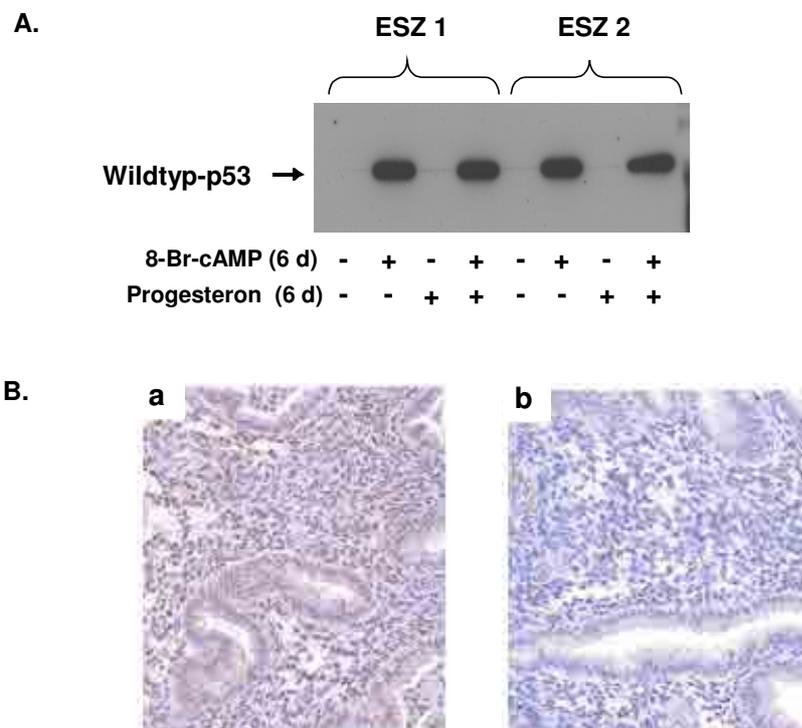
In der proliferativen Phase (P) konnte keine Expression von C/EBP $\beta$  im endometrialen Gewebe nachgewiesen werden. In der frühen sekretorischen Phase (ES) zeigte sich eine anfängliche C/EBP $\beta$ -Expression in Drüsen, nicht aber in den ESZ. Erst die späte Lutealphase (LS) zeigt eine starke Expression von C/EBP $\beta$  sowohl in den Drüsen als auch in den ESZ (Christian et al., 2002b).

Auf der Suche nach weiteren Transkriptionsfaktoren, die im Prozess der Dezidualisierung beteiligt sein könnten, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Hefe Ein-Hybrid Assay eingesetzt. Als Grundlage fungierte hierbei das Modellsystem des dPRL-Promotors mit der Region (-332/-270). Dabei wurde überraschenderweise p53 als ein mit dieser Region interagierender Faktor identifiziert. Obwohl der intakte dPRL-Promotor keine p53-Bindungsstellen aufweist, zeigten Kotransfektionsstudien, dass p53 in der Lage war, eine C/EBP $\beta$ -vermittelte Aktivierung des dPRL-Promotors zu inhibieren (Pohnke et al., 2004).

Bisher konnte p53 nur in Endometriumkarzinomen nachgewiesen werden (Ioffe et al., 1998), wo es aufgrund seiner Stabilisierung durch Mutationen akkumuliert (siehe Kapitel 2.2.5). In normalem Endometriumsgewebe konnte p53 dagegen nur sehr schwach oder gar

nicht detektiert werden (Brys et al., 2000; Ioffe et al., 1998), was vermutlich auf seiner kurzen Halbwertszeit beruht.

In unserer Arbeitsgruppe konnte erstmals eine erhöhte Akkumulation von p53 in Kernextrakten von ESZ, die mit 8-Br-cAMP allein oder in Kombination mit Progesteron behandelt worden waren, gezeigt werden (siehe Abb. 2.10, A). Darüber hinaus konnte eine Expression von Wildtyp-p53 in normalem Endometriumsgewebe gezeigt werden. Der Nachweis von p53 erfolgte in den Zellkernen des endometrialen Stroma-Kompartimentes in der späten Lutealphase des Menstruationszyklus (siehe Abb. 2.10, B) (Pohnke et al., 2004).



**Abbildung 2.10: Nachweis von Wildtyp-p53 in endometrialen Stromazellen (ESZ)**

A, *Western Blot* zweier individueller ESZ-Präparationen (ESZ 1 und ESZ 2), die über 6 Tage entweder mit einem cAMP-Analogen (8-Br-cAMP) oder Progesteron oder in Kombination der beiden stimuliert oder unstimuliert belassen wurden. Es wurden 22 µg Kernprotein/Ansatz geladen; B, Immunhistochemie von Paraffinschnitten endometrialer Biopsien aus der späten Lutealphase. Eine positive Immunfärbung von p53 konnte mit einem polyklonalen p53 Antikörper (CM1; B) in den Zellkernen des endometrialen Stroma-Kompartimentes (braunes Präzipitat) nachgewiesen werden (a). Die Kontrolle mit *Normal-rabbit-IgG* zeigte keine Anfärbung. Die Kerne sind blau gefärbt (b); Vergrößerung 20 x (Pohnke et al., 2004).

Einige Berichte deuten auf eine Modulation C/EBP-abhängiger Genexpression durch p53 hin. Studien verschiedener Arbeitsgruppen zeigten, dass Kotransfektionen mit p53 zu einer Inhibierung der C/EBP $\beta$ -vermittelten Aktivierung von verschiedenen Promotoren führte. Dazu gehören der IL-6-, der  $\beta$ -Fibrinogen- und der Insulinrezeptor-Promotor (Margulies &

Sehgal, 1993; Wang et al., 1995; Webster et al., 1996). Dennoch konnte der genaue Mechanismus dieser Repression nicht aufgedeckt werden. Daneben zeigten Kubicka et al. (1999), dass p53 die C/EBP $\beta$ -abhängige Transkription des Albumin-Gens inhibiert. Auch hier ist der Mechanismus der Repression noch unklar, zumal im EMSA keine Inhibierung der C/EBP $\beta$ -Bindung an sein responsives Element gezeigt werden konnte. Eine direkte Assoziation von C/EBPs und p53 ist bisher noch nicht publiziert worden.

## 2.5 Ziel der Arbeit

In einem GST-Pulldown Assay konnte erstmals eine Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 *in vitro* gezeigt werden (Manuskript in Vorbereitung). Hierbei wurden die an GST fusionierten C/EBP $\beta$ -Isoformen, LAP und LIP (siehe Abb. 3.1; Kapitel 3.1.3), mit *in vitro* translatiertem und transkribiertem  $^{35}\text{S}$ -p53-Protein inkubiert. Die Verwendung von p53-Deletionskonstrukten (siehe Abb. 3.1; Kapitel 3.1.3) zeigte, dass außer der p53-Mutante (p53 $\Delta$ T4-RR), die keine C-terminale Domäne aufweist, alle p53-Konstrukte in der Lage waren, sowohl mit GST-LAP als auch mit GST-LIP zu interagieren. Die für eine Bindung relevanten Domänen sind demnach der C-Terminus von p53 (T4-RR) und die C-terminale Domäne von C/EBP $\beta$  (LIP) (siehe Abb. 2.11).

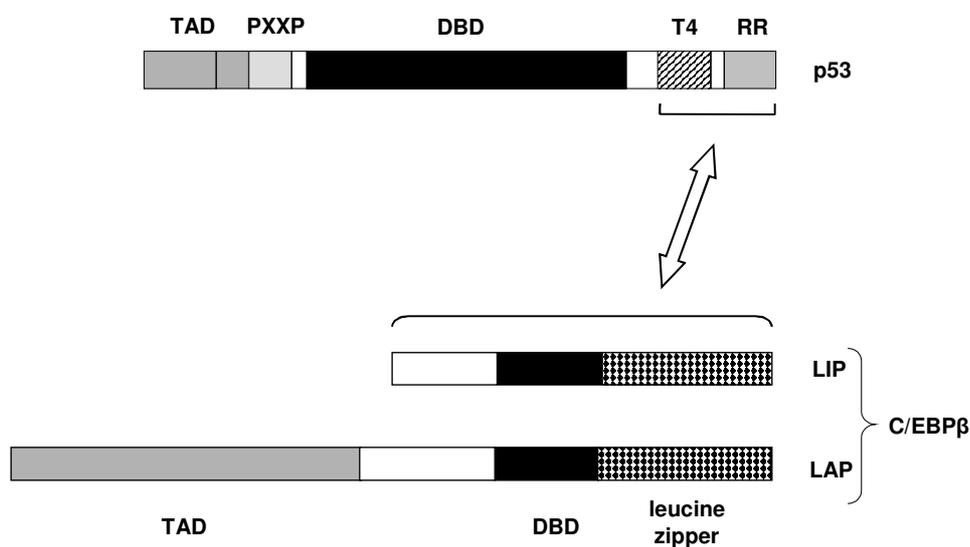
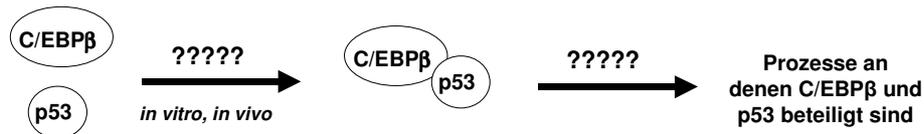


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung der interagierenden Domänen von C/EBP $\beta$  und p53 im GST-Pulldown Assay

A) In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst die Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 charakterisiert werden. Hierzu wurden verschiedene molekularbiologische Methoden angewendet, mit denen die Interaktion sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen und die daran beteiligten Domänen identifiziert werden sollten. Darüber hinaus sollte die physiologische Relevanz bei einer möglichen Interaktion *in vivo* für Prozesse aufgezeigt werden, in denen die beiden Transkriptionsfaktoren involviert sind (siehe Abb. 2.12).

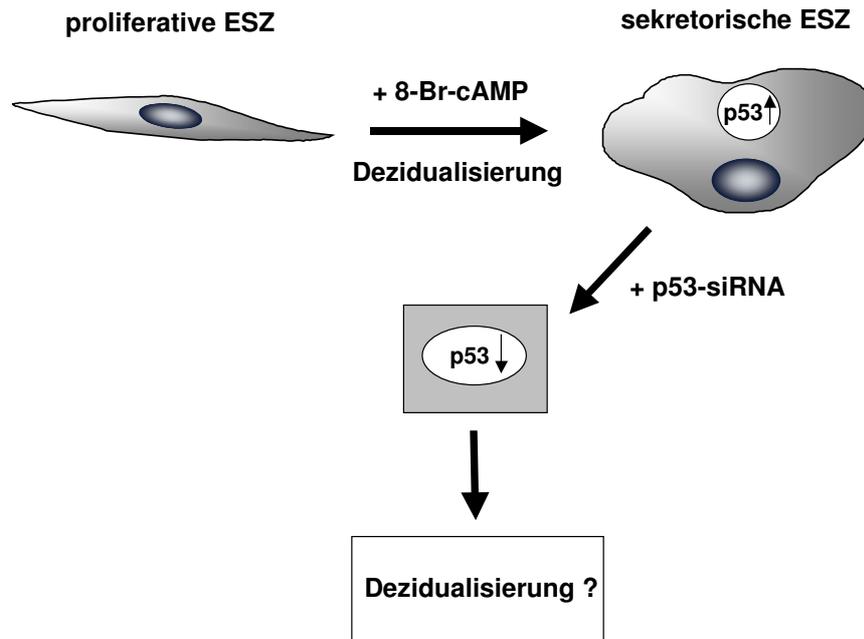


**Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der Fragestellung A**

Ziel dieser Arbeit ist es, eine Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 *in vitro* und *in vivo* nachzuweisen und eine physiologische Relevanz für Prozesse aufzuzeigen, in denen beide Faktoren beteiligt sind.

B) Ein zweites Ziel dieser Arbeit war, eine Funktion von p53 im Dezidualisierungsprozess des humanen Endometriums nachzuweisen. Frühere Studien zeigten eine deutliche Akkumulation von p53 in Kernextrakten aus cAMP-stimulierten dezidualisierten ESZ (siehe Abb. 2.11; Pohnke et al., 2004). Die genaue Funktion von p53 konnte jedoch noch nicht geklärt werden.

Als Grundlage dafür diente das *in vitro* Modell der Dezidualisierung von 8-Br-cAMP-behandelten ESZ (siehe Abb. 2.13). Es sollte überprüft werden, ob es sich bei der Akkumulation von p53 lediglich um eine Begleiterscheinung handelt oder ob man p53 eine physiologische Relevanz in diesem Differenzierungsprozess zuschreiben kann. Eine gute Möglichkeit die Relevanz von p53 in diesem Prozess zu untersuchen, ist die Methode der RNA *interference* (RNAi). Durch den Zusatz von p53-si (*short interference*) RNA-Oligonukleotiden soll ein *Knock down* von p53 erreicht und der daraus resultierende Effekt verifiziert werden (siehe Abb. 2.13).



**Abbildung 2.13: Schematische Darstellung der Fragestellung B**

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist, eine Funktion von p53 im Dezydualisierungsprozess von ESZ nachzuweisen. Als Grundlage dient das Modell der *in vitro* Dezydualisierung. Durch den Zusatz von p53-siRNA-Oligonukleotiden, die zu einem p53-*Knock down* führen, soll überprüft werden, ob eine Reduzierung des endogenen p53-Proteins zu einer Verhinderung der Dezydualisierung führt.

Eine Aufklärung der Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 sowie der Funktion von p53 im menschlichen Endometrium ist nicht nur für das bessere Verständnis der Abläufe während der Dezydualisierung interessant, sondern auch für andere Prozesse, an denen beide Faktoren beteiligt sind. Die Untersuchungen dieser Arbeit sollen zur Aufklärung beitragen.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Zellkultur**

Für die Zellkultur wurden sterile Kunststoffartikel von den Firmen Falcon, Greiner, NUNC und Sarstedt eingesetzt sowie sterile Lösungen und Medien von den Firmen Bio Whittaker, Gibco, Invivogen, PAA und Sigma verwendet. Alle Zellen wurden in Brutschränken (Heraeus) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert.

#### **3.1.1 Isolierung und Kultivierung von Primärzellen aus uterinem Gewebe**

Primärzellen wurden aus humanen Hysterektomien gewonnen, die durch Eingriffe aufgrund von gutartigen Tumoren des Myometriums (*Uterus myomatosus*) oder der Indikation „Prolaps“ an prämenopausalen Frauen vorgenommen wurden. Die Gewebestückchen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. C. Lindner aus der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe des ELIM-Krankenhauses (Hamburg) zur Verfügung gestellt. Die Verwendung solcher Gewebeproben wurde von der örtlichen Ethik-Kommission genehmigt.

##### **3.1.1.1 Präparation endometrialer Stromazellen (ESZ)**

Zur Gewinnung von endometrialen Stromazellen (ESZ) wurde das Endometrium vom Myometrium getrennt, enzymatisch verdaut und von den Epithelzellen separiert (Gellersen et al., 1994). Dazu wurde das endometriale Gewebe zunächst mit einem Skalpell vom Myometrium abgeschabt, in eine steril filtrierte Verdauungslösung überführt und in einer T75-Zellkulturflasche für 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Verdau führt dazu, dass sich die ESZ von den schlauchförmigen Drüsen ablösen und sich absetzen. Der Überstand wurde auf zwei T75-Zellkulturflaschen aufgeteilt und für weitere 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Abhängig von der Größe des Gewebestückes wurde dieser Vorgang nochmals wiederholt. Um den Verdau zu stoppen, wurde dem Überstand jeweils 3 bis 4 ml Minimalmedium zugesetzt. Am Tag nach der Präparation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das Medium gewechselt. Dies erfolgte alle zwei bis drei Tage. Die bei der Präparation entstehenden Verunreinigungen durch Epithelzellen wurden durch das häufige Waschen und Wechseln des Mediums innerhalb einer Woche eliminiert. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und im Verhältnis 1:3 passagiert. In dieser Arbeit wurden Primärzellen der ersten Passage für die Extraktionen

von Kern- und Zytosolproteinen verwendet. Die siRNA-Experimente wurden mit ESZ der zweiten Passage durchgeführt.

Verdaulösung: DMEM ohne Phenolrot (4,5 g/l Glukose): Ham's F-12 im Verhältnis 1:1,  
1 mg/ml DNaseI, 10 U/ml Kollagenase Typ IV, 100 µg/ml Primocin

Minimalmedium: DMEM ohne Phenolrot (4,5 g/l Glukose): Ham's F-12 im Verhältnis 1:1,  
10 % steroidfreies FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

### 3.1.1.2 Stimulierung endometrialer Stromazellen (ESZ)

Zur Untersuchung der physiologischen Prozesse im Dezidualisierungsprozess *in vitro* wurden ESZ über verschiedene Zeiträume mit einem cAMP-Analogon (Telgmann et al., 1998; Pohnke et al., 1999; 2004) behandelt. Die ESZ wurden entweder für unstimulierte Ansätze mit einer Dichte von  $4 \times 10^5$  Zellen pro 6-Well bzw. für stimulierte Ansätze mit  $8 \times 10^5$  Zellen pro 6-Well im Basalmedium ausplattiert und 24 Stunden nach Transfektion über 1, 2, 3, oder 6 Tage mit 8-Br-cAMP (0,5 mM; Biolog) stimuliert. In Versuchen mit T75-Zellkulturflaschen wurden die ESZ bei Erreichen einer Konfluenz von etwa 75 bis 80 % über 6 oder 12 Tage mit 8-Br-cAMP stimuliert oder unstimuliert belassen. Anschließend wurden aus den verschiedenen Ansätzen RNA- und Proteinextrakte isoliert (siehe Kapitel 3.3.1 und 3.4.1.2) und in RT-PCR (siehe Kapitel 3.3.4) oder *Western Blot* Analysen (siehe Kapitel 3.4.2) eingesetzt.

Basalmedium: DMEM ohne Phenolrot (4,5 g/l Glukose): Ham's F-12 im Verhältnis 1:1,  
10 % steroidfreies FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Primocin, 1 µg/ml Insulin,  $10^{-9}$  M 17-β-Östradiol

## 3.1.2 Kultivierung von Zelllinien

Die folgenden Zelllinien wurden in Flüssigstickstoff gelagert und aus Aliquots ( $5 \times 10^6$  Zellen in Kulturmedium + 10 % DMSO) herangezogen.

### 3.1.2.1 COS-7

Die COS-7-Zelllinie entstammt einem Affen (*African green monkey*)-Nierenkarzinom. Die Zellen wachsen adhärent und wurden alle drei bis vier Tage im Verhältnis 1:10 passagiert.

Kulturmedium<sub>Pen/Strep</sub>: DMEM ohne Phenolrot (4,5 g/l Glukose): Ham's F-12 im Verhältnis 1:1,  
10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

### 3.1.2.2 Saos-2

Die Saos-2-Zelllinie entstammt humanen Osteosarkomazellen (ATCC Nr. HTB-85; *American Type Culture Collection*, Rockville, MA, USA). Die Zellen wachsen adhärent und wurden einmal die Woche im Verhältnis 1:7 passagiert.

Kulturmedium<sub>Pen/Strep</sub>: DMEM ohne Phenolrot (4,5 g/l Glukose): Ham's F-12 im Verhältnis 1:1, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

### 3.1.2.3 Behandlung der Zelllinien

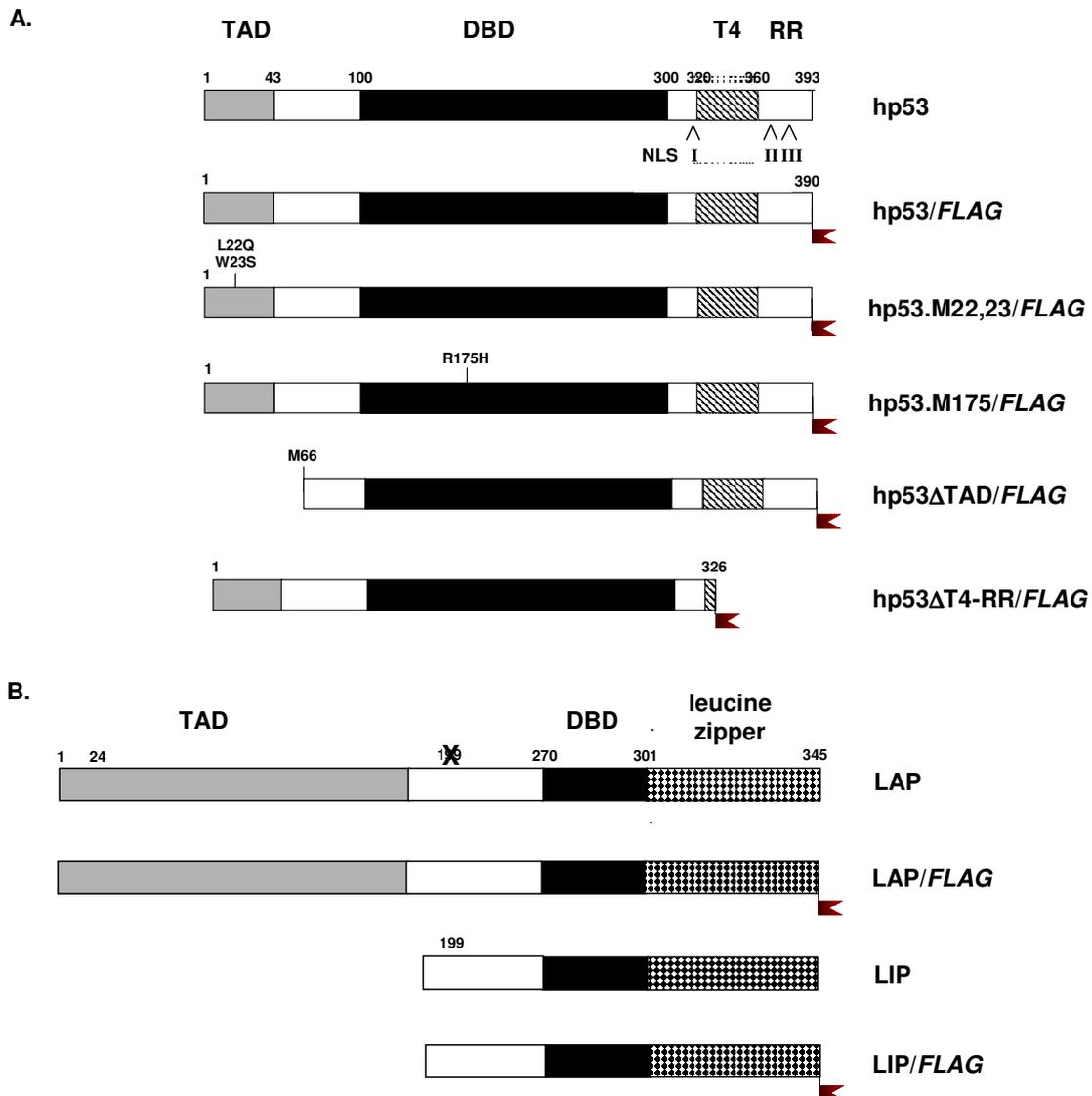
Zur Untersuchung der Stabilisierung von verschiedenen Proteinen wurden Saos-2-Zellen nach der Transfektion (siehe Kapitel 3.1.3.2) und vor der Proteinernte (siehe Kapitel 3.4.1.1) mit dem Proteasomen-Inhibitor MG-132 (30 µM; Calbiochem) für 7 Stunden behandelt.

### 3.1.3 Transiente Transfektion

Die Transfektion, d.h. Einschleusen von zellfremder DNA, ist eine Methode, um biologische Mechanismen wie z.B. die Regulation von Genexpression über eine Promotoraktivität zu untersuchen. Zu diesem Zweck wird exogene DNA vorübergehend (transient) in eukaryontische Zellen in Form von Plasmiden, sogenannten Reporter- oder Indikatorgen- und Expressionskonstrukten, eingeführt. Reportergenkonstrukte enthalten eine bekannte oder zu untersuchende Promotorsequenz stromaufwärts eines Luziferase-Gens (Reportergen), dessen Expression durch den Promotor initiiert und mit Hilfe eines Luziferase-Assays (siehe Kapitel 3.1.3.5) gemessen werden kann. Expressionskonstrukte unterliegen meist der Kontrolle eines starken, viralen Promotors wie z.B. des SV 40 (*Simian Virus*)- oder CMV (*Cytomegaly Virus*)-Promotors, der vor der kodierenden Region eines Gens (z.B. eines Transkriptionsfaktors) liegt. In Abhängigkeit von der Fragestellung werden die Reportergen- und Expressionskonstrukte in die Zellen transferiert und die Aktivierung des Promotors im Reportergenvektor durch Messung der Luziferaseaktivität ermittelt. Die Promotoraktivität wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, wie etwa durch kotransfizierte Transkriptionsfaktoren oder -modulatoren, Stimulation der Zellen mit Hormonen, oder durch zelleigene, endogen bereitgestellte Proteine. Das Ausmaß der Luziferase-Expression erlaubt Rückschlüsse auf die Genexpression bzw. Aktivierung des Promotors. Es wurden eine Reihe von Transfektionsmethoden zum Einbringen von DNA in eukaryontische Zellen eingesetzt, die in den Kapiteln 3.1.3.1 bis 3.1.3.3 vorgestellt werden.

### Expressionskonstrukte

Die verwendete Expressionskonstrukte sind im Folgenden aufgeführt (in der Arbeitsgruppe schon vorhanden):



**Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der verwendeten p53-Konstrukte**

A, p53-Konstrukte: Wildyp-p53 (ohne und mit *FLAG*-Epitop) sowie p53-Mutanten mit Punktmutationen in der Transaktivierungsdomäne (TAD; M22,23) oder DNA-Bindungsdomäne (DBD; M175) sowie Deletionen der TAD ( $\Delta$ TAD) oder des C-Terminus, der die Tetramerisierungsdomäne (T4) und die regulatorische Region (RR) beinhaltet ( $\Delta$ T4-RR). Alle Mutanten wurden ebenfalls am 3'-Ende mit ein *FLAG*-Epitop markiert. Die Zahlenangaben bezeichnen die entsprechenden Aminosäuren. NLS, nukleäres Lokalisationssignal. B, C/EBP $\beta$ -Konstrukte: LAP (*liver-enriched activatory protein*) oder LIP (*liver-enriched inhibitory protein*), jeweils ohne und mit *FLAG*-Epitop. Bei LAP und LAP/*FLAG* ist die Aminosäure 199 mutiert.

### pcDNA3.1(+/-):

Dieser Vektor wurde als Leervektor bei Kotransfektionen verwendet. In die *Multiple Cloning Site* (MCS) dieses Vektors kann die cDNA, z. B. eines Transkriptionsfaktors oder Kofaktors, kloniert und nach Transfektion durch den vorgeschalteten CMV-Promotor

konstitutiv exprimiert werden. Die MCS dieses Vektors existiert in 5' → 3'-Richtung (+) und 3' → 5'-Richtung (-) (Invitrogen).

pcDNA/hp53:

Menschliche p53-cDNA (Aminosäuren 1 bis 393) kloniert in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) (Pohnke et al., 2004) (siehe Abb. 3.1).

pcDNA/hp53/FLAG:

Menschliche p53-cDNA (Aminosäuren 1 bis 390) mit einem 3'-FLAG-Epitop markiert und kloniert in den pcDNA3.1(+)-Expressionsvektor (Pohnke et al., 2004). Durch Klonierung des *FLAG*-Epitopes gehen die letzten drei AS verloren (siehe Abb. 3.1).

pcDNA/hp53.M22,23/FLAG:

Menschliche p53-cDNA (Aminosäuren 1 bis 390), die in der Transaktivierungsdomäne (TAD) Mutationen in den Aminosäuren 22 und 23 (L22Q, W23S) aufweist. Dies führt zu einer Zerstörung der Transaktivierungsfunktion (Lin et al., 1994). Die mutierte p53-cDNA ist mit einem 3'-*FLAG*-Epitop markiert und kloniert in den pcDNA3.1(+)-Expressionsvektor (siehe Abb. 3.1).

pcDNA/hp53.M175/FLAG:

Menschliche p53-cDNA (Aminosäuren 1 bis 390), die in der DNA-Bindungsdomäne (DBD) eine Mutation in der Aminosäure 175 (R175H) aufweist, was zu einer Zerstörung der DNA-Bindungsfunktion führt. Die mutierte p53-cDNA ist mit einem 3'-*FLAG*-Epitop markiert und kloniert in den pcDNA3.1(+)-Expressionsvektor (siehe Abb. 3.1).

pcDNA/hp53ΔTAD/FLAG:

Menschliche p53-cDNA (Aminosäuren 66 bis 390), die eine Deletion der TAD aufweist. Die aminoterminal deletierte p53-cDNA ist mit einem 3'-*FLAG*-Epitop markiert und kloniert in den pcDNA3.1(+)-Expressionsvektor (siehe Abb. 3.1).

pcDNA/hp53ΔT4-RR/FLAG:

Menschliche p53-cDNA (Aminosäuren 1 bis 326), die eine Deletion der Tetramerisierungsdomäne und der Regulatorischen Region (T4-RR) aufweist. Die carboxyterminal deletierte p53-cDNA ist mit einem 3'-*FLAG*-Epitop markiert und kloniert in den pcDNA3.1(+)-Expressionsvektor (siehe Abb. 3.1).

pcDNA/LAP:

Menschliche CEBP $\beta$ -cDNA (Aminosäure 1 bis 345), die eine Mutation der Aminosäure 199 (Methionin  $\rightarrow$  Leucin) aufweist und zu einer Expression des Proteins LAP (*Liver-enriched activatory protein*) führt. Diese LAP-cDNA ist in den Expressionsvektor pcDNA3.1(-) kloniert (Pohnke et al., 2004) (siehe Abb. 3.1).

pcDNA/LAP-FLAG:

Menschliche LAP-cDNA (Aminosäuren 1 bis 345) mit einem 3'-FLAG-Epitop markiert und kloniert in den pcDNA3.1(+)-Expressionsvektor (siehe Abb. 3.1).

pcDNA/LIP:

Menschliche LIP (*Liver-enriched inhibitory protein*)-cDNA (Aminosäuren 199 bis 345) kloniert in den pcDNA3.1(+)-Expressionsvektor (siehe Abb. 3.1).

pcDNA/LIP-FLAG:

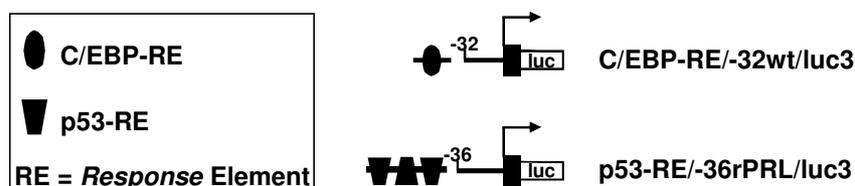
Menschliche LIP-cDNA (Aminosäuren 199 bis 345) mit einem 3'-FLAG-Epitop markiert und kloniert in den pcDNA3.1(+)-Expressionsvektor (siehe Abb. 3.1).

pCMV $\beta$ /NHA/p300:

Menschliche p300-cDNA (Aminosäuren 2 bis 2415) mit einem 5'-HA-Epitop markiert und kloniert in den pCMV $\beta$ -Vektor (Eckner et al., 1994). Dieses Konstrukt wurde freundlicherweise von Dr. D. Livingston (*Dana Farber Cancer Institute*; Boston, MA) zur Verfügung gestellt.

**Reportergenkonstrukte**

Die verwendeten Reportergenkonstrukte sind im Folgenden aufgeführt (in der Arbeitsgruppe schon vorhanden):



**Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der verwendeten Reportergenkonstrukte**

Reportergenkonstrukte, die in Transfektionsstudien eingesetzt wurden, enthalten entweder eine Minimal-Promotorsequenz des humanen dezidualen Prolaktins (-32wt) oder des Prolaktins aus der Ratte (-36rPRL) (schwarze Boxen) sowie das Luziferasegen (luc). Das C/EBP-Response Element (RE) ist als schwarzes Oval bzw. die p53-RE als schwarze Dreiecke dargestellt.

p53-RE/-36rPRL/luc3:

Drei *Konsensus*-Elemente für eine p53-Bindung, welche, vor einem Prolaktin-Minimalpromotor der Ratte (-36rPRL) liegend, in den pGL3-Basic Luziferase-Reportervektor (Promega) kloniert wurden (siehe Abb. 3.2).

C/EBP-RE/-32wt/luc3:

Ein *Konsensus*-Element für eine C/EBP-Bindung, welches, vor einem dezidualen Prolaktin-Minimalpromotor (-32wt/dPRL) liegend, in den pGL3-Basic-Vektor kloniert wurde. Bereits beschrieben als NFIL6-RE/-32wt/luc3 (Pohnke et al., 1999) (siehe Abb. 3.2).

**3.1.3.1 Transfektion mit der Kalziumphosphat-Kopräzipitationsmethode**

Saos-2-Zellen wurden mit der Kalziumphosphat-Kopräzipitationsmethode durch Verwendung des *ProFection™ Mammalian Transfection System Calcium Phosphate*-Kit (Promega) transfiziert. Das Prinzip beruht auf der Bildung von Kalziumphosphat-DNA-Präzipitaten, die von den Zellen über Endozytose aufgenommen werden. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die adhärent wachsenden Zellen wurden in Triplikaten mit einer Dichte von 0,5 bis 0,65 x 10<sup>5</sup> Zellen pro 24-Well bzw. 3,5 bis 4 x 10<sup>5</sup> Zellen pro 6-Well im Kulturmedium<sub>Pen/Strep</sub> ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Drei bis vier Stunden vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. In die Transfektion wurden bei Verwendung von 24-Well-Platten maximal 1 µg des Reportergenkonstruktes und 0,05 µg oder 0,5 µg von jedem Expressionsvektor eingesetzt. Bei Verwendung von 6-Well-Platten wurde die Menge an Transfektionskonstrukten um den Faktor 5 erhöht. Den Kontrollen wurden äquimolare Mengen an leerem Expressionsvektor zugefügt und der Gesamt-DNA-Gehalt aller Ansätze durch Zugabe des promotorlosen Plasmids p0GH (Nichols Institut, San Juan Capistrano, CA, USA) ausgeglichen. Anschließend wurden die Zellen für 16 bis 20 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach einem Mediumwechsel erfolgte eine weitere Inkubation über Nacht bei 37°C. Die Zellen wurden geerntet und entweder einem Luziferase-Assay (siehe Kapitel 3.1.3.5) zugeführt oder einer Proteinbestimmung (siehe Kapitel 3.4.1.3) unterzogen. Bei Versuchen mit gleichzeitiger Ernte für eine Luziferaseaktivitätsmessung und *Western-Blot*-Analyse wurden die Zellen in Quadruplikaten mit einer Dichte von 1.3 x 10<sup>5</sup> Zellen pro 12-Well ausgesät. Die Zellen des vierten Wells wurden direkt in 50 µl Gel-Ladungspuffer aufgenommen und in eine *Western Blot* Analyse eingesetzt (siehe Kapitel 3.4.2 oder 3.4.3).

Kulturmedium<sub>Pen/Strep</sub>: DMEM ohne Phenolrot (4,5 g/l Glukose): Ham's F-12 im Verhältnis 1:1, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

Gel-Ladungspuffer (*Rittenhouse-Marcus Gel Juice*): 62,5 mM Tris (pH 6,8), 62,5 mM Imidazol (pH 6,8), 5 % SDS, 20 % Glycerin, 2,5 % β-Mercaptoethanol, 0,0025 % Bromphenolblau

### 3.1.3.2 Transfektion mit der *Lipofectamine*-Methode

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus Saos-2-Zellen wurde die *Lipofectamine*-Transfektionsmethode verwendet. Das Prinzip beruht auf der Entstehung von stabilen Komplexen durch Bindung von negativ geladener DNA an kationische Lipide. Durch Verschmelzung mit der ähnlich aufgebauten Zellmembran wird dieser DNA-Liposomen-Komplex in die Zellen aufgenommen (Lipofektion). Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers unter der Verwendung des Reagenzes *Lipofectamine*<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen). Die Zellen wurden in einfachen Ansätzen mit einer Dichte von 3,5 bis 4 x 10<sup>5</sup> Zellen in 6-Well-Platten im Kulturmedium (ohne Antibiotika) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde kurz vor der Transfektion gewechselt. Für die Transfektion wurden maximal 4 bis 4,8 µg Gesamt-DNA pro 6-Well eingesetzt. Zum Ausgleich wurden äquimolare Mengen an leerem Expressionsvektor zugefügt und der Gesamt-DNA-Gehalt aller Ansätze durch Zugabe des promotorlosen Plasmids p0GH angeglichen. Nach der Transfektion inkubierten die Zellen über Nacht bei 37°C. Das *Lipofectamine*<sup>TM</sup> 2000 wurde anschließend durch einen Mediumwechsel entfernt und die Zellen entweder mit dem Proteasom-Inhibitor MG-132 (30 µM) über weitere 7 Stunden bei 37°C inkubiert oder geerntet und die Proteinkonzentration der Gesamtzellextrakte bestimmt (siehe Kapitel 3.4.1.3).

Kulturmedium: DMEM ohne Phenolrot (4,5 g/l Glukose): Ham's F-12 im Verhältnis 1:1, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin

### 3.1.3.3 Transfektion mit der *Dotap*-Methode

COS-7-Zellen wurden mit dem kationischen *Dotap*-Liposomalen Transfektionsreagenz (Roche) behandelt. Das Prinzip entspricht dem der *Lipofectamine*-Methode (siehe Kapitel 3.1.3.2). Die Transfektion erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 4 x 10<sup>5</sup> Zellen pro 6-Well im Kulturmedium ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte kurz vor der Transfektion. Für die Transfektion wurden maximal 4 µg pro Well Gesamt-DNA eingesetzt. Zum Ausgleich wurden äquimolare Mengen an leerem Expressionsvektor zugefügt und der Gesamt-DNA-Gehalt aller Ansätze durch Zugabe des promotorlosen Plasmids p0GH angeglichen.

Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation bei 37°C über Nacht. Durch einen Mediumwechsel wurde das *Dotap* entfernt und die Zellen für weitere 24 Stunden bei 37°C gehalten. Die Zellen wurden geerntet und die Proteinkonzentration (siehe Kapitel 3.4.1.3) der Kern- und Cytosolextrakte bestimmt.

Kulturmedium<sub>Pen/Strep</sub>: DMEM ohne Phenolrot (4,5 g/l Glukose): Ham's F-12 im Verhältnis 1:1, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

### 3.1.3.4 Klonierung von pEF-Konstrukten

#### 3.1.3.4.1 pEF1 $\alpha$

Dieser Vektor wurde freundlicherweise von Dr. C. Bauer (CCS GmbH; *Cell Culture Systems*, Hamburg) zur Verfügung gestellt. Der Vektor basiert auf dem pSI-Vektor (Promega), aus dem der F1ori entfernt und der SV40 *enhancer/early*-Promotor durch ein 1,2 kb großes menschliches EF (Elongationfaktor)1 $\alpha$ -Fragment mit 203 bp der 5'-flankierenden Region ersetzt wurde. In die *Multiple Cloning Site* (MCS) dieses Vektors kann die cDNA, z. B. eines Transkriptionsfaktors oder Kofaktors, kloniert und nach Transfektion durch den vorgeschalteten EF1 $\alpha$ -Promotor konstitutiv exprimiert werden.

#### 3.1.3.4.2 pEF/hp53

Dieses Konstrukt enthält menschliche p53-cDNA (Aminosäuren 1 bis 393), die in den pEF/1 $\alpha$ -Vektor kloniert wurde.

Zur Herstellung dieses Konstruktes wurde das Plasmid pcDNA/hp53 mit den Restriktionsenzymen *PmeI/NotI* geschnitten und das resultierende Fragment (1,3 kb) aus einem Agarosegel aufgetrennt. Parallel dazu wurde der Vektor pEF/1 $\alpha$ - mit *SmaI/NotI* verdaut und das linearisierte Plasmid (3,8 kb) aus dem Gel isoliert (siehe Kapitel 3.3.1). Die Ligation erfolgte in einem molaren Verhältnis 1:2 (Vektor : Insert) über Nacht. Nach Transformation der Ligationsprodukte in kompetente *E.coli*-Bakterien (TOP 10; Invitrogen) und deren Aufzucht wurden Plasmid-Minipräparationen (siehe Kapitel 3.2.2) und ein anschließender Kontrollverdau, durchgeführt.

#### 3.1.3.4.3 pEF/LAP/FLAG

Dieses Konstrukt enthält menschliche LAP-cDNA (Aminosäuren 1 bis 345), die am 3'-Ende mit einem *FLAG*-myc-His-Epitop markiert und in den pEF/1 $\alpha$ -Vektor kloniert wurde. Das Methionin 199 wurde mutiert (siehe Abb. 3.1).

Zur Herstellung dieses Konstruktes wurde das Plasmid pcDNA/LAP/FLAG mit den Restriktionsenzymen *EcoRI/PmeI* geschnitten und das resultierende Fragment (ca. 1,2 kb) aus einem Agarosegel aufgetrennt. Die Ligation erfolgte in den mit *SmaI/NotI* geschnittenen pEF1 $\alpha$ -Vektor (siehe 3.1.3.4.2) in einem molaren Verhältnis von 1:2 (Vektor : Insert) über Nacht. Nach Transformation der Ligationsprodukte in kompetente *E.coli*-Bakterien (TOP 10; Invitrogen) und deren Aufzucht wurden Plasmid-Minipräparationen (siehe Kapitel 3.2.2) und ein anschließender Kontrollverdau durchgeführt.

### 3.1.3.5 Luziferase-Assay

Das Prinzip des Luziferase-Assays beruht auf der Aktivitätsmessung des gebildeten Reporterproteins Luziferase. Bei der Oxidation des Substrates Luziferin durch das Enzym Luziferase wird Licht emittiert, welches bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen werden kann. Die ermittelte Lichtemission dient als Maß für die Promotoraktivität und wird als relative Lichteinheit (RLE) dargestellt. Der Assay wurde mit Hilfe des *Luciferase Assay System* (Promega) durchgeführt. Dazu wurden Zellen in den 24-Well-Platten einmal mit PBS gewaschen und mit 100  $\mu$ l pro Well *Passive-Lysis*-Puffer bei Raumtemperatur für 30 Minuten unter Schwenken (Schüttler, Biometra) inkubiert. Anschließend wurde das Lysat geerntet und die unlöslichen Zellbestandteile durch 2-minütige Zentrifugation bei 13000 x g präzipitiert. Bei Versuchen mit 12-Well-Platten wurden die Zellen in 200  $\mu$ l pro *Well Passive-Lysis*-Puffer aufgenommen. Für die Messung wurden je 50  $\mu$ l Luziferase-Substrat-Reagenz mit 20  $\mu$ l des Zellextraktes in einem Kunststoffröhrchen durch Schwenken gemischt. Die Lumineszenz wurde in einem Luminometer (Sirius, Berthold) innerhalb von drei Sekunden ermittelt.

### 3.1.4 Immunfluoreszenz

Zum Nachweis von p53 wurden ESZ mit einer Dichte von  $0,6 \times 10^5$  Zellen pro 24-Well im Basalmedium ausgesät und über 6 Tage mit 8-Br-cAMP (0,5 mM) stimuliert oder unstimuliert belassen. Nach der Behandlung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 10 Minuten mit Methanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fixiert. Anschließend folgten vier Waschschrte mit PBS und eine Permeabilisierung der Zellen mit 0,2 % TritonX-100 für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach weiteren vier Waschschrten wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit einem Ziegen Serum (NGS, *normal goat serum*) unter Schwenken bei Raumtemperatur blockiert. Danach wurde das Serum ohne Waschen entfernt und die Zellen mit einer 1:100 Verdünnung des 1. Antikörpers (anti-p53 PAb421;

siehe Kapitel 3.4.5) in PBS beschickt und auf einem Schüttler (Biometra) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kontrollen verblieben in NGS. Danach wurde der erste Antikörper durch 4 x 5-minütiges Waschen mit verdünnten PBS (1:10 mit ddH<sub>2</sub>O) entfernt und die Zellen mit Cy3<sup>TM</sup>-konjugiertem anti-Maus-IgG (siehe Kapitel 3.4.5) in einer Verdünnung von 1:100 in PBS/2 % NGS für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Der nicht gebundene Antikörper wurde durch 4 x 5-minütiges Waschen mit verdünntem PBS von den Zellen entfernt. Die Zellkerne wurden im Dunkeln für 30 Minuten mit einer 4,6-Diamidino-2'-Phenylindol-(DAPI)-Lösung (Endkonzentration 1 µg/ml in PBS) unter Schwenken gegengefärbt. Nach 4 x 5-minütigem Waschen mit verdünntem PBS wurden die Zellen in PBS bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Die Visualisierung der Zellen erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus).

Für den Nachweis mittels konfokaler Immunfluoreszenz wurden ESZ mit einer Dichte von  $1.1 \times 10^5$  pro 4-Well (Objektträger) ausgesät und über 6 Tage mit 8-Br-cAMP (0,5 mM) stimuliert oder unstimuliert belassen. Die Fixierung und anschließende Färbung erfolgte wie oben beschrieben. Die Zellkerne wurden in diesem Fall im Dunkeln für 5 Minuten mit einer TO-PRO-3-Lösung (1 µM; Molecular Probes) unter Schwenken gegengefärbt. Danach wurden die Zellen im Dunkeln (ohne Waschen) mit einem Eindeckmittel (ProLong<sup>®</sup> Antifade; Molecular Probes) überschichtet (ca. 100 µl/Well) und mit einem Deckgläschen (24 x 60 mm) abgedeckt. Die dabei entstehenden Luftblasen wurden mit Hilfe eines Glasstabes vorsichtig herausgedrückt. Nach einer 15-minütigen Aushärtung des ProLong<sup>®</sup> Antifade-Reagenzes bei Raumtemperatur erfolgte die Lagerung bei -20°C. Die Visualisierung der Zellen erfolgte mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. A. Bamberger am Universitätskrankenhaus Eppendorf (UKE), Hamburg.

DAPI-Stammlösung: 1 mg/ml 4,6-Diamidino-2'-phenylindol in PBS

TO-PRO-3-Stammlösung: 1mM Cyanin-Nukleinsäure-Färbelösung

## **3.2 Bakterien**

Für die Bakterien-Zellkultur wurden sterile Kunststoffartikel von den Firmen Falcon, Greiner, NUNC und Sarstedt bezogen sowie Chemikalien von den Firmen Difco Laboratories, Merck, Serva Feinbiochemika und Sigma.

### 3.2.1 Transformation und Aufzucht von Bakterien

Die Transformation und die Aufzucht von Bakterien mit einem Plasmid erfolgte, wenn vom Hersteller nicht anders empfohlen, nach einem Standardprotokoll (Sambrook et al., 1989). Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C entweder auf LB-Agarplatten im Brutschrank (Heraeus) oder im LB-Medium auf einem Schüttler (Biometra) bei 215 rpm kultiviert. Die Selektion auf Träger bestimmter Vektoren erfolgte über Zugabe des Antibiotikums Ampicillin (100 µg/ml) zum Nährmedium. Zur Aufbewahrung der Stämme wurde die jeweilige Kultur nach Anzucht mit einer 20 % Glycerin/LB-Lösung versetzt und bei -80°C eingefroren.

Luria Bertani (LB)-Medium: 1 % Trypton, 0,5 % Hefe-Extrakt, 1 % NaCl  
LB-Agar: LB-Medium mit 1,5 % Agar

### 3.2.2 Plasmid-Minipräparation

Die Präparation von kleineren Mengen an Plasmid-DNA erfolgte zur Überprüfung von Klonierungsprodukten. Hierzu wurde ein *Nucleospin*<sup>®</sup> Multi-8-Minipräparationskit (Machery & Nagel) verwendet oder das *FastPlasmid*<sup>™</sup>-Minipräparationskit (Eppendorf), um besonders gut aufgereinigte Plasmid-DNA für anschließende Sequenzierungsanalysen zu erhalten. Für die Präparationen wurden jeweils 2 ml einer Übernachtskultur eingesetzt und die Plasmid-DNA nach Anleitung des Herstellers präpariert. Im Anschluss wurde eine Analyse mittels Restriktionsverdau (siehe Kapitel 3.3) oder Sequenzierung (siehe Kapitel 3.3.8) durchgeführt. Die Lagerung der Plasmid-Minipräparation erfolgte bei 4°C.

### 3.2.3 Plasmid-Midipräparation

Eine Präparation von größeren Mengen an Plasmid-DNA wurde für Transfektionen (siehe Kapitel 3.1.3) hergestellt. Die Präparation erfolgte mit einem Plasmid-Midipräparationskit (JetStar, Genomed), wobei 100 ml einer Übernachtskultur nach dem Protokoll des Herstellers aufbereitet wurden. Anschließend wurde die isolierte Plasmid-DNA mit RNaseA (800 µg/ml) für 30 Minuten bei 37°C behandelt. Zur weiteren Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde eine PEG (Polyethylenglykol)-Fällung durchgeführt. Dazu wurde 40 %-iges PEG-6000 mit 5 M NaCl in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und mit der Plasmid-DNA über Nacht auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 13000 x g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Präzipitat, welches das aufgereinigte Plasmid enthält, wurde in TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen. Die Lagerung der aufgereinigten Plasmid-Midipräparation erfolgte bei 4°C.

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

Die Standardmethoden der Molekularbiologie wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Dazu gehören u.a. die Agarose-Gelelektrophorese, die RNA/DNA-Aufreinigung durch Phenol/Chloroform-Extraktion, die Ammonium- oder Natriumazetat- und Ethanol-fällung, der Restriktionsverdau von DNA und die Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren. Die verwendeten Enzyme wurden von AGS/Hybaid, Biotherm, Gibco, New England Biolabs (NEB), MBI Fermentas oder Promega bezogen sowie die DNA-Molekulargewichtsstandards von Invitrogen. Alle verwendeten Materialien und Chemikalien wurden von den Firmen Amersham Bioscience, Merck, ICN, Pharmacia Biotech, Riedel de Häen, Serva Feinbiochemika, Sigma und USB bezogen.

#### 3.3.1 RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen wurde aus dem Überstand der Proteinextraktion (siehe Kapitel 3.4.1.2) isoliert. Der in Puffer A aufgenommene Zellextrakt wurde mit einem gleichen Volumen an RNA-Isolierungspuffer (Gough, 1988) versetzt. Anschließend erfolgte eine RNA-Aufreinigung durch den Zusatz von doppeltem Volumen an Phenol/Chloroform und einer darauf folgenden Natriumazetatfällung. Das resultierende RNA-Präzipitat wurde in TE-Puffer (pH 7,5) aufgenommen.

