

Durchgeführt am
Heinrich-Pette-Institut (HPI)
für experimentelle Virologie und Immunologie
der Universität Hamburg

Abteilung für Tumorstudiologie (Leiter Prof. Dr. Wolfgang Deppert)
Betreuer: PD Dr. Wolfgang Bohn und Dr. Oliver Klotzsche

**Identifizierung und Charakterisierung einer
Verankerungsdomäne auf dem Tumorsuppressorgen
p53, welche für die Inaktivierung durch
zytoplasmatische Retention verantwortlich ist**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Thorsten Eismann

aus Erlenbach a./M.
Hamburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende/r: Prof. Dr. W. Deppert

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. W. Bohn

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. M. Jücker

1	<u>Inhaltsverzeichnis</u>	1
2	Abkürzungsverzeichnis	5
3	Zusammenfassung	7
4	Einleitung	9
4.1	Ursachen der Tumorentstehung	9
4.2	Der Tumorsuppressor p53	10
4.2.1	Struktur und biochemischen Aktivitäten von p53	10
4.2.2	Biologische Funktionen von p53	13
4.2.2.1	<i>Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose durch p53</i>	<i>14</i>
4.2.2.2	<i>Beteiligung von p53 an der DNA-Reparatur</i>	<i>15</i>
4.3	Inaktivierung von p53	16
4.3.1	Inaktivierung von p53 durch Mutation	16
4.3.2	Inaktivierung von p53 durch epigenetische Mechanismen	18
4.3.2.1	<i>Inaktivierung durch verstärkte Degradation</i>	<i>18</i>
4.3.2.2	<i>Inaktivierung durch Kernausschluss</i>	<i>19</i>
4.4	Problemstellung	22
4.4.1	Fragestellung	22
4.4.2	Zielsetzung und experimentelles Modell	22
5	Material & Methoden	25
5.1	Material	25
5.1.1	Eukaryontische Zelllinien	25
5.1.2	Bakterienstämme	25
5.1.3	Antikörper	25
5.1.4	Enzyme	26
5.1.5	Vektoren	26
5.1.6	Oligonukleotide	27
5.1.7	Molekulargewichtsstandards	28
5.1.8	Chemikalien und Biochemikalien	29

5.1.9	Geräte	29
5.1.10	Filme und Fotochemikalien	30
5.1.11	Sonstige Verbrauchsmaterialien	30
5.1.12	Computer-Software	30
5.2	Methoden	31
5.2.1	Zellkultur	31
5.2.1.1	<i>Prokaryontische Zellkultur</i>	31
5.2.1.1.1	<i>Herstellung transformationskompetenter Bakterien (Hanahan, 1983)</i>	31
5.2.1.1.2	<i>Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA (Kaiser und Hogness, 1960)</i>	32
5.2.1.2	<i>Eukaryontische Zellkultur</i>	32
5.2.1.2.1	<i>Erhaltungszellkultur</i>	32
5.2.1.2.2	<i>Einfrieren und Auftauen von Mammaliazellen</i>	32
5.2.2	Molekularbiologische Methoden	33
5.2.2.1	<i>Minipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Birnboim und Doly, 1979)</i>	33
5.2.2.2	<i>Maxipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien</i>	34
5.2.2.3	<i>Bestimmung der DNA-Konzentration</i>	34
5.2.2.4	<i>Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen</i>	35
5.2.2.5	<i>Agarose-Gelelektrophorese (Ausubel, 1992)</i>	35
5.2.2.6	<i>Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	36
5.2.2.7	<i>Ligation von DNA-Fragmenten (Ausubel, 1992)</i>	36
5.2.2.8	<i>Kinasierung der Primer</i>	37
5.2.2.9	<i>In vitro Mutagenesereaktion (Pharmacia)</i>	37
5.2.2.9.1	<i>In-vitro Mutagenese Primer</i>	38
5.2.2.9.2	<i>Durchführung der In-vitro Mutagenese</i>	38
5.2.2.10	<i>Sequenzierung von DNA (Sanger et al., 1977)</i>	39
5.2.2.10.1	<i>Sequenzierung nach dem »ABI PRISM Cycle Sequencing« Protokoll</i>	39
5.2.2.10.2	<i>Sequenzierung mit dem »2.0 DNA Sequencing Kit« der Firma Amersham</i>	40
5.2.3	Zellbiologische Methoden	42
5.2.3.1	<i>Transfektion von Expressionsvektoren in eukaryontische Zellen</i>	42
5.2.3.1.1	<i>Transiente Transfektion mit »SuperFect« Transfektions Reagenz (Qiagen)</i>	42
5.2.3.1.2	<i>Stabile Transfektion durch Elektroporation</i>	42