Puffer A: 10 mM HEPES/KOH (pH 7,9), 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA,  
2 mM DTT, Protease-Inhibitoren („Complete“; Roche)

RNA-Isolierungspuffer: 7 M Urea, 10 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 7,5), 0,35 mM NaCl, 1 % SDS

TE-Puffer: 10 mM Tris (pH 7,5), 0,1 mM EDTA

#### 3.3.2 Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurden die Extinktionen der Gesamt-RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm in einem Spektrophotometer (Ultrospec 3000, Pharmacia) ermittelt (eine optische Dichte  $OD_{260}$  von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$ ). Das Verhältnis aus  $OD_{260}$  und  $OD_{280}$  gilt als ein Maß für die Reinheit der RNA und sollte für saubere, nicht durch Protein verunreinigte RNA zwischen 1,9 und 2,1 liegen. Die Lagerung der Gesamt-RNA erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.3.3 cDNA-Synthese/reverse Transkription

Als reverse Transkription bezeichnet man die Umschreibung von RNA zu cDNA. Diese Erststrang cDNA wurde aus 5  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA mit Hilfe des *Ready-To-Go™ T-Primed*

*First-Strand Kit* (Amersham Bioscience) nach dem Protokoll des Herstellers synthetisiert und mit TE-Puffer (pH 8,0) auf ein Endvolumen von 100 µl aufgefüllt.

TE-Puffer: 10 mM Tris (pH 8,0), 0,01 mM EDTA

### 3.3.4 PCR (*polymerase chain reaction*)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der enzymatischen Amplifizierung spezifischer DNA-Segmente in einem zyklisch ablaufenden Prozess. Das Prinzip beruht auf der komplementären Bindung und Verlängerung zweier Oligonukleotide, die einen zu amplifizierenden DNA-Abschnitt flankieren. Die dabei neu synthetisierten DNA-Stränge dienen in weiteren Synthesezyklen wieder als Vorlage für die anschließende Synthese. Zu Beginn einer PCR werden die zu amplifizierenden DNA-Doppelstränge bei 95°C zu Einzelsträngen denaturiert. Während des Abkühlens erfolgt die Anlagerung („*annealing*“) der spezifischen Oligonukleotide an die komplementären DNA-Abschnitte (siehe Tab. 3.1). Mit Hilfe verschiedener Polymerasen, die sich in ihrer Genauigkeit und Herstellung von überhängenden Enden (5'- oder 3'-Enden, *sticky-ends*) oder glatten Enden (*blunt ends*) unterscheiden, findet eine Verlängerungs- („*Elongations*“) -Reaktion statt, in der das Enzym die Neusynthese eines DNA-Stranges katalysiert. Die thermostabile *Taq*-(*Thermus aquaticus*)-DNA-Polymerase hat ein Temperaturoptimum bei 72°C und erstellt *sticky-ends*. Die *Pfu* (*Pyrococcus furiosus*)- oder *Pfx* (*Pyrococcus species* des *Thermococcus kodakaraensis* (KOD)-DNA-Polymerase haben ihr Temperaturoptimum bei 68°C und produzieren *blunt-ends*. Anschließend beginnt das Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA erneut. Durch eine 20- bis 30-malige Wiederholung dieser Zyklen kann eine DNA-Amplifikationsrate von  $10^6$  bis  $10^7$  erreicht werden. Die PCR-Methode wurde zur Überprüfung von Klonierungen (diagnostische PCR oder Kolonie-PCR; siehe Kapitel 3.2.2 und 3.2.3), zur Amplifizierung von Fragmenten aus Plasmiden zur Subklonierung (siehe Kapitel 3.5.1.1) oder zur Sequenzierung nach Sanger et al. (1977) (siehe Kapitel 3.3.8) eingesetzt.

Zum Nachweis der Genexpression in unbehandelten und behandelten endometrialen Stromazellen (ESZ) (siehe Kapitel 4.6.4) wurde die RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*)-Methode eingesetzt. Diese wird an cDNA durchgeführt, die aus Gesamt-RNA synthetisiert wurde (siehe Kapitel 3.3.3).

Zur Vorbereitung der PCR bzw. der RT-PCR wurde ein Reaktionsgemisch hergestellt, das alle essentiellen Komponenten beinhaltet und im Folgenden mit den entsprechenden Endkonzentrationen aufgeführt ist:

PCR-Reaktionsansatz:	DNA-Polymerase-Puffer (Promega)	(1x)
	dNTP-Mix (Peqlab)	(200 µM)
	Betain	(1 M)
	<i>Sense</i> und <i>antisense</i> Oligonukleotid	(je 200 nM)
	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (Biotherm)	(1 U)
oder	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (Promega)	(2,5 U)
oder	<i>Pfx</i> -DNA-Polymerase (Gibco)	(1,5 U)
	cDNA oder Plasmid-DNA (10 ng)	1 µl
	ddH <sub>2</sub> O	(ad 20 µl)

Die Amplifikation der DNA erfolgte in einem Eppendorf Mastercycler (Eppendorf). In Tabelle 3.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Programme, Oligonukleotide (MWG, Sigma) und die zu erwartenden Größen der einzelnen PCR-Fragmente aufgeführt (siehe Tab. 3.1 A und B).

Zu amplifizierende cDNA	Oligonukleotid-Sequenz	PCR-Produktlänge	PCR-Programm
Deziduales Prolaktin (dPRL)	<i>sense</i> <sup>1</sup> : 5'-GACAGAGACACCAAGAAGAATCGGAACATA-3' <i>antisense</i> <sup>1</sup> : 5'-GCAATGGAACGGATCATTAAGGACCTTCTC-3'	875 bp	1. 95°C für 4 min 2. 95°C für 30 sek 3. 50°C für 30 sek 4. 72°C für 1 min 5. 2.-4. 29 Zyklen 6. 72°C für 10 min
GAPDH (Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase)	<i>sense</i> <sup>1</sup> : 5'-GGAGTCCACTGGCGTCTTCAC-3' <i>antisense</i> <sup>1</sup> : 5'-GAGGGGCCATCCACAGTCTTCT-3'	287 bp	1. 95°C für 4 min 2. 95°C für 30 sek 3. 50°C für 30 sek 4. 72°C für 30 sek 5. 2.-4. 24 Zyklen 6. 72°C für 10 min
IGFBP-1 ( <i>Insulin growth factor binding protein 1</i> )	<i>sense</i> <sup>1</sup> : 5'-TGCTGCAGAGGCAGGGAGCCC-3' <i>antisense</i> <sup>1</sup> : 5'-AGGGATCCTCTTCCCATTCCA-3'	379 bp	1. 95°C für 4 min 2. 95°C für 30 sek 3. 63°C für 30 sek 4. 72°C für 1 min 5. 2.-4. 2 Zyklen 6. 95°C für 30 sek 7. 60°C für 30 sek 8. 72°C für 1 min 9. 6.-8. 2 Zyklen 10. 95°C für 30 sek 11. 57°C für 30 sek 12. 72°C für 1 min 13. 10.-12. 2 Zyklen 14. 95°C für 30 sek 15. 54°C für 30 sek 16. 72°C für 1 min 17. 14.-16. 29 Zyklen 18. 72°C für 10 min

**Tabelle 3.1 A: In die RT-PCR eingesetzte Oligonukleotide, ihre Sequenzen, die Größe des erhaltenen PCR-Fragmentes und das verwendete PCR-Programm (<sup>1</sup>Pohnke et al., 2004).**

Zu amplifizierende cDNA	Oligonukleotid-Sequenz	PCR-Produktlänge	PCR-Programm
p53	<i>sense</i> <sup>1</sup> : 5'-TTCCACGACGGTGACACGCTT-3' <i>antisense</i> <sup>1</sup> : 5'-GTAGCTGCCCTGGTAGGTTTTCTG-3'	381 bp	1. 95°C für 4 min 2. 95°C für 30 sek 3. 57°C für 30 sek 4. 72°C für 45 sek 5. 2.-4. 30 Zyklen 6. 72°C für 10 min
s-Mdm2	<i>sense</i> <sup>1</sup> : 5'-CAGTGGCGATTGGAGGGTAGAC-3' <i>antisense</i> <sup>1</sup> : 5'-TTGTGGCGTTTTCTTTGTCGTTCA-3'	743 bp	1. 95°C für 4 min 2. 95°C für 30 sek 3. 65°C für 30 sek 4. 72°C für 1 min 5. 2.-4. 2 Zyklen 6. 95°C für 30 sek 7. 62°C für 30 sek 8. 72°C für 1 min 9. 6.-8. 2 Zyklen 10. 95°C für 30 sek 11. 59°C für 30 sek 12. 72°C für 1 min 13.10.-12. 29 Zyklen 14. 72°C für 10 min
p21 <sup>WAF1</sup>	<i>sense</i> <sup>1</sup> : 5'-GGCCCAGTGGACAGCGAGCAG-3' <i>antisense</i> <sup>1</sup> : 5'-ATCAGCCGCGTTTGGAGTGGTAG-3'	407 bp	1. 95°C für 4 min 2. 95°C für 45 sek 3. 58°C für 45 sek 4. 72°C für 1 min 5. 2.-4. 29 Zyklen 6. 72°C für 10 min
Bax	<i>sense</i> <sup>1</sup> : 5'-GGAGCGGCGGTGATGGAC-3' <i>antisense</i> <sup>1</sup> : 5'-GGCAAAGTAGAAAAGGGCGACAAC-3'	363 bp	1. 95°C für 4 min 2. 95°C für 30 sek 3. 63°C für 30 sek 4. 72°C für 40 sek 5. 2.-4. 29 Zyklen 6. 72°C für 10 min

**Tabelle 3.1 B:** In die RT-PCR eingesetzte Oligonukleotide, ihre Sequenzen, die Größe des erhaltenen PCR-Fragmentes und das verwendete PCR-Programm (<sup>1</sup>Pohnke et al., 2004).

### 3.3.5 Southern Blot

Der *Southern Blot* wurde 1975 von E.M. Southern (1992) entwickelt und dient zur spezifischen Identifizierung von DNA-Fragmenten. In dieser Arbeit wurden zur Hybridisierung DIG-markierte, komplementäre, einzelsträngige DNA-Fragmenten (Sonden) (*Southern Blot*) eingesetzt (siehe Kapitel 3.3.5.2). Die Durchführung erfolgte nach einem Protokoll von Sambrook et al. (1989). Abweichungen und Ergänzungen werden im Folgenden aufgelistet.

#### 3.3.5.1 Agarose-Gelelektrophorese und Transfer

Der komplette Reaktionsansatz einer PCR oder RT-PCR (siehe Kapitel 3.3.4) wurde auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen und die amplifizierten Fragmente nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Geldokumentation (siehe Kapitel 3.3.6) wurde das zurechtgeschnittene Gel für jeweils 30 Minuten in

Denaturierungspuffer und anschließend in Neutralisierungspuffer unter Schütteln inkubiert. Dazwischen wurde es jeweils in ddH<sub>2</sub>O gespült. Mit Hilfe eines Kapillartransfers wurde die DNA aus dem Gel auf eine Nylon<sup>+</sup>-Membran (Roche) *geblottet*. Als Transferpuffer diente 20 x SSC.

Denaturierungspuffer: 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH

Neutralisierungspuffer: 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris

Transferpuffer (20 x): 3 M NaCl, 0,3 M Na<sub>3</sub>Zitrat x 2 H<sub>2</sub>O

### 3.3.5.2 Markierung von Oligonukleotid-Sonden

Die Oligonukleotide (siehe Tab. 3.2) wurden mit einer terminalen Deoxynukleotidyltransferase (TdT) (NEB, *New England Biolabs*) nicht-radioaktiv markiert. Die TdT ist eine DNA-Polymerase und katalysiert die Addierung von Deoxynukleotiden (hier Digoxigenin-11-dUTP; DIG) an das 3'-Hydroxylende von DNA- bzw. Oligonukleotid-Molekülen.

Reaktionsansatz:	Oligonukleotid	(1,5 µM)
	CoCl <sub>2</sub> (NEB)	(0,25 mM)
	NEB-Puffer 4	(1 x)
	Digoxigenin-11-dUTP (Roche)	(3 µM)
	TdT (NEB)	(20 U)
	ddH <sub>2</sub> O	(ad 20 µl)

Der Reaktionsansatz wurde für 45 Minuten bei 37°C in einem Wärmeblock (Eppendorf) inkubiert. Anschließend wurden die verlängerten Oligonukleotide mit einem gleichen Volumen einer 5 M Ammonium-Azetat-Lösung (pH 5,2), 4-fachen Volumen an 100 %igem Ethanol und 20 µg Glykogen versetzt und 20 Minuten bei 11000 x *g* und 4°C präzipitiert. Das Präzipitat (aus Oligonukletiden) wurde in 20 µl TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und bei -20°C gelagert. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Interne Oligonukleotid-Sonde für das zu amplifizierende cDNA-Fragment von:	Oligonukleotid-Sequenz
Deziduales Prolaktin	<i>antisense</i> <sup>1</sup> : 5'-CAAGGGGGCCACGCTCTGGCA-3'
GAPDH	<i>sense</i> <sup>1</sup> : 5'-TCGTCATGGGTGTGAACCATG-3'

**Tabelle 3.2: Digoxigenin-markierte Oligonukleotide für Southern Blot-Hybridisierung**  
(<sup>1</sup>Pohnke et al., 2004)

TE-Puffer: 10 mM Tris (pH 8,0), 0,1 mM EDTA

### 3.3.6 Färbung von DNA-Gelen

Der komplette Reaktionsansatz einer PCR bzw. einer RT-PCR (siehe Kapitel 3.3.4) wurde auf ein 1,4 %-iges TAE-Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die amplifizierten Produkte wurden entweder durch den Zusatz von Ethidiumbromid (1 µg/ml) im Agarose-Gel auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht, oder durch Färbung mit einer fluoreszierenden Lösung (SYBR-Gold<sup>®</sup> *Nucleic Acid Gel Stain*; Molecular Probes) nachgewiesen. Die SYBR-Gold-Lösung wurde in TAE-Puffer verdünnt (1:10000) und das Gel für 15 Minuten auf einem Schüttler (Biometra) gefärbt. Die Visualisierung erfolgte mit einem Fluoreszenz-Scanner (Typhoon 8600; Amersham Bioscience) bei einer Wellenlänge von 532 nm.

TAE-Puffer (1 x): 46,6 mM Tris (pH 8,0, mit Eisessig eingestellt), 1 mM Titriplex III;

### 3.3.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennte DNA-Fragmente wurden aus dem Gel unter Verwendung des *High Pure PCR Purification Kit* (Roche) eluiert. Die gewünschte DNA-Bande wurde unter UV-Licht bei kurzer Exposition aus dem Gel ausgeschnitten und nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

### 3.3.8 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA-Molekülen wurde nach der Didesoxymethode von Sanger et al. (1977) mit einem Sequenzierkit (*BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*, Perkin Elmer) durchgeführt. Diese ermöglicht eine direkte Identifizierung der DNA-Sequenz und somit eine Überprüfung von z.B. klonierten DNA-Fragmenten. Die Methode beruht auf dem zufälligen Kettenabbruch von wachsenden DNA-Strängen nach dem Einbau von markierten Didesoxynukleotiden. Sie wurde dahingehend verändert, dass eine

Fluoreszenzmarkierung anstelle einer radioaktiven Markierung verwendet wird (McBride et al., 1989). Der Sequenzierungsansatz beinhaltet neben der aufgereinigten DNA (siehe Kapitel 3.2.2 und 3.2.3) eine *BigDye*-Lösung, die alle für die Synthese und Markierung der DNA benötigten Substanzen enthält. Die Sequenzierungsreaktion (siehe unten) wurde in einem Eppendorf Mastercycler (Eppendorf) durchgeführt. Anschließend wurde der Ansatz mit SDS (0,2 %) versetzt, für 5 Minuten auf 98°C erhitzt und dann 10 Minuten bei 25°C gehalten. Im Anschluss wurde die DNA mit dem 2,5-fachen Volumen 100 %-igen Ethanols und Natrium-Azetat pH 5.2 (90 mM) gefällt und getrocknet. Die Sequenzierung erfolgte bei der Firma Genteq, Hamburg.

Sequenzierungsansatz:	DNA	(500 ng)
	Oligonukleotid	(0,5 µM)
	<i>BigDye</i> (Perkin Elmer)	(20 %)
	5 x HT-Puffer (Perkin Elmer)	(2 x)
	ddH <sub>2</sub> O	(ad 10 µl)
Sequenzierungs-Programm:	1. 94°C für 2 Minuten	Denaturierung der DNA
	2. 94°C für 30 Sekunden	Denaturierung der DNA
	3. 50°C für 15 Sekunden	Primer Hybridisierung
	4. 60°C für 4 Minuten	Verlängerung der Primer durch <i>AmpliTaq</i> DNA Polymerase
	5. 2.-4. 25 Zyklen	
	6. 4°C	

### 3.4 Proteinbiochemische Methoden

Alle verwendeten Materialien und Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Gibco, ICN, NEB, NUNC, Serva und Sigma bezogen, die Molekulargewichtsstandards von Amersham und Invitrogen.

#### 3.4.1 Proteinisolierung

Proteine wurden zum einen aus Gesamtzellextrakten isoliert, die hauptsächlich für *Western Blot* Analysen verwendet wurden. Zum anderen wurden Kern- und Zytosolproteine getrennt isoliert und entweder für *Electrophoretic-Mobility-Shift* Assay- (EMSA)-Studien oder für *Western Blots* eingesetzt.

### 3.4.1.1 Isolierung von Gesamtzellproteinen

Die Extraktion von Gesamtzellproteinen erfolgte nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS durch die Zugabe von 100  $\mu$ l pro *Well* eiskaltem RIPA-Puffer (Sambrook, 1989). Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und die Zellsuspension für 30 Minuten auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Extrakte 3 x 5 Sekunden in einem Ultraschallbad (ELMA) sonifiziert und für 15 Minuten bei 4°C und 13000 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Gesamtzellproteine, die zeitgleich mit einer Transfektion geerntet oder Präzipitate, die direkt in einem SDS-Ladungspuffer (*Rittenhouse-Marcus Gel Juice*) aufgenommen worden waren, wurden ebenfalls 3 x 5 Sekunden in einem Ultraschallbad sonifiziert und für 5 Minuten bei 95°C erhitzt.

RIPA-Puffer: 50 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl; 1 % Nonidet P-40, 0,5 % (w/v) Natrium-Desoxycholatsäure, 0,1 % SDS, Protease-Inhibitoren („*Complete*“; Roche)

SDS-Ladungspuffer (*Rittenhouse-Marcus Gel Juice*): 62,5 mM Tris (pH 6,8), 62,5 mM Imidazol (pH 6,8), 5 % SDS, 20 % Glycerin, 2,5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,0025 % Bromphenolblau

### 3.4.1.2 Isolierung von Kern- und Zytosolproteinen

Die Extraktion von Kern- und Zytosolproteinen aus kultivierten ESZ, die entweder unstimuliert belassen oder mit 8-Br-cAMP behandelt (siehe Kapitel 4.6.4) worden waren, erfolgte mit einer modifizierten Hochsalzmethode nach Schreiber et al. (1989) und Gellersen et al. (1997). Die Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit PBS mit 300  $\mu$ l pro 6-*Well* kaltem, hypotonischem Puffer A vom Plattenboden abgeschabt. Die Zellsuspension wurde 5 bis 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen beginnen aufgrund der unterschiedlichen Salzkonzentrationen anzuschwellen. Durch Zugabe des Detergenzes Nonidet P-40 (1 %) und kräftiges Vortexen kommt es zum Membranaufschluss. Zelltrümmer wurden für 5 Minuten bei 13000 x *g* abzentrifugiert. Der Überstand (= Zytosolischer Proteinextrakt), mit allen löslichen Komponenten des Zytosols, wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert oder für eine RNA-Isolierung verwendet (siehe Kapitel 3.3.1). Das Zellpräzipitat, welches alle unlöslichen zytosolischen Bestandteile sowie die Zellmembran und Zellkerne enthielt, wurde in 75 bis 150  $\mu$ l hypertonischem Puffer B resuspendiert und für 30 Minuten bei 4°C auf einem Schüttler (Biometra) geschwenkt, um die Kernproteine aus dem Kern zu extrahieren. Anschließend wurden die Proben 15 Minuten bei 13000 x *g* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand (= Kernextrakt) enthielt die Kernproteine und wurde in Aliquots bei -80°C eingefroren.

Puffer A: 10 mM HEPES/KOH (pH 7,9), 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 2 mM DTT, Protease-Inhibitoren („Complete“; Roche)

Puffer B: 10 mM HEPES/KOH (pH 7,9), 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 2 mM DTT, 400 mM NaCl, 1 % NP-40, Protease-Inhibitoren („Complete“; Roche)

### **3.4.1.3 Bestimmung der Proteinkonzentration (Lowry)**

Der Nachweis der Proteinmenge wurde mit einem *DC* Protein Assay (BioRAD) durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung basiert dabei auf einer Anfärbung der Proteine durch eine Komplexbildung mit  $\text{Cu}^+$ -Ionen (Biuret-Reaktion) in alkalischer Lösung. Zusammen mit einem Folin-Ciocalteu Reagenz bildet sich ein instabiler blauer Farbkomplex, der als Maß für die Proteinkonzentration dient. Es wurden 4-fach Bestimmungen einer Proteinprobe durchgeführt, wobei jeweils 5  $\mu\text{l}$  Probenmenge eingesetzt und nach dem Protokoll des Herstellers bearbeitet wurden. Nach einer Inkubation von 15 Minuten wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 695 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät „GENios“ (TECAN) gemessen und mit einer entsprechend erstellten BSA-Eichreihe (0,17 bis 1,37  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) verglichen.

### **3.4.2 Western Blot**

Zum Nachweis der Expression von exogenen und endogenen Proteinen wurden *Western Blot* Analysen durchgeführt. Denaturierte Proteine wurden elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und auf eine Membran überführt („blotten“). Anschließend wurde die Membran zunächst mit spezifischen Antikörpern gegen Zielproteine und danach mit Peroxidase-gekoppelten Antikörpern gegen eine konservierte Region der Immunglobuline inkubiert (siehe Kapitel 3.4.5). Mit Hilfe der Peroxidase können spezifische Proteinbanden in einer Chemilumineszenzreaktion auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

#### **3.4.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine in einer denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) ist dem dekadischen Logarithmus ihrer molaren Masse umgekehrt proportional. Um eine gleichmäßige Wanderung trotz unterschiedlicher Konformationen zu gewährleisten, werden Proteine in einem SDS-haltigen Puffer hitzedenaturiert. Diese Denaturierung gleicht Konformationsunterschiede durch Zerstörung nicht-kovalenter Wechselwirkungen in nativen Proteinen weitestgehend aus und bewirkt durch das SDS eine gleichmäßige Ladungsverteilung. Die Proben werden dann auf ein

diskontinuierliches Polyacrylamidgel geladen, welches aus einem Sammel- und Trenngel besteht. Der pH-Sprung am Übergang vom Sammelgel zum Trenngel sowie eine deutlich höhere Acrylamidkonzentration im Trenngel, führen zu einer Fokussierung der Proteinbanden und damit zu einer Separation unterschiedlicher Proteine im Trenngel. Die Beschaffenheit der Trenngele richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden Proteine. Es wurden ein 12 %-iges Trenngel und das vertikale Elektrophorese Mini-Protean II System (Biorad) verwendet.

Für den Nachweis verschiedener Proteine wurden 10 bis 20 µg Proteinextrakt und 5 µl Proteinmarker (RPN 800; Amersham) mit einem gleichen Volumen an SDS-Ladungspuffer versetzt, 5 Minuten bei 95°C in einem Wärmeblock (Eppendorf) erhitzt und auf das polymerisierte Gel aufgetragen. Die Proben liefen zunächst bei 80 V und 4°C in das Sammelgel ein und die weitere Auftrennung erfolgte bei 150 V und 4°C für 50 Minuten unter Verwendung von adäquatem Laufpuffer (nach *Rittenhouse-Marcus*).

SDS-Ladungspuffer (*Rittenhouse-Marcus Gel Juice*): 62,5 mM Tris (pH 6,8), 62,5 mM Imidazol (pH 6,8), 5 % SDS, 20 % Glycerin, 2,5 % β-Mercaptoethanol, 0,0025 % Bromphenolblau

Sammelgel: 80 mM Tris (pH 6,8), 80 mM Imidazol (pH 6,8), 0,09 % SDS, 5 % Acrylamid/Bisacrylamid, 0,09 % APS, 0,09 % TEMED

Trenngel: 380 mM Tris (pH 8,9), 0,1 % SDS, 12 % Acrylamid/Bisacrylamid, 0,03 % APS, 0,07 % TEMED

Laufpuffer: 50 mM Tris, 380 mM Glyzin, 0,1 % SDS

### 3.4.2.2 Proteintransfer

Der Elektrotransfer von Proteinen auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran („Immobilion-P“, Millipore) erfolgte in einer Transfer-Kammer (Hoefer). Nach Aktivierung der Membran, durch Schwenken in Methanol und Äquilibration in Transferpuffer, wurde diese auf das zurechtgeschnittene Gel gelegt und beiderseits mit je drei Lagen *Whatman*-Papier verstärkt. Das „Transfer-Türmchen“ wurde in eine Vorrichtung der Transferkammer geklemmt, eingehängt und mit 1 x Transferpuffer überschichtet. Der „Nass“-Transfer erfolgte mit zwei Gelen bei 0,6 A, mit einem Gel bei 0,4 A bei 4°C über Nacht. Anschließend wurde der Transfer durch eine Färbung der Gele mit Coomassie-Blau (Biorad) überprüft. Die Membran wurde kurz in Methanol geschwenkt und etwa 10 Minuten bei 37°C getrocknet.

Transferpuffer: 100 mM Tris, 193 mM Glyzin

### 3.4.2.3 Immundetektion

Zur „Aktivierung“ wurde die Membran in Methanol geschwenkt, in TBS gespült und zur Absättigung freier Bindungsstellen in einer Blockierungslösung für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schwenktisch inkubiert. Zur Detektion von transferierten Proteinen wurde der entsprechende primäre Antikörper in der Blockierungslösung verdünnt (siehe Kapitel 3.4.5) und die Membran über Nacht bei 4°C auf einem Schwenktisch inkubiert. Anschließend wurde der nicht gebundene Antikörper durch Waschen mit TBS-T entfernt und mit TBS gespült. Darauf wurde zur Membran ein in Blockierungslösung verdünnter und mit Peroxidase gekoppelter, sekundärer Antikörper (siehe Kapitel 3.4.5) gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt. Überschüssiger Antikörper wurde wiederum durch Waschen mit TBS-T entfernt und jeweils mit TBS und ddH<sub>2</sub>O gespült. Zum spezifischen Nachweis der Proteine wurde das Detektionskit *SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate* von der Firma Pierce eingesetzt. Das Prinzip des Nachweisverfahrens beruht auf einer hoch sensitiven Chemilumineszenzreaktion, bei der die gekoppelte Peroxidase des sekundären Antikörpers den Farbstoff Luminol spaltet. Dazu wurden die Lösungen I (*Stable Peroxide Solution*) und II (*Luminol/Enhancer Solution*) im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Membran gegeben. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran in eine Leitz-Folie eingeschweißt und die Chemilumineszenzreaktion durch Exposition mit einem Röntgenfilm RX (Fuji) nachgewiesen.

Blockierungslösung (Blotto): 5 % (w/v) Milchpulver in TBS

TBS: 15 mM Tris (pH 7,6), 136 mM NaCl

TBS-T: TBS, 0.03 % Tween-20

### 3.4.3 Western Blot mit NuPAGE<sup>®</sup> (Invitrogen)

#### 3.4.3.1 Neutrale-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (NuPAGE<sup>®</sup>; Invitrogen)

In dieser Arbeit wurde zur Analyse von Proteingemischen zusätzlich ein Fertiggel-Elektrophoresesystem (*XCell SureLock<sup>™</sup>*) von der Firma Invitrogen verwendet. Zur Kontrolle der Proteinexpression in Zellen wurden 6 bis 15 µg Gesamtprotein (siehe Kapitel 3.4.1.1) mit einem Reduzierungsreagenz (*NuPAGE<sup>®</sup> Reducing Agent*; Invitrogen) und Probenpuffer (*NuPAGE<sup>®</sup> LDS Sample Buffer*; Invitrogen) versetzt (siehe unten) und 10 Minuten bei 70°C denaturiert. Die Proben wurden auf ein diskontinuierliches

Polyacrylamidgel (10 % *NuPAGE*<sup>®</sup> *Novex* Bis-Tris-Fertiggel; Invitrogen) geladen und unter reduzierenden Bedingungen bei konstant 200 V im elektrischen Feld aufgetrennt. Der Vorteil dieses Systems war die Anwendung eines neutralen pH-Wertes in den *NuPAGE*<sup>®</sup> *Novex* Gelen, der dadurch zu einer verbesserten Proteinstabilität und Bandenschärfe (Moos et al., 1998) führte. Als Laufpuffer wurde ein MOPS-Puffer (Invitrogen) verwendet, der Proteine im Bereich von 15 kDa bis 200 kDa auftrennte. Mit dem Zusatz von *NuPAGE*<sup>®</sup> *Antioxidant* (Invitrogen) in den Laufpuffer verringerte sich die Reoxidation der Proteine während der denaturierenden Elektrophorese. Zum Größenvergleich wurde der *See Blue Plus 2*-Marker (Invitrogen) aufgetragen.

*NuPAGE*<sup>®</sup>-Ansatz:    x µl Protein (6 bis 15 µg)  
                          2 µl Reduzierungsreagenz (enthält DTT; 50 mM)  
                          5 µl Probenpuffer  
                          x µl ddH<sub>2</sub>O (ad 20 µl)

### 3.4.3.2 Proteintransfer

Proteine aus einer denaturierenden *NuPAGE*<sup>®</sup>-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden mit Hilfe einer *Blotting*-Kammer (Invitrogen) auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Immobilon-P Transfermembran (Millipore) transferiert. Die zugeschnittene PVDF-Membran wurde zur besseren Benetzung der hydrophoben Oberfläche kurz in Methanol geschwenkt und anschließend im Transferpuffer (Invitrogen) äquilibriert. Das Polyacrylamidgel wurde blasenfrei auf die PVDF-Membran gelegt und beiderseits mit jeweils einer Lage *Whatman*-Papier bedeckt, die zuvor mit Transferpuffer befeuchtet wurde. Das Transfer-Türmchen wurde in die *Blotting*-Kammer überführt und mit Transferpuffer aufgefüllt. Der „Nass“-Transfer erfolgte bei Raumtemperatur für 1,5 Stunden bei einer konstanten Spannung von 30 V (Biometra). Anschließend wurde der erfolgreiche Transfer der Proteine durch eine Färbung des *NuPAGE*<sup>®</sup> Gels mit *Simply Blue Safe stain* (Invitrogen) ermittelt. Um die Proteine auf die Membran besser zu fixieren, wurde diese kurz in Methanol geschwenkt und etwa 10 Minuten bei 37°C getrocknet.

### 3.4.3.3 Immundetektion

Die Immundetektion wurde, wie bereits in Kapitel 3.4.2.3 beschrieben, durchgeführt.

### **3.4.4 Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (EMSA)**

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der schnelleren Wanderung von freien Nucleinsäuren durch ein elektrisches Feld im Vergleich zu Nucleinsäuren, die an Proteine gebunden sind. Um die Bindung von Faktoren an spezifische Promotorelemente zu untersuchen, wurden entweder radioaktiv-( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ )-markierte oder fluoreszenz-(Cy5)-markierte doppelsträngige Oligonukleotide (siehe Kapitel 3.4.4.1) mit Konsensusbindungsstellen verwendet und mit Kernextrakten aus unterschiedlichen Zellen inkubiert. Durch Zugabe von spezifischen Antikörpern oder Kompetitoren (unmarkierte, „kalte“ doppelsträngige Oligonukleotide) kann die Identität und Spezifität eines bindenden Proteins ermittelt werden. In einer nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese können die Proben aufgetrennt und entweder nach dem Trocknen durch Autoradiographie oder direkt an einem Fluoreszenz-Messgerät analysiert werden.

#### **3.4.4.1 Herstellung von doppelsträngigen Oligonukleotiden**

Alle verwendeten einzelsträngigen Oligonukleotide wurden von den Firmen IBA, MWG oder Santa Cruz synthetisiert (siehe Tab. 3.3). Es wurden jeweils palindromische Oligonukleotide mit komplementären Sequenzen hergestellt. Die Oligonukleotide für den Fluoreszenz-EMSA wurden mit 5'-Cy5-Markierungen bezogen. Jeweils 4  $\mu\text{mol}$  palindromisches Oligonukleotid oder 2  $\mu\text{mol}$  palindromisches fluoreszenz-markiertes Oligonukleotid wurde mit 183 mM NaCl (Endvolumen 200  $\mu\text{l}$ ) für 5 Minuten auf 95°C in einem Wärmeblock (Eppendorf) erhitzt und anschließend im ausgeschalteten Block langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Anlagerung der komplementären Stränge erfolgte unterhalb der spezifischen Schmelztemperatur des Doppelstranges. Anschließend wurden die Reaktionen entweder einer radioaktiven Markierung unterzogen (siehe Kapitel 3.4.4.2) oder direkt in den Fluoreszenz-EMSA eingesetzt (siehe Kapitel 3.4.4.3).

Sonde	Oligonukleotid-Sequenz
C/EBP-RE	<i>sense:</i> 5'-GTACCTGCAGATTGCGCAATCTGCAG-3' <i>antisense:</i> 5'-GTACCTGCAGATTGCGCAATCTGCAG-3'
p53-RE	<i>sense</i> <sup>1</sup> : 5'-GGACATGCCCGGGCATGTCC-3' <i>antisense:</i> 5'-GGACATGCCCGGGCATGTCC-3'
C/EBP-RE-Cy5	<i>sense</i> : 5'-Cy5-TGCAGATTGCGCAATCTGCA-3' <i>antisense:</i> 5'-Cy5-TGCAGATTGCGCAATCTGCA-3'
p53-RE-Cy5	<i>sense</i> <sup>1</sup> : 5'-Cy5-GGACATGCCCGGGCATGTCC-3' <i>antisense</i> <sup>1</sup> : 5'-Cy5-GGACATGCCCGGGCATGTCC-3'

**Tabelle 3.3: In die EMSA eingesetzte doppelsträngige Oligonukleotide und ihre Sequenzen**  
(<sup>1</sup>Funk et al., 1992)

### 3.4.4.2 Radioaktiver *Electrophoretic Mobility Shift* Assay (EMSA)

#### 3.4.4.2.1 Markierung der Sonden mit ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)-ATP durch T4-Polynukleotidkinase

Die Markierung der doppelsträngigen (ds) Oligonukleotide erfolgte in einer Reaktion mit ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)-ATP (3000 Ci/mmol) und der T4-Polynukleotidkinase (PNK), in der das Enzym radioaktive Phosphatgruppen an 5'-Enden der DNA transferierte. Die Reaktion (siehe unten) wurde auf Eis pipettiert und anschließend für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die markierten Sonden wurden unter Verwendung von Micro-Spin<sup>TM</sup> G25-Säulen (Pharmacia Biotech) aufgereinigt und die spezifische Aktivität in einem Szintillationszähler gemessen.

Markierungsansatz:	dsOligo	(2,5 pmol)
	PNK-Puffer	(1 x)
	T4-PNK	(10 Units)
	( $\gamma$ - <sup>32</sup> P)-ATP	(10-20 $\mu$ Ci)
	ddH <sub>2</sub> O	(ad 20 $\mu$ l)

### 3.4.4.2 Bindungsreaktion

Der Reaktionsansatz (Endvolumen 24  $\mu$ l), bestehend aus 3 bis 5  $\mu$ g Kernprotein und einer Mischung aus Reaktionspuffer und unspezifischem Kompetitor (Poly-dIdC; Amersham), wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Bei Verwendung von spezifischen Kompetitoren erfolgte, nach Zusatz von einem 300-fachen Überschuss an unmarkierter Sonde, eine weitere Inkubation für 30 Minuten auf Eis. Anschließend wurde die aufgereingte, ( $\gamma$ - $^{32}$ P)-markierte Sonde (10 bis 15 fmol) zupipettiert und nochmals 30 Minuten auf Eis inkubiert. Bei Verwendung von Antikörpern wurde der Reaktionsansatz nach Zugabe von 1  $\mu$ l pro Reaktionsansatz für 25 Minuten bei 25°C in einem Wärmeblock (Eppendorf) erwärmt. Danach wurden die Ansätze in einem 5 %-igem nativen, kontinuierlichen Polyacrylamidgel bei einer Spannung von 220 V und 4°C elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel anschließend auf *Whatman*-Papier unter Vakuum bei 80°C getrocknet. Die Exposition erfolgte auf RX-Filmen (Fuji) über Nacht bei -80°C.

Reaktionspuffer (Bf-B): 20 mM Tris (pH 8,0), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 % Glycerol, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 % Nonidet P-40, 50  $\mu$ g/ $\mu$ l BSA

### 3.4.4.3 Nicht-radioaktiver *Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay* (EMSA)

Bei dem nicht-radioaktiven EMSA werden fluoreszenz-(Cy5)-markierte doppelsträngige Oligonukleotide verwendet. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie bereits in Kapitel 3.4.4.2.2 beschrieben. Pro Reaktion wurden hierbei allerdings nur 3 fmol der Cy5-markierten Sonde eingesetzt. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenz-Messgerät (Typhoon 8600; Amersham Bioscience) bei einer Wellenlänge von 532 nm.

### 3.4.4.4 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Schägger & von Jagow, 1987)

Zur Trennung von multimeren Komplexen aus Proteinen und DNA wurde eine native Gelelektrophorese durchgeführt. Hierzu wurde aus einer Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung und TBE-Puffer (0,5 x) ein kontinuierliches, 5 %-iges Trenngel gegossen. Die Polymerisierung erfolgte durch Zugabe von APS (0,1 %) und TEMED (0,1 %). Nach Aushärtung des Gels wurden die Taschen gründlich mit TBE-Laufpuffer (0,25 x) gespült und das Gel für 1 Stunde bei 200 V und 4°C einem Vorlauf unterzogen.

EMSA-Gel: 5 % Acrylamid/Bisacrylamid, 0,5 x TBE, 0,1 % APS, 0,1 % TEMED

TBE (1x): 90 mM Trisbase (pH 8,0), 180 mM Borsäure, 2 mM EDTA

### 3.4.5 Antikörper

#### 3.4.5.1 Primäre Antikörper

Primär-Antikörper	Herkunft	Bindungs- stelle	Konzentration (Firma)	eingesetzt in: (Verdünnung)
<b>Bax</b>	Kaninchen	Human; Aminosäuren 42 bis 61	200 µg/0,1 ml (PharMingen)	<i>Western Blot</i> (1:1000)
<b>Bcl-2</b>	Kaninchen	Human; Aminosäuren 42 bis 54	200 µg/0,1 ml (PharMingen)	<i>Western Blot</i> (1:500)
<b>C/EBPβ (C-19)</b>	Kaninchen	Human; Aminosäuren 306 bis 324	200 µg/ml (Santa Cruz)	<i>Western Blot</i> (1:1000) <i>EMSA</i> (1 µl)
<b>C/EBPβ (LAP)</b>	Kaninchen	Human; N-terminal	-- (CellSignalling)	<i>Western Blot</i> (1:1000) Immunfluoreszenz (1:100)
<b>C/EBPβ</b>	Kaninchen	Human; Aminosäuren 228 bis 242	-- (Active Motif)	<i>EMSA</i> (1 µl)
<b>FLAG M2</b>	Maus	FLAG-Epitop	2 mg/ml (Stratagene)	<i>Western Blot</i> (1:1000) <i>EMSA</i> (1 µl)
<b>GAPDH</b>	Maus	--	1 mg/ml (HyTest)	<i>Western Blot</i> (1:10.000)
<b>p21<sup>WAF1</sup></b>	Maus	Human Aminosäuren 55 bis 77	0,5 mg/ml (PharMingen)	<i>Western Blot</i> (1:500)
<b>p53 (DO-1)</b>	Maus	Human; Aminosäuren 21 bis 25	100 µg/ml (Oncogene)	<i>Western Blot</i> (1:1000)
<b>p53 (DO-1) Agarose</b>	Maus	Human; Aminosäuren 21 bis 25	1 mg/ml (Oncogene)	Koimmunpräzipitation (15 µl/Ansatz)
<b>p53 (PAb421)</b>	Maus	Human; Aminosäuren 371 bis 380	1 mg/ml (Oncogene)	<i>Western Blot</i> (1:1000) <i>EMSA</i> (1 µl) Immunfluoreszenz (1:100)

Tabelle 3.4 A: In *Western Blot* Analysen, EMSA und Immunfluoreszenz eingesetzte primäre Antikörper (--, nicht bekannt)

Primärer Antikörper	Herkunft	Bindungsstelle	Konzentration (Firma)	eingesetzt in: (Verdünnung)
p53 (CM1)	Kaninchen	Human --	-- (Novocastra)	Immuncytochemie (1:100)
p53 (FL393)	Kaninchen	Human; --	200 µg/0,1 ml (Oncogene)	Western Blot (1:5000)
Mdm-2 (SMP14)	Maus	Human; Aminosäuren 154 bis 167	200 µg/ml (Santa Cruz)	Western Blot (1:200)

Tabelle 3.4 B: In *Western Blot* Analysen, EMSA und Immunfluoreszenz eingesetzte primäre Antikörper (--, nicht bekannt)

### 3.4.5.2 Sekundäre Antikörper

Sekundärer Antikörper	Herkunft	Konzentration (Firma)	eingesetzt in: (Verdünnung)
Kaninchen-IgG (Cy2™)	Ziege	1,5 mg/ml (Dianova)	Immunfluoreszenz (1:50)
Kaninchen-IgG (POD)	Ziege	0,8 mg/ml (Dianova)	Western Blot (1:2500)
Maus-IgG (Cy3™)	Ziege	1,5 mg/ml (Dianova)	Immunfluoreszenz (1:100)
Maus-IgG <sup>1</sup> (POD)	Ziege	0,8 mg/ml (Dianova)	Western Blot (1:10000)
Maus-IgG <sup>2</sup> (POD)	Ziege	0,8 mg/ml (Dianova)	Western Blot (1:5000)

Tabelle 3.5: In *Western Blot* Analysen und Immunfluoreszenz eingesetzte sekundäre Antikörper

<sup>1</sup>erkennt sowohl schwere (H; *heavy*; 50 kDa), als auch leichte (L; *light*; 25 kDa) Ketten eines Primär-Antikörpers; <sup>2</sup>erkennt nur die leichten Ketten eines Primär-Antikörpers; POD = Peroxidase (Meerschweinchen); Cy2, Cy3 = Fluoreszenzfarbstoffe.

## 3.5 Methoden zur Charakterisierung einer Interaktion von C/EBP $\beta$ und p53 *in vivo*

### 3.5.1 *Mammalian Two-Hybrid Assay*

Der *Mammalian Two-Hybrid Assay* ist eine effiziente Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in Säugerzellen *in vivo*. Eine Voraussetzung für diese Methode ist die Anwesenheit bestimmter Domänen, wie sie für Transkriptionsfaktoren charakteristisch sind: eine DNA-Bindungsdomäne (DBD), welche an eine spezifische DNA-Sequenz bindet, und eine Aktivierungsdomäne (AD), die mit Faktoren der Transkriptionsmaschinerie interagieren kann. Ein Fusionsprotein, bestehend aus dem zu untersuchenden Protein gekoppelt an eine DBD (XP-DBD), bindet an eine spezifische DNA-Sequenz. Bei einer Interaktion mit dem zweiten Fusionsprotein, bestehend aus dem zu untersuchenden Protein, gekoppelt an eine AD (YP-AD), kommt es zur Aktivierung eines Reportergenkonstruktes (z.B. Luziferase) durch Rekrutierung der AD an den Promotor. Die Aktivität des Promotors und die damit verbundene Expression eines Reportergens erlaubt Rückschlüsse auf die Interaktion der beiden zu untersuchenden Proteine *in vivo*.

#### 3.5.1.1 Klonierung von *Mammalian Two-Hybrid* –Konstrukten

Zur Klonierung einiger Konstrukte wurden folgende Primer verwendet:

p53-5-B ( <i>sense</i> ):	5'-ATTTTTGGATCCGAGGAGCCGCAGTCAGAT-3'
p53-AS74-X ( <i>sense</i> ):	5'-AAGAAACTCGAGCCCCTGCACCAGCAGCT-3'
p53-AS301-X ( <i>sense</i> ):	5'-AAGAAACTCGAGCCCCAGGGAGCACTAAG-3'
Xho-p53-RR ( <i>sense</i> ):	5'-AATAAACTCGAGGGGGGAGCAGGGC-3'
BGH-rev. ( <i>antisense</i> ):	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'
LAP-Xho-5 ( <i>sense</i> ):	5'-TTTAAACTCGAGCAACGCCTGGTGGCCT-3'
LAP-Mut-as ( <i>antisense</i> ):	5'-CGGGAAGCTTGCCGCAA-3'
NLS-B-s ( <i>sense</i> ):	5'-GATCCCAAAAAGAAGAGAAAGGTAGATTAG-3'
NLS-B-as ( <i>antisense</i> ):	5'-GATCCTAATCTACCTTTCTCTTTTGG-3'

Im Folgenden sind die klonierten Konstrukte aufgelistet:

#### 3.5.1.1.1 pLexA/poly II

Dieser Vektor wurde von Herrn Dr. Schneikert (Institut für Genetik, Forschungszentrum Karlsruhe) freundlicherweise zur Verfügung gestellt und als Leervektor in der *Mammalian*

*Two-Hybrid* Transfektion verwendet. Der Vektor kodiert für die DNA-Bindungsdomäne des bakteriellen LexA Repressors. In die *Multiple Cloning Site* (MCS) kann die cDNA eines Transkriptionsfaktors kloniert werden, die als Fusionsprotein mit einer 5'-LexA-DNA-Bindungsdomäne (DBD) nach Transfektion durch den vorgeschalteten SV40-Promotor konstitutiv exprimiert wird.

#### 3.5.1.1.2 pLex/hp53wt/FLAG

Das Konstrukt enthält menschliche p53-cDNA (Aminosäuren 2 bis 390), die am 3'-Ende mit einem *FLAG*-Epitop markiert und in den pLexA/polyII-Vektor kloniert wurde.

Zur Herstellung dieses Konstruktes wurde das Plasmid pGST/hp53 (Christian, 2002a) mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI geschnitten und das resultierende Fragment (1,2 kb) auf einem Agarosegel aufgetrennt. Parallel dazu wurde der Vektor pLex/polyII ebenfalls mit *Bam*HI verdaut und das linearisierte Plasmid (4,4 kb) aus dem Gel isoliert (siehe Kapitel 3.3.1). Anschließend wurde das Plasmid mit alkalischer Phosphatase (CIP; Amerham) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Die Ligation erfolgte in einem molaren Verhältnis 1:2 (Vektor : Insert) über Nacht. Nach Transformation der Ligationsprodukte in kompetente *E.coli*-Bakterien (TOP 10; Invitrogen) und deren Aufzucht wurden Plasmid-Minipräparationen (siehe Kapitel 3.2.2) und ein anschließender Kontrollverdau zur Analyse der richtigen Orientierung des einklonierten Inserts durchgeführt.

#### 3.5.1.1.3 pLex/hp53.M22,23/FLAG

Das Konstrukt enthält menschliche p53-cDNA (Aminosäuren 2 bis 390), die Mutationen in der TAD (Aminosäure 22; Leu→Glu und Aminosäure 23; Trp→Ser) aufweist, um die Transaktivierungsfähigkeit von p53 zu inaktivieren. Das Konstrukt wurde mit einem 3'-*FLAG*-Epitop markiert und in den pLexA/polyII-Vektor kloniert.

Zur Herstellung wurde eine PCR (siehe Kapitel 3.3.4) mit dem *Template* pcDNA/hp53.M22,23/FLAG (siehe Kapitel 3.1.4) und den Primern p53-5-B (*sense*; *s*) sowie *BGH*-*rev.*, ein *antisense* (*as*)-Primer des pcDNA3.1-Vektors, durchgeführt. Der *sense*-Primer führt eine 5'-*Bam*HI-Schnittstelle ein und eine Mutation im Startkodon. Um eine hohe Fehlerrate während der PCR auszuschließen, wurde die *Pfx*-Polymerase (Gibco) eingesetzt. Das amplifizierte PCR-Fragment (1,2 kb) wurde mit *Bam*HI geschnitten und wie pLex/hp53wt/FLAG in den *Bam*HI-geschnittenen pLex/polyII-Vektor kloniert (siehe Kapitel 3.5.1.1.2). Das Konstrukt wurde durch einen Kontrollverdau sowie durch DNA-Sequenzierung (siehe Kapitel 3.3.7) überprüft.

#### 3.5.1.1.4 pLex/hp53ΔT4-RR/FLAG

Das Konstrukt enthält menschliche p53-cDNA (Aminosäuren 2 bis 326) mit einer Deletion des C-Terminus, die mit einem 3'-FLAG-Epitop markiert und in den Vektor pLexA/polyII kloniert wurde.

Für die Konstruktion wurde eine PCR mit den Primern p53-B (*s*) und *BGH-rev.* (*as*) durchgeführt und als *Template* das Plasmid pcDNA/hp53/FLAG verwendet. Mit dem *sense*-Primer wurde eine 5'-*Bam*HI-Schnittstelle eingeführt und das Startkodon mutiert. Aus der PCR mit der *Pfx*-Polymerase resultierte ein Fragment mit einer Größe von 1080 bp, welches anschließend mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI geschnitten und aus einem Agarosegel isoliert wurde. Das Produkt (1014 bp) wurde in den bereits geschnittenen pLexA/polyII-Vektor (*Bam*HI; *CIP*; siehe Kapitel 3.5.1.1.2) ligiert. Zur Analyse der richtigen Orientierung des einklonierten Inserts wurde das Plasmid durch einen Kontrollverdau sowie durch Sequenzierung überprüft.

#### 3.5.1.1.5 pLex/hp53.M22,23ΔT4-RR/FLAG

Das Konstrukt enthält menschliche p53-cDNA (Aminosäuren 2 bis 326) mit Mutationen in der TAD (siehe Kapitel 3.5.1.1.3) und Deletion des C-Terminus (siehe Kapitel 3.5.1.1.4), die mit einem 3'-FLAG-Epitop markiert und in den pLexA/polyII-Vektor kloniert wurde.

Zur Konstruktion wurde das Konstrukt pLex/hp53.ΔT4-RR/FLAG (siehe Kapitel 3.5.1.1.4) mit den Restriktionsenzymen *Eco*47III/*Bgl*III geschnitten und das Fragment (492 bp) aus einem Agarosegel isoliert. Gleichzeitig wurde das Konstrukt pLex/hp53.M22,23/FLAG (siehe Kapitel 3.5.1.1.3) ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *Eco*47III/*Bgl*III geschnitten, der Restvektor (4,9 kb) aus einem Agarosegel aufgereinigt und mit dem oben genannten Fragment ligiert (siehe Kapitel 3.5.1.1.2). Nach der Isolierung des Plasmides wurde ein Kontrollverdau durchgeführt.

#### 3.5.1.1.6 pLex/hp53ΔTAD/FLAG

Das Konstrukt enthält menschliche p53-cDNA (Aminosäure 74 bis 390) mit einer Deletion der Transaktivierungsdomäne (TAD). Die aminoterminal deletierte p53-cDNA wurde mit einem 3'-FLAG-Epitop markiert und in den pLexA/polyII-Vektor kloniert.

Für die Konstruktion des Plasmides wurde eine PCR mit der *Pfu*-Polymerase (Promega) durchgeführt. Eingesetzt wurde das *Template* pcDNA/hp53/FLAG (siehe Kapitel 3.1.3) zusammen mit dem Primer p53-AS74-X (*s*), der 5' zu Aminosäure 74 eine *Xho*I-Schnittstelle einführt, und dem *BGH-rev.* (*as*)-Primer. Das amplifizierte Produkt (1037 bp)

wurde mit den Restriktionsenzymen *XhoI/BamHI* geschnitten und durch Verwendung eines *High Pure PCR Purifikation-Kits* (Roche) von kleineren Fragmenten gereinigt. Parallel dazu wurde der Vektor pLex/polyII mit *XhoI/BamHI* verdaut, das linearisierte Plasmid (4,4 kb) aus dem Gel isoliert und mit dem oben genannten Fragment ligiert (siehe Kapitel 3.5.1.1.2). Die korrekte Klonierung wurde durch einen Kontrollverdau sowie durch DNA-Sequenzierung überprüft.

#### **3.5.1.1.7 pLex/hp53ΔTADΔT4-RR/FLAG**

Das Konstrukt enthält menschliche p53-cDNA (Aminosäuren 74 bis 326) mit Deletionen der TAD und des C-Terminus, die mit einem 3'-*FLAG*-Epitop markiert und in den pLexA/polyII-Vektor kloniert wurde.

Für die Konstruktion wurde eine PCR mit *Pfu*-Polymerase (Promega) an dem Konstrukt pcDNA/hp53ΔT4-RR/FLAG mit dem Primer p53-AS74-X (*s*), der 5' zu Aminosäure 74 eine *XhoI*-Schnittstelle einführt, und dem *BGH rev. (as)*-Primer durchgeführt. Das PCR-Produkt (851 bp) wurde mit *XhoI/BamHI* geschnitten und wie für pLex/hp53ΔTAD/FLAG beschrieben (siehe Kapitel 3.5.1.1.6) weiter bearbeitet.

#### **3.5.1.1.8 pLex/hp53ΔTADΔDBD/FLAG**

Das Konstrukt enthält menschliche p53-cDNA (Aminosäuren 301 bis 390) mit Deletionen der TAD und der DNA-Bindungsdomäne (DBD). Das C-terminale Ende der p53-cDNA wurde mit einem 3'-*FLAG*-Epitop markiert und in den pLexA/polyII-Vektor kloniert.

Zur Herstellung wurde eine PCR mit der *Pfu*-Polymerase an dem *Template* pcDNA/hp53/FLAG mit dem Primer p53-AS301-X (*s*), der 5' zu Aminosäure 301 eine *XhoI*-Schnittstelle einführt, und dem *BGH rev. (as)*-Primer durchgeführt. Das daraus resultierende Fragment von 335 bp wurde mit *XhoI/BamHI* geschnitten und wie für pLex/hp53ΔTAD/FLAG beschrieben (siehe Kapitel 3.5.1.1.6) weiter bearbeitet.

#### **3.5.1.1.9 pLex/hp53.RR/FLAG**

Das Konstrukt enthält menschliche p53-cDNA (Aminosäuren 360 bis 390) mit Deletionen aller Domänen außer der *Regulatory Region* (RR), die am 3'-Ende mit einem *FLAG*-Epitop markiert und in den pLexA/polyII-Vektor kloniert wurde.

Zur Herstellung wurde eine PCR mit der *Pfu*-Polymerase (Promega) an dem *Template* pcDNA/hp53/FLAG mit dem Primer *Xho*-p53-RR (*s*), der 5' zu Aminosäure 360 eine *XhoI*-Schnittstelle einführt, und dem *BGH rev. (as)*-Primer durchgeführt. Das daraus resultierende PCR-Fragment (180 bp) wurde mit *XhoI/BamHI* geschnitten, aufgereinigt

und in den Vektor pLexA/polyII (*XhoI/BamHI*) kloniert und durch einen Kontrollverdau sowie durch Sequenzierung überprüft.

#### **3.5.1.1.10 pAB/VP16**

Das Konstrukt pAB/VP16 wurde von Herrn Dr. S. Onate und Frau Dr. S. Tsai (Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der Vektor kodiert für die Aktivierungsdomäne (AD) des *Herpes Simplex Virus* VP16 und wurde als Leervektor in der *Mammalian Two-Hybrid* Transfektion verwendet. In die MCS kann die cDNA eines Transkriptionsfaktors kloniert werden, welche als Fusionsprotein mit einer 5'-Aktivierungsdomäne nach Transfektion durch den vorgeschalteten RSV-(*Rous Sarcoma Virus*)-Promotor konstitutiv exprimiert wird.

#### **3.5.1.1.11 pVP16/hp53 $\Delta$ TAD/FLAG**

Das Konstrukt enthält menschliche p53-cDNA (Aminosäuren 74 bis 390), die eine Deletion der TAD aufweist. Die aminoterminal deletierte p53-cDNA wurde mit einem 3'-FLAG-Epitop markiert und in den pAB/VP16-Expressionsvektor kloniert.

Zur Herstellung wurde eine PCR mit der *Pfu*-Polymerase an dem *Template* pcDNA/hp53/FLAG mit dem Primer p53-AS74-X (s), welcher 5' zu Aminosäure 74 eine *XhoI*-Schnittstelle einführt, und dem *BGH rev.* (as)-Primer durchgeführt. Das amplifizierte PCR-Fragment (1 kb) wurde mit *XhoI/BamHI* geschnitten und aus einem Agarosegel aufgereinigt. Gleichzeitig wurde der Vektor pAB/VP16 (siehe Kapitel 3.5.1.1.10) ebenfalls mit *XhoI/BamHI* geschnitten und der linearisierte Vektor (5,6 kb) aus dem Agarosegel isoliert. Die Ligation und weitere Isolierung des Plasmides erfolgte wie in Kapitel 3.5.1.1.2 beschrieben. Die korrekte Klonierung wurde durch einen Kontrollverdau sowie durch DNA-Sequenzierung überprüft.

#### **3.5.1.1.12 pVP16/LAP-TAD/NLS**

Das Konstrukt enthält menschliche C/EBP $\beta$ -cDNA (Aminosäuren 2-204), deren aminoterminal Domäne (LAP-TAD) eine Mutation der Aminosäure 199 (Methionin) aufweist sowie ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) am 3'-Ende, kloniert in pABVP16. Zur Herstellung wurde eine PCR mit der *Pfu*-Polymerase an dem Konstrukt pcDNA/LAP (siehe Kapitel 3.1.3) mit den Primern LAP-*Xho*-5 (s) und LAP-Mut-as, die zur Einfügung einer 5' zu Aminosäure 2 eine *XhoI*-Schnittstelle und zur Mutation des Startkodons 1 und 199 führen, durchgeführt. Das PCR-Fragment (620 bp) wurde mit *XhoI* verdaut und mit Hilfe des *High Pure PCR Purification*-Kit (Roche) aufgereinigt. Parallel wurde der Vektor

pAB/VP16 (siehe Kapitel 3.5.1.1.10) mit *XhoI/PvuII* geschnitten und aus einem Agarosegel isoliert. Die Ligation und weitere Isolierung des Plasmides erfolgte wie in Kapitel 3.5.1.1.2 beschrieben. Die korrekte Klonierung wurde durch einen Kontrollverdau sowie durch DNA-Sequenzierung überprüft. Um sicherzustellen, dass dieses Konstrukt auch in den Zellkern gelangt, wurde an das 3'-Ende ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) vom großen T-Antigen des SV 40 eingefügt. Dazu wurde ein doppelsträngiges Oligonukleotid (siehe Kapitel 3.5.1.1) aus den Oligonukleotiden NLS-B-s und NLS-B-as mit *BamHI*-Überhängen und einem 3'-Stopkodon hergestellt und in das Konstrukt pVP16/LAP-TAD kloniert, welches zuvor ebenfalls mit *BamHI* geschnitten wurde.

#### 3.5.1.1.13 pVP16/LIP-DBD

Das Konstrukt wurde bereits in Pohnke et al. (1999) beschrieben. Es enthält den C-terminalen Anteil menschlicher C/EBP $\beta$ -cDNA mit der bZIP-Domäne (LIP; Aminosäuren 199 bis 345), markiert mit einem 3'-FLAG-Epitop und kloniert in den pAB/VP16-Expressionsvektor.

#### 3.5.1.1.14 pLexA/-36rPRL/luc 3

Bakterielle LexA-Operons (Lex), die vor einen Minimalpromotor des Ratten-Prolaktin-Gens (-36rPRL) in den Luziferase-Reportergen-Vektor (pGL3-Basic; Promega) kloniert wurden.

### 3.5.1.2 Transfektion eines *Mammalian Two-Hybrid Assays*

Für die Untersuchung einer Interaktion von p53 und C/EBP $\beta$  *in vivo* wurde eine Transfektion mittels Lipofectamine™ 2000 durchgeführt (siehe Kapitel 3.1.3.2). Hierbei wurden Saos-2-Zellen mit einer Dichte von  $0,65 \times 10^5$  Zellen pro 24-Well im entsprechenden Kulturmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen mit maximal 0,5  $\mu\text{g}$  des Reportergenkonstruktes und 0,03  $\mu\text{g}$  von jedem Expressionsvektor pro 24-Well transfiziert. Zum Ausgleich wurden äquimolare Mengen an leerem Expressionsvektor zugefügt und der Gesamt-DNA-Gehalt aller Ansätze durch Zugabe des promotorlosen Plasmids p0GH angeglichen. Nach Inkubation der transfizierten Zellen über Nacht erfolgte ein weiterer Mediumwechsel. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität im Lysat in einem Luziferase-Assay (siehe Kapitel 3.1.3.4) ermittelt.

Kulturmedium: DMEM ohne Phenolrot (4,5 g/l Glukose): Ham's F-12 im Verhältnis 1:1, 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin

### 3.5.2 Koimmunpräzipitation

Die Koimmunpräzipitation dient zur Untersuchung einer möglichen Interaktion von zwei verschiedenen Molekülen (meist Proteinen) *in vivo*. Das Prinzip der Immunpräzipitation beruht auf einem Aufreinigungsverfahren durch Verwendung eines spezifischen Antikörpers, der ein bestimmtes Protein (Antigen) von Interesse bindet. Bei der Koimmunpräzipitation erfolgt bei einer Interaktion zweier Proteine die Bindung eines Antigen-Antigen-Komplexes an den spezifischen Antikörper oder eine Bindung eines Antigens an den vorhandenen Antikörper-Antigen-Komplex. Die Separation des Antikörper-Antigen-Antigen-Komplexes erfolgt durch den Zusatz von entweder Protein A oder G, die, aufgrund ihrer Spezifität, bestimmte Sub-Klassen von Immunglobulinen (Antikörpern) binden. Protein A und G sind an unlösliche Trägermaterialien (z.B. Sepharose-Kügelchen) gekoppelt und können somit durch Zentrifugation präzipitiert werden. Die Identifizierung der Proteine im Präzipitat erfolgte durch *Western Blot* Analysen.

Zur Untersuchung einer möglichen Interaktion von p53 und C/EBP $\beta$  *in vivo* wurden zum einen Saos-2-Zellen mit Wildtyp-p53 (pcDNA/hp53), mutiertem p53 (pcDNA/hp53 $\Delta$ TAD/*FLAG*) und LAP/*FLAG* (pcDNA/LAP/*FLAG*) allein oder in Kombination transfiziert (siehe Kapitel 3.1.3.2). Zum anderen wurden endometriale Stromazellen über 6 Tage mit 8-Br-cAMP (0,5 mM) stimuliert oder unstimuliert belassen. 40 Stunden nach Transfektion oder nach 6 Tagen 8-Br-cAMP-Behandlung erfolgte die Ernte von Gesamtzellextrakten. Nach einmaligem Waschen der Monolayer mit PBS wurden 100  $\mu$ l TritonX-Puffer 1 (Nelson et al., 2001) pro 6-Well zugesetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Extrakte 3 x 5 Sekunden in einem Ultraschallbad (ELMA) sonifiziert, für 15 Minuten bei 13000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Anschließend wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.1.3) und 6 bis 10  $\mu$ g Gesamtprotein für einen „Input“-*Western Blot* separiert. In die Koimmunpräzipitation wurden 200 bis 500  $\mu$ g Gesamtprotein eingesetzt und mit einem spezifischen p53-Antikörper (DO-1-Agarose; siehe Kapitel 3.4.5) über Nacht bei 4°C auf einem Tube-Rotator (Snijders) inkubiert. Anschließend wurden die Agarose-Antikörper-Antigen-Komplexe durch drei Minuten Zentrifugation bei 1300 x g präzipitiert. Daran schlossen sich 6 Waschgänge mit je 900  $\mu$ l TritonX-Puffer 2 und 3-minütiger Zentrifugation bei 1300 x g an. Nach dem letzten Waschgang wurde eine Zentrifugation bei 13000 x g durchgeführt, um den restlichen Überstand komplett entfernen zu können.

Das Präzipitat wurde in 25 bis 35 µl Ladungspuffer aufgenommen und für 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch eine *Western Blot* Analyse (siehe Kapitel 3.4.3). In die Detektion der Immunpräzipitation wurden jeweils 5 µl des Gesamtproteinextraktes eingesetzt und für die Koimmunpräzipitation jeweils 30 µl des Saos-2-Zellextraktes oder 20 µl der Stromazellextrakte.

TritonX-Puffer 1: 0,5 % TritonX-100 in PBS, Protease-Inhibitoren („*Complete*“; Roche)

TritonX-Puffer 2: 0,1 % TritonX-100 in PBS, Protease-Inhibitoren („*Complete*“; Roche)

Ladungspuffer (Rittenhouse-Marcus Gel Juice): 62,5 mM Tris (pH 6,8), 62,5 mM Imidazol (pH 6,8), 5 % SDS, 20 % Glycerin, 2,5 % β-Mercaptoethanol, 0,0025 % Bromphenolblau

## 3.6 RNAi-Methode zur Untersuchung der Rolle von p53 im menschlichen Endometrium

### 3.6.1 Methode der RNA *interference* (RNAi)

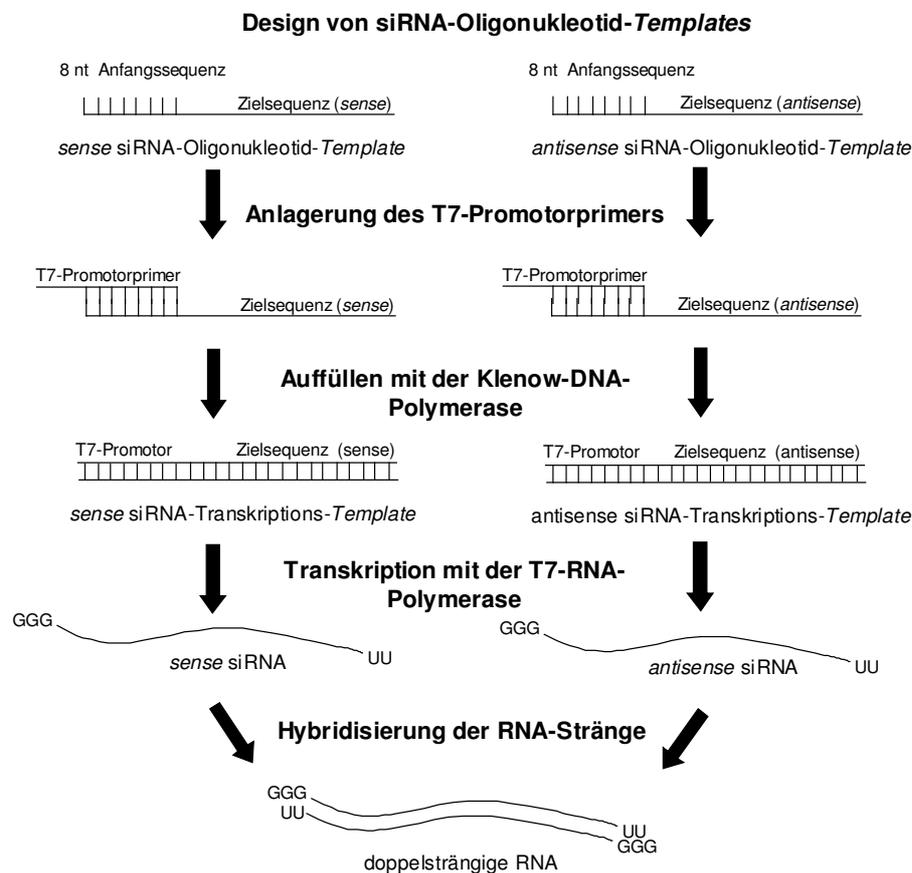
RNAi ist eine neue Methode von spezifischer Genstilllegung („*Gene silencing*“) auf posttranskriptineller Ebene in kultivierten Säugerzellen oder Organen und resultiert in einem „*Knock down*“-Phänotyp (Sharp, 1999). Das Prinzip beruht auf kurzen interferierenden RNA-Oligonukleotiden (*short interference*; siRNA; Elbashir et al., 2001), die sequenzspezifisch RNA-Bereiche erkennen und, durch Anlagerung eines Multikomplexes (Hammond et al., 2001), zum Abbau von mRNA führen. Dadurch können bestimmte Gene spezifisch „ausgeschaltet“ bzw. herunterreguliert werden. Um den Einfluss von bestimmten Faktoren in einem solchen „*Knock down*“-Modell zu untersuchen, werden Zellen mit siRNA-Oligonukleotiden transfiziert und der Effekt der Proteinreduktion durch *Western-Blot* Analysen überprüft.

### 3.6.2 Herstellung der siRNA-Oligonukleotide

Zur Herstellung von siRNA-Oligonukleotiden wurde das *Silencer*<sup>TM</sup> *siRNA Construction*-Kit (Ambion) verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip beruht auf einer *in vitro* Transkription eines *sense* und *antisense* siRNA-*Templates* mit der T7-RNA-Polymerase und einer anschließenden Hybridisierung der beiden siRNA-Stränge zu doppelsträngigen siRNA-Oligonukleotiden. Der Vorteil des *Silencer*<sup>TM</sup> *siRNA Construction*-Kit liegt in der Verwendung von siRNA-Oligonukleotid-*Templates*, die 5' eine T7-Promotorprimer-Anfangssequenz tragen („*leader*“ Sequenz) und dadurch eine optimale siRNA-Syntheserate bedingen. Die zwei einzelsträngigen siRNA-Oligonukleotid-

*Templates* (*sense* und *antisense*) wurden in separaten Reaktionen mit dem T7-Promotorprimer hybridisiert und die Stränge mit der Klenow-DNA-Polymerase komplementär vervollständigt (siehe Abb. 3.3). Diese doppelsträngigen *Templates* wurden von der T7-RNA-Polymerase transkribiert und die entstehenden *sense* und *antisense* siRNA-Stränge hybridisiert. Die T7-Promotorprimer-Anfangssequenz (GGG-Überhänge) sowie DNA-Verunreinigungen wurden durch einen anschließenden RNase/DNase-Verdau beseitigt. Die UU-Überhänge bleiben erhalten und dienen als Schutz vor dem Abbau durch die RNAsen (siehe Abb. 3.3).

Als Kontrollen wurden positiv-(GAPDH) und negativ-(*scrambled sequence*) siRNA-Oligonukleotide eingesetzt, deren *Templates* im *Silencer™ siRNA Construction*-Kit enthalten waren.



**Abbildung 3.3:** Schematische Darstellung der siRNA-Oligonukleotid-Synthese

Herstellung von siRNA-Oligonukleotiden durch Anlagerung eines T7-Promotorprimers, Auffüllen mit Klenow-DNA-Polymerase und Transkription der Einzelstränge (*sense* und *antisense*) durch T7-RNA-Polymerase. Eine Hybridisierung der einzelsträngigen siRNA-Oligonukleotide führt zur Synthese von doppelsträngigen siRNAs (aus *Silencer™ siRNA Construction*-Handbuch, Ambion).

Die verschiedenen p53-siRNA-Oligonukleotid-*Templates* wurden von der Firma Sigma synthetisiert (siehe Tab. 3.6).

siRNA- <i>Templates</i>	Oligonukleotid-Sequenz
p53-A	<i>sense</i> <sup>1</sup> : 5'-AACTACTTCCTGAAAACAACGCCTGTCTC-3' <i>antisense</i> <sup>1</sup> : 5'-AACGTTGTTTTTCAGGAAGTAGCCTGTCTC-3'
p53-B	<i>sense</i> <sup>2</sup> : 5'-AAGACTCCAGTGGTAATCTACCCTGTCTC-3' <i>antisense</i> <sup>2</sup> : 5'-AAGTAGATTACCACTGGAGTCCCTGTCTC-3'
p53-C	<i>sense</i> <sup>3</sup> : 5'-AAGTCTGTGACTTGCACGTACCCTGTCTC-3' <i>antisense</i> <sup>3</sup> : 5'-AAGTACGTGCAAGTCACAGACCCTGTCTC-3'

**Tabelle 3.6: In die RNAi-Methode eingesetzte p53-siRNA-Oligonukleotide**

(<sup>1</sup>Irwin et al., 2003; <sup>2</sup>Brummelkamp et al., 2002; <sup>3</sup>von unserer Arbeitsgruppe ausgewählt). Die unterstrichenen Sequenzen sind komplementäre Bereiche für den T7-Promotorprimer.

### 3.6.3 Markierung der siRNA-Oligonukleotide

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden die Kontrollen (GAPDH-siRNA, negativ-siRNA; Ambion) mit dem Cy3-Fluoreszenzfarbstoff unter Verwendung des *Silencer*<sup>TM</sup> *siRNA Labeling*-Kit (Ambion) nach dem Protokoll des Herstellers markiert.

### 3.6.4 Transfektion von endometrialen Stromazellen (ESZ) mit Cy3-markierten siRNA-Oligonukleotiden

Für den Nachweis der Transfektionseffizienz von siRNA-Oligonukleotiden in ESZ wurden zunächst zwei verschiedene Transfektionsmethoden getestet. Endometriale Stromazellen einer Präparation der zweiten Passage wurden mit der *Lipofectamine*-Methode (siehe Kapitel 3.1.3.2) oder der *RNAitect*-Methode transfiziert. Das Prinzip der *RNAitect*-Methode beruht auf der Bildung von Lipid-Komplexen und wurde nach dem Protokoll des Herstellers (Qiagen) durchgeführt. Ein Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, die Transfektion in Anwesenheit von Antibiotika durchzuführen. Die adhärent wachsenden ESZ wurden in Triplikaten mit einer Dichte von  $0,6 \times 10^5$  Zellen pro 24-Well im entsprechenden Kulturmedium, Basalmedium<sub>(ohne Antibiotika)</sub> für *Lipofectamine* und Basalmedium für *RNAitect*, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Kurz vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt. In die Transfektion wurden jeweils drei verschiedene Mengen (0,5 µg, 0,8 µg, 1 µg) an selbst hergestellter, Cy3-markierter GAPDH-siRNA und negativ-siRNA eingesetzt und mit den verschiedenen

Transfektionsreagenzien, nach Angaben des Herstellers, in den entsprechenden Verhältnissen vermischt. Nach einer Inkubation von 30 Stunden bei 37°C wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Lokalisation der Cy3-markierten siRNA-Oligonukleotide durch Visualisierung mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus) nachgewiesen.

Basalmedium: DMEM ohne Phenolrot (4,5 g/l Glukose): Ham's F-12 im Verhältnis 1:1, 10 % steroidfreies FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Primocin, 1 µg/ml Insulin, 10<sup>-9</sup> M 17-β-Östradiol

Basalmedium<sub>(ohne Antibiotika)</sub>: DMEM ohne Phenolrot (4,5 g/l Glukose): Ham's F-12 im Verhältnis 1:1, 10 % steroidfreies FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 µg/ml Insulin, 10<sup>-9</sup> M 17-β-Östradiol

### 3.6.5 Transfektion von ESZ mit siRNA-Oligonukleotiden und gleichzeitige Stimulation mit 8-Br-cAMP

Nachdem die effektivere Transfektionsmethode festgestellt worden war, wurden ESZ für unstimulierte Ansätze mit einer Dichte von 4 x 10<sup>5</sup> Zellen bzw. für stimulierte Ansätze mit 8 x 10<sup>5</sup> Zellen pro 6-Well-Platte im Basalmedium ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den Kontroll-siRNA-Oligonukleotiden sowie einer Kombination aus den drei verschiedenen p53-siRNA-Oligonukleotiden (siehe Kapitel 3.6.2) unter Verwendung der *RNAi*fect-Methode (im Verhältnis 1:6 = DNA:RNAi*fect*) transfiziert (2,5 µg pro 6-Well) und für 20 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte entweder eine Stimulation mit 8-Br-cAMP (0,5 mM) über 1, 2, 3, und 6 Tage oder die Zellen blieben unbehandelt. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 80 µl pro 6-Well in einem *Cell-Disruption-Buffer* (Ambion) geerntet. Nach einer Inkubation von 30 Minuten auf Eis wurden die Zellextrakte 3 x 5 Sekunden in einem Ultraschallbad sonifiziert und 15 Minuten bei 13000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und die Proteinextrakte bei -80°C gelagert.

Basalmedium: DMEM ohne Phenolrot (4,5 g/l Glukose): Ham's F-12 im Verhältnis 1:1, 10 % steroidfreies FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Primocin, 1 µg/ml Insulin, 10<sup>-9</sup> M 17-β-Östradiol

### 3.6.6 Überprüfung des siRNA-Transfektionseffektes durch Western Blot

Der Effekt der transfizierten siRNA-Oligonukleotide wurde auf Proteinebene durch *Western Blot* Analysen ermittelt (siehe Kapitel 3.4.3). Zunächst wurde eine Proteinbestimmung der Gesamtzellextrakte durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.1.3) und 6 µg Gesamtprotein in die *NuPAGE*-Gelelektrophorese eingesetzt. Anschließend erfolgte ein Nachweis der p53- und GAPDH-Proteinspiegel mit den entsprechenden Antikörpern.

## 4 Ergebnisse

Der Tumorsuppressor p53 wurde in einem Hefe Ein-Hybrid Assay als ein weiterer Transkriptionsfaktor identifiziert, der die Fähigkeit aufweist, an einem isolierten Abschnitt (-332/-270) des dezidualen Prolaktinpromotors (dPRL) zu binden und einen nachgeschalteten Minimalpromotor zu aktivieren. Im Kontext des intakten dPRL-Promotors (dPRL-332) stimuliert p53 allerdings die dPRL-Transkription nicht, zeigt aber die Fähigkeit, eine C/EBP $\beta$ -vermittelte Aktivierung des dPRLs zu inhibieren (Pohnke et al., 2004). Im dPRL-Promotor sind keine p53-Bindungsstellen beschrieben und im EMSA fehlt p53 die Fähigkeit an das isolierte Fragment dPRL-332/-270 zu binden.

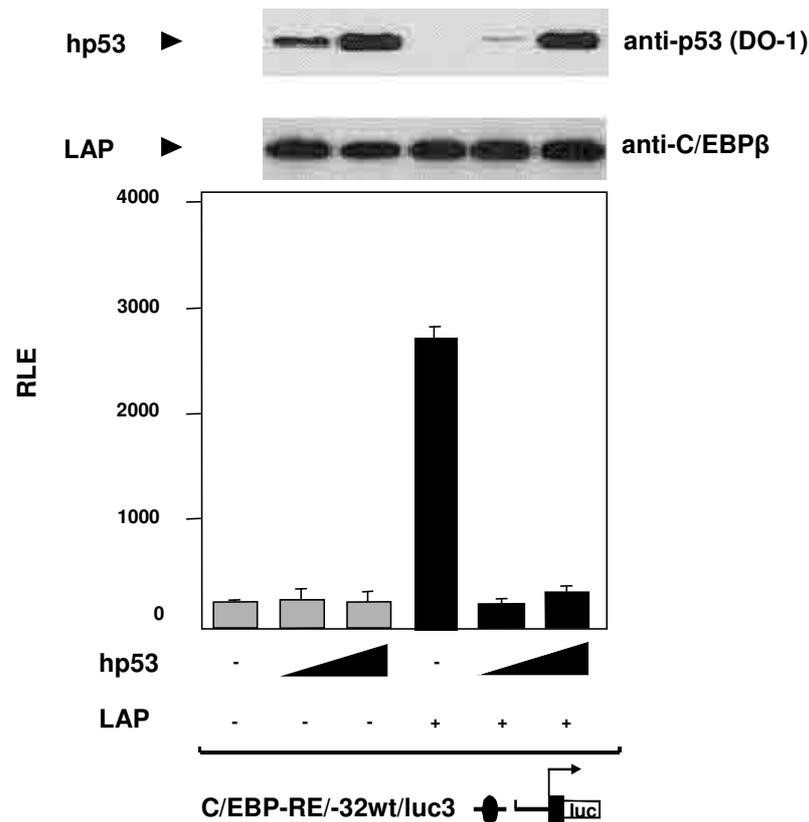
Ein Ziel dieser Arbeit war, diesen inhibitorischen Effekt von p53 genauer zu untersuchen und eine mögliche Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 nachzuweisen.

### 4.1 Transfektionen zur Analyse einer Interaktion von p53 und C/EBP $\beta$

Zur Überprüfung der Transrepression von p53 auf eine C/EBP $\beta$ -induzierte Aktivierung des dPRL-Promotors wurden Transfektionsexperimente mit der Saos-2-Zelllinie (siehe Kapitel 3.1.2.2) durchgeführt, die einen hohen Proteinspiegel an endogenem C/EBP $\beta$  aufweist, aber p53-defizient ist.

#### 4.1.1 Repression der C/EBP $\beta$ -abhängigen Transaktivierung durch p53

Saos-2-Zellen wurden mit einem Reportergenkonstrukt (C/EBP-RE/-32wt/luc3) transfiziert (siehe Abb. 4.1). Dieses enthält ein isoliertes C/EBP $\beta$ -responsives Element (C/EBP-RE), welches vor einen Prolaktin (PRL)-Minimalpromotor (dPRL-32wt) und ein Luziferasegen kloniert worden war. Expressionsvektoren mit den kodierenden Sequenzen für die aktivierende C/EBP $\beta$ -Isoform, LAP (pcDNA/LAP), und Wildtyp-p53 (pcDNA/hp53) wurden kotransfiziert. Dabei wurden entweder gleiche Mengen an Expressionsvektoren (0,05  $\mu$ g pro 24-Well) eingesetzt oder 10 x mehr an Wildtyp-p53 (0,5  $\mu$ g pro 24-Well) (siehe Kapitel 3.1.3). Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden die Expressionen der verschiedenen Proteine aus Gesamtzellextrakten ermittelt und in einem *Western Blot* dargestellt (siehe Abb. 4.1).



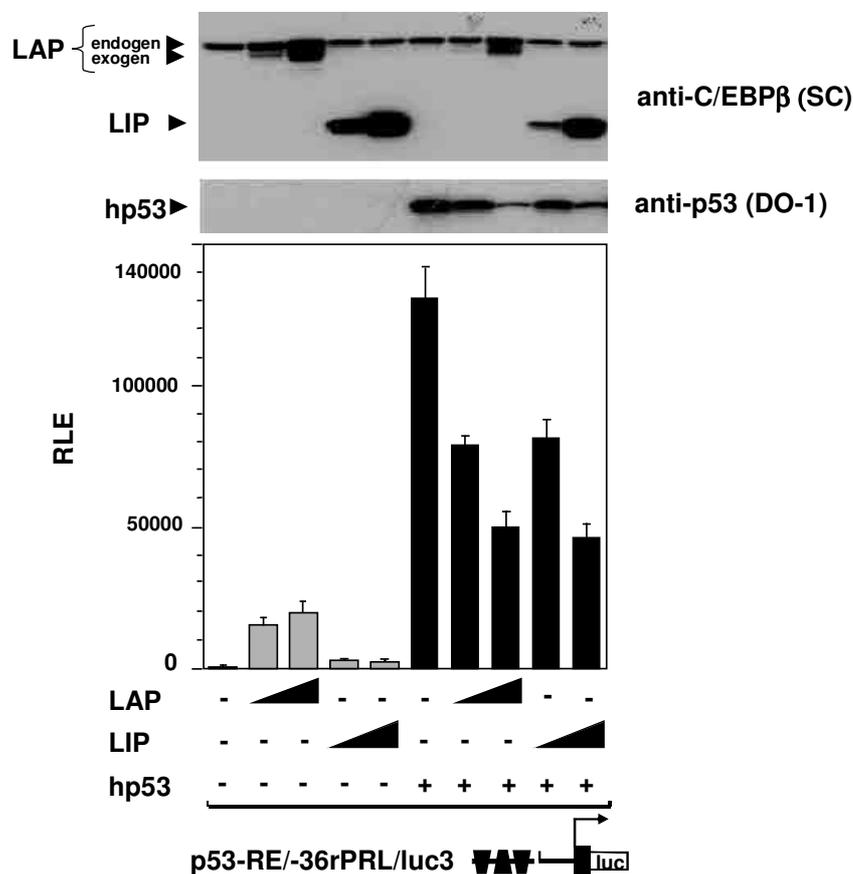
**Abbildung 4.1: Repression der C/EBPβ-abhängigen Transaktivierung durch p53**

Kotransfektion von Saos-2-Zellen mit dem Reportergenkonstrukt C/EBP-RE/-32wt/luc3 und den Expressionsvektoren pcDNA/LAP (0,05 µg pro 24-Well) oder pcDNA/hp53 oder einem Leervektor unter Verwendung der Kalziumphosphat-Präzipitationsmethode. Die Dreiecke bezeichnen die zwei verschiedenen Konzentrationen (0,05 µg und 0,5 µg pro 24-Well) des transfizierten p53-Expressionsvektors. Die Luziferaseaktivität wurde in relativen Lichteinheiten (RLE) gemessen. Die Gesamtzellextrakte wurden in einer Western Blot Analyse mit einem polyklonalen C/EBPβ-Antikörper (Santa Cruz; SC; siehe Kapitel 3.4.5) auf LAP (38 kDa) und mit einem monoklonalen Antikörper (p53 DO-1) auf p53 (53 kDa) detektiert.

Die Transfektion von LAP führte zu einer deutlichen Aktivierung des C/EBP-REs im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle. Während in Abwesenheit von transfiziertem LAP kein Effekt auf die Basalaktivität des C/EBP-RE durch die verschiedenen Mengen an exogenem p53 zu beobachten war, führte die Kotransfektion beider p53-Mengen zu einer kompletten Inhibierung der LAP-induzierten Aktivierung des C/EBP-REs. In den *Western Blot* Analysen konnte eine steigende Expression des p53-Proteins detektiert werden, wobei die niedrigere Konzentration an exogenem p53 in Gegenwart von transfiziertem LAP eine deutliche Reduktion aufwies. Aufgrund des hohen endogenen Spiegels an LAP-Protein in Saos-2-Zellen konnte exogenes LAP nicht dargestellt werden.

#### 4.1.2 Repression der p53-abhängigen Transaktivierung durch C/EBP $\beta$

Der Nachweis einer möglichen reziproken Inhibierung erfolgte durch eine Transfektion von Saos-2-Zellen mit einem p53-Reportergenkonstrukt (p53-RE/-36rPRL/luc3) (siehe Abb. 4.2). Dieses enthält drei isolierte p53-responsive Elemente, welche vor einen Prolaktin-Minimalpromotor der Ratte (-36rPRL) und ein Luziferasegen kloniert worden waren. Expressionsvektoren mit den kodierenden Sequenzen für das Wildtyp-p53-Protein (pcDNA/hp53), das LAP-Protein (pcDNA/LAP) oder das LIP-Protein (pcDNA/LIP), die inhibitorische Isoform von C/EBP $\beta$ , wurden kotransfiziert (siehe Kapitel 3.1.4). Hierbei wurden entweder gleiche Konzentrationen (0,05  $\mu$ g pro 24-Well) oder 10 x mehr (0,5  $\mu$ g pro 24-Well) an LAP- oder LIP-Expressionsvektoren eingesetzt.



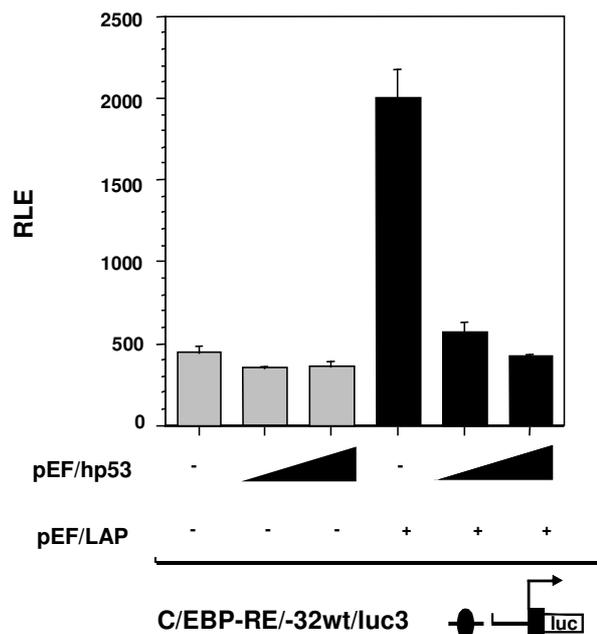
**Abbildung 4.2: Repression der p53-abhängigen Transaktivierung durch C/EBP $\beta$**

Kotransfektion von Saos-2-Zellen mit dem Reportergenkonstrukt p53-RE/-36rPRL/luc3 und den Expressionsvektoren pcDNA/hp53 (0,05  $\mu$ g pro 24-Well), pcDNA/LAP oder pcDNA/LIP oder einem Leervektor unter Verwendung der Kalziumphosphat-Präzipitationsmethode. Die Dreiecke stehen für die zwei verschiedenen Konzentrationen (0,05  $\mu$ g oder 0,5  $\mu$ g pro 24-Well) des entsprechenden Expressionsvektors für LAP oder LIP. Die Luziferaseaktivität wurde in relativen Lichteinheiten (RLE) gemessen. Die Gesamtzellextrakte wurden in einer *Western Blot* Analyse mit einem monoklonalen p53-Antikörper (DO-1) gegen p53 (53 kDa) und mit einem polyklonalen C/EBP $\beta$ -Antikörper (Santa Cruz; SC) gegen LAP (35, 38 kDa) und gegen LIP (16 kDa) detektiert.

Die Transfektion von p53 allein resultierte in einer sehr starken Aktivierung des Reportergenkonstruktes p53-RE/-36rPRL/luc3 im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle. Während transfiziertes LAP eine schwache Induktion der Basalaktivität des p53-RE bewirkte, war in Gegenwart von transfiziertem LIP keine Aktivierung des Promotors erkennbar. Kotransfektion von verschiedenen Mengen des LAP- oder LIP-Expressionsvektors führte jedoch in beiden Fällen zu einer deutlichen Reduktion der p53-abhängigen Aktivierung des Promoters (siehe Abb. 4.2). Die Überprüfung der Transfektionseffizienz durch *Western Blot* Analysen aus Gesamtzellextrakten ließ eine starke Expression von p53-Protein erkennen und ansteigende Mengen an exogenem LIP und LAP. Durch die Überexpression von LAP konnte in diesem Fall sogar das transfizierte, kleinere LAP2-Protein (Met<sup>24</sup>; 35 kDa; siehe Abb. 2.2) über den Spiegel an endogenem LAP-Protein (38 kDa) detektiert werden. Allerdings war auch hier eine Reduktion an p53-Protein in Gegenwart von exogenem LAP- und LIP-Protein zu beobachten, obwohl in allen Ansätzen gleiche Konzentrationen (0,05 µg) an p53-Expressionsvektor (siehe Kapitel 3.1.3.1) transfiziert worden waren.

#### 4.1.3 Überprüfung der p53-abhängigen Transrepression von Promotoren

Es ist berichtet worden, dass p53 eine Reihe von viralen Promotoren inhibiert und die *de novo* Synthese von Proteinen unterbindet. Dazu gehören der CMV-, RSV-, TK- und der SV40-Promotor (Allamane et al., 2001; Subler, 1992). Da die in dieser Arbeit verwendeten Expressionsvektoren mit dem pcDNA3.1-Vektor hergestellt wurden (siehe Kapitel 3.1.3), der von dem CMV-Promotor aktiviert wird, könnte die Transfektion des p53-Expressionsvektors (pcDNA/hp53) zu einer Auto-Transrepression führen oder, im Falle von pcDNA/LAP, die Transkription dieses kotransfizierten Faktors inhibieren. Um diesen Effekt auszuschließen, wurde ein anderes Expressionssystem gewählt, in dem p53 und LAP unter die Kontrolle eines nicht viralen Promotors gestellt werden. Die entsprechenden cDNAs wurden in den pEF1 $\alpha$ -Vektor kloniert, der ein eukaryontisches EF (Elongationsfaktor) 1 $\alpha$ -Promotorfragment enthält (siehe Kapitel 3.1.3.4). Es ist bisher keine Inhibierung des EF1 $\alpha$ -Promotors durch p53 beschrieben worden. Zur Überprüfung der p53-vermittelten Transrepression wurden Saos-2-Zellen mit dem isolierten C/EBP-RE sowie mit den Expressionsvektoren für LAP (pEF/LAP; 0,05 µg pro 24-Well) und verschiedenen Mengen (0,05 µg oder 0,5 µg pro 24-Well) an Wildtyp-53 (pEF/p53) transfiziert (siehe Abb. 4.3).



**Abbildung 4.3: Repression der C/EBP $\beta$ -abhängigen Transaktivierung durch p53 im neuen Expressionssystem**

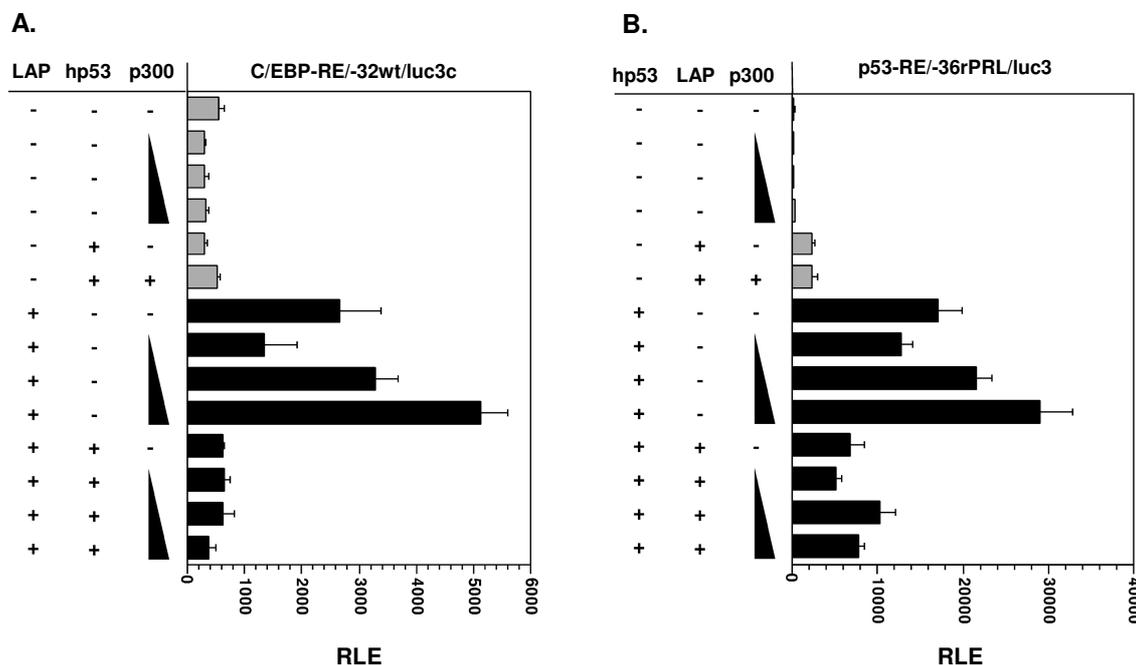
Die Transfektionen wurden mit einem neuen Expressionssystem durchgeführt. Dazu wurden Saos-2-Zellen mit dem Reportergenkonstrukt C/EBP-RE/-32wt/luc3 sowie mit pEF/LAP (0,05  $\mu$ g pro 24-Well) und verschiedenen Mengen an Expressionsvektor pEF/hp53 unter Verwendung der Kalziumphosphat-Präzipitationsmethode kotransfiziert. Die Dreiecke bezeichnen die zwei verschiedenen Konzentrationen (0,05  $\mu$ g und 0,5  $\mu$ g pro 24-Well) des transfizierten p53-Expressionsvektors. Die Luciferaseaktivität wurde in relativen Lichteinheiten (RLE) gemessen.

Die Transfektion von LAP allein führte zu einer Aktivierung des Reportergenkonstruktes C/EBP-RE, die in Anwesenheit von exogenem p53 deutlich reduziert wurde (siehe Abb. 4.3). Dies bestätigte die Beobachtungen aus den Versuchen mit dem CMV-Promotor (siehe Abb. 4.1). Der reprimierende Effekt von p53 auf die Aktivität von LAP ist demnach nicht ausschließlich auf eine Inhibierung des CMV-Promotors zurückzuführen.

#### 4.1.4 Gegenseitige Transrepression von C/EBP $\beta$ und p53 ist unabhängig von p300/CBP

C/EBP $\beta$  und p53 sind in der Lage, mit einer Vielzahl von Proteinen zu interagieren, u.a. mit dem Koaktivator p300/CBP (Goodman & Smolik, 2000). Eine mögliche Erklärung für die gegenseitige Transrepression könnte auf einer Kompetition um limitierende Faktoren, wie z.B. p300, beruhen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Transfektionen entweder mit einem isolierten C/EBP-RE (C/EBP/-32wt/luc3) oder einem p53-RE (p53-RE/-36rPRL/luc3) durchgeführt. Saos-2-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für Wildtyp-p53 (pcDNA/hp53) und LAP (pcDNA/LAP) allein oder in Kombination mit steigenden

Mengen (0,05  $\mu\text{g}$ , 0,1  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$  pro 24-Well) an p300-Expressionsvektor (pCMV/NHA/p300) kotransfiziert (siehe Kapitel 3.1.3.1) (siehe Abb. 4.4).



**Abbildung 4.4: p300 hat keinen Einfluss auf die Transrepression von C/EBP $\beta$  und p53**

Die Transfektion der Soas-2-Zellen erfolgte mit den Reporterergenkonstrukten C/EBP-RE-32wt/luc3 (A) oder p53-RE/-36rPRL/luc3 (B). Die Expressionsvektoren pcDNA/LAP, pcDNA/hp53, pCMV/NHA/p300 (0,05  $\mu\text{g}$  pro 24-Well) oder der Leervektor wurden kotransfiziert. Die Dreiecke bezeichnen die verschiedenen Mengen an transfiziertem p300 (0,05  $\mu\text{g}$ , 0,2  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$  pro 24-Well).

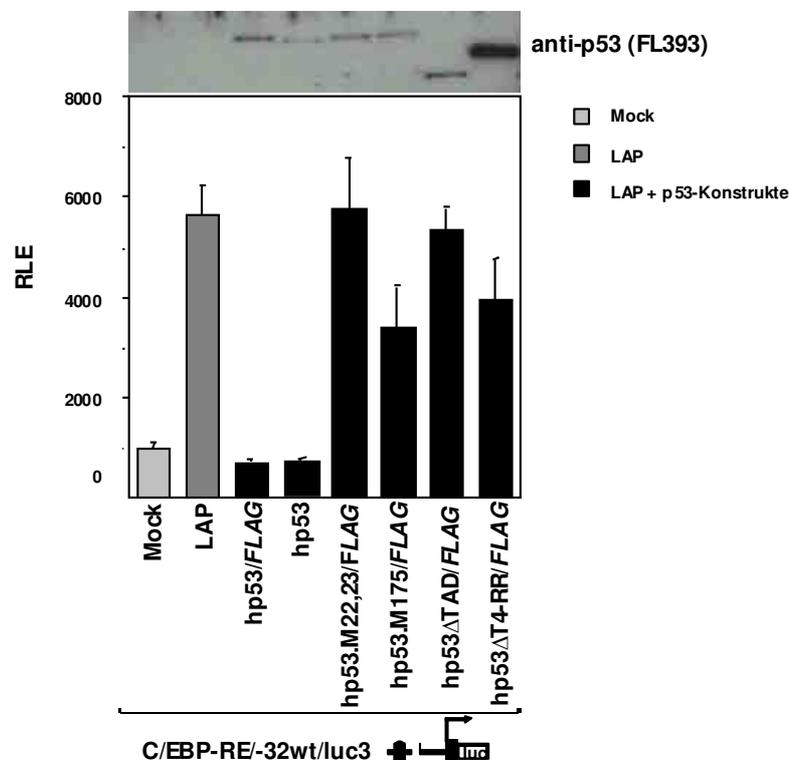
Steigende Mengen an p300-Expressionsvektor führten zu einer Erhöhung der LAP-vermittelten Aktivierung des C/EBP-RE-Reporterergenkonstruktes. Allerdings konnte die p53-induzierte Reduktion der LAP-abhängigen Aktivierung auch durch hohe Mengen an p300 nicht aufgehoben werden (siehe Abb. 4.3, A). Ein ähnlicher Effekt ist mit dem p53-RE zu beobachten. Auch hier führten steigende Mengen an p300-Expressionsvektor zu einer Erhöhung der p53-induzierten Transkription des p53-RE-Reporterergenkonstruktes. Allerdings konnte die LAP-vermittelte Reduzierung des Promotors durch steigende Mengen an p300 nicht revidiert werden (siehe Abb. 4.3, B).