5.2.3.2	<i>Klonierung und Etablierung der stabil transfizierten Mammaliazellen</i>	43
5.2.3.3	<i>Zytoplasmatische Extraktion</i>	44
5.2.3.4	<i>Immunfluoreszenzmarkierung</i>	44
5.2.4	Proteinbiochemische Methoden	45
5.2.4.1	<i>Herstellung der Protein-Rohlysate</i>	45
5.2.4.2	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i>	46
5.2.4.2.1	<i>Absorption bei 280 nm (Peterson, 1983)</i>	46
5.2.4.2.2	<i>Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)</i>	46
5.2.4.2.3	<i>Proteinbestimmung mit »Bicinchoninic Acid Reagent« (Smith et al., 1985)</i>	46
5.2.4.3	<i>Angleichen der Proteinkonzentration in den Zelllysaten</i>	47
5.2.4.4	<i>SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)</i>	47
5.2.4.5	<i>Western Blot und Antikörper-Detektion von transferierten Proteinen</i>	47
6	Ergebnisse	50
6.1	Herstellung von tsp53 Mutanten	50
6.1.1	Herstellung carboxyterminaler Deletionsmutanten von tsp53	50
6.1.2	Etablierung einer carboxyterminalen Punktmutation in AS 312 von tsp53	53
6.1.3	Klonierungsstrategie zur Herstellung von eukaryontischen Expressions-vektoren für carboxyterminal mutiertes tsp53	56
6.1.4	Klonierungsstrategie zur Herstellung von eukaryontischen Expressions-vektoren für aminoterminal mutiertes tsp53	58
6.1.4.1	<i>Klonierung der aminoterminal mutierten cDNA in den eukaryontischen Expressionsvektor pCI-neo</i>	59
6.1.5	Merkmale der amino- und carboxyterminalen tsp53 Mutanten	61
6.2	Reaktionsmuster der tsp53-Mutanten mit p53-spezifischen Antikörpern	62
6.3	Subzelluläre Lokalisation der tsp53-Mutanten in C6D8 Zellen nach transienter Transfektion	65
6.3.1	Lokalisation bei nicht-permissiver Temperatur (39°C)	65
6.3.2	Lokalisation nach Wechsel auf die permissive Temperatur (30°C)	66
6.4	Herstellung stabil transfizierter Zelllinien mit den tsp53-Mutanten in C6D8 Zellen	67
6.4.1	Wahl des tsp53 Konstruktes und Optimierung der Transfektionsbedingungen	68