Der Effekt der gegenseitigen Transrepression ist demnach nicht auf eine Konkurrenz um den limitierenden Faktor p300 zurückzuführen.

#### 4.1.5 Wildtyp-Konformation von p53 ist entscheidend für die transkriptionelle Repression von C/EBP $\beta$

Bisher konnte gezeigt werden, dass Wildtyp-p53 zu einer Reduktion der C/EBP $\beta$ -abhängigen Aktivierung eines Promotors führt. Um zu klären, welche Domänen von p53

an dieser Transrepression beteiligt sind, wurden verschiedene p53-Mutanten verwendet, die entweder Punktmutationen in der Transaktivierungsdomäne (TAD) oder der DNA-Bindungsdomäne (DBD) aufweisen oder Deletionen der TAD oder des Carboxyterminus tragen (siehe Abb. 3.1; Kapitel 3.1.3). Die Konstrukte sind zudem mit einem *FLAG*-Epitop markiert, so dass die p53-Mutanten auch über einen *FLAG*-Antikörper detektiert werden können. In Kotransfektionen mit Saos-2-Zellen wurden die p53-Mutanten auf ihre Fähigkeit hin überprüft, die C/EBP $\beta$ -abhängige transkriptionelle Aktivierung zu inhibieren. Dazu wurden die Zellen mit dem Reportergenkonstrukt C/EBP-RE/-32wt/luc3 und Expressionvektoren für LAP (pcDNA/LAP) in Kombination mit p53-Expressionsvektoren kotransfiziert (siehe Abb. 4.5).



**Abbildung 4.5: Repression der LAP-induzierten Transaktivierung durch Wildtyp-p53**

Kotransfektion von Saos-2-Zellen mit dem Reportergenkonstrukt C/EBP-RE/-32wt/luc3 und pcDNA/LAP oder einem Leervektor (pcDNA3.1) allein oder in Kombination mit verschiedenen p53-Expressionsvektoren unter Verwendung der Kalziumphosphat-Präzipitationsmethode. Die Luciferaseaktivität wurde aus Triplikaten bestimmt und aus Gesamtzellextrakten eines vierten *Wells* die Expression der p53-Proteine ermittelt. Der *Western Blot* erfolgte mit dem polyklonalen p53-Antikörper FL393.

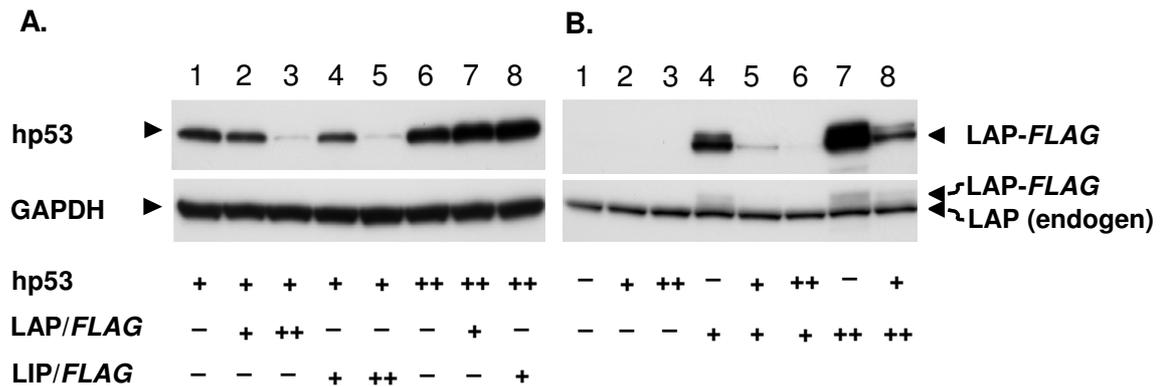
Die Aktivierung des Reportergenkonstruktes C/EBP-RE/-32wt/luc3 durch transfiziertes LAP wurde in Anwesenheit von exogenem Wildtyp-p53 (mit oder ohne *FLAG*) komplett reprimiert. Das *FLAG*-Epitop hat dabei keinen negativen Einfluss auf die Reprimierung, da

Wildtyp-p53/*FLAG* den gleichen Effekt erzielt wie unmarkiertes Wildtyp-p53. Dagegen zeigte die Transfektion der p53-Mutanten (hp53.M22,23/*FLAG*; hp53.M175/*FLAG*; hp53 $\Delta$ TAD/*FLAG*; hp53 $\Delta$ T4-RR/*FLAG*) keine bzw. nur eine sehr schwache Reduktion der LAP-abhängigen Aktivierung des Reportergenkonstruktes. In einer *Western Blot* Analyse aus Gesamtzellextrakten konnte eine gleichmäßige Expression von Wildtyp-p53 und Mutanten-p53 nachgewiesen werden. Eine Ausnahme bildet die Mutante hp53 $\Delta$ T4-RR, die im Vergleich deutlich stärker exprimiert wurde. Diese stärkere Expression ist vermutlich auf eine Stabilisierung des mutierten p53-Proteins zurückzuführen, dem der C-Terminus und damit die entscheidende Domäne für eine Ubiquitylierung durch Mdm-2 fehlt und die somit vor dem Abbau geschützt ist (siehe Kapitel 2.2.3.1).

## **4.2 Überprüfung einer gegenseitigen Proteinreduzierung von exogenem C/EBP $\beta$ und p53**

### **4.2.1 Effekt von transfiziertem p53 auf die Proteinexpression von exogenem C/EBP $\beta$ und *vice versa***

Bei der Überprüfung von Transfektionseffizienzen (siehe Kapitel 4.1) wurde in den *Western Blot* Analysen wiederholt eine Reduktion der exogenen p53-Proteinspiegel in Gegenwart von transfiziertem LAP oder LIP (siehe Abb. 4.1) beobachtet sowie eine Erniedrigung der exogenen LAP- oder LIP-Proteinspiegel durch transfiziertes p53 (siehe Abb. 4.2). Eine derartige Abnahme in den entsprechenden Proteinexpressionen könnte eine mögliche Erklärung für die gegenseitige Reprimierung der transkriptionellen Aktivität beider Proteine sein. Um diesem Phänomen weiter nachzugehen, wurden Gesamtzellextrakte von transfizierten Saos-2-Zellen geerntet und die Expression der Proteine mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. Zur Unterscheidung von endogenem und exogenem C/EBP $\beta$  wurden die Konstrukte für *FLAG*-markiertes LAP (pcDNA/LAP/*FLAG*) und LIP (pcDNA/LIP/*FLAG*) verwendet. In den Transfektionsstudien wurden entweder gleiche Mengen (0,4  $\mu$ g pro 6-Well) oder 10 x mehr (4  $\mu$ g pro 6-Well) Expressionsvektor für Wildtyp-p53 (pcDNA/hp53) und LAP/*FLAG* oder LIP/*FLAG* eingesetzt. Die Proteinspiegel wurden durch *Western Blot* Analysen ermittelt.



**Abbildung 4.6: Nachweis einer gegenseitigen Proteinreduktion von exogenem p53 und C/EBP $\beta$  durch Western Blot Analyse**

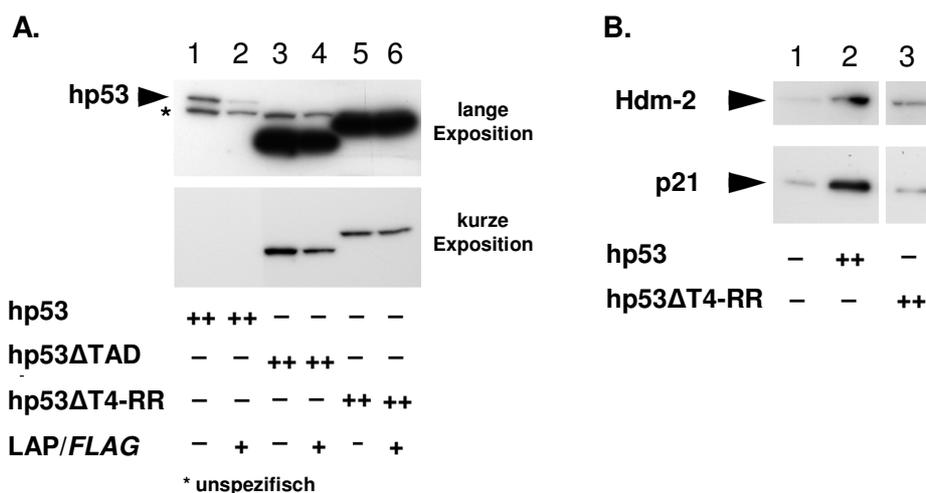
Saos-2-Zellen wurden entweder mit 0,4  $\mu$ g (+) oder 4  $\mu$ g (++) pro 6-Well der Expressionsvektoren für Wildtyp-p53 (pcDNA/hp53), LAP (pcDNA/LAP/FLAG) oder LIP (pcDNA/LIP/FLAG) unter Verwendung der *Lipofectamine*-Methode kotransfiziert. Jeweils 15  $\mu$ g Gesamtzelleextrakt pro Ansatz wurden mit den entsprechenden Antikörpern auf die Expression der jeweiligen Proteine überprüft. A: p53 (anti-p53-DO-1); als Ladekontrolle diente GAPDH (36 kDA; anti-GAPDH; siehe Kapitel 3.4.5); B: exogenes LAP/FLAG (anti-FLAG M2) und endogenes LAP (anti-C/EBP $\beta$ ; SC).

In Abbildung 4.6 A ist der Effekt auf den Proteinspiegel von p53 durch exogenes LAP oder LIP dargestellt, in Abbildung 4.6 B wird der Effekt von p53 auf den exogenen und endogenen C/EBP $\beta$ -Proteinspiegel gezeigt.

Bei Transfektion von gleichen Mengen an Wildtyp-p53 und LAP/FLAG oder LIP/FLAG konnte keine signifikante Reduktion der p53-Proteinexpression beobachtet werden (siehe Abb. 4.6, A; Spur 2, 4; obere Reihe). Die Anwesenheit von hohen Mengen an LAP/FLAG oder LIP/FLAG führte allerdings zu einer massiven Erniedrigung des p53-Proteinspiegels (siehe Abb. 4.6, A; Spur 3, 5). Dagegen zeigten hohe p53-Proteinmengen keine Reduktion durch transfiziertes LAP/FLAG oder LIP/FLAG. Der Nachweis auf GAPDH bestätigte jedenfalls eine gleichmäßige Beladung der einzelnen Ansätze (siehe Abb. 4.6, A). Um den gegenseitigen Effekt der Proteinreduktion zu überprüfen, wurde die Proteinexpression von LAP/FLAG in Gegenwart von p53 untersucht (siehe Abb. 4.6, B). In Ansätzen mit exogenem LAP/FLAG konnte schon bei gleichen Mengen an p53 eine drastische Reduktion des LAP/FLAG-Proteins beobachtet werden (siehe Abb. 4.6, B; Spur 5), dessen Expression durch Transfektion von hohen Mengen an p53 komplett verhindert wurde (siehe Abb. 4.6, B; Spur 6). Selbst hohe Mengen an transfiziertem LAP/FLAG wurden bereits durch geringe Mengen an exogenem p53 reduziert (siehe Abb. 4.6, B; Spur 8; obere Reihe). Um den Einfluss von p53 auch auf den endogenen C/EBP $\beta$ -Proteinspiegel zu untersuchen, wurde der zuvor mit einem FLAG-Antikörper behandelte *Blot* nochmals mit einem C/EBP $\beta$ -Antikörper detektiert (siehe Kapitel 3.4.3.3). Der Nachweis zeigte, dass die

Transfektion von Wildtyp-p53 keinen Effekt auf den endogenen C/EBP $\beta$ -Proteinspiegel erzielte, unabhängig von der exogenen Menge an p53 (siehe Abb. 4.6, B; Spur 2, 3). Darüber hinaus konnte lediglich ein schwacher Nachweis von exogenem LAP/FLAG über den Proteinspiegel an endogenem C/EBP $\beta$  werden beobachtet werden (siehe Abb. 4.6, B; Spur 4, 7), was auf eine schlechte Transfektionseffizienz hinweist.

Um zu überprüfen, welche Domänen von Wildtyp-p53 an der Reduktion des C/EBP $\beta$ -Proteins beteiligt sind, wurden Saos-2-Zellen mit Expressionsvektoren transfiziert, die kodierende Sequenzen für Wildtyp-p53-Protein, mutiertes p53-Protein (pcDNA/hp53 $\Delta$ TAD/FLAG, pcDNA/hp53 $\Delta$ T4-RR/FLAG) oder LAP/FLAG-Protein enthalten. Die Transfektion erfolgte entweder mit hohen Mengen (4  $\mu$ g pro 6-Well) an Wildtyp-p53 und Mutanten-p53-Expressionsvektor allein oder in Kombination mit geringen Mengen (0,4  $\mu$ g pro 6-Well) an LAP/FLAG-Expressionsvektor (siehe Abb. 4.7; A).



**Abbildung 4.7: Nachweis einer Reduktion von p53-Proteinen durch exogenes LAP/FLAG mittels Western Blot Analyse**

Saos-2-Zellen wurden mit 4  $\mu$ g (++) pro 6-Well an Wildtyp-p53 (pcDNA/hp53) oder Mutanten-p53 (pcDNA/hp53 $\Delta$ TAD/FLAG oder pcDNA/hp53 $\Delta$ T4-RR/FLAG) allein oder in Kombination mit 0,4  $\mu$ g (+) pro 6-Well an LAP/FLAG kotransfiziert. Jeweils 15  $\mu$ g Gesamtzell-extrakt wurden mit dem polyklonalen p53-Antikörper (FL393) auf die verschiedenen p53-Proteine detektiert. Aufgrund der starken Expression der p53-Mutanten wurden zwei Expositionen dargestellt (A). Parallel dazu wurden die Gesamtzell-extrakte auf die Expression der endogenen Proteine Hdm-2 (80 kDa) und p21<sup>WAF1</sup> (21 kDa) mit einem monoklonalen Mdm-2 (SMP-14)-Antikörper oder mit einem monoklonalen p21-Antikörper überprüft (B).

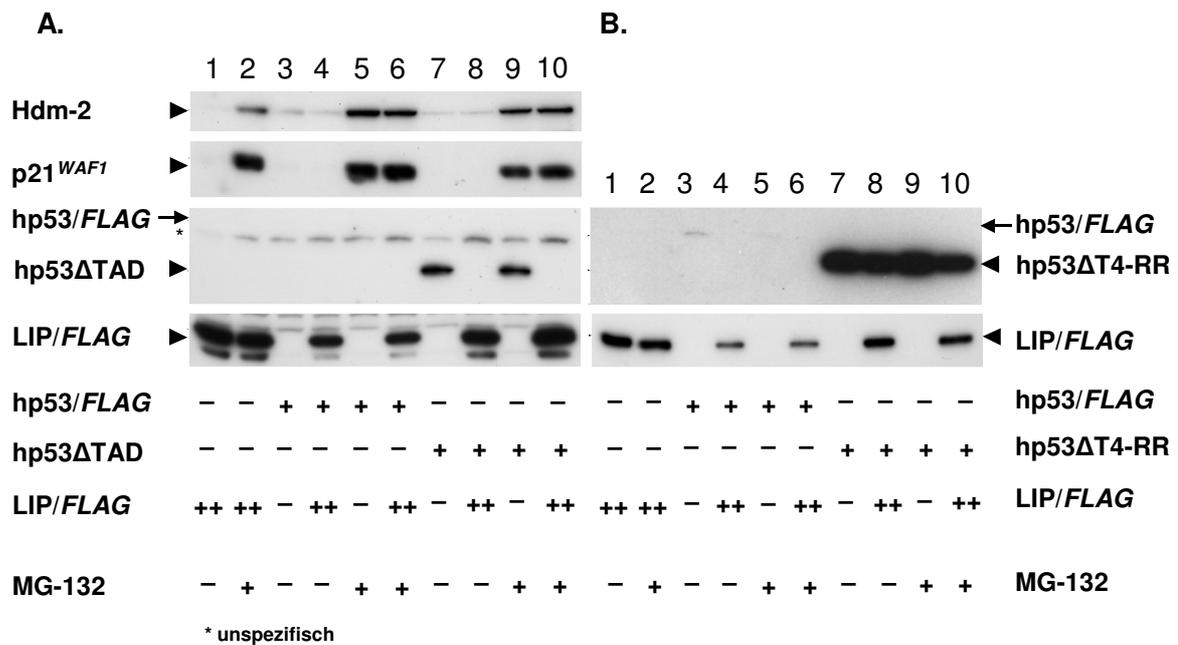
Die Western Blot Analyse von Gesamtzell-extrakten zeigte zunächst eine deutlich geringere Expression von Wildtyp-p53 im Vergleich zu den p53-Mutanten, die daher in einer zweiten, kürzeren Exposition nochmals dargestellt wurden (siehe Abb. 4.7, A). Die Transfektion von LAP/FLAG bewirkte eine drastische Reduktion des Wildtyp-p53-

Proteins, welches aufgrund der geringen Basalexpression kaum noch zu detektieren war (siehe Abb. 4.7, A; Spur 1, 2). Während auch die Mutante p53 $\Delta$ TAD eine schwache Proteinreduktion in Gegenwart von exogenem LAP/*FLAG* aufwies (Abb. 4.7; Spur 4), konnte dagegen im Proteinspiegel der Mutante p53 $\Delta$ T4 kein Effekt durch transfiziertes LAP/*FLAG* beobachtet werden (Abb.4.7; Spur 6). Dies deutet darauf hin, dass die C-terminale Domäne von p53 (T4-RR) scheint eine wichtige Rolle bei der LAP-vermittelten Proteinreduzierung zu spielen.

Zur Bestätigung der transkriptionelle Aktivität von Wildtyp-p53, wurden Saos-2-Zellen auf die Proteinexpression von endogenen p53-Zielgenen überprüft (siehe Abb. 4.7; B). In der *Western Blot* Analyse zeigte sich, dass sowohl Hdm-2 (humanes Mdm-2) als auch p21<sup>WAF1</sup> in Anwesenheit von transfiziertem Wildtyp-p53 hochreguliert wurden, nicht aber durch Transfektion der Mutante hp53 $\Delta$ T4-RR/*FLAG* (siehe Abb. 4.7; B, Spur 2, 3).

#### **4.2.2 Effekt des Proteasom-Inhibitors MG-132 auf die gegenseitige Proteinreduktion**

Im Folgenden sollte nun geklärt werden, ob der Effekt der gegenseitigen Proteinreduktion auf einen erhöhten Abbau von p53 oder C/EBP $\beta$  zurückzuführen ist. Möglicherweise fördert die Anwesenheit von einem der beiden Faktoren die schnellere Erkennung und die damit verbundene Einleitung des Abbaus. Sowohl p53, vermittelt durch das Onkoprotein Mdm-2 (siehe Kapitel 2.2.3.1), als auch C/EBP $\beta$ , werden durch den Ubiquitin-abhängigen 26-S-Proteasom-Komplex abgebaut (Meek & Knippschild, 2003; Hattori, 2003). Wichtig für diesen Abbau sind die C-terminalen Domänen der beiden Proteine. Die Transfektion erfolgte daher entweder mit Wildtyp-p53 (pcDNA/hp53) oder mutiertem p53 (pcDNA/hp53 $\Delta$ TAD/*FLAG*, pcDNA/hp53 $\Delta$ T4-RR/*FLAG*), die beide nicht durch Hdm-2 abbaubar sind oder mit LIP/*FLAG* (pcDNA/LIP/*FLAG*). Saos-2-Zellen wurden entweder mit geringen Mengen (0,4  $\mu$ g pro 6-Well) an p53-Expressionsvektor allein oder in Kombination mit hohen Mengen an LIP/*FLAG* (4  $\mu$ g pro 6-Well) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG-132 behandelt (siehe Kapitel 3.1.2.3) und der Effekt auf die Proteinreduktion oder Proteinstabilisierung in einer *Western Blot* Analyse mit Gesamtzellextrakten verifiziert.



**Abbildung 4.8: Nachweis der Proteinexpression in Gegenwart des Proteasom-Inhibitors MG-132 mittels Western Blot Analyse**

Saos-2-Zellen wurden mit 0,4 µg (+) pro 6-Well an Wildtyp-p53 (pcDNA/hp53) oder p53-Mutanten (pcDNA/hp53ΔTAD/FLAG, pcDNA/hp53ΔT4-RR/FLAG) allein oder in Kombination mit 4 µg (++) pro 6-Well an LIP/FLAG (pcDNA/LIP/FLAG) unter Verwendung der *Lipofectamine*-Methode transfiziert. Anschließend wurden die Zellen über 7 Stunden mit dem Proteasom-Inhibitor MG-132 (30 µM) behandelt. Jeweils 15 µg Gesamtzellextrakt wurden mit den entsprechenden Antikörpern auf die jeweiligen Proteine detektiert: A, Hdm-2 (anti-Mdm-2); p21<sup>WAF1</sup> (anti-p21<sup>WAF1</sup>), hp53-Proteine (anti-p53 FL393), LIP/FLAG (anti-FLAG M2); B, hp53-Proteine (anti-p53 DO-1), LIP/FLAG (anti-FLAG M2); → kennzeichnet die erwartete Laufhöhe von hp53/FLAG.

Die Funktionalität des Proteasom-Inhibitors MG-132 wurde durch Stabilisierung von endogenen Proteinen, wie Hdm-2 und p21<sup>WAF1</sup>, bestätigt, die auch unabhängig von exogenem p53 in Gegenwart des Proteasom-Inhibitors hochreguliert waren (siehe Abb. 4.8, A; Spur 2, 9, 10). Im Gegensatz dazu wurde Wildtyp-p53 nicht bzw. nur sehr schwach exprimiert (siehe Abb. 4.8; A, B; Spuren 3 bis 6). Auch in Anwesenheit des Proteasom-Inhibitors MG-132 konnte keine erhöhte Expression des Wildtyp-p53-Proteins nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu zeigten die p53-Mutanten hp53ΔTAD/FLAG und hp53ΔT4-RR/FLAG sowohl in An- als auch in Abwesenheit von MG-132 eine gleichbleibende Proteinexpression (siehe Abb. 4.8, A; B; Spur 7, 9).

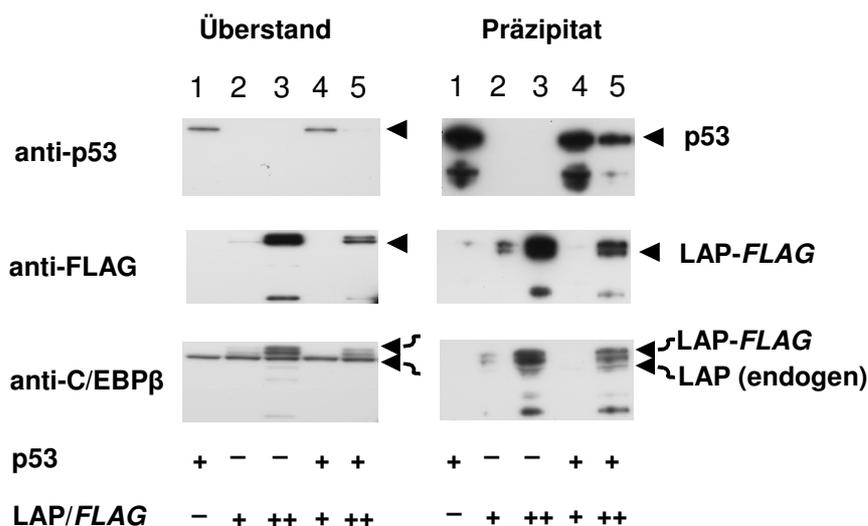
Obwohl das Wildtyp-p53-Protein nicht direkt bzw. nur schwach nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 4.8, A; B; Spuren 3 bis 6), zeigte sich in Kotransfektion mit p53 dennoch eine deutliche Reduktion des LIP-Proteins, die auch in Anwesenheit von MG-132 nicht aufgehoben wurde (siehe Abb. 4.8, A; B; Spur 6). Ein erhöhter Nachweis des LIP/FLAG-Proteins wurde durch den Zusatz von MG-132 nicht erreicht (siehe Abb. 4.8, A; B; Spur 2). In Transfektionen, die entweder mit hp53ΔTAD/FLAG oder mit hp53ΔT4-

RR/*FLAG* durchgeführt wurden, konnte keine bzw. nur eine sehr schwache Reduktion des LIP/*FLAG*-Proteins beobachtet werden (siehe Abb. 4.8, A; B; Spuren 8, 10). Umgekehrt war in Anwesenheit von exogenem LIP/*FLAG* dagegen eine deutliche Reduzierung des hp53 $\Delta$ TAD-Proteins, nicht aber des hp53 $\Delta$ T4-RR-Proteins, zu beobachten (siehe Abb. 4.8, A; Spur 8, 10 gegen B; Spur 8, 10). Dieser Effekt konnte aber auch durch Behandlung mit MG-132 nicht revidiert werden (siehe Abb.4.8, A; Spur 10).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die p53-TAD weder für eine LIP-vermittelte Reduzierung des p53-Proteins, noch für eine p53-vermittelte Reduzierung des LIP-Proteins von Bedeutung ist. Dagegen scheint die C-terminale p53-Domäne (T4-RR) in der gegenseitigen Proteinreduzierung von C/EBP $\beta$  und p53 eine wichtige Rolle zu spielen.

#### **4.2.3 Überprüfung unlöslicher Komplexe von C/EBP $\beta$ und p53**

Die Transkriptionsfaktoren C/EBP $\beta$  und p53 sind in der Lage, multimeren Strukturen auszubilden. C/EBP $\beta$  bildet Homodimere oder Heterodimere mit anderen C/EBP-Isoformen (Hattori, 2003). p53 kann auch in Abwesenheit von DNA als tetramere Struktur existieren, aber auch als Monomer oder Dimer vorliegen (Chène, 2001). Beide sind bekannt dafür, vielfältige Interaktionen mit verschiedenen Proteinen einzugehen. Um zu überprüfen, ob eine Proteinreduktion durch eine Interaktion von transfiziertem, überexprimiertem p53 und C/EBP $\beta$  auf einer Bildung von unlöslichen, multimeren Komplexen basiert, wurden Transfektionen mit Wildtyp-p53 (pcDNA/hp53) und LAP/*FLAG* (pcDNA/LAP/*FLAG*) durchgeführt. Saos-2-Zellen wurden dabei mit p53 allein oder in Kombination entweder mit gleichen Mengen (0,4  $\mu$ g pro 6-Well) oder 10 x mehr (4  $\mu$ g pro 6-Well) an LAP/*FLAG* kotransfiziert. Die Gesamtzellextrakte wurden geerntet (siehe Kapitel 3.4.1.1), zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das resultierende Präzipitat, welches zuvor immer verworfen worden war, wurde direkt in SDS-Ladungspuffer aufgenommen und durch Aufkochen in Lösung gebracht. Der Nachweis auf die entsprechenden Proteine in den Extrakten erfolgte in beiden Fällen durch eine *Western Blot* Analyse (siehe Abb. 4.9).



**Abbildung 4.9: Detektion von Proteinen aus dem Überstand und dem Pellet von transfizierten Saos-2-Zellextrakten mittels Western Blot Analyse**

Saos-2-Zellen wurden mit 0,4 µg (+) pro 6-Well an Wildtyp-p53 (pcDNA/hp53) allein oder in Kombination mit gleichen Mengen (+) oder mit 4 µg (++) pro 6-Well an LAP/FLAG (pcDNA/LAP/FLAG) unter Verwendung der *Lipofectamine*-Methode kotransfiziert. Jeweils 10 µg des Proteins aus dem Überstand des Gesamtzellextraktes (160 µg) oder das gesamte Pellet wurden auf die Expression der entsprechenden Proteine mit den entsprechenden Antikörpern nachgewiesen: p53 mit einem Gemisch aus den p53-Antikörpern DO-1 und PAb421, LAP/FLAG mit dem anti-FLAG M2 und endogenes LAP mit dem anti-C/EBPβ (SC).

Die Detektion der Überstände demonstrierte eine schwache Expression von Wildtyp-p53, die in Anwesenheit von hohen Konzentrationen an exogenem LAP/FLAG deutlich reduziert wurde (siehe Abb. 4.9; Spur 4, 5). Des Weiteren konnte eine LAP/FLAG-Expression nachgewiesen werden, bei der in Anwesenheit von p53 eine deutliche Reduktion zu erkennen war. Damit wurden frühere Beobachtungen der Proteinreduktion bestätigt (siehe Kapitel 4.2.1 bis 4.2.2). Im Vergleich dazu zeigten die *Western Blot* Analysen des Präzipitates sowohl einen deutlich stärkeren Nachweis des exogenen p53-Proteins als auch des transfizierten LAP-FLAG-Proteins. Dennoch war auch hier eine Reduktion in den Ansätzen mit exogenem LAP/FLAG zu beobachten (siehe Abb. 4.9; Spur 4, 5). Dieses Resultat spiegelt damit den Effekt der Proteinreduktion in den Proteinspiegeln des Überstandes wider. Der Nachweis von endogenem LAP zeigte eine deutliche Expression im Überstand, im Präzipitat dagegen nur in Anwesenheit von hohen Mengen an transfiziertem LAP/FLAG (siehe Abb. 4.9; Spur 3, 5). Dies beruht vermutlich auf einer Homodimerisierung der beiden Faktoren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwar eine Komplexbildung durch Homodimerisierung der Proteine im Präzipitat nachgewiesen werden konnte, dass aber der unlösliche Proteinanteil von p53 durch exogenes LAP nicht erhöht und *vice versa*, der

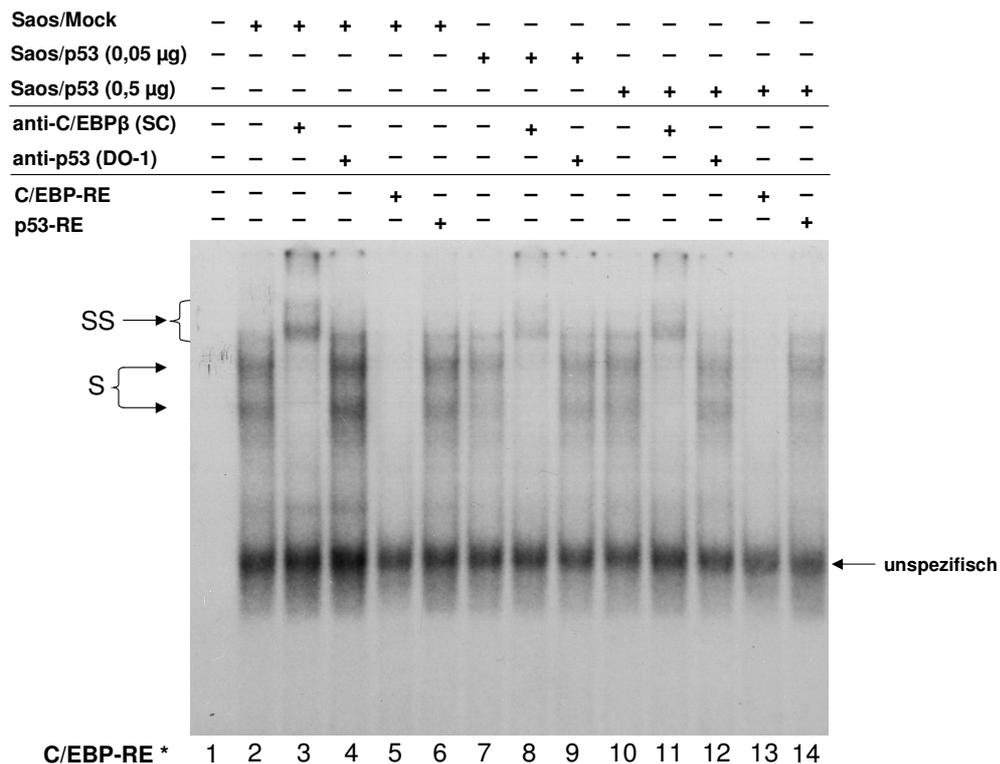
unlösliche Proteinanteil von LAP auch nicht durch exogenes p53 erhöht wurde. Zudem ist eine Proteinreduktion im Überstand nicht auf eine vermehrte Akkumulation im Präzipitat zurückzuführen.

### **4.3 EMSA-Studien zur Analyse einer Interaktion von C/EBP $\beta$ und p53**

In den vorhergehenden Transfektionsstudien zeigte sich eine gegenseitige Beeinträchtigung der transkriptionellen Aktivität von C/EBP $\beta$  und p53 sowie eine gegenseitige Proteinreduktion in den *Western Blot* Analysen. Beide Phänomene deuten auf eine mögliche direkte oder indirekte Interaktion der beiden Faktoren hin. Im *GST-Pulldown* Assay konnte bereits eine Interaktion *in vitro* gezeigt werden (siehe Kapitel 2.5). Der Effekt der gegenseitigen Inhibierung in der Zelle beruht möglicherweise auf einer Protein-Protein-Interaktion der beiden Faktoren. Die Bildung eines Proteinkomplexes aus C/EBP $\beta$  und p53 könnte zum einen zu einer Behinderung der Bindung des entsprechenden Faktors an seine spezifische DNA-Bindungsstelle führen oder sogar zu einer Verdrängung. Eine damit verbundene Einschränkung der Transkription wäre die Folge. Zum anderen könnte möglicherweise einer der Faktoren auch direkt mit einem bereits DNA-gebundenen Faktor interagieren und zur Bildung eines repressorischen oder „inaktiven“ Komplexes führen und eine Inhibierung der Transkription bewirken. Um dieser Frage nachzugehen, wurden zunächst Bindungs-(EMSA)-Studien durchgeführt.

#### **4.3.1 Einfluss von p53 auf die DNA-Bindung von C/EBP $\beta$ *in vitro***

Zunächst sollte untersucht werden, ob p53 in der Lage ist, mit C/EBP $\beta$  zu interagieren oder zu einer Inhibierung der C/EBP $\beta$ -Bindung an sein responsives Element (RE) zu führen. Dazu wurde ein radioaktiv-( $\gamma$ -<sup>32</sup>P)-markiertes ds-Oligonukleotid (C/EBP-RE\*; siehe Kapitel 3.4.4.1) mit Kernextrakten von Saos-2-Zellen inkubiert, die entweder mit einem Leervektor oder mit zwei verschiedenen Konzentrationen an Wildtyp-p53 (pcDNA/hp53) transfiziert worden waren. Ein Teil der Ansätze wurde mit einem Überschuss an unmarkiertem C/EBP-RE oder p53-Konsensuselement (p53-RE) kompetiert oder mit spezifischen Antikörpern gegen C/EBP $\beta$  (SC) oder p53 (DO-1) versetzt (siehe Kapitel 3.4.5). Die Auftrennung der DNA-Proteinkomplexe erfolgte in einer nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 3.4.4.4).



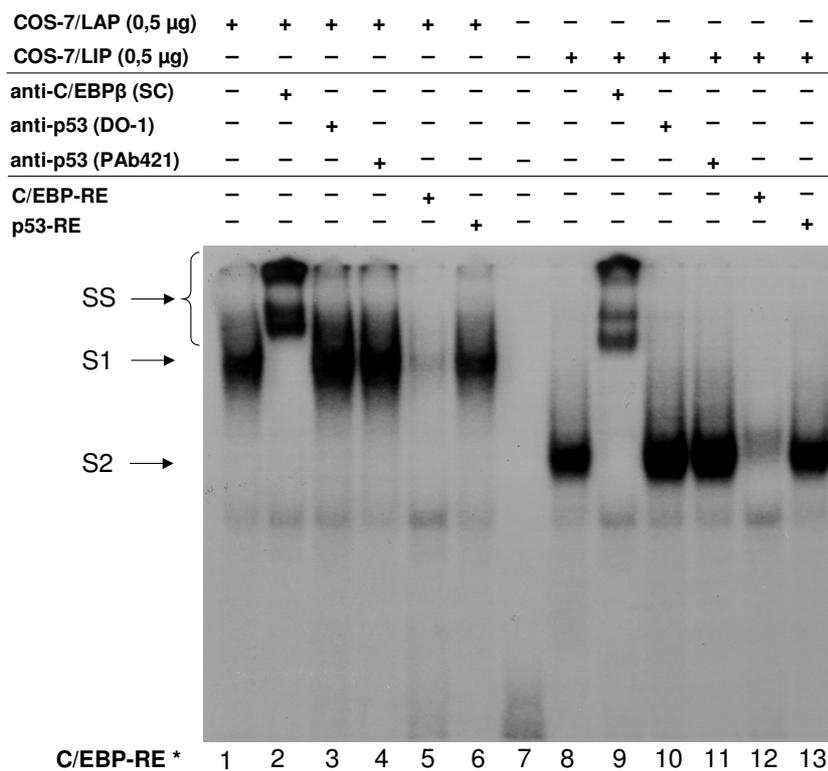
**Abbildung 4.10: Effekt von transfiziertem p53 auf die C/EBPβ-DNA-Bindung im EMSA**

Eine radioaktiv-markierte Sonde (C/EBP-RE\*; Spur 1) wurde mit Kernextrakten von transfizierten Saos-2-Zellen inkubiert. Unter Verwendung der Kalziumphosphat-Präzipitationsmethode wurde die Zelllinie mit unterschiedlichen Mengen an pcDNA/hp53 (0,05 µg oder 0,5 µg pro 6-Well) oder einem Leervektor pcDNA3.1 transfiziert. *Supershifts* wurden mit Antikörpern gegen C/EBPβ (Santa Cruz; SC) oder p53 (DO-1) durchgeführt. Für eine Kompetition wurde ein 300-facher Überschuss an unmarkierter Sonde (C/EBP-RE) oder eines p53-Konsenselementes (p53-RE) eingesetzt. S, *Shift*; SS, *Supershift*.

Endogene C/EBP-Isoformen aus Saos-2-Zellen bildeten mehrere spezifische Komplexe, die durch einen Überschuss an nicht-radioaktiv-markiertem C/EBP-RE komplett verdrängt wurden (siehe Abb. 4.10; Spur 5, 13). Der Zusatz eines polyklonalen C/EBPβ-Antikörpers (Santa Cruz; SC) resultierte in einem „*Supershift*“-Komplex. Dies deutet auf eine Anwesenheit von Komplexen aus C/EBPβ-Homodimeren und/oder Heterodimeren mit anderen Isoformen der C/EBP-Familie hin (siehe Abb. 4.10; Spur 2, 4). In Anwesenheit von transfiziertem p53 waren diese Komplexe zwar ein wenig reduziert (siehe Abb. 4.10; Spuren 7 bis 14), dennoch zeigte die Verwendung eines Überschusses an unmarkiertem p53-RE (siehe Abb. 4.10; Spur 6, 14) oder eines p53-Antikörpers (DO-1) (siehe Abb. 4.10; Spur 4, 12) keinen Einfluss auf die C/EBPβ-Komplexbildung. Dies spricht gegen eine Anwesenheit von p53 in dem C/EBPβ-DNA-Komplex.

Da in Saos-2-Zellen keine eindeutige Inhibierung der DNA-Bindung von C/EBPβ durch transfiziertes p53 gezeigt werden konnte, wurde der Effekt der gegenseitigen Inhibierung

in einem anderen Zellsystem untersucht. COS-7-Zellen (siehe Kapitel 3.1.2.1), eine *Simian* Virus 40-transformierte Zelllinie, weisen, im Gegensatz zu Saos-2-Zellen, einen hohen Gehalt an endogenem Wildtyp-p53 auf. Dies liegt mit dem SV40 T-Antigen assoziiert vor und wird dadurch stabilisiert (Shaulsky et al., 1990). Allerdings besitzen COS-7-Zellen nur einen sehr geringen Anteil an endogenen C/EBP-Isoformen, wie C/EBP $\beta$  oder C/EBP $\delta$  (Pohnke et al., 1999). Die COS-7-Zellen wurden mit C/EBP $\beta$ -Isoformen (pcDNA/LAP, pcDNA/LIP) transfiziert und die gewonnenen Kernextrakte mit einem C/EBP-RE\* inkubiert (siehe Abb. 4.11)



**Abbildung 4.11: Effekt von endogenem p53 auf die C/EBP $\beta$ -DNA-Bindung im EMSA**

Die radioaktiv-markierte Sonde (C/EBP-RE\*; Spur 7) wurde mit Kernextrakten von COS-7-Zellen inkubiert, die unter Verwendung der *Dotap*-Methode mit pcDNA/LAP oder pcDNA/LIP (0,5  $\mu$ g pro 6-Well) transfiziert worden waren. *Supershifts* wurden mit Antikörpern gegen C/EBP $\beta$  (SC) oder p53 (DO-1) oder mit p53 (PAb421) durchgeführt. S1, spezifischer Komplex mit transfiziertem LAP; S2, spezifischer Komplex mit transfiziertem LIP. SS, *Supershift*-Komplex durch den Einsatz eines Antikörpers.

Kernextrakte aus COS-7-Zellen, die mit LAP oder LIP transfiziert worden waren, zeigten bei Inkubation mit einem radioaktiv-markierten C/EBP-RE\* einen starken Komplex, der in Anwesenheit des polyklonalen C/EBP $\beta$ -Antikörpers (SC) einen *Supershift* bildete (siehe Abb. 4.11; Spur 2, 9). Durch einen Überschuss an unmarkiertem C/EBP-RE konnte der LAP- oder LIP-Komplex vom C/EBP-RE\* verdrängt werden (siehe Abb. 4.11; siehe Spur 5, 12). Dagegen zeigte sich weder bei Zusatz eines monoklonalen p53-Antikörpers (DO-1)

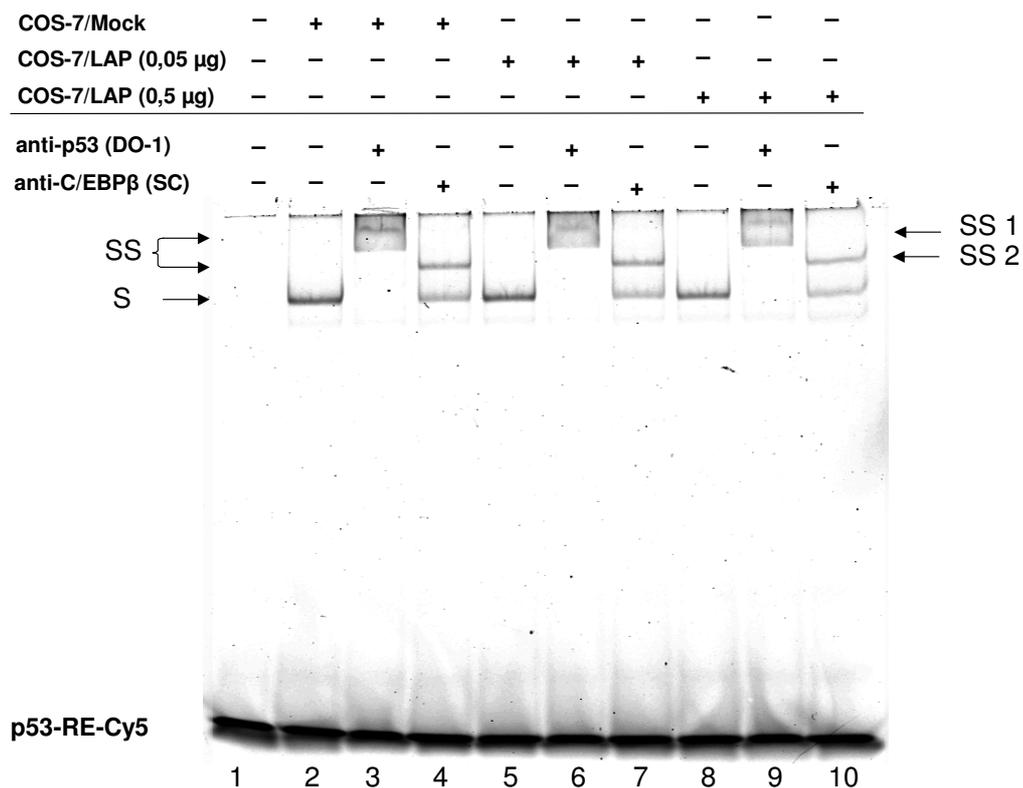
die Bildung eines *Supershifts* (siehe Abb. 4.11; Spur 3, 10), noch konnte, unter Einsatz eines p53-RE-Kompetitors, die Bindung von LAP oder LIP an das C/EBP-RE\* kompetiert werden (siehe Abb. 4.11; Spur 6, 13). Die Verwendung eines weiteren monoklonalen p53-Antikörpers (PAb421), der den Carboxyterminus von p53 erkennt und normalerweise zur Aktivierung sequenzspezifischer DNA-Bindung von p53 *in vitro* eingesetzt wird (Hupp & Lane, 1994), zeigte ebenfalls keine Bildung eines *Supershift*-Komplexes (siehe Abb. 4.11; Spur 4, 11).

Die Beobachtungen der oben dargestellten EMSAs zeigen, dass p53 nicht in der Lage ist an das C/EBP-RE zu binden oder die DNA-Bindungsdomäne von C/EBP $\beta$  sterisch zu behindern, da in beiden Fällen keine Inhibierung der C/EBP $\beta$ -DNA-Bindung zu erkennen war. Der fehlende Nachweis eines *Supershifts* mit den beiden p53-Antikörpern deutet zudem darauf hin, dass p53 nicht mit DNA-gebundenem C/EBP $\beta$  interagieren kann. Allerdings könnte dieser Effekt auch auf einer Blockierung der Antikörperbindungsstellen in einem DNA-LAP-p53-Komplex beruhen.

#### **4.3.2 Einfluss von C/EBP $\beta$ auf die DNA-Bindung von p53 *in vitro***

Saos-2-Zellen weisen einen hohen Proteinspiegel an endogenem C/EBP $\beta$  auf, sind aber p53-defizient. COS-7-Zellen enthalten zwar nur einen sehr geringen Anteil an endogenen C/EBP-Isoformen, wie C/EBP $\beta$  oder C/EBP $\delta$  (Pohnke et al., 1999), dafür aber einen hohen Proteinspiegel an endogenem Wildtyp-p53. Bei der Verwendung von COS-7-Zellen in EMSA-Studien liegt der Vorteil in der Bindungsfähigkeit des endogenen Wildtyp-p53-Proteins an die sequenzspezifische Sonde in Abwesenheit des normalerweise benötigten „aktivierenden“ Antikörpers PAb421 (Hupp & Lane, 1994). Daher wurde diese Zelllinie in weiteren EMSA-Studien genutzt, um eine mögliche Interaktion von p53 und C/EBP $\beta$  genauer zu untersuchen.

Bisher konnte keine eindeutige Inhibierung der C/EBP $\beta$ -DNA-Bindungsfähigkeit durch p53 beobachtet werden. Um zu überprüfen, ob im Gegenzug C/EBP $\beta$  die p53-DNA-Bindung beeinflussen kann, wurden EMSA-Studien mit einer fluoreszenz-markierten p53-Sonde (p53-RE-Cy5; siehe Abb. 4.12; Spur 1) durchgeführt. Diese Sonde wurde mit COS-7-Kernextrakten, die mit zwei verschiedenen Mengen an LAP (pcDNA/LAP) oder einem Leervektor (pcDNA3.1) transfiziert worden waren, inkubiert (siehe Abb. 4.12).

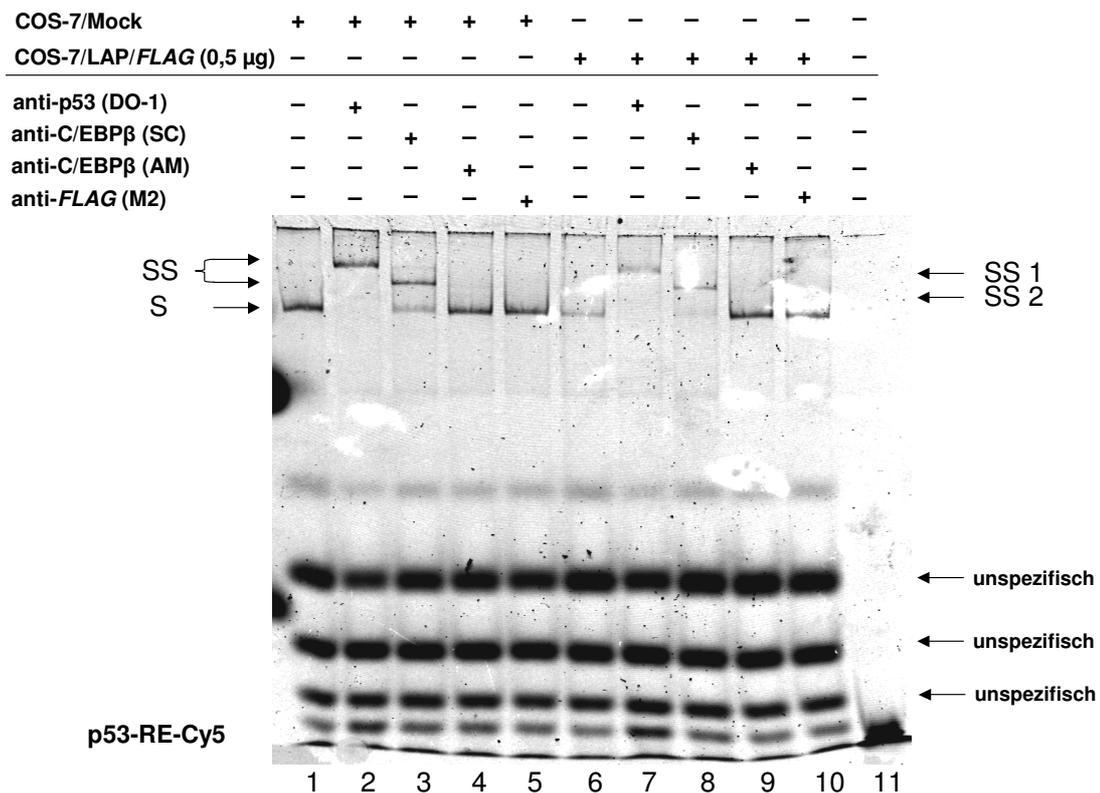


**Abbildung 4.12: Effekt von transfiziertem C/EBPβ auf die p53-DNA-Bindung im EMSA**

Eine fluoreszenz-markierte p53-Sonde (p53-RE-Cy5; Spur 1) wurde mit Kernextrakten von COS-7-Zellen, die mit verschiedenen Mengen an pcDNA/LAP (0,05 µg oder 0,5 µg pro 6-Well) oder mit dem Leervektor pcDNA3.1 unter Verwendung der *Dotap*-Methode transfiziert worden waren, inkubiert. *Supershifts* wurden entweder mit dem monoklonalen p53-Antikörper (DO-1) oder mit dem polyklonalen C/EBPβ-Antikörper (SC) durchgeführt. S, spezifischer Komplex von endogenem p53 aus COS-7-Zellen; SS, *Supershift*-Komplex durch den Einsatz eines Antikörpers; SS 1, *Supershift*-Komplex mit endogenem p53; SS 2, *Supershift*-Komplex durch Einsatz des C/EBPβ-Antikörpers (SC).

Aus Abbildung 4.12 geht hervor, dass p53 in der Lage war an das p53-RE zu binden (Abb. 4.12; siehe Spur 2) und in Anwesenheit eines p53-Antikörpers (DO-1) einen *Supershift* bildete (Abb. 4.12; siehe Spur 3). Die Transfektion von zunehmenden Mengen an exogenem LAP führte zu einer leichten Reduktion der p53-DNA-Komplexbildung (siehe Abb. 4.12; Spur 2, 5, 8). Um eine mögliche Anwesenheit von C/EBPβ in dem p53-DNA-Komplex zu überprüfen, wurde ein indirekter *Supershift* mit einem C/EBPβ-Antikörper (SC) durchgeführt. Es war zu beobachten, dass ein Teil des p53-DNA-Komplexes durch Zugabe des Antikörpers in einem *Supershift* resultierte (siehe Abb. 4.12; Spur 7, 10). Allerdings zeigte sich diese Beobachtung auch in den mit einem Leervektor transfizierten Ansätzen (siehe Abb. 4.12; Spur 4). Der C/EBPβ-Antikörper (SC) erkennt die Aminosäuren 258 bis 276 von C/EBPβ der Ratte. Diese Bindungsstelle ist konserviert und entspricht in humanem C/EBPβ den Aminosäuren 306 bis 324.

Zur Überprüfung des indirekten *Supershifts* wurden weitere Antikörper verwendet und auf ihre Fähigkeit hin untersucht, einen *Supershift* zu bilden. Zum einen wurde ein polyklonaler C/EBP $\beta$ -spezifischer Antikörper von der Firma Active Motif (AM) eingesetzt, der die Aminosäuren 228 bis 242 von humanem C/EBP $\beta$  erkennt und zum anderen ein monoklonaler FLAG M2-Antikörper, der transfiziertes LAP/FLAG erkennt.



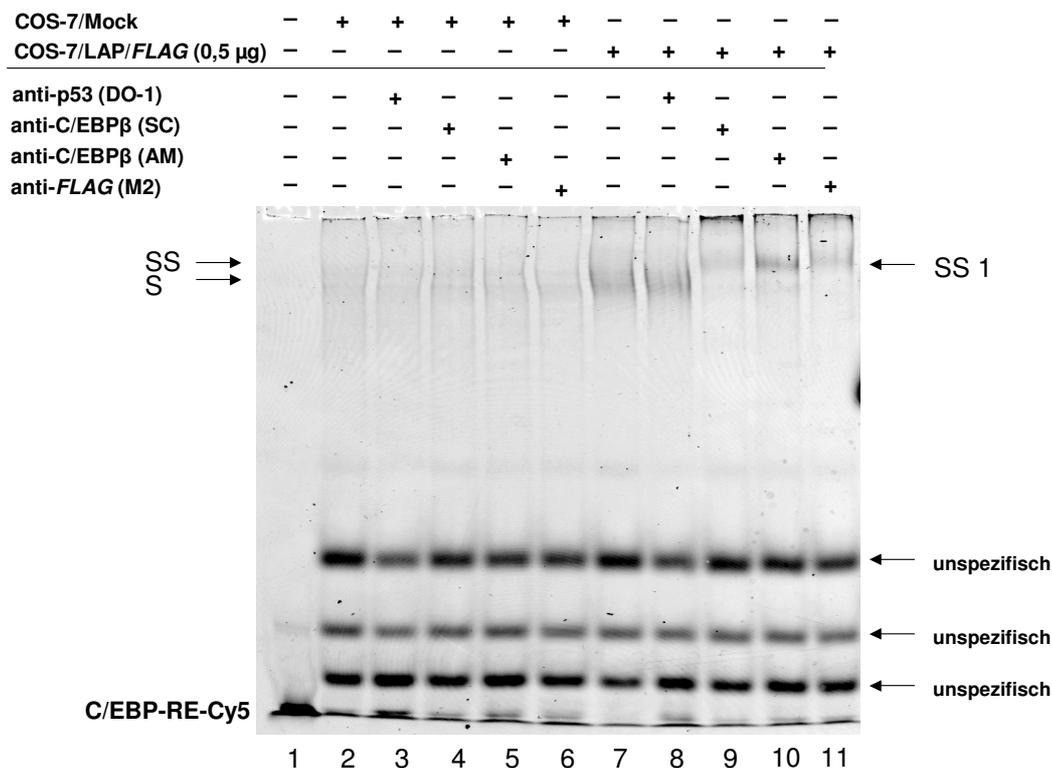
**Abbildung 4.13: Nachweis eines indirekten *Supershifts* von transfiziertem C/EBP $\beta$  im EMSA**

Die fluoreszenz-markierte p53-Sonde (p53-RE-Cy5; Spur 11) wurde mit Kernextrakten von COS-7-Zellen, die mit pcDNA/LAP/FLAG (0,5  $\mu$ g pro 6-Well) oder mit dem Leervektor pcDNA3.1 unter Verwendung der *Dotap*-Methode transfiziert worden waren, inkubiert. Für die *Supershifts* wurden neben dem monoklonalen p53-Antikörper (DO-1) und dem polyklonalen C/EBP $\beta$ -Antikörper (SC), ein weiterer polyklonaler C/EBP $\beta$ - (Active Motif; AM) und ein monoklonaler FLAG M2-Antikörper verwendet. S, spezifischer Komplex von endogenem p53 aus COS-7-Zellen; SS, *Supershift*-Komplex durch den Einsatz eines Antikörpers; SS 1, *Supershift*-Komplex mit endogenem p53; SS 2, *Supershift*-Komplex durch Einsatz des C/EBP $\beta$ -Antikörpers (SC).

Der EMSA in Abbildung 4.13 bestätigte eine Bindung von p53 an sein *Response Element* (p53-RE-Cy5) sowie einen *Supershift* dieses Komplexes mit dem p53-Antikörper DO-1 (siehe Abb. 4.13; SS 1; Spur 2, 7). In Anwesenheit von transfiziertem pcDNA/LAP/FLAG zeigte sich abermals eine Reduktion in der p53-DNA-Bindungsfähigkeit. Außerdem konnte wiederum ein partieller *Supershift* mit dem C/EBP $\beta$ -Antikörper (SC) beobachtet werden (siehe Abb. 4.13; SS 2; Spur 3, 8). Im Vergleich dazu zeigte sich jedoch kein

*Supershift* des p53-Komplexes in Gegenwart des C/EBP $\beta$ -Antikörpers von der Firma Active Motif oder des *FLAG* M2-Antikörpers (siehe Abb. 4.13; Spur 4, 5).

Um die Spezifität und Funktionalität der verwendeten Antikörper zu überprüfen, wurden die transfizierten COS-7-Kernextrakte mit einem fluoreszenz-markiertem C/EBP-RE inkubiert (siehe Abb. 4.14).



**Abbildung 4.14: Spezifitätsnachweis von verschiedenen Antikörpern im EMSA**

COS-7-Kernextrakte, die mit einem Leervektor oder pcDNA/LAP/FLAG (0,5  $\mu$ g pro 6-Well) transfiziert worden waren, wurden mit einem fluoreszenz-markiertem C/EBP-RE inkubiert. Für die *Supershifts* wurden der p53-Antikörper (DO-1), die polyklonalen C/EBP $\beta$  (SC)- und C/EBP $\beta$  (AM)-Antikörper und der *FLAG* M2-Antikörper verwendet. S, spezifische Komplexe; SS, *Supershift* von exogenem LAP/FLAG; SS 1, *Supershift*-Komplexe mit den eingesetzten spezifischen Antikörpern gegen C/EBP $\beta$  bzw. LAP/FLAG.

In den mit einem Leervektor transfizierten COS-7-Zellen, die nur geringe Proteinmengen an endogenen C/EBP-Isoformen aufweisen, ist lediglich eine sehr schwache Komplexbildung zu beobachten. Diese ist auch durch einen *Supershift* nicht darstellbar (siehe Abb. 4.14; Spuren 2 bis 6). Der fehlende Effekt des p53-Antikörpers DO-1 spricht gegen eine unspezifische Bindung von p53 an das C/EBP-RE. In den Extrakten mit kotransfiziertem LAP/FLAG zeigte sich, sowohl in Anwesenheit der beiden C/EBP $\beta$ -Antikörper (SC und AM; siehe Abb. 4.14; Spur 9, 10), als auch mit dem *FLAG* M2-Antikörper (siehe Abb. 4.14; Spur 11), die Bildung eines Komplexes in Form eines *Supershifts*. Mit dem p53-Antikörper (DO-1) konnte jedoch kein *Supershift* beobachtet

werden (siehe Abb. 4.14; Spur 8). Die alleinige Fähigkeit des C/EBP $\beta$ -Antikörpers (SC) einen p53-Komplex auf einem p53-RE zu erkennen, könnte möglicherweise auf einer Kreuzreaktion mit p53 beruhen. Bisher konnte jedoch kein Nachweis von p53 in einer *Western Blot* Analyse unter denaturierenden Bedingungen beobachtet werden. Dies würde auf eine Erkennung einer nativen p53-Konformation durch den C/EBP $\beta$ -Antikörper (SC) hindeuten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass p53 zwar die DNA-Bindung von C/EBP $\beta$  zu inhibieren vermag, aber in einem C/EBP $\beta$ -DNA-Komplex nicht nachzuweisen war. LAP dagegen bewirkt nicht nur die Reduzierung der p53-DNA-Bindungsfähigkeit, sondern scheint auch in einem p53-DNA-Komplex involviert zu sein.

#### **4.4 Untersuchungen zum Nachweis einer Interaktion von C/EBP $\beta$ und p53 *in vivo***

In einem *GST-Pulldown* Assay *in vitro* wurde bereits gezeigt, dass C/EBP $\beta$  und p53 interagieren können (siehe Kapitel 2.5). Zur weiteren Überprüfung dieser Beobachtung *in vivo* wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein *Mammalian Two-Hybrid* Assay und eine Koimmunpräzipitation durchgeführt.

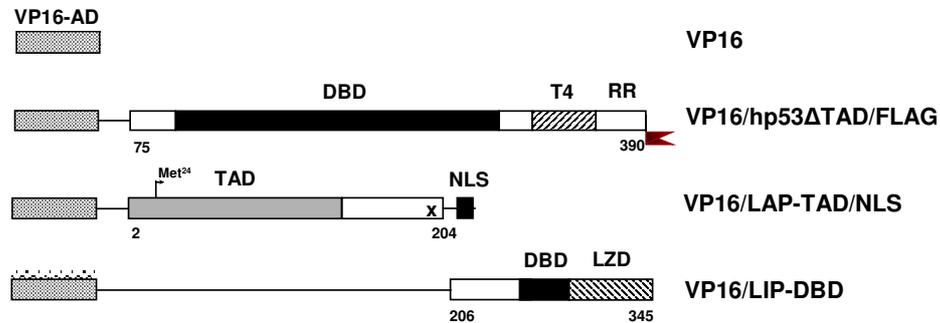
##### **4.4.1 Der *Mammalian Two-Hybrid* Assay**

###### **4.4.1.1 Klonierung von *Mammalian Two-Hybrid* Konstrukten**

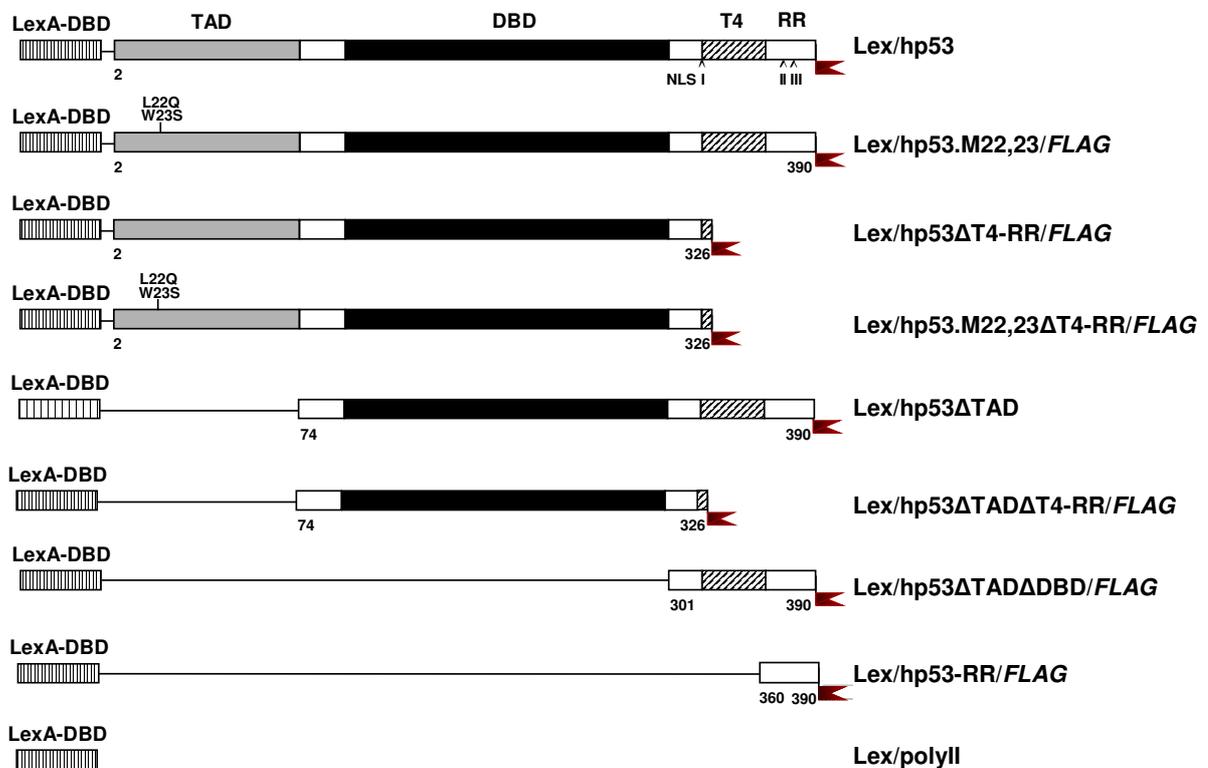
Zum Nachweis der Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 *in vivo* sollte zunächst ein *Mammalian Two-Hybrid* Assay zur Anwendung kommen. Dafür mussten zunächst verschiedenste Konstrukte hergestellt werden. Abbildung 4.15 zeigt eine schematische Darstellung der transaktivierenden Hybridkonstrukte, die aus der VP16-Aktivierungsdomäne (VP16-AD) bestehen und fusioniert sind mit einer p53-Mutante (hp53 $\Delta$ TAD/*FLAG*), der aminoterminalen Domäne (LAP-TAD; Aminosäure 2 bis 204) oder der carboxyterminalen Domäne (LIP-DBD; Aminosäuren 206 bis 345) von C/EBP $\beta$ . Die Klonierung der Konstrukte wurde in Kapitel 3.5.1.1 ausführlich beschrieben. Um die Kernlokalisierung von LAP-TAD zu gewährleisten, wurde dem Konstrukt ein NLS (nukleäres Lokalisationssignal) angehängt, wohingegen LIP-DBD das endogene NLS von C/EBP $\beta$  trägt. Die DNA-Bindungskonstrukte bestehen aus der Lex-DNA-Bindungsdomäne (Lex-DBD), die mit Wildtyp-p53 oder Mutanten-p53 sowie der aminoterminalen oder carboxyterminalen Domäne von C/EBP $\beta$  fusioniert sind. Das

verwendete Reportergerkonstrukt 2xLex/-36rPRL/luc3 besteht aus zwei bakteriellen LexA-Operons, kloniert vor einen Prolaktin-Minimalpromotor der Ratte (-36rPRL) und das Luziferasegen (siehe Abb. 4.15).

A.



B.



C.

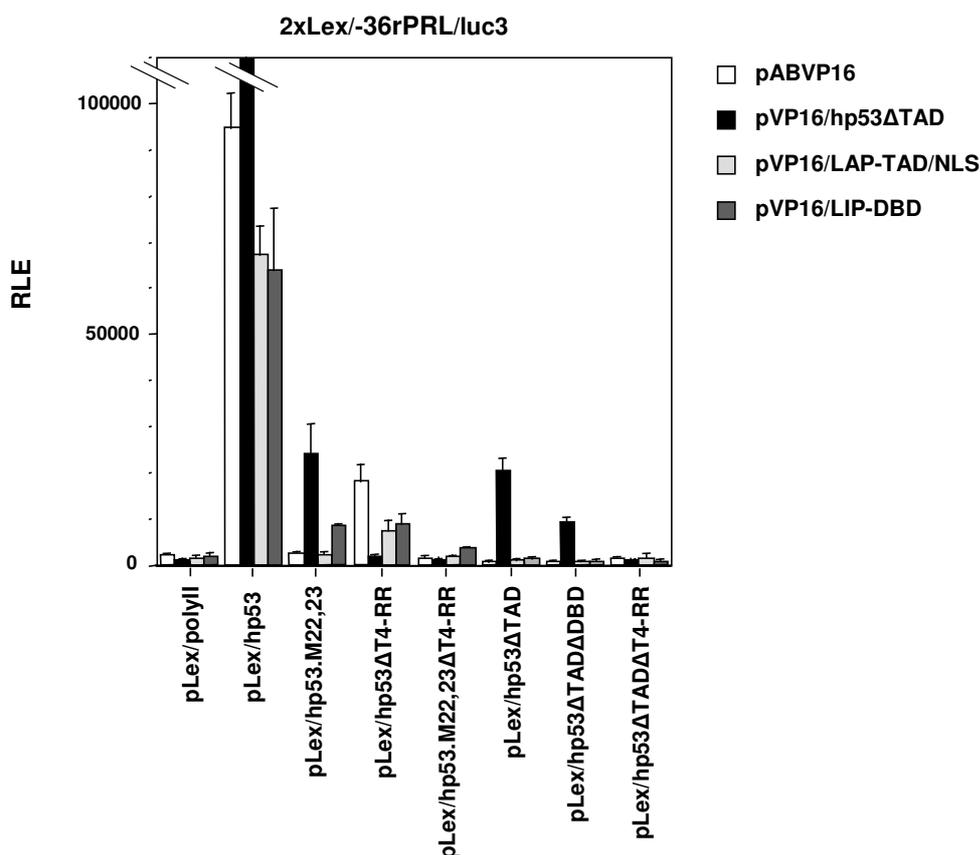


Abbildung 4.15: Schematische Darstellung der *Mammalian Two-Hybrid*-Konstrukte

A, Die VP16-Aktivierungsdomäne (VP16-AD) wurde entweder mit der Mutante hp53ΔTAD/FLAG oder der aminoterminalen Domäne (LAP-TAD), mit einem eingefügten NLS sowie der carboxyterminalen Domäne (LIP-DBD) von C/EBPβ fusioniert. Der mit x gekennzeichnete Bereich ist eine Mutation der Aminosäure Methionin 199. Der Leervektor pAB/VP16 trägt nur die AD. B, Die LexA-DNA-Bindungsdomäne (LexA-DBD) wurde mit Wildtyp-p53 oder den gezeigten p53-Mutanten fusioniert. Der Leervektor pLex/polyII trägt nur die LexA-DBD. C, das verwendete Reportergerkonstrukt 2xLex/-36rPRL/luc3 trägt zwei LexA-Operons (Rauten), die vor einen Prolaktin-Minimalpromotor (-36rPRL) der Ratte und das Luziferasegen (luc) kloniert wurden.

#### 4.4.1.2 Überprüfung einer Interaktion von C/EBP $\beta$ und p53 *in vivo* durch einen *Mammalian Two-Hybrid* Assay

Zur Überprüfung der Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 *in vivo* wurden Saos-2-Zellen mit dem Reporter-genkonstrukt 2xLex/-36rPRL/luc3 und Kombinationen aus transaktivierenden und DNA-bindungsfähigen Fusionskonstrukten kotransfiziert.



**Abbildung 4.16:** Transfektion eines *Mammalian Two-Hybrid* Assays

Saos-2-Zellen wurden mit dem Reporter-genkonstrukt 2xLex/-36rPRL/luc3 und LexA-Fusionskonstrukten aus Wildtyp-p53 oder Mutanten-p53 transfiziert. Mögliche Interaktionen wurden durch Kotransfektion mit VP16-Fusionskonstrukten aus den C/EBP $\beta$ -Domänen (LAP und LIP) angezeigt. Das Fusionskonstrukt pVP16/hp53ΔTAD diente als Positivkontrolle, die Leervektoren pLex/polyII und pABVP16 als Negativkontrolle.

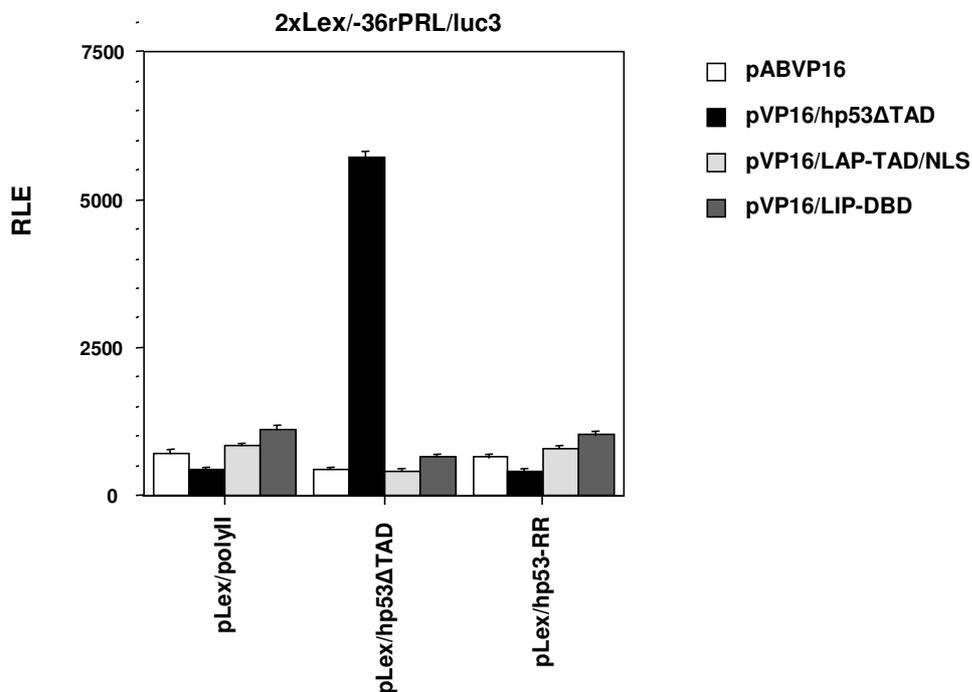
Die Transfektion des Leervektors pLex/polyII führte in Gegenwart von keinem der VP16-Konstrukte zu einer Aktivierung des Reporter-genkonstruktes und diente in diesem Assay als Negativkontrolle (siehe Abb. 4.16). Eine Aktivierung kann nur dann erfolgen, wenn eine Interaktion zwischen zwei Proteinen stattfindet, die Bindung des LexA-Fusionsproteins an die entsprechende Lex-DBD erfolgt und dadurch die Rekrutierung der VP16-Domäne an den Promotor nach sich zieht. Die sehr starke Aktivierung durch Transfektion des Konstruktes pLex/hp53 beruht in diesem Falle allerdings nicht auf der

Kotransfektion der VP16-Fusionskonstrukte, sondern resultiert aus der Transaktivierungsdomäne (TAD) von p53, die in diesem Konstrukt noch vollständig vorliegt. Um dies auszuschließen, wurden weitere Konstrukte eingesetzt, die entweder Mutationen oder Deletionen der p53-TAD aufwiesen. Keines der Lex-Fusionskonstrukte mit einer mutierten (M22.23) oder deletierten ( $\Delta$ TAD) p53-TAD waren in der Lage, eine Reporterogenaktivität zu induzieren. Eine Aktivierung wurde durch Kotransfektion mit dem Fusionsprotein VP16/hp53 $\Delta$ TAD erzielt. Das Protein interagiert mit den p53-Lex-Fusionsproteinen über die Tetramerisierungsdomäne (T4) von p53 und dient daher als Positivkontrolle. In Anwesenheit von VP16-Fusionen mit entweder der aminoterminalen (LAP-TAD) oder der carboxyterminalen (LIP-DBD) Domäne von C/EBP $\beta$ , konnte keine Induktion der Reporterogenaktivität in Gegenwart von p53-Lex-Proteinen beobachtet werden. Das Konstrukt pLex/hp53 $\Delta$ T4-RR war als einziges Protein in der Lage, eine Transaktivierung des Reporterkonstruktes auch ohne das p53-VP16-Protein zu induzieren. Erstaunlicherweise führte die Anwesenheit von VP16-Fusionsproteinen sogar zu einer deutlichen Reduzierung der Reporterogenaktivität. Die Aktivierung ist entweder auf die TAD in diesem Konstrukt zurückzuführen und/oder auf eine Rekrutierung von endogenen Koaktivatoren an den Promotor. Die Reduktion beruht möglicherweise auf einem dominant-negativen Effekt, aufgrund einer Konformationsänderung des Proteins oder der Rekrutierung von Korepressoren.

Eine mögliche Erklärung für den fehlenden Nachweis einer Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 könnte eine Blockierung der entscheidenden interagierenden Domänen sein. Aus dem GST-Pulldown Assay ist bekannt, dass die C-terminalen Domänen für eine Interaktion eine wichtige Rolle spielen (siehe Kapitel 2.5). Mit Ausnahme der p53-Konstrukte, denen ein C-Terminus fehlt ( $\Delta$ T4-RR) (siehe Abb. 4.15; Kapitel 4.4.1.1), sind alle p53-Lex-Proteine (p53wt, p53.M22,23, p53 $\Delta$ TAD, p53 $\Delta$ TAD $\Delta$ DBD) in der Lage, über die T4 miteinander zu interagieren und tetramere/multimere Strukturen, auch in Abwesenheit von DNA, auszubilden (Chène, 2001). Dadurch wäre die C-terminale Domäne möglicherweise für C/EBP $\beta$  nicht mehr zugänglich und eine Interaktion würde verhindert werden. Allerdings ist eine Dimerisierung des Konstruktes VP16-AD/LIP-DBD über die bZIP-Domäne ebenfalls wahrscheinlich (Hattori et al., 2003) und könnte damit ebenfalls eine entscheidende interagierende Domäne besetzen.

Zur Überprüfung einer weiteren Interaktionsmöglichkeit von C/EBP $\beta$  und p53 wurde daher das Konstrukt Lex/hp53-RR hergestellt. Es besitzt nur die kodierende Sequenz für die regulatorische Region (RR; siehe Abb. 4.15; Kapitel 4.4.1.1), die eine unspezifische DNA-

Bindung von p53 vermittelt (Zotchev et al., 2000). Die Abwesenheit der T4 verhindert die Bildung von p53-Dimeren oder -Tetrameren und ermöglicht dadurch eventuell eine Interaktion mit C/EBP $\beta$ .



**Abbildung 4.17:** Transfektion eines *Mammalian Two-Hybrid* Assays mit einer isolierten regulatorischen Region des p53-Proteins

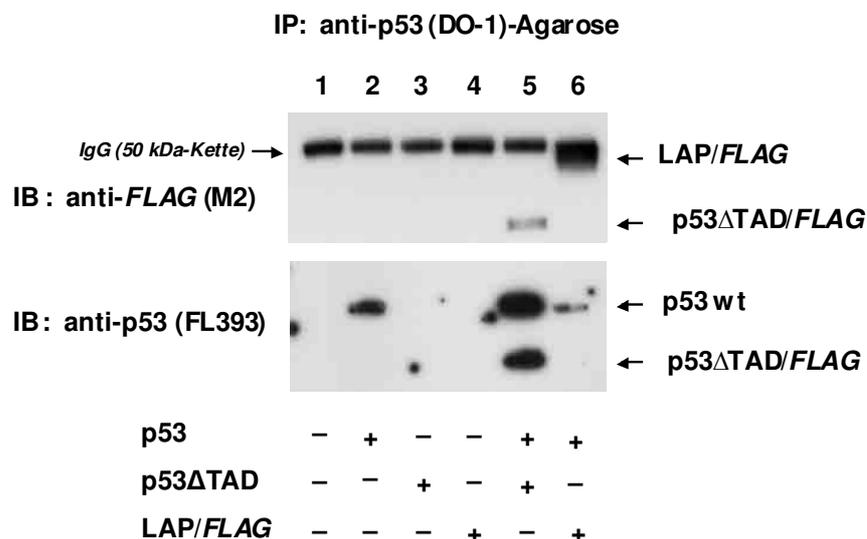
Saos-2-Zellen wurden mit dem Reportergenkonstrukt 2xLex/-36rPRL/luc3 und Lex-Fusionskonstrukten aus Mutanten-p53 transfiziert. Mögliche Interaktionen wurden durch Kotransfektion mit VP16-Fusionskonstrukten aus den C/EBP $\beta$ -Domänen (LAP und LIP) angezeigt. Das Fusionskonstrukt pVP16/hp53 $\Delta$ TAD diente als Positivkontrolle, die Leervektoren pLex/polyII und pABVP16 als Negativkontrolle.

Wie erwartet führte die Transfektion des Leervektors pLex/polyII bei Kotransfektion von VP16-Konstrukten zu keiner Aktivierung des Reportergenkonstruktes. Eine Aktivierung mit dem Fusionsprotein VP16/hp53 $\Delta$ TAD konnte nur mit dem pLex/hp53 $\Delta$ TAD beobachtet werden, allerdings nicht mit einer isolierten RR (p53-RR), weil dieses Protein keine Multimere aufgrund der fehlenden T4 ausbilden kann. Auch mit den C/EBP $\beta$ -VP16-Fusionsproteinen konnte keine Induktion der Reportergenaktivität in Gegenwart des p53-RR-Lex-Proteins nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.17).

#### 4.4.2 Koimmunpräzipitation mit transfizierten Saos-2-Zellen

Da mit dem *Mammalian Two-Hybrid* Assay keine direkte Interaktion von p53 und C/EBP $\beta$  *in vivo* nachgewiesen werden konnte, wurde als weitere Methode die Koimmunpräzipitation zum Nachweis einer Interaktion *in vivo* angewandt. Dazu wurden Saos-2-Zellen mit Wildtyp-p53 (pcDNA/hp53), mutiertem p53

(pcDNA/hp53 $\Delta$ TAD/*FLAG*) und *LAP/FLAG* (pcDNA/*LAP/FLAG*) entweder allein oder in Kombination transfiziert. Anschließend wurden die Gesamtzellextrakte mit einem monoklonalen Antikörper, p53 (DO-1)-Agarose, immunpräzipitiert (siehe Kapitel 3.5.2) und das Eluat mit den entsprechenden Antikörpern auf die Anwesenheit von Wildtyp-p53-, mutiertem p53- und *LAP/FLAG*-Protein überprüft. Die Verwendung der Mutante hp53 $\Delta$ TAD/*FLAG* diente in diesem Fall als Positivkontrolle. Das Protein kann mit dem monoklonalen p53-Antikörper (DO-1) nicht direkt präzipitiert werden, da ihm die von diesem Antikörper erkannte Domäne (TAD) fehlt. Die Interaktion der p53-Proteine über ihre T4 sollte aber in einer Koimmunpräzipitation resultieren. Der Einsatz von *LAP/FLAG* hat den Vorteil, dass eine direkte Interaktion des Proteins mit p53 mit einem *FLAG*-Antikörper nachgewiesen werden kann.



**Abbildung 4.18: Koimmunpräzipitation aus transfizierten Saos-2-Zellen**

Saos-2-Zellen wurden mit Wildtyp-p53 (pcDNA/hp53), Mutanten-p53 (hp53 $\Delta$ TAD/*FLAG*), *LAP/FLAG* (pcDNA/*LAP/FLAG*) oder einem Leervektor (pcDNA3.1) allein (4  $\mu$ g pro 6-Well) oder in Kombination transfiziert. Gesamtzellextrakte wurden mit dem monoklonalen Antikörper p53 (DO-1)-Agarose immunpräzipitiert und auf die entsprechenden Proteine mit den Antikörpern p53 (FL393) (polyklonal) und *FLAG* M2 (monoklonal) detektiert. Der Nachweis mit einem anti-Maus Sekundärantikörper führt zur Erkennung der schweren Kette eines monoklonalen Primärantikörpers (50 kDa). IP, Immunpräzipitation; IB, Immunblot

Wie erwartet, zeigte sich in den Ansätzen, die jeweils nur mit dem Leervektor, der p53-Mutante oder *LAP/FLAG* transfiziert worden waren, keine Detektion der entsprechenden Proteine (siehe Abb. 4.18; Spur 1, 3, 4). Dagegen konnte mit dem p53-Antikörper (FL393) eine Immunpräzipitation des Wildtyp-p53 bestätigt werden (siehe Abb. 4.11; Spur 2). Der fehlende Nachweis mit dem *FLAG*-Antikörper beruht auf dem fehlenden *FLAG*/Epitop im

Wildtyp-p53. Die Koimmunpräzipitation der p53-Mutante, die über die T4 mit Wildtyp-p53 interagieren kann, wurde sowohl mit dem *FLAG*-Antikörper als auch mit dem p53-Antikörper (FL393) bestätigt (siehe Abb. 4.18; Spur 5). Darüber hinaus konnte mit dem *FLAG*-Antikörper in Anwesenheit von Wildtyp-p53 eine Bande auf Höhe des LAP/*FLAG*-Proteins nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.18; Spur 6; oben). Die Anwesenheit des Wildtyp-p53-Proteins wurde in der Immunpräzipitation mit dem p53-Antikörper (FL393) bestätigt (siehe Abb. 4.18; Spur 6; unten). Im Vergleich zur Immunpräzipitation mit der p53-Mutante, zeigte sich allerdings auch hier wieder eine deutliche Reduzierung des ausgefällten Wildtyp-p53-Proteins in Anwesenheit von LAP/*FLAG* (siehe Abb. 4.18; Spur 6; unten).

Die Ergebnisse der Koimmunpräzipitation bestätigten somit eine Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 *in vivo* und damit die Beobachtungen aus dem *GST-Pulldown Assay in vitro*.

#### **4.5 Ergebnisse zur Charakterisierung einer Interaktion zwischen C/EBP $\beta$ und p53**

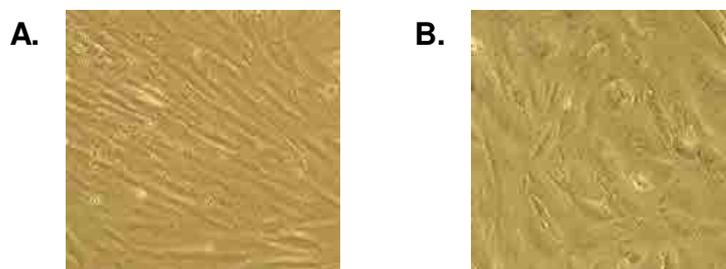
In den Transfektionsanalysen konnte eine gegenseitige Reprimierung der transkriptionellen Aktivität von C/EBP $\beta$  und p53 beobachtet werden. Diese Inhibierung beruhte dabei nicht auf dem Effekt einer Konkurrenz um den limitierenden Kofaktor p300/CBP. Zudem konnte der gegenseitige reprimierende Effekt nicht auf eine Inhibierung des CMV-Promotors durch p53 zurückgeführt werden. Eine immer wieder auftretende Beobachtung der gegenseitigen Proteinreduktion war zunächst eine weitere Erklärung der gegenseitigen Transrepression. Allerdings konnte ein verstärkter Abbau durch den 26-S-Proteasom-Komplex nicht nachgewiesen werden. Auch eine Ausfällung der Proteine durch Bildung unlöslicher Komplexe in der Zelle konnte den Effekt der gegenseitigen Proteinreduktion nicht erklären. Eine schwache gegenseitige Inhibierung zeigte sich auch auf Ebene der DNA-Bindung. Sowohl C/EBP $\beta$  als auch p53 waren in der Lage, die DNA-Bindungsfähigkeit des anderen an sein RE zu reduzieren. Darüber hinaus scheint C/EBP $\beta$  in einem p53-DNA-Komplex enthalten zu sein. Die Beobachtungen einer Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 in einem *GST-Pulldown Assay in vitro* konnte *in vivo* zwar nicht durch einen *Mammalian Two-Hybrid Assay* bestätigt werden, dafür aber in einer Koimmunpräzipitation.

## 4.6 Untersuchungen zur Funktion von p53 im humanen Endometrium

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass p53 sowohl in Kernextrakten von 8-Br-cAMP-behandelten Primärzellkulturen akkumulierte als auch in Zellkernen des endometrialen Stroma-Kompartimentes exprimiert wurde (siehe Abb. 2.9 und 2.10; Kapitel 2.4). Zur Überprüfung einer möglichen Funktion von p53 im Endometrium, wurde das Model der Dezidualisierung von endometrialen Stromazellen (ESZ) als Grundlage für weitere Untersuchungen herangezogen (Telgmann & Gellersen, 1998; Pohnke et al.; 2004).

### 4.6.1 Kultivierung von endometrialen Stromazellen (ESZ)

Endometriale Stromazellen (ESZ) wurden aus uterinem Gewebe isoliert und kultiviert (siehe Kapitel 3.1.1). Die ESZ konnten über mehrere Wochen in Kultur gehalten werden. Um aber eine Vergleichbarkeit der nachfolgenden Versuche zu gewährleisten, wurden nur Zellen der ersten Passage bei einer Konfluenz von 75 % bis 80 % für die *Western Blot*- und RT-PCR-Analysen sowie für die Immunfluoreszenz eingesetzt. Für siRNA-Versuche wurden Zellen der zweiten Passage, aufgrund des hohen Bedarfs an Zellmaterial, verwendet. Die ESZ wurden in einem Minimalmedium gehalten, in dem sie nicht mehr dem hormonellen Einfluss des menstruellen Zyklus unterliegen. Proliferative Zellen zeigen eine spindelförmige, längliche Morphologie (siehe Abb. 4.19; A). Durch Behandlung mit 8-Br-cAMP differenzieren die ESZ innerhalb von 2 bis 6 Tagen zu einem polygonalen, dickeren Phänotyp. Dies ist eine charakteristische Erscheinungsform für sekretorische Zellen und den Prozess der Dezidualisierung. (siehe Abb. 4.19; B).

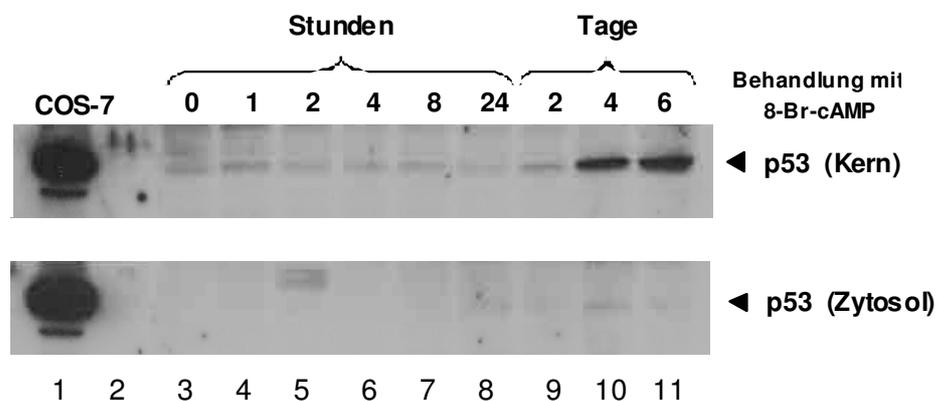


**Abbildung 4.19: Phasenkontrastaufnahmen von primären, humanen endometrialen Stromazellen (ESZ) *in vitro***

Die endometrialen Stromazellen (ESZ) sind unbehandelt (A) oder über 6 Tage mit 8-Br-cAMP (0,5 mM) behandelt (B). Vergrößerung 10 x

#### 4.6.2 Zeitverlauf der p53-Expression in dezidualen ESZ

Die endogene Expression von p53 in menschlichen ESZ wurde bereits von Pohnke et al. (2004) dargestellt. Hierbei wurde eine Erhöhung in den p53-Proteinspiegeln durch eine 8-Br-cAMP-Behandlung über 6 Tage erzielt (siehe Abb. 2.10 A; Kapitel 2.4). In einem Zeitverlauf-Experiment sollte nun die Kinetik der endogenen p53-Expression genauer untersucht werden. Dazu wurden primäre ESZ für eine bis 24 Stunden und über 2 bis 6 Tage mit 8-Br-cAMP (0,5 mM) behandelt. Nach Extraktion von Kern- und Zytosolproteinen aus den behandelten Zellen wurden *Western Blots* angefertigt (siehe Kapitel 3.4.2.1). Es wurden jeweils 15 µg Kernextrakt und 20 µg Zytosolextrakt eingesetzt, um die Expression von p53 zu überprüfen. Als Kontrolle dienten Kernextrakte von COS-7-Zellen, die eine hohe basale p53-Expression aufweisen.



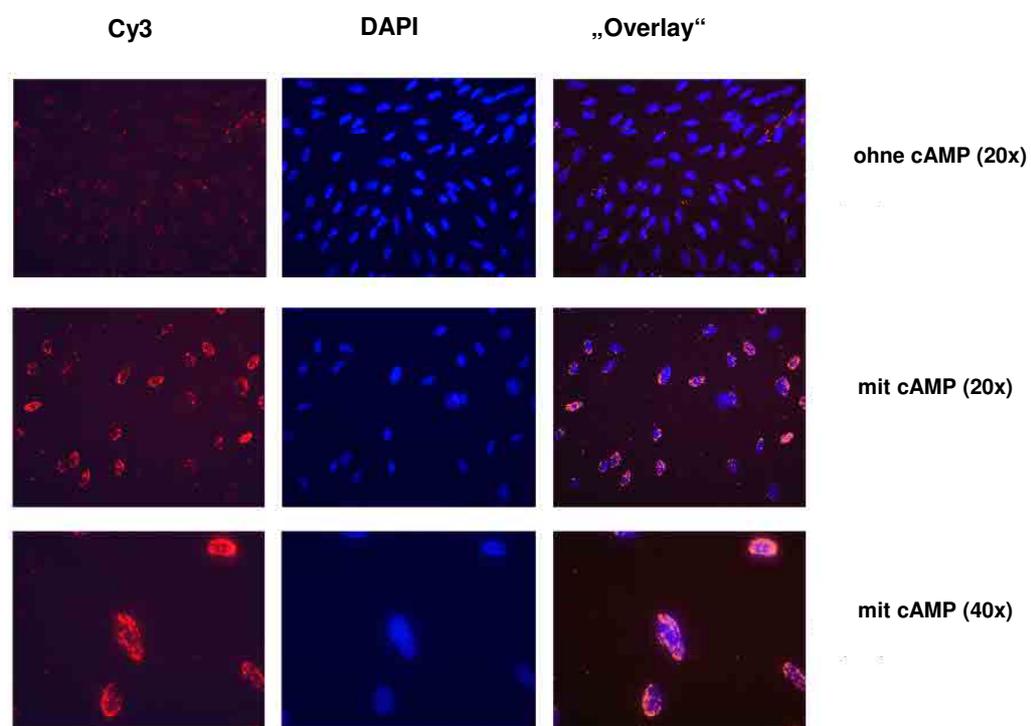
**Abbildung 4.20: Expression von p53 in humanen endometrialen Stromazellen nach Behandlung mit 8-Br-cAMP**

In die *Western Blot* Analyse wurden 15 µg Kernprotein (obere Reihe) und 20 µg Zytosolprotein (untere Reihe) eingesetzt und mit einem polyklonalen p53-Antikörper (FL393) detektiert. Die Zellen waren zuvor über die entsprechende Zeit mit 8-Br-cAMP (0,5 mM) behandelt (Spuren 4 bis 11) oder unbehandelt (Spur 3) belassen worden. COS-7-Zellen wurden als Kontrolle eingesetzt (Spur 1).

In Abbildung 4.20 ist ein Vergleich der p53-Expression in Kern- und Zytosol-Extrakten von stimulierten ESZ dargestellt. Die Akkumulation von p53 im Kern ist nicht akut, sondern beginnt erst nach 2 bis 4 Tagen der cAMP-Behandlung (siehe Abb. 4.20; Spur 9, 10) und verbleibt auch nach 6-tägiger Behandlung noch erhöht (siehe Abb. 4.20; Spur 11). Im Zytosol dagegen ist lediglich eine schwache p53-Expression zwischen einem und 6 Tagen zu beobachten. Die schwache Doppelbande nach 2 Stunden 8-Br-cAMP-Behandlung (siehe Abb. 4.20; Spur 5) könnte auf ubiquitinyliertes p53 hindeuten.

### 4.6.3 Nachweis von endogenem p53-Protein in ESZ durch Immunfluoreszenz

Um die Kernlokalisierung des p53-Proteins unter dem Einfluss von 8-Br-cAMP in ESZ zu bestätigen, wurden die Zellen für 6 Tage mit 8-Br-cAMP (0,5 mM) stimuliert und die Kontrollen unstimuliert belassen. Es erfolgte eine Fixierung der Zellen durch Methanol und eine anschließende Permeabilisierung mit TritonX-100, um die Zellen für die darauf folgende Detektion durchlässig zu machen. Der Nachweis wurde mit einem monoklonalen p53-Antikörper (PAb421) und einem Cy3-markierten, sekundären Antikörper mittels indirekter Immunfluoreszenz durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit 4,6-Diamidino-2'-Phenylindol (DAPI) gegengefärbt (siehe Abb. 4.21).



**Abbildung 4.21: Zelluläre Lokalisierung von endogenem p53 in ESZ durch indirekte Immunfluoreszenz**

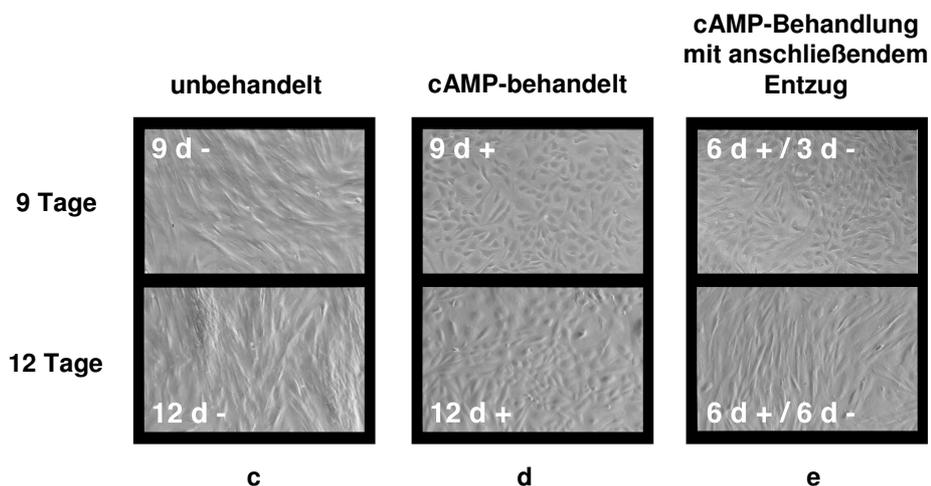
ESZ wurden für 6 Tage mit 8-Br-cAMP (0,5 mM) behandelt (Mitte, unten) oder unbehandelt belassen (oben). Anschließend wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen p53-Antikörper (PAb421) und einem Cy3-markierten Sekundärantikörper durchgeführt (linke Spalte). Zellkerne wurden mit 4,6-Diamidino-2'-Phenylindol (DAPI) gegengefärbt (mittlere Spalte). Eine Überlagerung (rechte Spalte) zeigt eine Kernlokalisierung von p53 in cAMP-stimulierten ESZ (Vergrößerung: obere beiden Bildreihen, 20 x; untere Bildreihe, 40 x).

In den 8-Br-cAMP-behandelten Zellen ist nicht nur eine starke Induktion von endogenem p53-Protein zu beobachten, sondern auch eine ausschließliche Ansammlung von p53 in den Zellkernen (siehe Abb. 4.21, Mitte/unten links). Eine Gegenfärbung mit DAPI bestätigt dies („Overlay“, Mitte/unten links). Im Vergleich zu den 8-Br-cAMP-behandelten

Zellen ist in den unbehandelten Zellen lediglich eine sehr schwache Färbung im Zytosol einiger Zellen zu erkennen (siehe Abb. 4.21; obere Reihe, links).

#### 4.6.4 Expression von p53 und p53-Zielgenen im Dezidualisierungsprozess von ESZ

Zur Charakterisierung der Funktion und Regulation von p53 in differenzierenden ESZ wurde zum einen die Expression von p53 während des Prozesses der Dezidualisierung analysiert, zum anderen erfolgte eine Überprüfung der Expression und Aktivität von p53-Zielgenen und Genen, die an der Differenzierung von ESZ beteiligt sind (Pohnke et al., 2004). Dazu wurde eine Präparation von ESZ der ersten Passage auf fünf T75-Zellkulturflaschen aufgeteilt und ein Teil über 6 Tage mit 8-Br-cAMP behandelt (0,5 mM) oder unbehandelt belassen (a, b; in Abb. 4.22 nicht dargestellt). Ein anderer Teil wurde über 12 Tage mit 8-Br-cAMP behandelt (siehe Abb. 4.22; c) oder unbehandelt belassen (siehe Abb. 4.22; d). Ein weiterer Ansatz wurde über 6 Tage mit 8-Br-cAMP behandelt und anschließend einem Entzug des Stimulus über 6 Tage ausgesetzt (siehe Abb. 4.22; e). Nach 9 und 12 Tagen Behandlung wurden die Kulturen der ESZ fotografiert (siehe Abb. 4.22; c bis e). Die Kulturen a und b zeigten nach 6 Tagen 8-Br-cAMP-Stimulation das gleiche Erscheinungsbild wie die Kulturen c bis d und wurden daher nicht noch einmal gesondert dargestellt (siehe Abb. 4.22).