6.4.2	Subzelluläre Lokalisation der tsp53-Mutanten in stabil transfizierten C6D8 Zellen bei nicht-permissiver Temperatur	69
6.4.3	„Steady-state-level“ der trunkierten tsp53-Formen in stabil transfizierten C6D8 Zellen bei nicht-permissiver Temperatur	72
6.4.4	„Steady-state-level“ der tsp53-Mutanten in stabil transfizierten C6D8 Zellen nach Wechsel auf die permissive Temperatur	74
6.4.5	Subzelluläre Lokalisation der tsp53 Mutanten bei permissiver Temperatur und Assoziation mit zellulären Strukturen	76
7	Diskussion	80
7.1	Die Rolle des Aminoterminus von tsp53 für die zytoplasmatische Verankerung	81
7.2	Die Rolle des Carboxyterminus von tsp53 Mutanten für die zytoplasmatische Verankerung	82
7.2.1	Der carboxyterminalen Deletionsmutante tsp53/ Δ c-TGA308 fehlt eine für die zytoplasmatische Verankerung essentielle Domäne	82
7.2.2	Der Verlust der negativ regulatorischen Domäne führt zu konstitutiver zytoplasmatischer Verankerung	83
7.2.3	Der Phosphorylierungsstatus der c-terminalen Linkerregion beeinflusst die zytoplasmatische Verankerung	84
8	Literaturverzeichnis	87
9	Abbildungsverzeichnis	101
10	Anhang	102

2 Abkürzungsverzeichnis

- α anti (Antikörperspezifität)
- APS..... Ammoniumpersulfat
- AS..... Aminosäuren
- ATP..... Adenosintriphosphat
- BrdU..... Brom-desoxy-Uridin
- BSA..... Bovines Serumalbumin
- cAMP..... cyclisches Adenosinmonophosphat
- cdk..... Cyklin abhängige Kinase
- dATP..... Desoxyadenosintriphosphat
- dCTP..... Desoxycytidintriphosphat
- dGTP..... Desoyguanosintriphosphat
- DMEM..... Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
- DMSO..... Dimethylsulfoxid
- DNA..... Desoyribonukleinsäure
- dNTP..... Desoxynukleosidtriphosphat
- DTT..... Dithiothreitol
- dTTP..... Desoxythymidintriphosphat
- ECL..... Enhanced Chemoluminescence
- EDTA..... Ethylen-diamin-tetraessigsäure
- EGTA..... Ethylen-glycol bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
- FCS..... Fötales Kälberserum
- FITC..... Fluoreszeinisothiocyanat
- HEPES..... N-2-hydroxyethyl)-piperazin-N`-(2-ethan sulfonsäure)
- IgG..... Immunglobulin G
- kb..... Kilobasen
- kDA..... Kilodalton
- 17kT..... 17kDA kleines T-Antigen
- mt-p53..... mutanten p53
- NES..... Nuclear Export Signal
- NLS..... Nuclear Import Signal
- NP 40..... Nonidet P-40
- PAGE..... Polyacrylamid-Gelelektrophorese
- PBS..... Phosphat gepufferte Salzlösung

- PCNA Proliferating Cell Nuclear Antigen
- PEG Polyethylenglykol
- PGS..... Protein-G-Sepharose
- PIPES Piperazin-1,4-bis (2-ethan sulfonsäure)
- PO Peroxidase
- PPO..... 2,4-diphenyl-oxazol
- RNA Ribonukleinsäure
- RNase Ribonuclease
- SDS..... Natriumdodecylsulfat
- SV40..... Simian Virus 40
- T-Antigen großes Tumor-Antigen
- TBST Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20
- TEMED N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylen-diamin
- TR..... Texas Red (Sulforhodamin-101-säurechlorid)
- Tris Trishydroxymethyl-aminomethan
- tsp53^{Val135} temperatursensitives p53
- U enzymatische Aktivitätseinheit (Unit)
- UpM Umdrehung pro Minute
- 5'-UTR 5'-untranslatierte Region
- UV Ultraviolette Strahlung
- v/v Volumenprozent
- w/v Gewichtsprozent
- waf1 wildtyp p53 activated fragment
- wt-p53 wildtyp p53
- XP Xeroderma pigmentosum

3 Zusammenfassung

Das Phosphoprotein p53 ist ein Tumorsuppressor, welcher in jeder Körperzelle in geringen Konzentrationen vorkommt. p53 gilt nach gängiger Vorstellung als „Wächter des Genoms“, der Zellen nach DNA-Schädigung an ihrer Progression durch den Zellzyklus hindert. Es kontrolliert einerseits Prozesse des DNA-Metabolismus, wie Replikation, Reparatur und Rekombination und schützt andererseits die Zellen davor, dass sich DNA-Schäden in Form von Mutationen im Genom manifestieren.