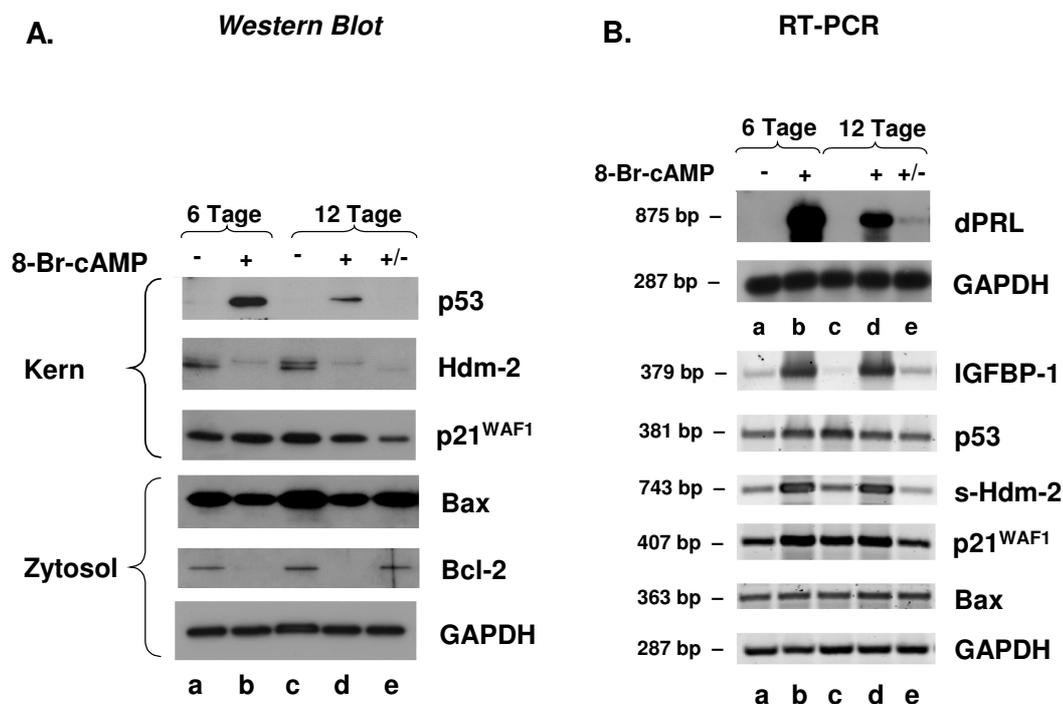


**Abbildung 4.22: Reversible Dezidualisierung von ESZ durch Entzug des cAMP-Stimulus**

ESZ wurden in fünf parallelen Ansätzen (a bis e) kultiviert: unbehandelt (a, nicht dargestellt), 6 Tage 8-Br-cAMP-Behandlung (b, nicht dargestellt), 12 Tage unbehandelt (c), 12 Tage 8-Br-cAMP-Behandlung (d), 6 Tage 8-Br-cAMP-Behandlung mit anschließendem Entzug über 6 Tage (e). Von den Kulturen (c bis e) wurden nach 9 und 12 Tagen Phasenkontrastaufnahmen gemacht (Vergrößerung 20 x).

Die unstimulierten Zellen zeigten einen spindelförmig-länglichen Phänotyp (siehe Abb. 4.20; Kultur c), während die stimulierten ESZ nach 9 und 12 Tagen 8-Br-cAMP-Behandlung eine rundliche, polygonale Morphologie (siehe Abb. 4.20; Kultur d) aufwiesen. Zellen, die zunächst über 6 Tage mit 8-Br-cAMP stimuliert worden waren, zeigten auch nach drei Tagen 8-Br-cAMP-Entzug immer noch die deziduale Erscheinungsform (siehe Abb. 4.20; Kultur e, oberes Bild). Mit fortlaufendem Entzug von 8-Br-cAMP über weitere drei Tage vollzog sich allerdings eine komplette Umgestaltung in den Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp (siehe Abb. 4.22; Kultur e, unteres Bild).

Nach 6 und 12 Tagen wurden von den jeweiligen Kulturansätzen (a bis e) Protein- und RNA-Extrakte hergestellt und mit Hilfe der *Western Blot* oder RT-PCR-Methode analysiert (siehe Abb. 4.23).



**Abbildung 4.23: Expression von mRNA und Proteinen im Dezidualisierungsprozess durch RT-PCR und *Western Blot* Analysen**

Western Blot (A) und RT-PCR Analysen (B) von endometrialen Stromazellkulturen, die über 6 und 12 Tage mit 8-Br-cAMP (0,5 mM) behandelt (b, d) oder unbehandelt (a, c) belassen wurden oder über 6 Tage mit 8-Br-cAMP behandelt und anschließend einem Entzug von 6 Tagen ausgesetzt wurden (e). Es wurden Kern- und Zytosol-Proteinextrakte sowie zytoplasmatische RNA isoliert. Kernextrakte (15 µg/Ansatz) wurden auf p53 (anti-p53-FL393), Hdm-2 und p21WAF1 detektiert, Zytosolextrakte auf Bax, Bcl-2 und GAPDH (A). RT-PCR Analysen wurden mit den entsprechenden mRNAs durchgeführt (B). Die Detektion von dPRL und GAPDH cDNAs erfolgte durch eine Southern Blot Analyse (B, obere Abb.), während IGFBP-1-, p53-, s-Hdm-2-, p21WAF1-, Bax- und GAPDH-Amplifikate durch eine SYBR-Gold-Färbung nachgewiesen wurden (B, untere Abb.).

Es wurden Kern- und Zytosolextrakte isoliert (siehe Kapitel 3.4.1.2) und die Proteinexpression von p53 und bereits gut charakterisierten p53-Zielgenen, p21<sup>WAF1</sup> und Hdm-2, im Kern nachgewiesen sowie das pro-apoptische Bax-Protein und das anti-apoptische Bcl-2-Protein im Zytosol (siehe Abb. 4.23, A). GAPDH diente als Ladekontrolle für die einzelnen Ansätze (Hsieh et al., 2004).

In Extrakten von unbehandelten Kulturansätzen konnte sowohl nach 6 Tagen als auch nach 12 Tagen kein p53-Protein detektiert werden (siehe Abb. 4.23; a, c). Durch eine 8-Br-cAMP-Behandlung von 6 Tagen wurde eine starke p53-Expression induziert (siehe Abb. 4.23; b), die auch nach 12 Tagen noch erhöht war (siehe Abb. 4.23; d), allerdings etwas schwächer im Vergleich zur einer 6 Tage andauernden Behandlung. In Kulturansätzen mit einem 6-tägigem Entzug von 8-Br-cAMP (siehe Abb. 4.23; d) konnte beobachtet werden, dass die Proteinexpression von p53 auf den Level der unstimulierten Ansätze reduziert war. Ein wichtiges Zielgen von p53 ist das Onkoprotein Hdm-2 (humanes Mdm-2) (Lane & Hall, 1997) mit einer Größe von etwa 80 kDa, wobei auch kürzere Produkte von 60 kDa auftreten können (Pochampally et al., 1998). Es zeigte sich eine deutlich stärkere Detektion des Hdm-2-Proteins in Kernextrakten von unstimulierten Ansätzen im Vergleich zu den 8-Br-cAMP-behandelten Ansätzen, in denen p53 nicht zu detektieren war. Des Weiteren konnten zwei Banden zwischen 60 kDa und 80 kDa (siehe Abb. 4.23; a, c) beobachtet werden. In den 8-Br-cAMP-behandelten Ansätzen (siehe Abb. 4.23; b, d) konnte nur die größere Proteinbande, und im Verhältnis deutlich schwächer, nachgewiesen werden. Im Ansatz mit einem 8-Br-cAMP-Entzug war dagegen nur eine schwache Expression des kleineren Hdm-2-Proteins zu erkennen (siehe Abb. 4.23; e). Das Zellzyklusprotein p21<sup>WAF1</sup> zeigte bei der Detektion der Kernextrakte eine kontinuierliche Proteinexpression in allen Kulturansätzen. Lediglich in dem Entzugsansatz konnte eine leichte Reduktion beobachtet werden (siehe Abb. 4.23; e). Die Expression des pro-apoptischen Bax-Proteins konnte in allen Ansätzen nachgewiesen werden, allerdings war der Proteinspiegel in 8-Br-cAMP-behandelten Zellen etwas reduziert (siehe Abb. 4.23; b, d). Der Nachweis des anti-apoptischen Bcl-2-Proteins zeigte eine erhöhte Expression in den unstimulierten Ansätzen (siehe Abb. 4.23; a, c) oder dem Entzugsansatz (siehe Abb. 4.23; e) im Vergleich zu Ansätzen mit 8-Br-cAMP-Behandlung (siehe Abb. 4.23; b, d), in denen das Protein nicht oder nur sehr schwach detektiert werden konnte. Die GAPDH-Kontrolle zeigte eine gleichmäßige Beladung der einzelnen Spuren.

Um den Einfluss der 8-Br-cAMP-Stimulation auch auf Transkriptebene zu untersuchen, wurden RT-PCR Analysen durchgeführt (siehe Abb. 4.23, B). Dazu wurden, neben den wichtigsten Dezidualisierungsmarkern, dPRL (DiMattia et al., 1990) und IGFBP-1 (siehe Kapitel 2.3.4), die Transkription von p53 und p53-Zielgenen, wie p21<sup>WAF1</sup>, Hdm-2 und Bax überprüft. Zunächst wurde die Expression des dezidualen Prolaktins (dPRL), untersucht, das mit Hilfe eines *Southern Blots* durch Hybridisierung mit einer internen Sonde (siehe Kapitel 3.3.5) nachgewiesen wurde. Die Behandlung der ESZ mit 8-Br-cAMP über 6 und 12 Tage führte zu einer sehr starken Aktivierung der dPRL-Expression (siehe Abb. 4.23, B; b, d), die allerdings nach 12 Tagen leicht erniedrigt war. In unbehandelten Kulturansätzen (siehe Abb. 4.23; a, c) unterblieb die Induktion. Eine deutliche Reduktion der dPRL-mRNA-Expression erfolgte dagegen in den Ansätzen mit einem Entzug des 8-Br-cAMP-Stimulus über 6 Tage (siehe Abb. 4.23; e). Dies korreliert mit der morphologischen Veränderung der ESZ in diesem Zeitraum (siehe Abb. 4.23; e). Die Kontrolle mit GAPDH zeigte eine gleichmäßige Expression von mRNA. Die folgenden RT-PCR Analysen wurden zum Nachweis der Amplifikate einer SYBR-Gold-Färbung (siehe Kapitel 3.3.6) unterzogen. Die Detektion von IGFBP-1, ebenfalls ein Dezidualisierungsmarker (Gao et al., 1994), zeigte einen ähnlichen Verlauf der mRNA-Expression wie dPRL und bestätigte damit die Ergebnisse in den Ansätzen mit dem Entzug von 8-Br-cAMP (siehe Abb. 4.23; e). p53 und p21<sup>WAF1</sup> zeigten eine gleichbleibende mRNA-Expression in allen Kulturansätzen und damit eine von der 8-Br-cAMP-Behandlung unabhängige Regulation der Promotoren. Dagegen war eine erhöhte Amplifikationsrate von s-Hdm-2, das kurze (*short*) Produkt des p53-induzierbaren Hdm-2 P2-Promotors, in Ansätzen mit 8-Br-cAMP-Behandlung (siehe Abb. 4.23; b, c) zu erkennen, gefolgt von einer deutlichen Reduzierung der mRNA-Expression in Ansätzen mit 8-Br-cAMP-Entzug (siehe Abb. 4.23; e). Die Expression des Apoptosefaktors Bax zeigte keine Veränderung durch Behandlung mit 8-Br-cAMP in den mRNA-Leveln und scheint ebenfalls cAMP-unabhängig reguliert zu sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Behandlung mit 8-Br-cAMP über 6 und 12 Tage nicht nur in einer morphologischen Veränderung der ESZ resultierte, sondern auch zur Hochregulierung von mRNA spezifischer Dezidualisierungsmarker wie dPRL und IGFBP-1 führte sowie zu einer erhöhten p53-Protein-Expression. Der Entzug des 8-Br-cAMP-Stimulus führte zu einer Erniedrigung aller Komponenten und resultierte in einer gleichzeitigen Veränderung des dezidualen Phänotyps von ESZ in eine undifferenzierte

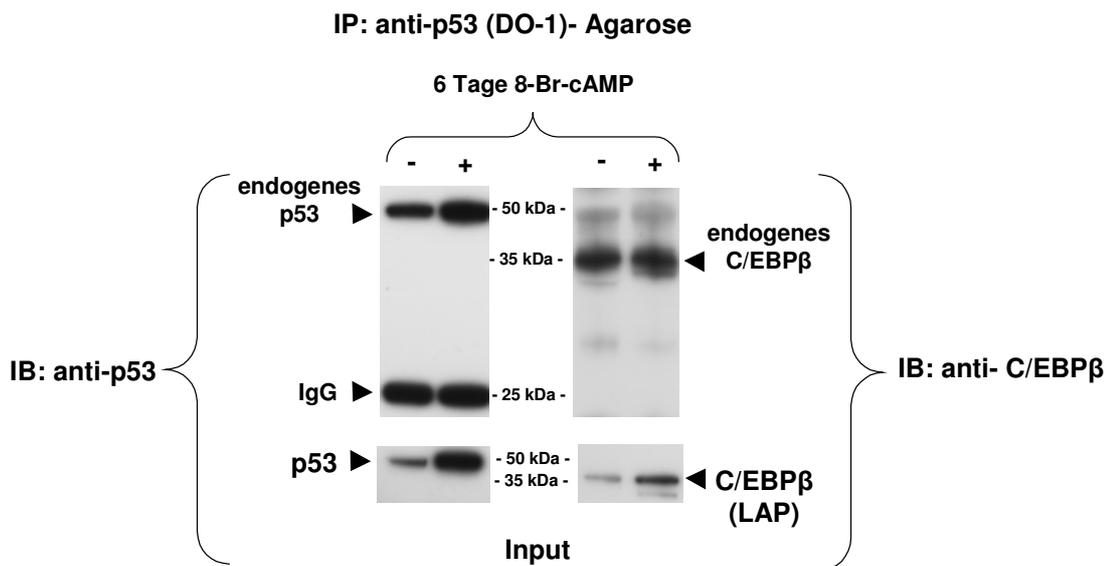
Form. Während die p53-Zielgene p21<sup>WAF1</sup> und Bax keine Regulation auf mRNA-Ebene zeigten, scheint Hdm-2 reguliert zu werden. Die Transkriptionsrate von s-Hdm-2 war in Ansätzen mit 8-Br-cAMP-Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten Ansätzen deutlich erhöht. Dies korreliert mit der Anwesenheit von erhöhten p53-Proteinspiegeln, die als Konsequenz zu einer p53-vermittelten Aktivierung des P2 Hdm-2-Promotors führen. Diese Beobachtungen stehen allerdings im Widerspruch zu den Beobachtungen des Proteinnachweises von Hdm-2. Erhöhte Hdm-2-Proteinspiegel sind dabei nicht allein auf eine erhöhte Transkription zurückzuführen, obwohl der Hdm-2 P2-Promotor durch p53 induziert zu sein scheint. Bei den Proteinen könnte es sich um Produkte des konstitutiven p53-unabhängigen Hdm-2 P1-Promotors handeln, der zur Entstehung von verschiedenen Hdm-2-Splicevarianten führen kann (Olson et al., 1993). Die im Kern erniedrigten Hdm-2-Proteinspiegel sind vermutlich nicht nur auf eine Blockade der Kernlokalisierung zurückzuführen, sondern möglicherweise auch auf einen erhöhten Kernexport und vermehrten Abbau von Hdm-2 im Zytoplasma. Die p53-Proteinspiegel sind auch unabhängig von einer veränderten Transkriptionsrate in 8-Br-cAMP-behandelten Ansätzen deutlich erhöht, was hauptsächlich auf eine posttranskriptionelle Regulation hinweist. Obwohl in Gegenwart von hohen p53-Proteinmengen eine Hochregulierung des Zielgenes Bax zu erwarten war, konnte weder auf mRNA- noch auf Protein-Ebene eine erhöhte Expression beobachtet werden. Auch das p53-Zielgen p21<sup>WAF1</sup> zeigte keine verstärkte Expression der mRNA oder des Proteins in Gegenwart von erhöhtem p53. Dagegen konnte ein reduzierter Proteinspiegel von Bcl-2, einem Faktor, der durch p53 inhibiert wird, in Anwesenheit von hohen p53-Proteinmengen nachgewiesen werden.

#### **4.6.5 Koimmunpräzipitation mit ESZ**

Die Überprüfung einer möglichen Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 wurde bisher nur in Systemen durchgeführt, in denen beide Proteine transfiziert wurden. In dezidualen ESZ ist nicht nur C/EBP $\beta$  hochreguliert (Pohnke et al., 1999), sondern auch p53 (siehe Kapitel 4.6.4) (Pohnke et al., 2004). Daher wurde das Model der Dezidualisierung von ESZ zur Untersuchung einer Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 herangezogen (Telgmann & Gellersen, 1998; Pohnke et al., 1999, 2004). Hierbei wird die Expression der beiden Faktoren durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels induziert, so dass C/EBP $\beta$  und p53 endogen vorliegen.

Um eine Interaktion *in vivo* zwischen endogenem p53 und C/EBP $\beta$  zu bestätigen, wurde eine Koimmunpräzipitation mit Extrakten von ESZ durchgeführt. Die Zellen wurden

entweder über 6 Tage mit 8-Br-cAMP stimuliert oder unstimuliert belassen. Nach der Ernte (siehe Kapitel 3.5.2) wurden 200 µg Gesamtzellextrakt mit dem p53-Antikörper (DO-1)-Agarose (siehe Kapitel 3.4.5) immunpräzipitiert und das resultierende Präzipitat mit den entsprechenden Antikörpern auf die Anwesenheit der Proteine p53 und C/EBPβ überprüft. In der Immundetektion wurde ein F(ab)<sub>2</sub>-spezifischer Sekundärantikörper (siehe Kapitel 3.4.5) eingesetzt, der nur die leichten Ketten (25 kDa) eines monoklonalen (Maus) Primärantikörpers erkennt (siehe Abb. 4.24).



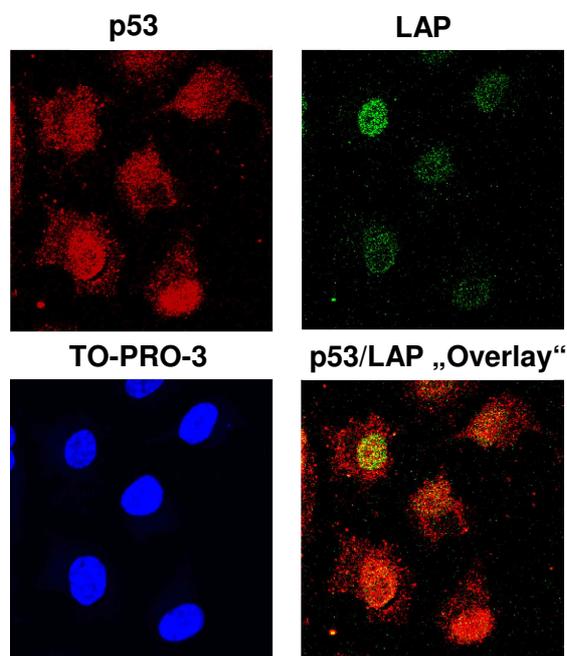
**Abbildung 4.24: Koimmunpräzipitation von endogenem C/EBPβ und p53 in ESZ**

ESZ wurden über 6 Tage mit 8-Br-cAMP (0,5 mM) behandelt (+) oder unbehandelt (-) belassen. Gesamtzellextrakte wurden mit dem monoklonalen p53-Antikörper (DO-1)-Agarose immunpräzipitiert. In die Detektion des p53-Proteins wurde ein Gemisch aus den monoklonalen Antikörpern p53 (DO-1) und (PAb421) eingesetzt sowie ein F(ab)<sub>2</sub>-spezifischer Sekundärantikörper, mit dem nur leichten Ketten (25 kDa) eines Primärantikörpers detektiert werden. Der Nachweis einer Koimmunpräzipitation des endogenen C/EBPβ wurde mit einem polyklonalen C/EBPβ-Antikörper (SC) durchgeführt. Der Nachweis der eingesetzten Proteinmenge („Input“; untere Abb.) zeigt eine endogene Expression von p53 und C/EBPβ, die durch eine 8-Br-cAMP-Behandlung deutlich erhöht sind.. IP, Immunpräzipitation; IB, Immunblot.

Der Nachweis der endogenen Proteinexpression von C/EBPβ und p53 zeigte eine deutliche Hochregulierung beider Faktoren durch eine 8-Br-cAMP-Behandlung über 6 Tage („Input“; siehe Abb. 4.24; untere Abb.). Eine Immunpräzipitation von p53 erfolgte sowohl in den behandelten als auch in den 8-Br-cAMP-unbehandelten Ansätzen, die ebenfalls eine schwache Expression des endogenen p53-Proteins aufwiesen. Eine Koimmunpräzipitation von endogenem C/EBPβ konnte in beiden Ansätzen nachgewiesen werden und bestätigt damit eine Interaktion von C/EBPβ und p53 *in vivo*.

#### 4.6.6 Lokalisationsnachweis von endogenem C/EBP $\beta$ und p53 in ESZ durch konfokale Immunfluoreszenz

Für den Nachweis einer Interaktion von zwei Proteinen ist die zelluläre Lokalisation von ganz entscheidender Bedeutung. Eine direkte Interaktion kann nur dann zustande kommen, wenn beide Partner zur gleichen Zeit am gleichen Ort sind. Um eine mögliche Ko-Lokalisation von endogenem C/EBP $\beta$ - und p53-Protein unter dem Einfluss von cAMP in ESZ zu untersuchen, wurden die Zellen für 6 Tage mit 8-Br-cAMP (0,5 mM) behandelt (siehe Abb. 4.25).



**Abbildung 4.25: Nachweis der Kernlokalisierung von C/EBP $\beta$  und p53 in ESZ durch konfokale Immunzytochemie**

ESZ wurden über 6 Tage mit 8-Br-cAMP (0,5 mM) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Methanol fixiert und mit 0,2 %-igem TritonX-100 permeabilisiert. Die Detektion der entsprechenden Proteine erfolgte entweder mit einem p53-Antikörper (PAb421) oder einem C/EBP $\beta$  (LAP)-Antikörper (Cell Signaling; CS). Anschließend wurde die indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit einem Cy3 (rot)- oder Cy2 (grün)-markierten Sekundärantikörper durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit TO-PRO-3 (blau) gegengefärbt. Die Überlagerung („Overlay“) zeigt eine nur in Teilen überlappende Lokalisation (gelb) von p53 und LAP in subnukleären Strukturen (Vergrößerung 40  $\times$ ).

Um eine mögliche Kreuzreaktion des C/EBP $\beta$ -Antikörpers (Santa Cruz; SC) mit p53 auszuschließen (siehe Kapitel 4.3.2), wurde der LAP-spezifische Antikörper von der Firma Cell Signaling (CS) verwendet (siehe Kapitel 3.4.5).

Während eine Akkumulation von endogenem p53 überwiegend im Kern, aber auch im Zytoplasma von 8-Br-cAMP-behandelten ESZ zu beobachten war (siehe Abb. 4.25; links oben), akkumulierte endogenes C/EBP $\beta$  (LAP) ausschließlich im Kern (siehe Abb. 4.25; rechts oben). Eine Gegenfärbung mit TO-PRO-3 bestätigte dies (siehe Abb. 4.25; unten links). Allerdings zeigte sich, dass die Ko-Lokalisation (gelbe Färbung) von p53 und C/EBP $\beta$  nicht unmittelbar oder nur zum Teil in subnukleären Strukturen überlappend ist (siehe Abb. 4.25; unten rechts).

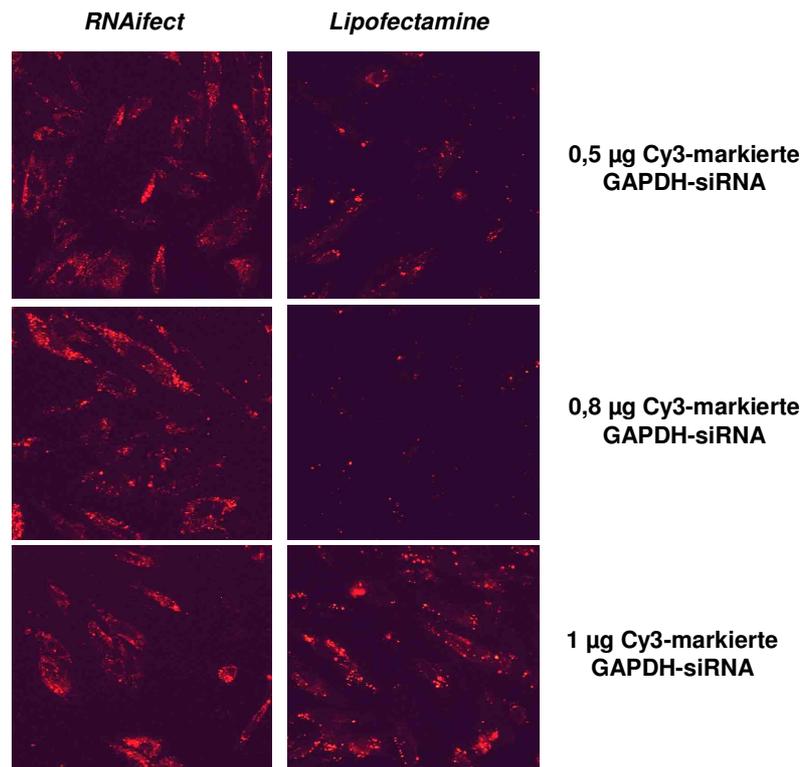
#### **4.6.7 Einfluss eines p53-Knock down auf den Dezidualisierungsprozess**

Im Zuge einer 8-Br-cAMP-Behandlung und der damit einhergehenden Dezidualisierung von ESZ konnte nicht nur eine morphologische Veränderung der Zellen beobachtet werden, sondern auch die Akkumulation von endogenem p53-Protein. Der Entzug des Stimulus führte darüber hinaus nicht nur zu einem Verlust des Dezidualisierungsstatus, sondern resultierte gleichzeitig in einem Rückgang der p53-Proteinexpression (siehe Abb. 4.23; A; Kapitel 4.6.4).

Um die Funktion von p53 im Dezidualisierungsprozess genauer zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit versucht, das RNA *interference* (RNAi), in ESZ zur Anwendung zu bringen. Der Mechanismus dieser Methode beruht auf kleinen RNA-interagierenden RNA-Molekülen, si (*small interference*)-RNAs, die zu einer sequenz-spezifischen Erkennung und zum Abbau von RNA führen. Das Resultat ist ein „*Knock down*“-Phänotyp des entsprechenden Gens (Elbashir et al., 2001; Sharp, 1999; Zamore et al., 2000). Um den Effekt eines *Knock down* und damit eine mögliche Rolle von p53 im Dezidualisierungsprozess von ESZ zu untersuchen, wurden verschiedene p53-siRNA-Oligonukleotide hergestellt (siehe Kapitel 3.6.2). Anschließend wurden die ESZ mit den p53-siRNA-Oligonukleotiden transfiziert, über verschiedene Zeiträume mit 8-Br-cAMP stimuliert und der Effekt auf Proteinebene durch *Western Blot* Analysen überprüft.

##### **4.6.7.1 Vergleich verschiedener siRNA-Transfektionsmethoden durch Immunfluoreszenz**

Zunächst wurde die Transfektionseffizienz von siRNA-Oligonukleotiden mit verschiedenen Transfektionsmethoden durch Immunfluoreszenz untersucht. Dazu wurden ESZ mit verschiedenen Konzentrationen an markierter Cy3-GAPDH-siRNA oder Cy3-negativ-siRNA (0,5  $\mu$ g, 0,8  $\mu$ g und 1  $\mu$ g pro 24-Well) entweder mit der *Lipofectamine*- oder der *RNAitect*-Methode transfiziert. Der Nachweis der Cy3-markierten Proteine erfolgte durch eine direkte Immunfluoreszenz (siehe Abb. 4.26).



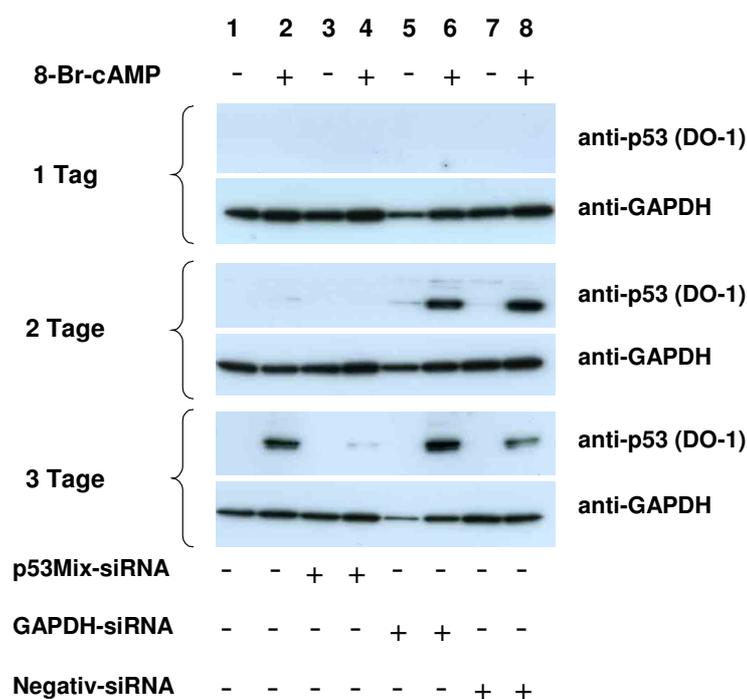
**Abbildung 4.26: Lokalisation von transfizierten Cy3-GAPDH-siRNA-Oligonukleotiden in ESZ durch direkte Immunfluoreszenz**

ESZ wurden mit selbst hergestellter Cy3-GAPDH-siRNA unter Verwendung der *RNAifect*-Methode oder der *Lipofectamine*-Methode transfiziert. Es wurden verschiedene Mengen (0,5 µg, 0,8 µg und 1 µg pro 24-Well) verwendet und die Lokalisation der Cy3-siRNAs durch direkte Immunfluoreszenz ermittelt (Vergrößerung 10 x).

Der Vergleich der beiden Transfektionsmethoden zeigte eine deutlich bessere Transfektionsrate mit der *RNAifect*-Methode mit bereits geringen Mengen an Cy3-GAPDH-siRNA (0,5 µg pro 24-Well; siehe Abb. 4.26; links, oben). Die Verwendung von höheren Konzentrationen von transfizierten siRNA-Oligonukleotiden führte zu keiner stärkeren Aufnahme in das Zytosol der ESZ. Im Gegensatz dazu konnte mit der *Lipofectamine*-Methode lediglich in den Ansätzen mit einer hohen Menge an Cy3-GAPDH-siRNA (1 µg pro 24-Well) eine Aufnahme in die Zellen beobachtet werden (siehe Abb. 4.26; rechts, unten). Alle folgenden siRNA-Transfektionen wurden daher mit *RNAifect* durchgeführt. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass ein Experiment auch in Gegenwart von Antibiotika durchgeführt werden kann. Die Transfektion erfolgte mit 0,5 µg siRNA pro 24-Well bzw. 2,5 µg siRNA pro 6-Well, in einem Verhältnis von 1:6 (siRNA:*RNAifect*)

#### 4.6.7.2 p53-Knock down in siRNA-behandelten ESZ

Um die Möglichkeit eines *Knock down* von p53 im Dezidualisierungsprozess des Endometriums näher zu untersuchen, wurden zwei Präparationen von ESZ entweder mit verschiedenen siRNA-Oligonukleotiden transfiziert oder untransfiziert belassen (siehe Kapitel 3.6.4). Anschließend wurden Zellen einer Präparation über 1, 2 und 3 Tage mit 8-Br-cAMP behandelt bzw. Zellen einer zweiten Präparation wurden einer Behandlung von 6 Tagen ausgesetzt. Um die Effizienz des p53-Knock down zu erhöhen, wurde eine Kombination aus drei verschiedenen p53-siRNA-Oligonukleotiden eingesetzt (siehe Kapitel 3.6.2). Als Positivkontrolle wurde eine siRNA gegen das Haushaltsgen GAPDH verwendet sowie eine *scrambled*-siRNA als Negativkontrolle. Der Effekt der transfizierten siRNA-Oligonukleotide wurde auf Proteinebene mittels *Western Blot* Analysen (siehe Kapitel 3.4.3) verifiziert (siehe Abb. 4.27).



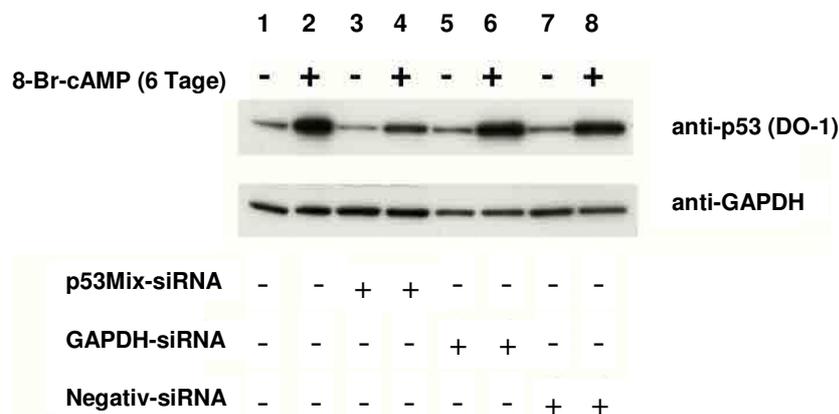
**Abbildung 4.27: Nachweis eines p53-Knock down in 8-Br-cAMP-stimulierten ESZ mittels *Western Blot* Analyse**

ESZ einer Präparation wurden entweder mit einem Gemisch aus p53-siRNA-Oligonukleotiden oder positiv- (GAPDH)- und negativ-siRNA-Oligonukleotiden unter Verwendung der *RNAi*fect-Methode transfiziert (2,5 µg pro 6-Well) oder untransfiziert belassen. Danach erfolgte eine Stimulation mit 8-Br-cAMP (0,5 mM) über einem Zeitraum von 1, 2 und 3 Tagen. Gesamtzellextrakte wurden auf die Proteinexpression von p53 und GAPDH durch den Einsatz eines monoklonalen p53-Antikörpers (DO-1) oder GAPDH-Antikörpers untersucht

In unstimulierten Ansätzen mit transfizierter GAPDH-siRNA zeigte sich bereits nach einem Tag eine Reduktion des GAPDH-Proteins (siehe Abb. 4.27; Spur 5). In Ansätzen

mit einer 8-Br-cAMP-Behandlung wurde jedoch keine Erniedrigung durch Transfektion mit GAPDH-siRNA erzielt (siehe Abb. 4.27; Spur 6). Eine Proteinexpression von p53 konnte nach einem Tag 8-Br-cAMP-Behandlung in keinem der Ansätze nachgewiesen werden. Nach zweitägiger Behandlung zeigte sich lediglich eine Induktion von p53-Protein in den transfizierten Ansätzen (siehe Abb. 4.27; Spur 6, 8). Dabei wurde in Gegenwart von transfizierten positiv und negativ Kontroll-siRNA-Oligonukleotiden eine massive Expression von p53 in Ansätzen mit 8-Br-cAMP-Behandlung beobachtet. In den p53-siRNA-transfizierten Ansätzen blieb die p53-Expression jedoch aus (siehe Abb. 4.27; Spur 3, 4). Nach drei Tagen konnte zum ersten Mal eine deutliche Induktion von p53 durch eine 8-Br-cAMP-Stimulation in untransfizierten Zellen beobachtet werden (siehe Abb. 4.27; Spur 2), vergleichbar mit der Expression in den transfizierten Ansätzen der Kontroll-siRNA-Oligonukleotide. Die Transfektion eines Gemisches aus p53-siRNA-Oligonukleotiden führte dagegen zu einer massiven Unterdrückung der p53-Expression und resultierte in einem Verlust des p53-Proteins (siehe Abb. 4.27; Spur 4). In den Ansätzen mit transfizierter GAPDH-siRNA zeigten sich erst nach 3 Tagen eine deutliche Reduktion des GAPDH-Proteins in den unstimulierten Ansätzen (siehe Abb. 4.27; Spur 6).

Zur Überprüfung des p53-*Knock down* über einen längeren Zeitraum wurde der Effekt der transfizierten siRNA-Oligonukleotide auch nach 6 Tagen ermittelt (siehe Abb. 4.28).



**Abbildung 4.28:** Nachweis des p53-*Knock down* in 8-Br-cAMP-stimulierten ESZ nach 6 Tagen mittels *Western Blot* Analyse

ESZ einer zweiten Präparation wurden entweder mit einem Gemisch aus p53-siRNA-Oligonukleotiden oder positiv-(GAPDH)- und negativ-siRNA-Oligonukleotiden, unter Verwendung der *RNAi*fect-Methode, transfiziert (2,5 µg pro 6-Well) oder untransfiziert belassen. Danach erfolgte eine Stimulation mit 8-Br-cAMP (0,5 mM) über 6 Tage. Gesamtzellextrakte wurden auf die Proteinexpression von p53 und GAPDH durch den Einsatz eines monoklonalen p53-Antikörpers (DO-1) oder GAPDH-Antikörpers untersucht.

Eine deutliche Stimulierung der p53-Proteinexpression wurde durch eine 8-Br-cAMP-Behandlung erreicht. Allerdings zeigte sich auch in den unbehandelten Zellen eine

schwache p53-Expression. Diese beruht vermutlich auf individuellen p53-Schwankungen in den einzelnen ESZ-Präparationen oder ist auf die Kulturdauer zurückzuführen. Dennoch konnte der durch Transfektion von p53-siRNA reduzierende Effekt auf das p53-Protein auch nach 6 Tagen noch nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.28).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die RNAi-Methode in humanen ESZ erstmals erfolgreich angewendet werden konnte. Die GAPDH-siRNA ist dabei weniger effizient als die p53-siRNA. Der Effekt einer effizienten endogenen p53-Proteinreduzierung erfolgt nach 2 bis 3 Tagen und ist sogar nach 6 Tagen noch nachzuweisen.

#### **4.7 Ergebnisse der Untersuchungen einer möglichen Funktion von p53 im Dezidualisierungsprozess von ESZ**

Eine Akkumulation von Wildtyp-p53 im Kern von dezidualisierenden ESZ erfolgte nicht akut, sondern erst innerhalb von 2 bis 4 Tagen und war auch nach 12 Tagen immer noch erhöht. Hohe p53-Proteinspiegel im Dezidualisierungsprozess von ESZ korrelieren mit einer verstärkten Expression von C/EBP $\beta$  zu diesem Zeitpunkt. Zwar konnte nur in Teilen eine überlappende Lokalisation der beiden Faktoren in dezidualen ESZ gezeigt werden, aber eine Koimmunpräzipitation mit ESZ bestätigte eine direkte Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53. Erhöhte Proteinmengen von p53 in dezidualisierenden ESZ beruhen dabei nicht auf einer verstärkten Transkription des p53-Genes, sondern sind vermutlich auf eine Stabilisierung des p53-Proteins durch posttranslationale Modifikationen zurückzuführen. Obwohl der p53-responsive Hdm-2 P2-Promotor durch p53 aktiviert zu sein scheint, nachweislich durch einen erhöhten s-Hdm-2 Transkriptlevel, sollte dies einen erhöhten Hdm-2 Proteinspiegel zur Folge haben. Der fehlende Nachweis des Hdm-2-Proteins könnte auf einer Blockade des Hdm-2 Transportes in den Kern beruhen oder auf einem erhöhten Export. Obwohl in Gegenwart von hohen p53-Proteinspiegeln erhöhte Expressionen der Zielgene p21<sup>WAF1</sup>- und Bax zu erwarten waren, blieben diese sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene unverändert. Dagegen wurde die Expression des Bcl-2-Proteins, einem „negativen“ Zielgen von p53, in Gegenwart von hohen Mengen an p53 deutlich reduziert. Der Entzug des 8-Br-cAMP-Stimulus führte jedenfalls nicht nur zu einer Reduktion der Transkriptlevel der Dezidualisierungsmarker, dPRL und IGFBP-1, und zu einer morphologischen Veränderung der ESZ, sondern resultierte auch in einem Verlust des p53-Proteins. Darüber hinaus konnte erstmals eine p53-Proteinreduktion in humanen ESZ mittels der RNAi-Methode gezeigt werden.

## 5 Diskussion

C/EBP $\beta$  ist ein Transkriptionsfaktor, der in verschiedenen Differenzierungsprozessen eine wichtige Funktion ausübt. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass C/EBP $\beta$  an der Aktivierung des dezidualen Prolaktin (dPRL)-Promotors beteiligt ist und im Dezidualisierungsprozess von endometrialen Stromazellen (ESZ) eine wichtige Rolle spielt (Pohnke et al., 1999). Zur Identifizierung von weiteren Transkriptionsfaktoren, die am Prozess der Dezidualisierung beteiligt sein könnten, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Hefe Ein-Hybrid Assay durchgeführt. Im Zusammenhang mit der dPRL-Promotor Regulation wurde erstaunlicherweise der Tumorsuppressor p53 als ein Faktor identifiziert, der in der Lage ist, in Abwesenheit von p53-Bindungsstellen eine C/EBP $\beta$ -induzierte Aktivierung des dPRL-Promotors zu inhibieren (Pohnke et al., 2004). Aufgrund der fehlenden p53-Bindungsstellen im dPRL-Promotor wurde eine mögliche Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 diskutiert.

Aufgrund dieser Ergebnisse sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst eine mögliche Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 *in vitro* und *in vivo* überprüft sowie die interagierenden Domänen identifiziert werden.

Des Weiteren sollte die Bedeutung von p53 für den Dezidualisierungsprozess des humanen Endometriums untersucht werden.

### 5.1 Interaktion von C/EBP $\beta$ und p53

Eine direkte Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 *in vitro* konnte erstmals in einem GST-*Pulldown* Assay gezeigt werden (Manuskript in Vorbereitung). Hierbei wurden die an GST fusionierten C/EBP $\beta$ -Isoformen, LAP und LIP (siehe Abb. 3.1; Kapitel 3.1.3), mit *in vitro* translatiertem und transkribiertem <sup>35</sup>S-p53-Protein inkubiert. Außer der p53-Mutante p53 $\Delta$ T4-RR waren alle p53-Konstrukte (siehe Abb. 3.1; Kapitel 3.1.3) in der Lage, sowohl mit GST-LAP als auch mit GST-LIP zu interagieren. Die für eine Bindung relevanten Domänen sind dabei die C-terminale Region von C/EBP $\beta$  (LIP) und der C-Terminus von p53 (T4-RR) (siehe Abb. 2.11; Kapitel 2.5). Diese Domänen sind ebenfalls für Interaktionen mit anderen Proteinen von Bedeutung. Die bZIP-Domäne von C/EBP $\beta$  ist beispielsweise an der Homo- und Heterodimerisierung mit C/EBPs oder anderen bZIP-Faktoren beteiligt sowie an Interaktionen mit dem nukleären PR, ER, oder dem GR (Stein

& Yang, 1995; Boruk et al., 1998). Der C-Terminus von p53 interagiert mit einer Vielzahl von viralen und zellulären Proteinen (May & May, 1999).

Die im *GST-Pulldown* Assay beobachtete Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 *in vitro* sollte nun weiter charakterisiert werden. In Koimmunpräzipitationsstudien konnte in dieser Arbeit erstmals eine Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 *in vivo* nachgewiesen werden. Extrakte aus Saos-2-Zellen, die mit LAP und p53 transfiziert worden waren, wurden mit einem p53-Antikörper (DO-1-Agarose; siehe Kapitel 3.4.5) immunpräzipitiert, der gegen die aminoternale Domäne von p53 gerichtet ist (siehe Abb. 2.3; Kapitel 2.3.2). In Anwesenheit von Wildtyp-p53 konnte eine Bande nachgewiesen werden, die der Größe von exogenem LAP entsprach (siehe Abb. 4.18; Kapitel 4.4.2). Diese Beobachtung konnte weiterhin mit endogen exprimierten Proteinen bestätigt werden. Primärkulturen von endometrialen Stromazellen (ESZ) weisen nach einer 8-Br-cAMP-Behandlung über 6 Tage einen hohen Proteinspiegel an endogenem C/EBP $\beta$  und p53 auf (Pohnke et al., 1999; 2004). Die Koimmunpräzipitation von endogenem C/EBP $\beta$  in Gegenwart von endogenem p53 ist als ein Nachweis einer Interaktion der beiden Faktoren *in vivo* zu betrachten.

Die Auswirkungen einer Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 sind noch unklar. Beide Faktoren sind an vielen Differenzierungsprozessen beteiligt (Almog & Rotter, 1997; Ramji & Foka, 2002) und spielen auch in der Tumorgenese eine wichtige Rolle (Sigal & Rotter, 2000; Bundy et al, 2003). Aufgrund der Tatsache, dass p53 in über 50 % aller Tumoren mutiert ist und das Verhältnis von LAP zu LIP in vielen Tumoren verändert ist (Descombes & Schibler, 1991; Zahnow et al., 1997), gewinnt der Nachweis einer Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 immer mehr an Bedeutung.

### **5.1.1 Gegenseitige Inhibierung der DNA-Bindungsfähigkeit von C/EBP $\beta$ und p53**

Zur weiteren Charakterisierung der Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 wurde überprüft, ob eine Interaktion einen Einfluss auf die DNA-Bindungsfähigkeit der beiden Faktoren nimmt. Eine direkte Interaktion könnte zu einer Blockade von essentiellen Domänen führen oder zu einer Sequestrierung der interagierenden Faktoren im Zytoplasma. Solche Assoziationen sind bereits für p53 und den menschlichen Östrogen-, Thyroidhormon- sowie für den Glukokortikoid-Rezeptor beschrieben worden (Lui et al., 1999; Sengupta & Wasylyk, 2004; Yap et al., 1996). Für C/EBP $\beta$  konnte ebenfalls eine Interaktion mit dem Östrogenrezeptor nachgewiesen werden, dessen Bindung zu einer Inhibierung der C/EBP-vermittelten Aktivierung des IL-6 Promotors führte (Ray et al.; 1997).

Zur Überprüfung, ob eine direkte Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 deren DNA-Bindungsfähigkeit beeinflusst, wurden EMSA-Studien durchgeführt.

In Gegenwart von transfiziertem p53 in Saos-2-Zellen konnte lediglich eine schwache Reduktion in der Bindung des endogenen C/EBP $\beta$  an sein RE beobachtet werden (siehe Abb. 4.10; Kapitel 4.3). Bei der Expression von C/EBP $\beta$  in COS-7-Zellen zeigte sich im Gegenzug auch nur eine schwache Reduzierung in der Bindung des endogenen p53 an sein RE (siehe Abb. 4.12; 4.13; Kapitel 4.3). Nach Zugabe eines polyklonalen C/EBP $\beta$ -Antikörpers (SC), der gegen die Aminosäuren 258 bis 276 des C/EBP $\beta$ -Proteins der Ratte gerichtet ist, konnte ein indirekter *Supershift* beobachtet werden (siehe Abb. 4.12; 4.13). Der Antikörper erkennt eine konservierte Region im humanen C/EBP $\beta$ , die in der *leucine zipper*-Domäne liegt (Aminosäuren 306 bis 324) (siehe Abb. 2.2; Kapitel 2.2.3.1). Der erzielte indirekte *Supershift* deutet auf eine Anwesenheit von C/EBP $\beta$  in dem p53-DNA-Komplex hin. Allerdings konnte diese Beobachtung weder durch Zugabe eines anderen C/EBP $\beta$ -Antikörpers (AM; erkennt die Aminosäuren 228 bis 242 des humanen C/EBP $\beta$ ; siehe Abb. 2.2; Kapitel 2.1.3) noch durch einen Antikörper, der das C-terminale *FLAG*-Epitop von kotransfiziertem *LAP/FLAG* erkennt, bestätigt werden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der indirekte *Supershift* mit dem C/EBP $\beta$ -Antikörper (SC) auf einer möglichen Kreuzreaktion unter nativen Bedingungen mit p53 oder einem anderen in diesem p53-DNA-Komplex vorliegenden Protein beruht. Bisher zeigte dieser Antikörper unter denaturierenden Bedingungen jedenfalls keine Reaktion mit p53 oder einem anderen Protein und war in *Western Blot* Analysen hochspezifisch. Diese Beobachtungen könnten allerdings auf eine Erkennung eines p53-Epitopes in der nativen Konformation durch den C/EBP $\beta$ -Antikörper (SC) hindeuten. Falls es sich bei dem indirekten *Supershift* jedoch um einen spezifischen Nachweis von C/EBP $\beta$  handelt, so scheint das Epitop des anderen C/EBP $\beta$ -Antikörpers (AM) bzw. des *FLAG*-Antikörpers durch eine C/EBP $\beta$ /p53-Bindung möglicherweise blockiert zu sein. Dies suggeriert aber auch eine stärkere Affinität von C/EBP $\beta$  zu p53, als zu einem der Antikörper.

Ein Argument gegen eine direkte Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 auf DNA-Ebene ist die Tatsache, dass im umgekehrten Fall, bei der Expression von C/EBP $\beta$  in COS-7-Zellen, mit der Zugabe von p53-Antikörpern kein indirekter *Supershift* auf einem C/EBP-RE erzielt werden konnte. Weder der p53-Antikörper (DO-1), der die aminoterminal Domäne von p53 erkennt, noch der p53-Antikörper (PAb421), der an die regulatorischen Domäne

bindet (siehe Abb. 2.3; Kapitel 2.3.2), deuteten auf die Anwesenheit von p53 in einem LAP-DNA- oder LIP-DNA-Komplex hin.

Des Weiteren wurde eine reduzierte DNA-Bindung als Folge einer immer wieder auftretende Proteinreduktion von transfizierten Faktoren vermutet. Jedoch konnte keine Reduktion auf endogenem Proteinspiegel durch transfizierte Proteine beobachtet werden, so dass dieser Aspekt zu vernachlässigen ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass transfiziertes p53 zwar die DNA-Bindung von endogenem C/EBP $\beta$  zu inhibieren vermag, aber in einem C/EBP $\beta$ -DNA-Komplex nicht nachzuweisen war. LAP dagegen bewirkt nicht nur die Reduzierung der endogenen p53-DNA-Bindungs-fähigkeit, sondern könnte auch in einem p53-DNA-Komplex anwesend sein. Weitere Studien hierzu sind notwendig, um diesen Aspekt genauer zu klären.

### 5.1.2 Gegenseitige Transrepression von C/EBP $\beta$ und p53

Um zu überprüfen, ob neben der DNA-Bindungs-fähigkeit auch die Transaktivierungsfähigkeit durch eine Interaktion beeinflusst wird, wurden Transfektionsstudien durchgeführt. Eine Interaktion könnte ebenfalls zu einer Blockierung bzw. zu einer Inhibierung der TAD führen. Frühere Studien beschrieben eine Repression der C/EBP $\beta$ -abhängigen Aktivierung eines intakten dPRL-Promotors durch p53 (Pohnke et al., 2004). Eine Bestätigung dieser Beobachtung erfolgte in Transfektionen mit der p53-defizienten Saos-2-Zelllinie und einem isolierten C/EBP-RE. Hierbei konnte ebenfalls eine deutliche Reduzierung einer C/EBP $\beta$ -vermittelten Aktivierung des Reportergenkonstruktes in Gegenwart von exogenem Wildtyp-p53 nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.1; Kapitel 4.1.1). Während eine Inhibierung von C/EBP $\beta$ -abhängiger Transkription durch p53 bereits für andere Systeme beschrieben wurde, wie z.B. für die Promotoren des  $\beta$ -Fibrinogen-, des IL-6-, des Insulinrezeptor- oder des Albumin-Gens (Margulies & Sehgal, 1993; Kubicka et al., 1999; Wang et al., 1995; Webster et al., 1996), so war die Beobachtung neu, dass *vice versa* eine p53-abhängige Transkription durch C/EBP $\beta$  inhibiert werden kann. In Transfektionen mit Saos-2-Zellen führten beide Isoformen, LAP und LIP, zu einer Repression der p53-vermittelten Aktivierung des p53-RE (siehe Abb. 4.2; Kapitel 4.1.2). Die Inhibierung durch die LIP-Isoform ist nicht so überraschend, da es als ein transkriptioneller Repressor für LAP beschrieben wurde (Descombes & Schibler, 1991), aber möglicherweise auch repressorische Funktionen auf andere Faktoren ausüben kann. LAP dagegen ist als ein Transaktivator bekannt (Kowentz & Leutz, 1999), aber über eine Funktion als Repressor ist bisher nichts beschrieben worden.

Der Mechanismus dieser gegenseitigen Transrepression ist noch unklar. Eine mögliche Erklärung der gegenseitigen Repression der transkriptionellen Aktivität könnte in einer Konkurrenz um limitierende Faktoren, wie z.B. den Koaktivator p300/CBP, liegen. Sowohl für C/EBP $\beta$  als auch für p53 konnte eine funktionelle Interaktion mit p300/CBP gezeigt werden (Blobel, 2000; Goodman & Smolik, 2000; Grossman, 2001; Lui, 2003; Mink et al., 1997). Die aminoternale Region (LAP-TAD) von C/EBP $\beta$  bindet hierbei eine Region in der C-terminalen Bindungsdomäne von p300/CBP (Mink et al., 1997). Eine Bindung mit p53 erfolgt über die Zinkfinger-Motive von p300/CBP an die Mdm-2-Region in der TAD von p53 (Wadgaonkar & Collins, 1999; Goodman & Smolik, 2000). Allerdings konnte in Rahmen dieser Arbeit in Transfektionsstudien mit verschiedenen Mengen an p300/CBP gezeigt werden, dass der Koaktivator nicht in der Lage war, die gegenseitige Transrepression aufzuheben (siehe Abb. 4.4, Kapitel 4.1.4). Darüber hinaus sprechen weitere Beobachtungen gegen eine Konkurrenz um limitierende Mengen an p300 als eine mögliche Erklärung der gegenseitigen Transrepression zwischen C/EBP $\beta$  und p53. Zum einen konnte auch die C/EBP $\beta$ -Isoform, LIP, die die p300-Bindungsstelle fehlt, eine p53-vermittelte Aktivierung des p53-RE inhibieren. Zum anderen besaßen die p53-Mutanten, p53 $\Delta$ T4-RR und p53.M175, obwohl sie eine p300-Bindungsdomäne aufweisen, nicht die Fähigkeit, die LAP-abhängige Aktivierung des C/EBP-RE zu inhibieren (siehe Abb. 4.5; Kapitel 4.1.5).

Allerdings könnten andere Faktoren einen Einfluss nehmen, wie z.B. das Retinoblastoma (Rb)-Protein, ein wichtiger Regulator des Zellzyklus (siehe Abb. 2.4; Kapitel 2.2.4.1) (Steinman, 2000). Das Rb-Protein ist in der Lage, die transkriptionelle Aktivität von C/EBP $\beta$  zu erhöhen (Chen et al., 1996). Rb kann aber auch in einem tertiären Komplex mit Mdm-2 und p53 vorliegen und zur Stabilität des p53-Proteins beitragen (Hsieh et al., 1999; Yap et al., 1999). In diesem Komplex ist zwar die transaktivierende Funktion von p53 eingeschränkt, nicht aber seine transrepressorische Funktion. Da Saos-2-Zellen allerdings nur mutiertes Rb aufweisen (Lauricella et al., 2001), dass dadurch nicht mehr in der Lage ist, p53 zu binden, scheidet auch dieser Faktor als eine mögliche Erklärung der gegenseitigen Transrepression aus.

### **5.1.3 Gegenseitige Proteinreduktion von C/EBP $\beta$ und p53**

Eine immer wieder auftretende Beobachtung in den Kotransfektionen mit C/EBP $\beta$  und p53 war eine Reduktion in den Proteinspiegeln von entweder Wildtyp-p53 in Gegenwart der C/EBP $\beta$ -Isoformen, LAP und LIP, oder von LAP- und LIP-Proteinen in Anwesenheit von

Wildtyp-p53 (siehe Abb. 4.1, 4.2; Kapitel 4.1. und Abb. 4.6; Kapitel 4.2). Bei der Überprüfung der an dieser gegenseitigen Proteinreduktion beteiligten Domänen zeigte sich, dass Kotransfektion von LAP oder LIP zu einer Repression in den Proteinspiegeln von Wildtyp-p53 und der Mutante p53 $\Delta$ TAD führte, nicht aber bei der Mutante p53 $\Delta$ T4-RR (siehe Kapitel 4.2). Im Gegensatz dazu war nur Wildtyp-p53 in der Lage, eine Reduktion in den Proteinspiegeln von LAP und LIP zu bewirken, während den Mutanten p53 $\Delta$ TAD und p53 $\Delta$ T4-RR diese Eigenschaft fehlt. Diese Beobachtungen decken sich aber mit den Ergebnissen der Transfektionsstudien, bei denen nur Wildtyp-p53 eine Inhibierung der C/EBP $\beta$ -vermittelten Aktivierung des RE zu bewirken vermochte (siehe Abb. 4.3; Kapitel 4.1), nicht aber die Mutanten p53 $\Delta$ TAD oder p53 $\Delta$ T4-RR. Die Reduktion des CEBP $\beta$ -Proteins ist, wie auch die transkriptionelle Repression, auf die Wildtyp-Konformation von p53 beschränkt. Dies stimmt mit Studien von Kim et al. (2003) überein, die ebenfalls nur eine transkriptionelle Inhibierung durch Wildtyp-p53 beobachten konnten.

Der Mechanismus der Proteinreduktion ist unklar. Möglicherweise ist diese Reduzierung als ein Phänomen der Transfektion zu deuten, da beispielsweise kein Effekt auf die endogenen Proteinspiegel nachzuweisen war (siehe Abb. 4.6; Kapitel 4.2). Allerdings ist eine hohe Transfektionseffizienz und Sensitivität der eingesetzten Analyse-Methoden eine wichtige Voraussetzung, um einen Effekt von transfizierten Faktoren auf endogene Proteinspiegel detektieren zu können.

Darüber hinaus wurde eine gegenseitige Einleitung des Abbaus als mögliche Ursache dieser Proteinreduktion vermutet. Sowohl für C/EBP $\beta$  als auch p53 ist eine Ubiquitylierung und ein Abbau durch den 26-S-Proteasom-Komplex beschrieben worden (Hattori et al., 2003; Rodriguez et al., 2000). Da die Proteinreduktion jedoch auch in Anwesenheit des Proteasom-Inhibitors MG-132 nicht aufgehoben werden konnte, wurde ein Abbau-Mechanismus durch diesen Komplex ausgeschlossen. Möglicherweise existiert ein anderer noch nicht identifizierter Abbauweg. Dieser Frage wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings nicht weiter nachgegangen.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Effekt der gegenseitigen Proteinreduktion auf eine Überexpression der entsprechenden Proteine in transfizierten Zellen zurückzuführen ist. Für C/EBP $\beta$  wurde berichtet, dass eine Homo- oder Heterodimerisierung mit anderen bZIP-Proteinen auch in Abwesenheit von DNA

stattfinden kann (Hattori et al., 2003). Eine Dimerisierung von p53 erfolgt kotranslational an den Polysomen und eine Tetramerisierung ist in Abwesenheit von DNA ebenso möglich (Chène, 2001; Nicholls et al., 2002). Darüber hinaus konnte im *GST-Pulldown* Assay eine Interaktion von C/EBP $\beta$  und p53 nachgewiesen werden (siehe Kapitel 2.5), so dass eine mögliche Reduktion durch eine Komplexbildung und Ausfällung der Proteine vermutet wurde. Obwohl beide Faktoren kotransfiziert worden waren, konnte eine Komplexbildung der entsprechenden Proteine und Ausfällung im Präzipitat nur mit den eigenen, zum Teil sogar endogenen Isoformen, nicht aber mit dem transfizierten Gegenspieler nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich nicht nur im Überstand, sondern auch im Präzipitat der Effekt der gegenseitigen Proteinreduktion, im Überstand allerdings in einer deutlich schwächeren Form (siehe Abb. 4.9; Kapitel 4.2.3). Eine gegenseitige Proteinreduktion ist demnach nicht allein auf eine Ausfällung der Proteinkomplexe zurückzuführen. Der Effekt der Komplexbildung ist zumindest eine mögliche Erklärung für die geringen Expressionsnachweise von Wildtyp-p53 in *Western Blot* Analysen. Der genaue Mechanismus der Proteinreduktion konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter geklärt werden und bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Es ist beschrieben worden, dass p53 in der Lage ist, eine Vielzahl von viralen Promotoren zu inhibieren (Allamane et al., 2001; Subler et al., 1992) und die *de novo* Synthese von Proteinen zu unterbinden. Dazu gehört auch der CMV-Promotor, ein viel genutzter Promotor in eukaryontischen Expressionsvektoren, wie z.B. auch dem pcDNA3.1-Vektor. Dieser Expressionsvektor war Grundlage der meisten in dieser Arbeit verwendeten Expressionskonstrukten für C/EBP $\beta$  und p53. Eine Inhibierung des CMV-Promotors könnte eine reduzierte Expression der eingesetzten Konstrukte und damit eine verringerte Proteinmenge zur Folge haben. Dies wäre eine weitere mögliche Erklärung für die reduzierte Proteinmenge von Wildtyp-p53 selbst oder von LAP in Gegenwart von Wildtyp-p53 oder Wildtyp-p53/*FLAG* (siehe Abb. 4.1, 4.2, 4.5; Kapitel 4.1). Die *Western Blot* Analysen zeigten dennoch eine Expression von Wildtyp-p53 (siehe Abb. 4.1, 4.2; Kapitel 4.1), die mit der Expression der Mutanten vergleichbar war, mit Ausnahme der Mutante pcDNA/hp53 $\Delta$ T4-RR (siehe Abb. 4.5; Kapitel 4.1). Daraus würde jedoch resultieren, dass die Mutanten ebenfalls in der Lage sind, den CMV-Promotor zu inhibieren. In der Literatur gibt es dafür allerdings keine Hinweise.

Die erhöhte Expression der Mutante hp53 $\Delta$ T4-RR ist vermutlich auf eine Proteinstabilisierung zurückzuführen, da dieser Mutante die entscheidende Domäne für

eine Ubiquitylierung fehlt (siehe Abb. 3.1; Kapitel 3.1.3) und sie somit vor dem Abbau durch Mdm-2 geschützt ist (Fang et al., 2000; Kubbutat & Vousden, 1998; Rodriguez et al., 2000; Vousden, 2002).

Weitere Argumente gegen eine Inhibierung des CMV-Promotors durch Wildtyp-p53 sind zum einen, dass exogenes Wildtyp-p53 zu einer massiven Aktivierung eines p53-Reportergenkonstruktes führte (siehe Abb. 4.2; Kapitel 4.2) und zum anderen in der Lage war, endogene Zielproteine, wie Hdm-2 und p21<sup>WAF1</sup> zu induzieren (siehe Abb. 4.7, B; Kapitel 4.2). Um sicher zu stellen, dass die Transrepression sowie die Proteinreduzierung nicht auf einer Inhibition der *de novo* Synthese durch exogenes Wildtyp-p53 beruhen, wurde in dieser Arbeit ein neues Expressionssystem eingesetzt. Auf der Suche nach starken, nicht-viralen Promotoren, die nicht durch p53 inhibiert werden, kristallisierte sich der EF (*elongation factor*)-1 $\alpha$ -Promotor heraus (Kim et al., 1990; Kato et al., 1997). Um zu überprüfen, ob eine gegenseitige Transrepression auch unter dem Einfluss des pEF1 $\alpha$ -Promotors zu beobachten ist, wurden neue Expressionsvektoren für C/EBP $\beta$  und p53 hergestellt. Die Klonierung der entsprechenden cDNAs erfolgte dabei in einen Expressionsvektor (pEF1 $\alpha$ ; siehe Kapitel 3.1.3.4), der einen Teil des EF1 $\alpha$ -Promotors enthält (Mizushima & Nagata, 1990). In zusätzlichen Saos-2-Transfektionsstudien mit den entsprechenden isolierten RE und neu konstruierten Expressionsvektoren für C/EBP $\beta$  und p53 konnte dennoch ein inhibierender Effekt der C/EBP $\beta$ -abhängigen Transaktivierung des C/EBP-RE durch p53 nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.3; Kapitel 4.1.3). Ein ähnliches Ergebnis konnte für das p53-RE gezeigt werden (Daten nicht dargestellt). Die vergleichbaren Ergebnisse der Transrepression von C/EBP $\beta$  und p53 sind somit nicht allein auf eine Inhibierung der Promotoren durch Wildtyp-p53 zurückzuführen. Die Transfektionsexperimente zeigten darüber hinaus, dass der EF1 $\alpha$ -Promotor eine gute Alternative zum CMV-Promotor ist.

#### 5.1.4 Charakterisierung der interagierenden Domänen von C/EBP $\beta$ und p53

Zur Charakterisierung der an einer Interaktion beteiligten Domänen von C/EBP $\beta$  und p53 wurde ein *Mammalian Two-Hybrid* Assay durchgeführt (siehe Kapitel 4.4.1). Dazu wurden verschiedene Fusionsproteine mit C/EBP $\beta$  und p53 hergestellt, die entweder eine Lex-DNA-Bindungsdomäne (DBD) oder eine VP16-Aktivierungsdomäne (AD) enthielten (siehe Abb. 4.15). Als Positivkontrolle wurde das Fusionsprotein Lex-p53 $\Delta$ TAD mit dem Fusionsprotein VP16-AD-p53 $\Delta$ TAD kotransfiziert. Dabei bindet das Lex-p53 $\Delta$ TAD-Protein zunächst an die Lex-Bindungsstellen im Reportergenkonstrukt 2xLex/-

36rPRL/luc3. Durch eine Interaktion der beiden Fusionsproteine über die Tetramerisierungsdomäne (T4), kommt es zur Rekrutierung der VP16-AD-Domäne an den Minimalpromotor und resultiert in einer Aktivierung des Reportergenkonstruktes. Allerdings konnte keine Aktivierung des Reportergenkonstruktes durch Kotransfektionen mit weiteren p53-Lex-DBD-Konstrukten und VP16-C/EBP $\beta$ -Konstrukten, die entweder die aminoternale (LAP-TAD)- oder carboxyterminale (LIP)-Domäne enthalten, erzielt werden. Das Ausbleiben einer Interaktion zwischen C/EBP $\beta$  und p53 im *Mammalian Two-Hybrid* Assay könnte auf einer Blockade der interagierenden Domänen beruhen. Mit Ausnahme der Proteine, denen der C-Terminus fehlt ( $\Delta$ T4-RR) (siehe Abb.4.15; Kapitel 4.4.1), sind alle p53-Lex-Konstrukte (p53wt, p53.M22,23, p53 $\Delta$ TAD, p53 $\Delta$ TAD $\Delta$ DBD) in der Lage, über die T4, miteinander zu interagieren und tetramere/multimere Strukturen, auch in Abwesenheit von DNA, auszubilden (Chène, 2001). Dadurch ist die C-terminale Domäne von p53 möglicherweise für C/EBP $\beta$  nicht mehr zugänglich und eine Interaktion wird verhindert. Dennoch zeigte auch eine Kotransfektion mit einer isolierten regulatorischen Region (p53-RR), die aufgrund der fehlenden T4 keine Multimere ausbilden kann, ebenfalls keine Aktivierung des Reportergenkonstruktes in Gegenwart der VP16-C/EBP $\beta$ -Konstrukte. Eine Homodimerisierung des Konstruktes VP16-AD/LIP-DBD über die bZIP-Domäne ist auch nicht auszuschließen (Hattori et al., 2003) und könnte dadurch ebenfalls die entscheidende interagierende Domäne besetzen.

Im *GST-Pulldown* Assay sind die Isoformen von C/EBP $\beta$ , LAP und LIP, an eine GST fusioniert und an einer Matrix immobilisiert. Es ist nicht klar, ob auch hier multimere Strukturen von C/EBP $\beta$  vorliegen. Das dazugegebene *in vitro* translatierte p53 könnte viele Formationen (Monomer, Dimer, Tetramer) aufweisen, wobei beschrieben wurde, dass p53 in Abwesenheit von DNA hauptsächlich als Tetramer vorliegt (Chène, 2001). Im *GST-Pulldown* Assay wurde allerdings nicht zwischen der T4 und der RR unterschieden. Die Frage, ob die beiden Proteine (C/EBP $\beta$  und p53) in multimeren Strukturen miteinander reagieren oder nicht, bleibt offen. Die fehlende Bindung des p53-Konstruktes p53 $\Delta$ T4-RR, einem Monomer, an GST-LAP oder GST-LIP, deutet zumindest auf die Erfordernis einer intakten T4-RR und/oder einer multimeren Struktur von p53 hin.

In Tabelle 5.1 A und B ist eine Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse, der Effekte und der daran beteiligten Domänen dargestellt.

Effekt von / auf	LAP	LIP
<b>Wildtyp-p53</b>	<b>I<sub>(GST)</sub>; I<sub>(KoIP)</sub></b> <b>TA ↓; Prot ↓</b>	<b>I<sub>(GST)</sub>; I<sub>(KoIP)</sub></b> <b>TA n.a.; Prot ↓</b>
<b>p53ΔTAD</b>	<b>I<sub>(GST)</sub>; I<sub>(KoIP) n.g.</sub></b> <b>TA ∅; Prot n.g.</b>	<b>I<sub>(GST)</sub>; I<sub>(KoIP) n.g.</sub></b> <b>TA n.g.; Prot ∅</b>
<b>p53ΔT4-RR</b>	<b>I<sub>(GST) k.B.</sub>; I<sub>(KoIP) n.g.</sub></b> <b>TA ∅; Prot n.g.</b>	<b>I<sub>(GST) k.B.</sub>; I<sub>(KoIP) n.g.</sub></b> <b>TA n.g.; Prot ∅</b>

**Tabelle 5.1 A: Effekte von Wildtyp-p53 und p53-Mutanten auf C/EBPβ**

(GST-Pulldown Assay (GST); Koimmunpräzipitation (KoIP); TA, Transaktivierungsfähigkeit, Prot, Protein; I, Interaktion; ↓, Reduktion; ∅, kein Effekt; k.B., keine Bindung; n.a., nicht anwendbar; n.g., nicht getestet)

Effekt von / auf	Wildtyp-p53	p53ΔTAD	p53ΔT4-RR
<b>LAP</b>	<b>I<sub>(GST)</sub>; I<sub>(KoIP)</sub></b> <b>TA ↓; Prot ↓</b>	<b>I<sub>(GST)</sub>; I<sub>(KoIP) n.g.</sub></b> <b>TA n.g.; Prot ↓</b>	<b>I<sub>(GST) k.B.</sub>; I<sub>(KoIP) n.g.</sub></b> <b>TA n.g.; Prot ∅</b>
<b>LIP</b>	<b>I<sub>(GST)</sub>; I<sub>(KoIP)</sub></b> <b>TA ↓; Prot ↓</b>	<b>I<sub>(GST)</sub>; I<sub>(KoIP) n.g.</sub></b> <b>TA n.g.; Prot ↓</b>	<b>I<sub>(GST) k.B.</sub>; I<sub>(KoIP) n.g.</sub></b> <b>TA n.g.; Prot ∅</b>

**Tabelle 5.1 B: Effekte von C/EBPβ auf Wildtyp-p53 und p53-Mutanten.**

(GST-Pulldown Assay (GST); Koimmunpräzipitation (KoIP); TA, Transaktivierungsfähigkeit, Prot, Protein; I, Interaktion; ↓, Reduktion; ∅, kein Effekt; k.B., keine Bindung; n.a., nicht anwendbar; n.g., nicht getestet)

In Tabelle 5.1 A sind die Effekte von Wildtyp-p53 und p53-Mutanten auf C/EBPβ dargestellt. Es zeigt sich, dass Wildtyp-p53 sowohl im GST-Pulldown als auch in der Koimmunpräzipitation mit C/EBPβ (LAP und/oder LIP) interagieren kann. Des Weiteren führt Wildtyp-p53 zu einer Reduktion des LAP- und/oder LIP-Proteins und inhibiert die transkriptionelle Aktivität von LAP. Die Mutante p53ΔTAD interagiert im GST-Pulldown Assay ebenfalls mit beiden C/EBPβ-Isoformen, hat aber weder einen Effekt auf die transkriptionelle Aktivität von LAP noch auf die Proteinreduzierung von LIP. Im Gegensatz dazu, ist die Mutante p53ΔT4-RR nicht in der Lage, im GST-Pulldown mit LAP oder LIP zu interagieren und zeigt auch keinen Effekt auf die Transaktivierung von LAP oder auf die Proteinreduktion von LIP.

In Tabelle 5.1 B sind die Effekte von C/EBPβ auf Wildtyp-p53 und p53-Mutanten dargestellt. Beide C/EBPβ-Isoformen führen zu einer Proteinreduktion von Wildtyp-p53 und der Mutante p53ΔTAD, allerdings nicht von der Mutante p53ΔT4-RR.

Aufgrund der vorherigen Ergebnisse scheint dem C-Terminus (T4-RR) von p53 und der bZIP-Domäne von CEBP $\beta$  (LIP) entscheidende Rolle bei der Interaktion der beiden Faktoren sowie in der gegenseitigen Repression zuzukommen.

Eine negative Wechselwirkung von C/EBP $\beta$  und p53 zeigt nicht nur eine Auswirkung auf die Regulation der beiden Proteine selbst, sondern könnte auch einen Einfluss auf C/EBP $\beta$ - und p53-regulierte Zielgene haben. Die Bedeutung einer negativen Wechselwirkung wird im Zusammenhang mit der Tumorgenese klar. Die Tatsache, dass p53 in über 50 % aller Tumoren mutiert ist (Sigal & Rotter, 2000) und das Verhältnis von LAP zu LIP in vielen Tumoren verändert ist (Descombes & Schibler, 1991; Zahnow et al., 1997), führt zu der Vermutung, dass eine Fehlregulation in der p53-C/EBP $\beta$ -Interaktion in der Tumorgenese involviert ist. In Tumoren des Ovars, der Brust, des Dick- oder Mastdarms und der Nieren wurden erhöhte C/EBP $\beta$ -Proteinspiegel beschrieben (Bundy et al., 2003; Milde-Langosch et al., 2003; Oya et al., 2003; Rask et al., 2000; Sundfeldt et al., 1999), die dem tumorsuppressiven Effekt von Wildtyp-p53 entgegenwirken könnten. Auf der anderen Seite könnten erhöhte Wildtyp-p53-Proteinspiegel eine tumorfördernde Rolle von C/EBP $\beta$  unter Kontrolle halten. In Geweben, die geprägt sind von immer wieder auftretenden Zyklen an Proliferation und Differenzierung und in denen C/EBP $\beta$  eine wichtige Rolle spielt, wie z.B. die Brustdrüsen während der Schwangerschaft und Laktation oder dem endometrialen Stroma während des Menstruationszyklus des menschlichen Uterus (siehe Kapitel 2.3.2), konnten ebenfalls erhöhte p53-Proteinspiegel bestätigt werden (Pohnke et al., 2004; Sivaraman, 2001).

Im Gegensatz dazu könnte eine erhöhte p53-Expression in normalem Gewebe als eine Vorsorgemaßnahme angesehen werden, die im Falle einer Dysregulation von C/EBP $\beta$ , entsprechende Gegenmaßnahmen einleiten kann, wie z.B. Zellzyklusarrest.

## **5.2 Rolle von p53 im Dezidualisierungsprozess**

Auf der Suche nach weiteren Transkriptionsfaktoren, die an dem Prozess der Dezidualisierung von endometrialen Stromazellen (ESZ) beteiligt sind, wurde erstaunlicherweise p53 als ein Faktor identifiziert, der, in Abwesenheit von p53 Bindungsstellen, eine C/EBP $\beta$ -induzierte Aktivierung eines intakten dPRL-Promotors zu inhibieren vermag. Eine kürzlich erschienene Studie aus unserer Arbeitsgruppe demonstrierte zudem erstmals eine Hochregulierung von Wildtyp-p53 in

dezidualisierenden ESZ. In verschiedenen ESZ-Präparationen erfolgte dabei eine Akkumulation von p53 im Kern nach 6 Tagen 8-Br-cAMP-Behandlung. Darüber hinaus konnte p53 in Gewebeschnitten von humanem Endometrium in der späten Lutealphase in Zellkernen des Stroma-Kompartimentes nachgewiesen werden (siehe Abb. 2.10; Kapitel 2.4) (Pohnke et al., 2004).

p53 ist als „Wächter des Genoms“ für die Aufrechterhaltung und Integrität des Genoms in normalen Zellen verantwortlich (Lane, 1992). In Antwort auf genotoxischen Stress erfolgt ein rapider Anstieg der intrazellulären p53-Proteinkonzentration. Die Akkumulation im Kern beruht dabei auf einer Proteinstabilisierung durch posttranslationale Modifikationen, hauptsächlich durch Phosphorylierung, Azetylierung oder Sumoylierung (Apella & Anderson, 2001). Diese Akkumulation führt entweder zu einem Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>- oder G<sub>2</sub>-Phase, mit der Möglichkeit der DNA-Reparatur, oder leitet die Apoptose ein. Die Induktion des Mdm-2-Proteins bewirkt eine Inhibierung des p53 Signals. Es bindet p53 an der aminoterminalen Domäne, blockiert dadurch dessen Transaktivierungsfunktion und initiiert dessen Abbau über den 26-S-Proteasom-Komplex (Vousden, 2002).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Akkumulation von Wildtyp-p53 im Kern von dezidualisierenden ESZ nicht akut erfolgt, sondern erst nach 2 bis 4 Tagen einsetzt und auch nach 12 Tagen immer noch hoch ist. Der Mechanismus dieser späten, anhaltenden Akkumulation in differenzierenden ESZ ist noch nicht klar. Erhöhte Proteinlevel beruhen dabei allerdings nicht auf einer verstärkten Transkription des p53-Genes (siehe Abb. 4.23; Kapitel 4.6.4), sondern vermutlich auf einer Stabilisierung des p53-Proteins. Eine mögliche Ursache dafür wäre eine Erniedrigung des Hdm-2-Spiegels. Tatsächlich zeigte sich eine Abnahme des nukleären Hdm-2 Proteinspiegels nach 6 und 12 Tagen 8-Br-cAMP-Behandlung. Obwohl der p53-responsive Hdm-2-P2-Promotor durch p53 aktiviert zu sein scheint, nachweislich durch einen erhöhten s-Hdm-2 Transkriptlevel (siehe Abb. 4.23, B; Kapitel 4.6.4), war der Hdm-2-Proteinspiegel in Folge nicht erhöht (siehe Abb. 4.23, A). Der fehlende Nachweis des Hdm-2-Proteins in Kernextrakten könnte sowohl auf einem erhöhten Kernexport als auch auf einer Blockade des Hdm-2 Transportes aus dem Zytoplasma in den Kern beruhen. Die Einschleusung von Hdm-2 in den Kern ist von seinem Phosphorylierungsstatus abhängig (Mayo & Donner, 2001). Eine Hypophosphorylierung von Hdm-2 führt zu seiner Sequestrierung im Zytoplasma. Eine Blockade des nukleären Eintritts von Hdm-2 würde somit nicht nur die Bindung und den

Abbau von p53 verhindern, sondern auch zu einer Stabilisierung des p53-Proteins führen. Ein wichtiger Faktor in diesem Prozess ist das Protein Akt (PKB). Studien aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass auch der Spiegel des Akt-Proteins durch eine 8-Br-cAMP-Behandlung deutlich reduziert war und somit auch keine Phosphorylierung von Hdm-2 erfolgen konnte (Pohnke et al., 2004). Darüber hinaus kann eine Stabilisierung von p53 durch die Aktivierung von PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosom 10*) (Scheid & Woodgett, 2003) erreicht werden. PTEN dephosphoryliert den sekundären Botenstoff PIP<sub>3</sub> (Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat) und inhibiert somit die Aktivierung von Akt. Als Konsequenz wird Hdm-2 nicht phosphoryliert und verbleibt im Zytoplasma, wo es einem schnellen Abbau unterworfen ist (Oren et al., 2002; Mayo & Donner, 2002).

Die Frage nach der transkriptionellen Aktivität von p53 in dezidualisierenden ESZ ist noch nicht geklärt. Der Nachweis der transkriptionellen Aktivierungsfähigkeit kann nicht allein auf dem beobachteten erhöhten Transkriptlevel von s-Hdm-2 begründet werden. Phelps et al. (2003) berichteten eine p53-unabhängige Aktivierung des Hdm-2 P2-Promotors in Östrogenrezeptor- $\alpha$ -positiven Brustkrebszellen. Zudem sprechen die kinetischen Daten der p53-Akkumulation in dezidualisierenden ESZ eher gegen einen aktiven Status von p53. Die Aktivierung von p53 wird normalerweise durch Stressfaktoren akut hochgeregelt und erfolgt durch posttranslationale Modifikationen (Appella, 2001). In dezidualisierten ESZ akkumuliert p53 allerdings erst nach einigen Tagen.

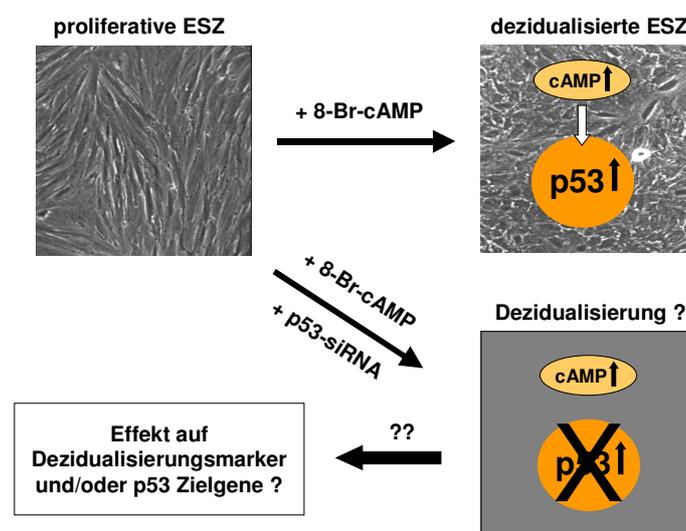
Durch einen cAMP-Entzugsversuch konnte bestätigt werden, dass eine enge Korrelation zwischen der Akkumulation des p53-Proteins und dem Differenzierungsstatus von ESZ besteht. Mit Entzug des 8-Br-cAMP-Stimulus erfolgte nicht nur ein Rückgang der Dezidualisierung, gekennzeichnet durch eine morphologische Umwandlung der ESZ in einen proliferativen Zustand (siehe Abb. 4.22; Kapitel 4.6.4) und eine Reduzierung der Dezidualisierungsmarker (siehe Abb. 4.23, B; Kapitel 4.6.4), sondern bewirkte gleichzeitig auch eine Reduzierung des p53-Proteins (siehe Abb. 4.23, A).

Die Funktion des erhöhten p53-Proteinspiegels ist noch unklar. Möglicherweise diene es dazu, den proliferativen Status des Endometriums in Grenzen zu halten und durch Zellzyklusarrest den Differenzierungsstatus einzuleiten. Des Weiteren könnte p53, im Falle, dass keine Einnistung des Embryos erfolgt, die Apoptose der dezidualen ESZ einleiten und dadurch den Beginn der Menstruation auslösen. Zudem wäre eine

Hochregulierung als Schutzmechanismus während der Implantation denkbar, um bei möglichen Fehlfunktionen sofort einen Zellzyklus oder die Apoptose einleiten zu können. Ob es sich bei der Expression von p53 in ESZ letztlich nur um eine Begleiterscheinung handelt, oder ob p53 eine bestimmte Rolle im Dezidualisierungsprozess zukommt, sollte durch Studien mit der RNAi-Methode geklärt werden. Der Mechanismus der RNAi beruht auf kleinen RNA-interagierenden RNA-Molekülen, si (*small interference*)-RNAs, die zu einer sequenz-spezifischen Erkennung und zum Abbau von RNA führen. Das Resultat ist ein „*Knock down*“-Phänotyp (Elbashir et al., 2001; Sharp, 1999; Zamore et al., 2000). Eine Mischung aus verschiedenen p53-siRNAs (Brummelkamp et al., 2002; Irwin et al., 2003) führte nach einer dreitägigen 8-Br-cAMP-Behandlung zu einer deutlichen Reduktion des p53-Proteinspiegels, die auch nach 6 Tagen immer noch bestehen blieb. Es ist somit gelungen, die RNAi-Methode an humanen ESZ zu etablieren.

### 5.3 Ausblick

Um eine physiologische Rolle von p53 im Dezidualisierungsprozess von ESZ nachzuweisen, ist die Aufklärung des Effektes eines reduzierten p53-Proteinspiegels auf die Expression von Dezidualisierungsmarkern und p53-Zielgenen von entscheidender Bedeutung. Dabei könnte der Einfluss sowohl auf Proteinebene als auch auf RNA-Ebene überprüft werden.



**Abbildung 5.1:** Überprüfung einer möglichen Relevanz von p53 im Dezidualisierungsprozess von ESZ mittels der RNAi-Methode

Stimulation von proliferativen ESZ mit 8-Br-cAMP führt zu einer Dezidualisierung von ESZ und resultiert in einer Erhöhung des intrazellulären p53-Proteinspiegels. Die Behandlung mit p53-siRNA führt zu einer Reduzierung des endogenen Proteins. Mit dieser Technik kann nun die Frage einer Funktion von p53 im Dezidualisierungsprozess untersucht werden.

Im Zusammenhang mit der engen Korrelation von erhöhten p53- und C/EBP $\beta$ -Proteinspiegeln während der Dezidualisierung und der Annahme einer Interaktion der beiden Faktoren liegt die Vermutung einer gegenseitigen Beeinflussung nahe. Es ist beispielsweise zu vermuten, dass p53 eine kontrollierte C/EBP $\beta$ -abhängige Proliferation des Endometriums vermittelt. Dabei könnte es nicht nur einer unkontrollierten Proliferation entgegenwirken, sondern auch den Dezidualisierungsprozess unterstützen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Akira S., Isshiki H., Sugita T., Tanabe O., Kinoshita S., Nisho Y., Nakajima T., Hirano T., Kishimoto T. (1990) A nuclear factor for IL-6 expression (NF-IL6) is a member of a C/EBP family. *EMBO J.* 9: 1897-1906
- Alarcon-Vargas D., Ronai Z. (2002) p53-Mdm2--the affair that never ends. *Carcinogenesis* 23: 541-547
- Allamane S., Ratel D., Jourdes P., Berger F., Benabid A.L., Wion D. (2001) p53 status and gene transfer experiments using CMV enhancer/promoter. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 280: 45-47
- Almog N., Rotter V. (1997) Involvement of p53 in cell differentiation and development. *Biochim. Biophys. Acta* 1333: F1-F27
- Aloni-Grinstein R., Zan-Bar I., Alboum I., Goldfinger N., Rotter V. (1993) Wildtype p53 functions as a control protein in the differentiation pathway of B-cell lineage. *Oncogene* 8: 3297-3305
- Aloni-Grinstein R., Schwartz D., Rotter V. (1995) Accumulation of wildtype p53 protein upon  $\gamma$ -irradiation induces a G<sub>2</sub>-dependent immunoglobulin  $\kappa$  light chain gene expression. *EMBO J.* 14: 1392- 1401
- Appella E. (2001) Modulation of p53 function in cellular regulation. *Eur. J. Biochem.* 268: 2763
- Appella E., Anderson C.W. (2001) Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stress. *Eur. J. Biochem.* 268: 2764-2772
- Armstrong J.F., Kaufman M.H., Harrison D.J., Clarke A.R. (1995) High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice. *Curr. Biol.* 5: 931-936
- Ashcroft M., Vousden K.H. (1999) Regulation of p53 stability. *Oncogene* 18: 7637-7643
- Ashcroft M., Kubbutat M.H.G., Vousden K.H. (1999) Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 19: 1751-1758
- Avantaggiati M.L., Ogryzko V., Gardner K., Giordano A., Levine A.S., Kelly K. (1997) Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell.* 89: 1175-1184
- Baer M., Johnson P.F. (2000) Generation of truncated C/EBP $\beta$  isoforms by *in vitro* proteolysis. *J. Biol. Chem.* 275: 26582-26590
- Bakhanashvili M. (2001) Exonucleolytic proofreading by p53 protein. *Eur. J. Biochem.* 268: 2047-2054

- Balagurumoorthy P., Sakomoto H., Lewis M.S., Zambrano N., Clore G.M., Gronenborn A.M., Appella E., Harrington R.E. (1995) Four p53 DNA-binding domain peptides bind natural p53-response elements and bend the DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8591-8595
- Balkalkin G., Yakovleva T., Selivanova G., Magnusson K.P., Szekely L., Kiseleva E., Klein G., Terenius L., 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
- Barak Y., Juven T., Haffner R., Oren M. (1993) Mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* 12: 461-468
- Barlev N.A., Liu L., Chehab N.H., Mansfield K., Harris K.G., Halazonetis T.D., Berger S.L. (2001) Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferase. *Mol. Cell.* 8: 1243-1254
- Bayle J.H., Elenbaas B., Levine A.J. (1995) The carboxyl-terminal domain of the p53 protein regulates sequence-specific DNA binding through its nonspecific nucleic acid-binding activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5729-5733
- Ben-Jonathan N., Mershon J.L., Allen D.L., Steinmetz R.W. (1996) Extrapituitary prolactin: Distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine Rev.* 17: 639-669
- Bienz B., Zakut-Houri R., Givol D., Oren M. (1984) Analysis of the gene coding for the murine cellular tumour antigen p53. *EMBO J.* 3: 2179-2183
- Blagosklonny M.V. (2000) p53 from complexity to simplicity: mutant p53 stabilization, gain-of-function, and dominant-negative effect. *FASEB J.* 14: 1901-1907
- Blobel G.A. (2000) CREB-binding protein and p300: molecular integrators of hematopoietic transcription. *Blood* 95: 745-755
- Bonhoff A., Gellersen B. (1996) Modulation of prolactin secretion in human myometrium by cytokines. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 54: 55-62
- Boruk M., Savory J.G.A., Hache R.J.G. (1998) AF-2-Dependent potentiation of CCAAT enhancer binding protein  $\beta$ -mediated transcriptional activation by glucocorticoid receptor. *Mol. Endocrinol.* 12: 1749-1763
- Boyd S.D., Tsai K.Y., Jacks T. (2000) An intact HDM2 RING-finger domain is required for nuclear exclusion of p53. *Nat. Cell. Biol.* 2: 563-568
- Brooks C.L., Gu W. (2003) Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 upregulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 15: 164-171
- Brooks C.L., Li M., Gu W. (2004) Monoubiquitination: The signal for nuclear export? *Cell Cycle* 3: 436-438

- Brosens J.J., Hayashi N., White J.O. (1999) Progesterone receptor regulates decidual prolactin expression in differentiating human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 140: 4809-4820
- Brosens J.J., Pijnenborg R., Brosens I.A. (2002) The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of literature. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 187: 1416-1423
- Brummelkamp T.R., Bernards R., Agami R. (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296: 550-553
- Brys M., Romanowicz-Makowska H., Nawrocka A., Krajewska W.M. (2000) Female breast carcinomas: nuclear and cytoplasmic proteins versus steroid receptors. *Cytobios* 101: 87-94
- Buck M., Chojkier M. (2003) Signal transduction in the liver: C/EBP $\beta$  modulates cell proliferation and survival. *Hepatology* 37: 731-738
- Bundy L.M., Sealy L. (2003) CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBP $\beta$ )-2 transforms normal mammary epithelial cells and induces epithelial to mesenchymal transition in culture. *Oncogene* 22: 869-883
- Buschmann T., Adler V., Matusevich E., Fuchs Y., Ronai Z. (2000) p53 phosphorylation and association with murine double minute 2, c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase p14<sup>ARF</sup>, and p300/CBP during the cell cycle and after exposure to ultraviolet irradiation. *Cancer Res.* 60: 896-900
- Buschmann T., Lin Y., Aithmitti N., Fuchs S.Y., Lu H., Resnick-Silverman L., Manfredi J.J., Ronai Z., Wu X. (2001a) Stabilization and activation of p53 by the coactivator protein TAF<sub>II</sub>31. *J. Biol. Chem.* 276: 13852-13857
- Buschmann T., Potapova O., Bar-Shira A., et al. (2001b) Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase phosphorylation of p53 on Thr-81 is important for p53 stabilization and transcriptional activities in response to stress. *Mol. Cell. Biol.* 21: 2743-2754
- Calkhoven C.F., Müller C., Leutz A. (2000) Translational control of C/EBP $\alpha$  and C/EBP $\beta$  isoform expression. *Genes Dev.* 14: 1920-1932
- Cao Z., Umek R.M., McKnight S.L. (1991) Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.* 5: 1538-1552
- Cao Y., Gao Q., Wazer D.E., Band V. (1997) Abrogation of wild-type p53-mediated transactivation is insufficient for mutant p53-induced immortalization of normal human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 57: 5584-5589
- Chan A.K., Persad S., Litchfield D.W., Wright J.A. (1999) Ribonucleotide reductase R2 protein is phosphorylated at serine-20 by P34cdc2 kinase. *Biochem. Biophys. Acta* 1448: 363-371

- Chao C., Saito S., Anderson C.W., Appella E., Xu Y. (2000) Phosphorylation of murine p53 at Ser-18 regulates the p53 response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 11936-11941
- Chen J., Lin J., Levine A.J. (1995) Regulation of transcription functions of the tumor suppressor by the *mdm-2* oncogene. *Mol. Med.* 1: 142-152
- Chen J., Marechal V., Levine A. (1993) Mapping of the p53 and mdm-2 interaction Domains. *Mol. Cell. Biol.* 13: 4107- 4114
- Chen P.-L., Riley D.J., Cheng-Kiang S., Lee W.-H. (1996) Retinoblastoma protein directly interacts with and activates the transcription factor NF-IL6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 465-469
- Chen X. (2002) Cyclin G: A regulator of the p53-Mdm2 network. *Dev. Cell* 2: 518-519
- Chène P. (1998) *In vitro* analysis of the dominant negative effect of p53 mutants. *J. Mol. Biol.* 281: 205-209
- Chène P. (2001) The role of tetramerization in p53 function. *Oncogene* 20: 2611-2617
- Chène P., Bechter E. (1999) p53 mutants without a functional tetramerization domain are not oncogenic. *J. Mol. Biol.* 286: 1269-1274
- Chinkers M. (2001) Protein phosphatase 5 in signal transduction. *Trends Endocrin. Metab.* 12: 28-32
- Chipuk J.E., Kuwana T., Bouchier-Hayes L., Droin N.M., Newmeyer D.D., Schuler M., Green D.R. (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303: 1010-1014
- Cho Y., Gorina S., Jeffrey P.D., Pavletich N.P. (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265: 346-355
- Choi J., Donehower L.A. (1999) p53 in embryonic development: maintaining a fine balance. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 38-47
- Christian M., Pohnke Y., Kempf R., Gellersen B., Brosens J.J. (2002a) Functional association of PR and CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  isoforms: Promotor-dependent cooperation between PR-B and liver-enriched inhibitory protein, or liver-enriched activatory protein and PR-A in human endometrial stromal cells. *Mol. Endocrinol.* 16: 141-154
- Christian M., Zhang X., Schneider-Merck T., Unterman T.G., Gellersen B., White J.O., Brosens J.J. (2002b) Cyclic AMP-induced forkhead transcription factor, FKHR, cooperates with CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  in differentiating human endometrial stromal cells. *J. Biol. Chem.* 277: 20825-20832

- Clore G.M., Ernst J., Clubb R., Omichinski J.G., Kennedy W.M., Sakaguchi K., Appella E., Gronenborn A.M. (1995) Refined solution structure of the oligomerization domain of the tumour suppressor p53. *Nat. Struct. Biol.* 2: 321-333
- Cortés-Canteli M., Pignatelli M., Santos A., Perez-Castillo A. (2002) CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 277: 5460-5467
- Craig A.L., Burch L., Vojtesek B., Mikutowska J., Thompsons A., Hupp T.R. (1999) Novel phosphorylation sites of human tumour suppressor p53 at Ser<sup>20</sup> and Thr<sup>18</sup> that disrupt the binding of mdm2 (mouse double minute 2) protein are modified in human cancers. *Biochem. J.*: 342-141
- Crichton D., Woiwode A., Zhang C., Mandavia N., Morton J.P., Warnock L.J., Milner J., White R.J., Johnson D.I. (2003) p53 represses RNA polymerase III transcription by targeting TBP and inhibiting promoter occupancy by TFIIB. *EMBO J.* 22: 2810-2820
- Croniger C., Trus M., Lysek-Stupp K., Cohen H., Liu Y., Darlington G.J., Poli V., Hanson R., Reshef L. (1997) Role of the isoforms of CCAAT/enhancer-binding protein in the initiation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription at birth. *J. Biol. Chem.* 272: 26306-26312
- Cummins J.M., Vogelstein B. (2004) HAUSP is required for p53 destabilization. *Cell Cycle* 3: 689-692
- Deb S., Jackson C.T., Subler M.A., Martin D.W. (1992) Modulation of cellular and viral promoters by mutant human p53 proteins found in tumor cells. *J. Virol.* 66: 6164-6170
- Deppert W. (1994) The yin and yang of p53 in cellular proliferation. *Cancer Biol.* 5:187-202
- De Rozières S., Maya R., Oren M., Lozano G. (2000) The loss of *mdm2* induces p53 mediated apoptosis. *Oncogene* 19: 1691-1697
- Descombes P., Schibler U. (1991) A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the same mRNA. *Cell* 67: 569-579
- Dey S.K., Lim H., Das S.K., Reese J., Paria B.C., Daikoku T., Wang H. (2004) Molecular cues to implantation. *Endocr. Rev.* 25: 341-373
- Diehl A.M. (1998) Roles of CCAAT/enhancer-binding proteins in regulation of liver regenerative growth. *J. Biol. Chem.* 273: 30843-30846
- DiMattia G.E., Gellersen B., Duckworth M.L., Friesen H.G. (1990) Human prolactin gene expression. The use of an alternative noncoding exon in decidua and the IM-9-P3 lymphoblast cell line. *J. Biol. Chem.* 265: 16412-16421
- Donehower L.A., Harvey M., Slagle B.L., McArthur M.J., Montgomery C.A. Jr., Butel J.S., Bradley A. (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356: 215-221

- Donehower L.A. (1996) The p53-deficient mouse: a model for basic and applied cancer studies. *Semin. Cancer Biol.* 7: 269-278
- Dumaz N., Milne D.M., Lesley J.J., Meek D.W. (2001) Critical roles for the serine 20, but not serine 15, phosphorylation site and for the polyproline domain in regulating p53 turnover. *Biochem. J.* 359: 459-464
- Duong D.T., Waltner-Law M., Sears R., Sealy L., Granner D.K. (2002) Insulin inhibits hepatocellular glucose production by utilizing liver-enriched transcriptional inhibitory protein to disrupt the association of the CREB-binding protein and RNA polymerase II with the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter. *J. Biol. Chem.* 277: 32234-32242
- Eckner R., Ewen M.E., Newsome D., Gerdes M., DeCaprio J.A., Lawrence J.B., Livingston D.M. (1994) Molecular cloning and functional analysis of the adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev.* 8: 869-884
- Elbashir S.M., Lendeckel W., Tuschl T. (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15: 188-200
- Elberg G., Gimble J.M., Tsai S.Y. (2000) Modulation of the murine peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 promoter activated by CCAAT/enhancer-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 27: 27815-27822
- 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., Vogelstein B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*: 75: 817-825
- El-Deiry W.S. (1998) Regulation of p53 downstream genes. *Sem. Cancer Biol.* 8: 345-357
- Espinosa J.M., Emerson B.M. (2001) Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol. Cell* 8: 57-69
- Fang S., Jensen J.P., Ludwig R.L., Vousden K.H., Weissmann A.M. (2000) Ubiquitin protein ligase activity of Mdm2: Differential RING finger requirements for ubiquitination and proteosomal targeting of Mdm2 and p53. *J. Biol. Chem.* 275: 8945-8951
- Farmer G., Friedlander P., Colgan J., Manley J.L., Prives C.A. (1996) Transcriptional repression by p53 involves molecular interactions distinct from those with the TATA box binding protein. *Nucleic Acids Res.* 24: 4281-4288
- Fei P., Bernhard E.J., El-Deiry W.S. (2002) Tissue-specific induction of p53 targets *in vivo*. *Cancer Res.* 62: 7316-7327
- Firth S.M., Baxter R.C. (2002) Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocr. Rev.* 23: 824-854

- Frazier M., He X., Wang J., Gu Z., Cleveland J.L., Zambetti G.P. (1998) Activation of *c-myc* gene expression by tumor-derived p53 mutants requires a discrete C-terminal domain. *Mol. Cell Biol.* 18: 3735-3743
- Freedman D.A., Levine A.J. (1998) Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol. Cell. Biol.* 18: 7288-7293
- Fridman J.S., Scott W.L. (2003) Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22: 9030-9040
- Friedler A., Hansson L.O., Vepintsev D.B., Freund S.M.V., Rippin T.M., Nikolova P.V., Proctor M.R., Rüdiger S., Fersht A.R. (2002) A peptide that binds and stabilizes p53 core domain: Chaperone strategy for rescue of oncogenic mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 937-942
- Friedler A., Vepintsev D.B., Hansson L.O., Fersht A.R. (2003) Kinetic instability of p53 core domain mutants. *J. Biol. Chem.* 278: 24108-24112
- Fuchs S.Y., Adler V., Buschmann T., Yin Z., Wu X., Jones S.N., Ronai Z. (1998) JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev.* 12: 2658-2663
- Funk W.D., Pak D.T., Karas R.H., Wright W.E., Shay J.W. (1992) A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol. Cell. Biol.* 12: 2866-2871
- Gao J., Mazela J., Tseng L. (1994) Activation of the human IGFBP-1 gene promoter by progesterin and relaxin in primary culture of human endometrial stromal cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 104: 39-46
- Gellersen B., Bonhoff A., Hunt N., Bohnet H.G. (1991) Decidual-type prolactin expression by human myometrium. *Endocrinology* 129: 158-168
- Gellersen B., Brosens J.J. (2003) Cyclic AMP and progesterone receptor cross-talk in human endometrium: a decidualizing affair. *J. Endocrin.* 178: 357-372
- Gellersen B., Kempf R., Telgmann R. (1997) Human endometrial stromal cells express novel isoforms of the transcriptional modulator CREM and up-regulate ICER in the course of decidualization. *Mol. Endo.* 11: 97-113
- Gellersen B., Kempf R., Telgmann R., DiMattia G.E. (1994) Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma. *Mol. Endocrinol.* 8: 356-373
- Geyer R.K., Yu Z.K., Maki C.G. (2000) The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export. *Nat. Cell. Biol.* 2: 569-573
- Giaccia A.J., Kastan M.B. (1998) The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev.* 12: 2973-2983

- Giannakakou P., Sackett D.L., Ward Y., Webster K.R., Blagosklonny M.V., Fojo T. (2000) p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein. *Nature Cell Biol.* 2: 709-717
- Göhler T., Reimann M., Cherny D., Walter K., Warnecke G., Kim E., Deppert W. (2002) Specific interaction of p53 with target binding sites is determined by DNA conformation and is regulated by the C-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 277: 41192-41203
- Goodman R.H., Smolik S. (2000) CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev.* 14: 1553-1577
- Gostissa M., Hengstermann A., Fogal V., Sandy P., Schwarz S.E., Scheffner M., Del Sal G. (1999) Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO J.* 18: 6462-6471
- Gottifredi V., Karni-Schmidt O., Shih S.S., Prives C. (2001) p53 down-regulates CHK1 through p21 and the retinoblastoma protein. *Mol. Cell. Biol.* 21:1066-1076
- Gottlieb E., Haffner R., von Ruden T., Wagner E.F., Oren M. (1994) Down-regulation of wildtype p53 activity interferes with apoptosis of IL-3-dependent hematopoietic cells following IL-3 withdrawal. *EMBO J.* 13: 1368-1374
- Gough M.N. (1988) Rapid and quantitative preparation of cytoplasmic RNA from small numbers of cells. *Anal. Biochem.* 173: 93-95
- Graham J.D., Clarke C.L. (1997) Physiological action of progesterone in target tissue. *Endocr. Rev.* 18: 502-519
- Grimm S.L., Rosen J.M. (2003) The role of C/EBP $\beta$  in mammary gland development and breast cancer. *J. Mamm. Biol. Neopl.* 8: 191-204
- Grossmann S.R. (2001) p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *Eur. J. Biochem.* 268: 2773-2778
- Gu W., Luo J., Brooks C.L., Nikolaev A.Y., Li M. (2004) Dynamics of the p53 acetylation pathway. *Novartis Found Symp.* 259: 197-205
- Hammond S.M., Caudy A.A., Hannon G.J. (2001) Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat. Rev. Genet.* 2: 110-119
- Haneda M., Kojima E., Nishikimi A., Hasegawa T., Nakashima I., Isobe K. (2004) Protein phosphatase 1, but not protein phosphatase 2A, dephosphorylates DNA-damaging stress-induced phospho-serine 15 of p53. *FEBS Lett.* 567: 171-174
- Harada K., Ogden G.R. (2000) An overview of the cell cycle arrest protein, p21(WAF1). *Oral Oncol.* 36: 3-7
- Hattori T., Ohoka N., Inoue Y., Hayashi H., Onozaki K. (2003) C/EBP family transcription factors are degraded by the proteasome but stabilized by forming dimer. *Oncogene* 22: 1273-1280

- Haupt S., Berger M., Goldberg Z., Haupt Y. (2003) Apoptosis – the p53 network. *J. Cell. Sci.* 116: 4077-4085
- Hendricks-Taylor L.R., Bachinski L.L., Siciliano M.J., Feritta A., Trask B., de Jong P.J., Ledbetter D.H., Darlington G.J. (1992) The CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP alpha) gene (CEBPA) maps to human chromosome 19q13.1 and the related nuclear factor NFIL-6 (C/EBP beta) gene (CEBPB) maps to human chromosome 20q13.1. *Genomics* 14: 12-17
- Hermeking H., Lengauer C., Polyak K., He T.C., Zhang L., Thiagalingam S., Kinzler K.W., Vogelstein B. (1997) 14-3-3 $\sigma$  is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell* 1: 3-11
- Hochstrasser M. (2002) SP-RING for SUMO: new function bloom for a ubiquitin-like protein. *Cell* 107: 5-8
- Hoffman R., Craik D.J., Pierens G., Bolger R.E., Otvos L. Jr. (1998) Phosphorylation of the C-terminal sites of human p53 reduces non-sequence-specific DNA binding as modeled with synthetic peptides. *Biochemistry* 37: 13755-13764
- Honda R., Tanaka H., Yasuda H. (1997) Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* 420: 25-27
- Hsieh J.K., Chan F.S., O'Connor D.J., Mittnacht S., Zhong S., Lu X. (1999) RB regulates the stability and the apoptotic function of p53 via MDM2. *Mol. Cell* 3: 181-193
- Hsieh Y.-Y., Chang C.-C., Hsu C.-W., Lin C.-S. (2004) Gene transfections with p53 and p21 inhibit cell proliferation, collagen type I, leukemia inhibitory factor, and tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in leiomyoma cells. *Fertil. Steril.* 81: 1665-1670
- Hupp T.R. (1995) Small peptides activate the latent sequence-specific DNA-binding function of p53. *Cell* 83: 237-245
- Hupp T.R., Lane D.P. (1994) Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Curr. Biol.* 4: 865-875
- Hurst H.C. (1995) Transcription factor 1: bZIP proteins. *Protein Profile* 2: 101-168
- Ioffe O.B., Papadimitriou J.C., Drachenberg C.B. (1998) Correlation of proliferation indices, apoptosis, and related oncogene expression (bcl-2 and c-erbB-2) and p53 in proliferative, hyperplastic, and malignant endometrium. *Hum. Pathol.* 29: 1150-1159
- Irwin M.S., Kondo K., Marin M.C., Cheng L.S., Hahn W.C., Kaelin W.G. Jr. (2003) Chemosensitivity linked to p73 function. *Cancer Cell* 3: 403-410
- Isobe M., Emanuel B.S., Givol D., Oren M., Croce C.M. (1986) Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 320: 84-85
- Iwabuchi K., Bartel P.L., Li B., Marraccino R., Fields S. (1994) Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6098-6102

- Iwakuma T., Lozano G. (2003) MDM2, an introduction. *Mol. Cancer Res.* 1: 993-1000
- Janus F., Albrechtsen N., Knippschild U., Wiesmuller L., Grosse F., 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
- Jayaraman L., Prives C. (1999) Covalent and noncovalent modifiers of the p53 protein. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 76-87
- Jeffrey P.D., Gorina S., Pavletich N.P. (1995) Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* 267: 1498-1502
- Jenkins J.R., Rudge K., Currie G.A. (1984) Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* 312: 651-654
- Joers A., Kristjuhan A., Kadaja L., Maimets T. (1998) Tumour associated mutants of p53 can inhibit transcriptional activity of p53 without heterooligomerization. *Oncogene* 17: 2351-2358
- Johnson P.F. (1993) Identification of C/EBP basic region residues involved in DNA sequence recognition and half-site spacing preference. *Mol. Cell. Biol.* 13: 6919-6930
- Juang L.-J., Shia W.-J., Chen M.-H., Yang W.-M., Seto E., Lin Y.-S., Wu C.W. (2000) Histone deacetylase specifically down-regulates p53-dependent gene activation. *J. Biol. Chem.* 275: 20436-20443
- Kamijo T., Weber J.D., Zambetti G., Zindy F., Roussel M., Sherr C.J. (1998) Functional and physical interaction of the tumor suppressor with p53 and MDM2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 8292-8297
- Kato M.V., Sato H., Nagayoshi M., Ikawa Y. (1997) Upregulation of the elongation factor-1 $\alpha$  gene by p53 in association with death of an erythroleukemic cell line. *Blood.* 90:1373-1378
- Kern S.E., Pietenpol J.A., Thiagalingam S., Seymor A., Kinzler K.W., Vogelstein B. (1992) Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science* 256: 827-830
- Kieser A., Weich H.A., Brandner G., Marme D., Kolch W. (1994) Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene* 9: 963-969
- Kim D.W., Uetsuki T., Kaziro Y., Yamaguchi N., Sugano S. (1990) Use of the human elongation factor 1 $\alpha$  promoter as a versatile and efficient expression system. *Gene* 91: 217-723
- Kim E., Rohaly G., Heinrichs S., Gimnopoulos D., Meißner D., Deppert W. (1999) Influence of promotor DNA topology on sequence-specific DNA binding and transactivation by tumor suppressor p53. *Oncogene* 18: 7310-7318

- Kim J., Cantwell C.A., Johnson P.F., Pfarr C.M., Williams S.C. (2002) Transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding proteins is controlled by a conserved inhibitory domain that is a target for sumoylation. *J. Biol. Chem.* 277: 38037-38044
- Ko L.J., Prives C. (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 10: 1054-1072
- Kobet E., Zeng X., Zhu Y., Keller D., Lu H. (2000) MDM2 inhibits p300-mediated p53 acetylation and activation by forming a ternary complex with the two proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 12547-12552
- Kowentz-Leutz E., Leutz A. (1999) A C/EBPbeta isoform recruits the SWI/SNF complex to activate myeloid genes. *Mol. Cell.* 4: 735-743
- Kubbutat M.H., Ludwig R.L., Ashcroft M., Vousden K.H. (1998a) Regulation of Mdm2-directed degradation by the C-terminus of p53. *Mol. Cell. Biol.* 18: 5690-5698
- Kubbutat M.H., Vousden K.H. (1998b) Keeping an old friend under control: regulation of p53 stability. *Mol. Med. Today.* 4: 250-256
- Kwek S.S., Derry J., Tyner A.L., Shen Z., Gudov A.V. (2001) Functional analysis and intracellular localization of p53 modified by SUMO-1. *Oncogene* 20: 2587-2599
- Landschulz W.H., Johnson P.F., McKnight S.L. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240: 1759-1764
- Landschulz W.H., Johnson P.F., McKnight S.L. (1989) The DNA binding domain of rat liver nuclear protein C/EBP is bipartite. *Science* 243: 1681-1688
- Lane D.P. (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16
- Lane D.P., Crawford L.V. (1979) T Antigen is bound to a host protein in SV 40-transformed cells. *Nature* 278: 261-263
- Lane D.P., Hall P.A. (1997) MDM2—arbiter of p53's destruction. *Trends Biochem. Sci.* 22: 372-374
- Lane M.D., Tang Q.Q., Jiang M.S. (1999) Role of CCAAT enhancer binding protein (C/EBPs) in adipocyte differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266: 677-683
- Lauricella M., Clavaruso G., Carabillo M., D'Anneo A., Giuliano M., Emanuele S., Vento R., Tesoriere G. (2001) pRB suppresses camptothecin-induced apoptosis in human osteosarcoma Saos-2 cells by inhibiting c-Jun N-terminal kinase. *FEBS Lett.* 499: 191-197
- Lee S., Elenbaas B., Levine A.J., 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
- Leidenberger F.A. (1998) *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hongkong, London, Mailand, Paris, Santa Clara, Singapur, Tokio

- Lekström-Himes J., Xanthopoulos K.G. (1998) Biological role of CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J. Biol. Chem.* 273: 28545-28548
- Leveillard T., Andera L., Bissonnette L., Schaeffer L., Bracco J., Egly B., Wasylyk B. (1996) Functional interaction between p53 and the THIIH complex are affected by tumour-associated mutations. *EMBO J.* 15: 1615-1624
- Levine A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331
- Levine A.J., Chang A., Dittmer D., Notterman D.A., Silver A., Thorn K., Welsh D., Wu M. (1994) The p53 tumor suppressor gene. *J. Lab. Clin. Med.* 123: 817-823
- Levine A.J., Momand J. (1990) Tumor suppressor genes: the p53 and retinoblastoma sensitivity genes and gene products. *Biochim. Biophys. Acta* 1032: 119-136
- Levine A.J., Momand J., Finlay C.A. (1991) The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351: 453-456
- Li M., Brooks C.L., Kon N., Gu W. (2004) A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway. *Mol. Cell.* 13: 879-886
- Li M., Chen D., Shiloh A., Luo J., Nikolaev A.Y., Qin J., Gu W. (2002) Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for 53 stabilization. *Nature* 416: 648-653
- Lill N.L., Grossman S.R., Ginsberg D., DeCaprio J., Livingston D.M. (1997) Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* 387: 823-827
- Lin H.K., Wang L., Hu Y.C., Altuwaijri S., Chang C. (2002) Phosphorylation-dependent ubiquitinylation and degradation of androgen receptor by Akt require Mdm2 E3 ligase. *EMBO J.* 21: 4037-4048
- Lin J., Chen J., Elenbaas B., Levine A.J. (1994) Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and adenovirus 5 E1B 55-kD protein. *Genes Dev.* 8: 1235-1246
- Linzer D.I., Levine A.J. (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV 40 tumor antigen present in SV 40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17: 43-52
- Liu G., Schwartz J.A., Brooks S.C. (1999) p53 down-regulates ER-responsive genes by interfering with the binding of ER to ERE. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264: 359-364
- Lohrum M.A.E., Ashcroft M., Kubbutat M.H.G., Vousden K.H. (2000) Contribution of two independent MDM2-binding domains in p14<sup>ARF</sup> to stabilization. *Curr. Biol.* 10: 539-542
- Lohrum M.A.E., Woods D.B., Ludwig R.L., Balint E., Vousden K.H. (2001) C-terminal ubiquitination of p53 contributes to nuclear export. *Mol. Cell. Biol.* 21: 8521-8532

- Maki C.G. (1999) Oligomerization is required for p53 to be efficiently ubiquitinated by MDM2. *J. Biol. Chem.* 274: 16531-16535
- Margulies L., Sehgal P.B. (1999) Modulation of the human interleukin-6 promoter (IL-6) and transcription factor C/EBP $\beta$  (NF-IL6) activity by p53 species. *J. Biol. Chem.* 268: 15096-15100
- May P., May E. (1999) Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 18: 7621-7636
- Mayo L.D., Donner D.B. (2001) A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11589-11603
- Mayo L.D., Donner D.B. (2002) The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network. *Trends Biochem. Sci.* 27: 462-467
- Mazzaro G., Bossi G., Coen S., Sacchi A., Soddu S. (1999) The role of wild-type p53 in the differentiation of primary hemopoietic and muscle cells. *Oncogene* 18: 5831-5835
- McBride L.J., Koepf S.M., Gibbs R.A., Salser W., Mayrand P.E., Hunkapiller M.W., Kronick M.N. (1989) Automated DNA sequencing methods involving polymerase chain reaction. *Clin. Chem.* 35: 2196-2201
- McLure K.G., Lee P.W.K. (1998) How p53 binds DNA as a tetramer. *EMBO J.* 17: 3342-3350
- Meek D.W. (1994) Posttranscriptional modification of p53. *Semin. Cancer Biol.* 5: 203-210
- Meek D.W. (1999) Mechanism of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene* 18: 7666-7675
- Meek D.W., Knippschild U. (2003) Posttranslational modification of MDM2. *Mol. Cancer Res.* 1: 1017-1026
- Mekeel K.L., Tang W., Kachnic L.A., Luo C.-M., DeFrank J.S., Powell S.N. (1997) Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. *Oncogene* 14: 1847-1857
- Melle C., Nasheuer H.P. (2002) Physical and functional interactions of the tumor suppressor protein p53 and DNA polymerase alpha-primase. *Nucleic Acids Res.* 30: 1493-1499
- Meulmeester E., Frenk R., Stad R., de Graaf P., Marine J.C., Vousden K.H., Jochemsen A.G. (2003) Critical role for a central part of Mdm2 in the ubiquitylation of p53. *Mol. Cell. Biol.* 23: 4929-4938
- Michalopoulos G.K., DeFrances M.C. (1997) Liver regeneration. *Science* 276: 60-66

- Milde-Langosch K., Löning T., Bamberger A.M. (2003) Expression of the CCAAT/enhancer-binding proteins C/EBPalpha, C/EBPbeta and C/EBPdelta in breast cancer: correlations with clinicopathologic parameters and cell-cycle regulatory proteins. *Breast Cancer Res. Treat.* 79: 175-185
- Mink S., Haenig B., Klempnauer K.-H. (1997) Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBP $\beta$ . *Mol. Cell. Biol.* 17:6609-6617
- Minty A., Dumont X., Kaghad M., Caput D. (2000) Covalent modification of p73alpha by SUMO-1. Two-hybrid screening with p73 identifies novel SUMO-1-interacting proteins and a SUMO-1 interaction motif. *J. Biol. Chem.* 275: 36316-36323
- Mizushima S., Nagata S. (1990) pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res.* 18: 5322
- Moos M. Jr., Nguyen N.Y., Liu T.Y. (1988) Reproducible high yield sequencing of proteins electrophoretically separated and transferred to an inert support. *J. Biol. Chem.* 263: 6005-6008
- Mosner J., Mummenbrauer T., Bauer C., Szakiel G., Grosse F., Deppert W. (1995) Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *EMBO J.* 14: 4442-4449
- Müller S., Berger M., Lehembre F., Seeler J.S., Haupt Y., Dejean A. (2000) c-Jun and p53 activity is modulated by SUMO-1 modification. *J. Biol. Chem.* 275: 13321-13329
- Mundt M., Hupp T., Fritsche M., Merkle C., Hansen S., Lane D., Groner B. (1997) Protein interaction at the carboxyl terminus of p53 result in the induction of its in vitro transactivation potential. *Oncogene* 15: 237-244
- Murphy M., Ahn J., Walker K.K., Hoffmann W.H., Evans R.M., Levine A.J., George D.L. (1999) Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev.* 13: 2490-2501
- Myung J., Kim K.B., Crews C.M. (2001) The ubiquitin-proteasome pathway and protease inhibitors. *Med. Res. Reviews* 21: 245-273
- Nelson V., Davis G.E., Maxwell S.A. (2001) A putative protein inhibitor of activated STAT (PIASy) interacts with p53 and inhibits p53-mediated transactivation but not apoptosis. *Apoptosis* 6: 221-234
- Nicholls C.D., McLure K.G., Shields M.A., Lee P.W.K. (2002) Biogenesis of p53 involves cotranslational dimerization of monomers and posttranscriptional dimerization of dimers. *J. Biol. Chem.* 277: 12937-12945
- Novina C.D., Sharp P.A. (2004) The RNAi revolution. *Nature* 430: 161-164
- Okamoto K., Li H., Jensen M.R., Zhang T., Taya Y., Thorgeirsson S.S., Prives C. (2002) Cyclin G recruits PP2A to phosphorylate Mdm2. *Mol. Cell* 9: 761-771

- O'Keefe K., Li H., Zhang Y. (2003) Nucleocytoplasmic shuttling of p53 is essential for MDM2-mediated cytoplasmic degradation but not ubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* 23: 6396-6405
- Olson D.C., Marechal V., Momand J., Chen J., Romocki C., Levine A.J. (1993) Identification and characterization of multiple mdm-2 proteins and mdm-2-p53 protein complexes. *Oncogene* 8: 2353-2360
- Oren M. (1985) The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochim. Biophys. Acta* 823: 67-78
- Oren M., Damalas A., Gottlieb T., Michael D., Taplick J., Martinez Leal J.F., Maya R., Moas M., Seger R., Taya Y., Ben-Ze'ev A. (2002) Regulation of p53-Intricate loops and delicate balances. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 973: 374-383
- Osada S., Yamamoto H., Nishihara T., Imagawa M. (1996) DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *J. Biol. Chem.* 271: 3891-3896
- Ossipow V., Descombes P., Schibler U. (1993) CCAAT/enhancer-binding protein mRNA is translated into multiple proteins with different transcription activation potentials. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8219-8223
- Otto M., Deppert W. (1993) Upregulation of mdm-2 expression in Met A tumor cells tolerating wild-type p53. *Oncogene* 8: 2591-2603
- Oya M., Horiguchi A., Mizuno R., Marumo K., Murai M. (2003) Increased activation of CCAAT/enhancer binding protein-beta correlates with the invasiveness of renal cell carcinomas. *Clin. Cancer Res.* 9: 1021-1027
- Palecek E., Brazdova M., Brazda V., Palecek J., Billova S., Subramaniam V., Jovin T.M. (2001) Binding of p53 and its core domain to supercoiled DNA. *Eur. J. Biochem.* 268: 573-581
- Parada L.F., Land H., Weinberg R.A., Wolf D., Rotter V. (1984) Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 312: 649-651
- Patschinsky T., Deppert W. (1990) Phosphorylation of p53 in primary, immortalized and transformed Balb/c mouse cells. *Oncogene* 5: 1071-1076
- Phelps M., Darley M., Primrose J.N., Blaydes J.P. (2003) p53-independent activation of the hdm2-P2 promoter through multiple transcription factor response elements results in elevated hdm2 expression in estrogen receptor alpha-positive breast cancer cells. *Cancer Res.* 63: 2616-2623
- Picksley S.M., Vojtesek B., Sparks A., 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

- Pochampally R., Fodera B., Chen L., Shao W., Levine E.A., Chen J. (1998) A 60 kd MDM2 isoform is produced by caspase cleavage in numerous apoptotic tumor cells. *Oncogene* 17: 2629-2636
- Pohnke Y., Schneider-Merck T., Fahnenstich J., Kempf R., Christian M., Milde-Langosch K., Brosens J.J., Gellersen B. (2004) Wild-type p53 protein is up-regulated upon cyclic adenosine monophosphate-induced differentiation of human endometrial stromal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89: 5233-5344
- Poli V. (1998) The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions. *J. Biol. Chem.* 273: 29279-29282
- Porterfield S.P. (2001) *Endocrine Physiology*. Second Edition, Mosby, Inc., St. Louis, Missouri, U.S.A.
- Prives C., Hall P.H. (1999) The p53 pathway. *J Pathol.* 187: 112-126
- Prives C., Manley J.L. (2001) Why is p53 acetylated? *Cell* 107: 815-818
- Ramji D.P., Foka P. (2002) CCAAT/enhancer-binding proteins: Structure, function and regulation. *Biochem. J.* 365: 561-575
- Rask K., Thorn M., Ponten F., Kraaz W., Sundfeldt K., Hedin L., Enerbäck S. (2000) Increased expression of the transcription factors CCAAT-enhancer binding protein-beta (C/EBB $\beta$ ) and C/EBZeta (CHOP) correlate with invasiveness of human colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 86: 337-343
- Ray P., Ghosh S.K., Zhang D.H., Ray A. (1997) Repression of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol: inhibition of the DNA-binding activity of the transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B by the estrogen receptor. *FEBS Lett.* 409: 79-85
- Reed M., Wölcker B., Wang P., Wang Y., Anderson M.E., Tegtmeyer P. (1995) The C-terminal domain of p53 recognizes DNA damaged by ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 9455-9459
- Robinson G.W., Johnson P.F., Henninghausen L., Sterneck E. (1998) The C/EBP $\beta$  transcription factor regulates epithelial cell proliferation and differentiation in the mammary gland. *Genes Dev.* 12: 1907-1916
- Rodriguez M.S., Desterro J.M.P., Lain S., Lane D.P., Say R.T. (2000) Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol. Cell. Biol.* 20: 8458-8467
- Rodriguez M.S., Desterro J.M.P., Lain S., Midgley C.A., Lane D.P., Hay R.T. (1999) SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO J.* 18: 6455-6461
- Rodway H., Llanos S., Rowe J., Peters G. (2004) Stability of nucleolar versus non-nucleolar forms of human p14 (ARF). *Oncogene* 23: 6184-6192

- Sakamuro D., Sabbatini P., White E., Prendergast G.C. (1997) The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* 15: 887-898
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467
- Schägger H., von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379
- Scheid M.P., Woodgett J.R. (2003) Unravelling the activation mechanisms of protein kinase B/Akt. *FEBS Lett.* 546: 108-112
- Scheidtmann K.H., Virshup D.M., Kelly T.J. (1991) Dephosphorylation of simian virus 40 large-T antigen and p53 protein by protein phosphatase 2A: inhibition by small-t antigen. *Mol. Cell. Biol.* 11: 1996-2003
- Schmidt D., Müller S. (2002) Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 2872-2877
- Schreiber E., Matthias P., Müller M.M., Schaffner W. (1989) Rapid detection of octamer binding proteins with mini-extra prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 17: 6419
- Seagroves T.N., Krnacik S., Raught B., Gay J., Burgess-Beusse B., Darlington G.J. et al. (1998) C/EBPbeta, but not C/EBPalpha, is essential for ductal morphogenesis, lobuloalveolar proliferation, and functional differentiation in the mouse mammary gland. *Genes Dev.* 12: 1917-1928
- Sengupta S., Harris C.C. (2005) p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6: 44-55
- Sengupta S., Vonesch J.L., Waltzinger C., Zheng H., Wasylyk B. (2000) Negative cross-talk between p53 and the glucocorticoid receptor and its role in neuroblastoma cells. *EMBO J.* 19: 6051-6064
- Sengupta S., Wasylyk B. (2004) Physiological and pathological consequences of the interactions of the p53 tumor suppressor with the glucocorticoid, androgen, and estrogen receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1024: 54-71
- Seto E., Usheva A., Zambetti G.P., Momand J., Horikoshi N., Weinmann R., Levine A.J., Shenk T. (1992) Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 12028-12032
- Sharp P.A. (1999) RNAi and double-strand RNA. *Genes Dev.* 13: 139-141

- Shaulian E., Schreiber M., Piu F., Beeche M., Wagner E.F., Karin M. (2000) The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell* 103: 897-907
- Shaulian E., Zauberman A., Milner J., Davies E.A., Oren M. (1993) Tight DNA binding and oligomerization are dispensable for the ability of p53 to transactivate target genes and suppress transformation. *EMBO J.* 12: 2789-2797
- Shaulsky G., Goldfinger N., Ben-Ze'ev A., 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., Goldfinger N., Rotter V. (1991) Alterations in tumor development in vivo mediated by expression of wild type or mutant p53 proteins. *Cancer Res.* 51: 5232-5237
- Shimon I., Melmed S. (1997) Genetic basis of endocrine disease: pituitary tumor pathogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 1675-1681
- Shirangi T.R., Zaika A., Moll U.M. (2002) Nuclear degradation of p53 occurs during down-regulation of the p53 response after DNA damage. *FASEB J.* 16: 420-422
- Sigal A., Rotter V. (2000) Oncogenic mutation of the p53 tumor suppressor: The demons of the guardian of the genome. *Cancer Res.* 60: 6788-6793
- Sivaraman L., Conneely O.M., Medina D., O'Malley B.W. (2001) p53 is a potential mediator of pregnancy and hormone-induced resistance to mammary carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 12379-12384
- Smith M.L., Chen I.T., Zhan Q., Bae I., Chen C.Y., Gilmer T.M., Kastan M.B., O'Connor P.M., Fornace A.J. Jr. (1994) Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 266: 1376-1380
- Soddu S., Blandino G., Scardigli R., Coen S., Marchetti A., Rizzo M.G., Bossi G., Cimino L., Crescenzi M., Sacchi A. (1996) Interference with p53 proteins inhibits hematopoietic and muscle differentiation. *J. Cell. Biol.* 134: 1-12
- Soussi T., Caron de Fromental C., May P. (1990) Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 5: 945-952
- Soussi T., May P. (1996) Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *J. Mol. Biol.* 260: 623-637
- Southern E.M. (1992) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. 1975. *Biotechnology* 24: 122-139
- Stein B., Yang M.X. (1995) Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta. *Mol. Cell. Biol.* 15: 4971-4979
- Steinmann R.A. (2002) Cell cycle regulators and hematopoiesis. *Oncogene* 21: 3403-3413

- Sterneck E., Tessarollo L., Johnson P.F. (1997) An essential role for C/EBP $\beta$  in female reproduction. *Genes Dev.* 11: 2153-2162
- Stommel J.M., Marchenko N.D., Jimenez G.S., Moll U.M., Hope T.J., Wahl G.M. (1999) A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J.* 18: 1660-1672
- Stommel J.M., Wahl G.M. (2004) Accelerated MDM2 auto-degradation induced by DNA-damage kinases is required for p53 activation. *EMBO J.* 23: 1547-1556
- Stryer L. (1995) *Biochemie*. Spectrum, Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford
- Subler M.A., Martin D.W., Deb S. (1992) Inhibition of viral and cellular promoters by human wild-type p53. *J. Virol.* 66: 4757-4762
- Sundfeldt K., Ivarsson K., Carlsson M., Enerbäck S., Janson P.O., Brännström M., Hedin L. (1999) The expression of CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) in the human ovary in vivo: specific increase in C/EBP $\beta$  during epithelial tumour progression. *Br. J. Cancer* 79: 1240-1248
- Takiguchi M. (1998) The C/EBP family of transcription factors in the liver and other organs. *Int. J. Exp. Pathol.* 79: 369-391
- Tanaka T., Yoshida N., Kishimoto T., Akira S. (1997) Defective adipocyte differentiation in mice lacking the C/EBP $\beta$  and/or C/EBP $\delta$  gene. *EMBO J.* 16: 7432-7443
- Tang B., Guller S., Gurpide E. (1994) Mechanism of human endometrial stromal cells decidualization. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 734:19-25
- Tang H.Y., Zhao K., Pizzolato J.F., Fonarev M., Langer J.C., Manfredi J.J. (1998) Constitutive expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 is transcriptionally regulated by the tumor suppressor protein p53. *J. Biol. Chem.* 273: 29156-29163
- Tang J-G., Koeffler H.P. (2001) Structural and functional studies of CCAAT/enhancer-binding protein  $\epsilon$ . *J. Biol. Chem.* 276: 17739-17746
- Tao W., Levine A.J. (1999) Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 3077-3080
- Telgmann R., Gellersen B. (1998) Marker genes of decidualization: activation of the decidual prolactin gene. *Hum. Reprod. Update* 4: 472-479
- Telgmann R., Maronde E., Taskén K., Gellersen B. (1997) Activated protein kinase A is required for differentiation-dependent transcription of the decidual prolactin gene in human endometrial stromal cells. *Endocrinology* 138: 929-937
- Thompson T., Tovar C., Yang H., Carvajal D., Vu B.T., Xu Q., Wahl G.M., Heimbrook D.C. (2004) Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279: 53015-53022

- Thut C.J., Goodrich J.A., Tijan R. (1997) Repression of p53-mediated transcription by MDM2: A dual mechanism. *Genes Dev.* 11: 1974-1986
- Timchenko L.T., Iakova P., Welm A.L., Cai Z.J., Timchenko N.A. (2002) Calreticulin interacts with C/EBPalpha and C/EBPbeta mRNAs and represses translation of C/EBP proteins. *Mol. Cell. Biol.* 22: 7242-7257
- Tortora G.J., Grabowski S.R. (1996) Principles of anatomy and physiology. Eighth Edition, HarperCollins College Publishers, Inc., New York, NY, U.S.A.
- Tsutsumi-Ishii Y., Todakoro K., Hanaoka F., Tsuchida N. (1995) Response of heat shock element within the human HSP70 promoter to mutated p53 genes. *Cell. Growth Differ.* 6: 1-8
- Uesugi M., Verdine G.L. (1999) The alpha-helical FXXΦΦ motif in p53: TAF interaction and discrimination by MDM2. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96: 14801-14806
- Unger T., Nau M., Segal S., Minna J.D. (1992) p53: a transdominant regulator of transcription whose function is ablated by mutation occurring in human cancer. *EMBO J.* 11: 1383-1390
- Vaziri H., Dessain S.K., Eaton E.N., Imai S.I., Frye R.A., Pandita T.K., Guarente L., Weinberg R.A. (2001) hSIR2 (SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* 107: 149-159
- Vaziri H., West M.D., Allsopp R.C., Davison T.S., Wu Y.-S., Arrowsmith C.H., Poirier G.G., Benchimol S. (1997) ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to post-translational activation of p53 protein involving poly (ADP-ribose) polymerase. *EMBO J.* 16: 6018-6033
- Venot C., Maratrat M., Dureuil C., Conseiller E., Bracco L., Debussche L. (1998) The requirement for p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transcription and with transcriptional repression. *EMBO J.* 17: 4668-4679
- Verbeek W., Lekstöm-Himes J., Park D.J., Dang P.M., Vuong P.T., Kawano S., Babior B.M., Xanthopoulos K., Koeffler H.P. (1999) Myeloid transcription factor C/EBPε is involved in the positive regulation of lactoferrin gene expression in neutrophils. *Blood* 94: 3141-3150
- Vogelstein B., Lane D., Levine A.J. (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307-310
- Vousden K.H. (2002) Activation of the tumor suppressor protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1602: 47-59
- Vousden K.H., Woude G.F. (2000) The ins and outs of p53. *Nat. Cell. Biol.* 2: E178-E180
- Wadgaonkar R., Collins T. (1999) Murine double minute (MDM2) blocks p53-coactivator interaction, a new mechanism for inhibition of p53-dependent gene expression. *J. Biol. Chem.* 274: 13760-13767

- Wallingford J.B., Seufert D.W., Virta V.C., Vize P.D. (1997) p53 activity is essential for normal development in *Xenopus*. *Curr. Biol.* 7: 747-757
- Wang L., Rayanade R.J., Garcia D., Patel K., Pan H., Sehgal P.B. (1995) Modulation of interleukin-6 –induced plasma protein secretion in hepatoma cells by p53 species. *J. Biol. Chem.* 270: 23159-23165
- Wang P., Reed M., Wang Y., Mar G., Stenger J.E., Anderson M.E., Schwedes J.F., Tegtmeyer P. (1994) p53 domains: structure, oligomerization, and transformation. *Mol. Cell. Biol.* 14: 5182-5191
- Webster N.J., Resnik J.L., Reichart D.B., Strauss B., Haas M., Seely B.L. (1996) Repression of the insulin receptor promoter by the tumor suppressor gene product p53: a possible mechanism for receptor overexpression in breast cancer. *Cancer Res.* 56: 2781-2788
- Weissmann A.M. (2001) Themes and variation on ubiquitylation. *Nature Reviews.* 2: 169-178
- Weisz L., Zalcenstein A., Stambolsky P., Cohen Y., Goldfinger N., Oren M., Rotter V. (2004) Transactivation of the EGR1 gene contributes to mutant p53 gain of function. *Cancer Res.* 64: 8318-8327
- Welm A.L., Timchenko N.A., Darlington G.J. (1999) C/EBP $\alpha$  regulates generation of C/EBP $\beta$  isoforms through activation of specific proteolytic cleavage. *Mol. Cell. Biol.* 19: 1695-1704
- Węsierska-Gądek J., Horky M. (2003) How the nucleolar sequestration of p53 protein or its interplayers contributes to its (re)-activation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1010: 266-272
- Woods D.B., Vousden K.H. (2001) Regulation of p53 function. *Exp. Cell. Res.* 264: 56-66
- Wu X., Bayle J.H., Olson D., Levine A.J. (1993) The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 7: 1126-1132
- Yakovlev A.G., Giovanni D., Wang G., Liu W., Stoica B., Faden A.I. (2004) BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279: 28367-28374
- Yakovleva T., Pramanik A., Kawasaki T., Tan-No K., Gileva I., Lindegren H., Langel U., Ekström T.J., Rigler R., Terenius L., Bakalkin G. (2001) p53 Latency. C-terminal domain prevents binding of p53 core to target but not to nonspecific DNA sequences. *J. Biol. Chem.* 276: 15650-15658
- Yakovleva T., Pramanik A., Terenius L., Ekström T.J., Bakalkin G. (2002) p53 latency -- out of the blind alley. *Trends Biochem. Sci.* 27: 612-618
- Yamanaka R., Kim G.D., Radomska H.S., Lekström-Himes J., Smith L.T., Antonson P., Tenen D.G., Xanthopoulos K.G. (1997) CCAAT/enhancer binding protein epsilon is preferentially up-regulated during granulocytic differentiation and its functional

- versatility is determined by alternative use of promoters and differential splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6462-6467
- Yang Y., Pares-Matos E.I., Tesmer V.M., Dai C., Ashworth S., Huai J, et al. (2002) Organization of the promoter region of the human NF-IL6 gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1577: 102-108
- Yang Y., Winkler K., Yoshida M., Kornbluth S. (1999) Maintenance of G2 arrest in the *Xenopus* oocyte: a role for 14-3-3-mediated inhibition of Cdc25 nuclear import. *EMBO J.* 18: 2174-2183
- Yap D.B., Hsieh J.K., Chan F.S., Lu X. (1999) mdm2: a bridge over the two tumor suppressors, p53 and Rb. *Oncogene* 18: 7681-7689
- Yap N., Yu C.L., Cheng S.Y. (1996) Modulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors by the tumor suppressor p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4273-4277
- Yen SSC (1990) *Clinical Endocrinology of Reproduction*. In: *Hormones* (eds. Baulieu EE, Kelly PA) Hermann Publishers in Art & Science, Chapman and Hall, New York, London, 455-486
- Yu C., Yap N., Chen D. (1997) Modulation of hormone-dependent transcriptional activity of the glucocorticoid receptor by the tumor suppressor p53. *Cancer Lett.* 116: 191-196
- Zahnow C.A. (2002) CCAAT/enhancer binding proteins in normal mammary development and breast cancer. *Breast Cancer Res.* 4: 113-121
- Zahnow C.A., Younes P., Laucirica R., Rosen J.M. (1997) Overexpression of C/EBPbeta-LIP, a naturally occurring, dominant-negative transcription factor, in human breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 89: 1887-1891
- Zamore P.D., Tuschl T., Sharp P.A., Bartel D.P. (2000) RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101: 25-33
- Zauberman A., Flusberg D., Haupt Y., Barak Y., Oren M. (1995) A functional p53-responsive intronic promoter is contained within the human mdm2 gene. *Nucleic Acids Res.* 23: 2584-2592
- Zhang Y., Xiong Y. (2001) Control of p53 ubiquitination and nuclear export by MDM2 and ARF
- Zhu J., Jiang J., Zhou W., Zhu K., Chen X. (1999) Differential regulation of cellular target genes by p53 devoid of the PXXP motifs with impaired apoptotic activity. *Oncogene* 18: 2149-2155
- Zotchev S.B., Protopopova M., Selivanova G. (2000) p53 C-terminal interaction with DNA ends and gaps has opposing effect on specific DNA binding by the core. *Nucleic Acids Res.* 28: 4005-4012

## 7 Abkürzungen und Glossar

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AM	Active Motif
AD	Aktivierungsdomäne
ADP	Adenosin-Diphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
as	<i>antisense</i>
ATM	<i>(Ataxia telangiectasia mutated)</i>
ATR	<i>(Ataxia telangiectasia related)</i>
ATP	Adenosin-Triphosphat
AUG	Startkodon auf der mRNA
bp	Basenpaar(e)
53BP	Bindungsprotein
8-Br-cAMP	8-Bromo-cAMP
BSA	Rinderserum-Albumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bZIP	<i>basic region/leucine zipper</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-Monophosphat
CBP	CREB-Bindungsprotein
CDK	Zyclin D Kinase
CDKI	Zyclin D Kinase-Inhibitor
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure ( <i>complementary desoxyribonucleic acid</i> )
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding proteins</i>
C/EBP-RE	<i>CCAAT/enhancer binding proteins-Response Element</i>
CMV	<i>Cytomegaly-Virus</i>
COS-7	Nierenkarzinomzelllinie ( <i>African green monkey</i> )
cpm	Maßeinheit für die Radioaktivität ( <i>counts per minute</i> )
CRH	<i>(Corticotrophin-releasing hormone)</i>
DAPI	4,6-Diamidino-2'-phenylindol
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DCC	<i>(dextrane coated charcoal)</i>
d.h.	das heißt
Δ	Delta
DMEM	<i>Dulbecco's Modification of Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	Desoxynukleotidphosphat
DOTAP	N-[1-(2,3 Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat
dPRL	deziduales Prolaktin
DR5	Apoptoserezeptor 5 ( <i>death receptor</i> )
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)N,N,N',N'-Tetraacetat
eIF	Translations-Initiationfaktor
EGR1	früher Wachstumsfaktor-1 ( <i>early growth response factor 1</i> )
EMSA	<i>(electromobility Shift Assay)</i>
ER	Östrogenrezeptor ( <i>estrogen receptor</i> )
ESZ	endometriale Stromazellen
et al	und andere (lat. <i>et alterum</i> )

EtBr	Ethidiumbromid
f.c.	Endkonzentration ( <i>final concentration</i> )
FCS	Fötale Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
fmol	Femtomol
FKHR	( <i>forkhead homologue in rhabdomyosarcoma</i> )
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon ( <i>follicle stimulating hormone</i> )
g	Gramm
GADD45	<i>growth arrest and DNA damage 45</i>
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GR	Glukokortikoidrezeptor
GST	Glutathion-S-Transferase
h	human
HAUSP	Herpesvirus-assoziierte Ubiquitin-spezifische Protease
Hdm-2	humanes Mdm-2
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfat
HF-12	Nutrient MixtureHAM's-F12
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>Horseradish peroxidase</i> )
HSP-70	Hitzschockprotein-70( <i>heat shock protein-70</i> )
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor ( <i>insulin-like growth factor</i> )
IGFBP-1	Insulin-ähnliches Wachstumsfaktorbindungsprotein ( <i>insulin-like growth factor binding protein-1</i> )
IgG <sub>1</sub>	Immunglobulin G <sub>1</sub>
IgG <sub>2a</sub>	Immunglobulin G <sub>2a</sub>
IgG <sub>2b</sub>	Immunglobulin G <sub>2b</sub>
IL	Interleukin
IR	ionisierende Strahlung
IVTT	<i>in vitro</i> -Transkription/Translation
JNK	Jun-aminoternale (N)-Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knock out</i>
l	Liter
LAP	<i>liver-enriched activatory protein</i>
LDS	Lithiumdodecylsulfat ( <i>lithium dodecyl sulfate</i> )
LH	Luteinisierendes Hormon
LIP	<i>liver-enriched inhibitory protein</i>
luc3	Luziferase-Gen in dem Reporterkonstrukt pGL3-Basic
M	Molar
MAP	Mitogen aktivierte Protein
MAPK	Mitogen aktivierte Protein-Kinase
MAPK	Mitogen aktivierte Protein-Kinase
Map4	<i>microtubule associated protein 4</i>
MCS	multiple Klonierungsstelle ( <i>multiple cloning site</i> )
Mdm-2	<i>mouse double minute chromosome-2</i>
Met	Methionin
mM	Millimolar (mMol/l)
μCi	Mikrocurie
MDR	<i>multiple drug resistance-1</i>
μg	Mikrogramm
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
μmol	Mirkomol
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )
NES	nukleäres Exportsignal

NFIL6	<i>nuclear factor interleucin-6</i> (Alternativname für C/EBP $\beta$ )
NFIL6-RE	<i>nuclear factor interleucin-6 response element</i>
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
P <sub>4</sub>	Progesteron
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly (ADP-ribose) Polymerase
PBS	Phosphat/NaCl-Puffer ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PGE	Prostaglandine
PI3-K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
pmol	Pikomol
p53-RE	<i>p53-response element</i>
PEG	Polyethylenglykol
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PR	Progesteronrezeptor
PRL	Prolaktin
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosom 10</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rb	Retinoblastoma
RE	<i>Response Element</i>
RLE	relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNAi	<i>RNA interference</i>
RSV	<i>Rous Sarkoma- Virus</i>
RT-PCR	PCR nach reverser Transkription der mRNA in cDNA
RLX	Relaxin
s	<i>sense</i>
Saos-2	humane Osteosarkom-Zelllinie
SC	Santa Cruz
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
siRNA	<i>small interference RNA</i>
SV40	<i>Simian-Virus 40</i>
T4	Tetramerisierungsdömane
Tab.	Tabelle
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE-Puffer	Tris/Azetat/EDTA-Puffer
TAF	TBP-assoziiertes Faktor ( <i>TBP associated factor</i> )
TBE-Puffer	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TBP	TATA-Box-Bindungsprotein ( <i>TATA-box binding protein</i> )
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin
N-Terminus	Amino-Terminus
C-Terminus	Carboxy-Terminus
TO-PRO-3	Cyanin-Nukleinsäure-Färbelösung (monomer)
TR	Thyroidhormonrezeptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
u.a.	unter anderem
IU	internationale Einheiten ( <i>international units</i> )

UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VP16	Virus Protein 16
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

<i>antisense</i> Oligonukleotid	Sequenz, die dem <i>antisense</i> DNA-Strang komplementär ist
Assay	Test/ Untersuchung
Blotten	Übertragung von DNA/RNA/Protein auf Membranen
<i>blunt ends</i>	glatte, nicht überhängende Enden eines dsDNA-Fragmentes nach einem Restriktionsverdau oder einer PCR mit entsprechenden Enzymen oder Primern
Insert	dsDNA-Fragment, welches in eine MCS eines Plasmidvektors kloniert wurde
<i>Knock down</i>	gezielte Reprimierung eines Gens durch homologe Rekombination mit entsprechenden Molekülen (z.B. siRNA)
Primer	Oligonukleotid, welches als Startmolekül für DNA-Polymerasen eingesetzt wird (z.B. PCR)
<i>sense</i> Oligonukleotid	Sequenz, die dem <i>sense</i> DNA-Strang komplementär ist
<i>sticky ends</i>	5'- oder 3'-überhängende Enden eines dsDNA-Fragmentes nach einem Restriktionsverdau oder einer PCR mit entsprechenden Enzymen oder Primern
<i>Supershift</i>	Retardierung eines DNA-Protein-Komplexes im Gel durch Zugabe eines spezifischen Antikörpers, der dadurch eine langsamere Laufgeschwindigkeit aufweist, als der DNA-Protein-Komplex ohne Antikörper
Template	Matrizen-DNA
<i>Well</i>	Vertiefung einer Zellkulturplatte (12- oder 24- <i>Well</i> -Platten)

## 8 Danksagung

Diese Arbeit wurde im Institut für Hormon- und Fortpflanzungsforschung an der Universität Hamburg begonnen und am Endokrinologikum Hamburg zu Ende geführt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. F. Leidenberger, der es mir ermöglicht hat, meine Doktorarbeit am IHF zu beginnen sowie Herrn Prof. Dr. H. M. Schulte für die Unterstützung, diese Arbeit zu Ende zu bringen.

Einen besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. W. Deppert und Herrn Prof. Dr. W. Schäfer für die Begutachtung der Dissertation aussprechen.

Ebenso dankbar bin ich Herrn Prof. Dr. H.-P. Mühlbach und Herrn PD Dr. T. Patschinsky für die freundliche Übernahme des Disputationsgutachtens.

Frau Dr. B. Gellersen danke ich sehr herzlich für die Vergabe des Themas sowie für die fachlich ausgezeichnete Betreuung und persönliche Unterstützung.

Alex, Bernd, Birgit, Christian, Claudia, Maria, Olli, Tilo, Tom und Ulrike danke ich für die freundliche Zusammenarbeit, das gute Arbeitsklima und den Spaß bei der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner lieben Arbeitskollegin Rita, die mich in vielen Situationen unterstützt hat und mir mit vielen Ratschlägen, nicht nur während der Arbeit, zur Seite stand.

Anita, Bernd, Christian, Hajo, Lars, Loni, Martin, Rita, Tom und Herrn Hinz danke ich sehr herzlich für die Durchsicht des Manuskriptes und ihre Bereitschaft, dies auch in arbeitsreicher Zeit anzugehen.

Herrn Prof. Dr. C. Lindner sowie den Mitarbeitern des ELIM-Krankenhauses danke ich recht herzlich für die Bereitstellung des uterinen Gewebes.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich während meiner langjährigen Ausbildung immer mit vollem Enthusiasmus und Liebe begleitet hat und mir ihr ganzes Vertrauen schenkt.