Als sequenzspezifischer Transaktivator ist p53 ein typisches Kernprotein, dessen Kernlokalisierung über Kernimport- (NLS) und Kernexportsequenzen (NES) bestimmt wird. Die subzelluläre Lokalisation ist somit Ergebnis eines Gleichgewichts zwischen Kernimport und Kernexport. Ein Kernausschluß von p53 ist ein effektiver Mechanismus zur Inaktivierung von p53, mit dem die tumorsuppressive Wirkung von p53 aufgehoben wird. Tatsächlich kann in einigen Tumoren eine zytoplasmatische Akkumulation von p53 nachgewiesen werden. In allen undifferenzierten Neuroblastomen, sowie in einem erheblichen Prozentsatz von inflammatorischen Mammakarzinomen und Pankreastumoren ist p53 im Zytoplasma lokalisiert und zudem überexprimiert. Diese Gewebe zeigen auch schon im Verlauf der Differenzierung eine zytoplasmatische Akkumulation von p53.

Obwohl der Kernausschluß und die damit verbundene Sequestrierung von p53 im Zytoplasma für die Progression einiger Tumore eine wichtige Rolle spielt, ist bislang noch nicht geklärt, über welche Bereiche von p53 die zytoplasmatische Retention vermittelt wird. Bislang existiert kein zelluläres Modell, an dem der zytoskelettale Verankerungsmechanismus von p53 im Detail analysiert werden kann.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Zellen der Rattengliomzelllinie C6, die eine temperatursensitive Mutanten von p53, dass $tsp53^{Val135}$, exprimieren, ein geeignetes Modell für die Identifizierung von Verankerungsdomänen von p53 darstellen. Die temperatursensitive Mutante entfaltet bei permissiver Temperatur (30°C) Eigenschaften von Wildtyp p53, bei nicht-permissiver Temperatur (39°C) liegt sie in Mutantenkonformation vor. Durch die zytoplasmatische Sequestrierung von $tsp53$ bei permissiver Temperatur werden seine wachstumsinhibitorischen Eigenschaften blockiert. Es wurden in dieser Arbeit nun sowohl amino- als auch carboxyterminale Deletionsmutanten von $tsp53$ hergestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die zytoskelettale Verankerung durch einen Bereich von AS 308 bis 357 im Carboxyterminus von p53 vermittelt wird. Fehlt der Carboxyterminus vollständig,

so kann p53 nicht mehr im Zytoplasma verankert werden. Weiterhin scheint der Grad der Phosphorylierung im Carboxyterminus Einfluss auf die Verankerung zu haben. Austausch eines Serins in Position 309 gegen Alanin führt zu einer ausschließlich nukleären Lokalisation von p53, sowohl bei permissiver als auch bei nicht-permissiver Temperatur.

4 Einleitung

4.1 Ursachen der Tumorentstehung

Tumore entstehen durch genetische Veränderungen (Mutationen), mit denen zelluläre Kontrollmechanismen der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und des programmierten Zelltods (Apoptose) außer Kraft gesetzt werden. Der Verlust der Proliferationskontrolle resultiert zum einen aus der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, die inhibitorisch auf die Zellproliferation wirken, zum anderen aus der Aktivierung von Onkogenen, welche proliferationsstimulierende Signale auslösen.

Onkogene enthalten *per definitionem* "die genetische Information, die nach einem Aktivierungsprozess in der Lage ist, den neoplastischen Phänotyp einer Zelle zu initiieren und aufrechtzuerhalten". Zelluläre Onkogene entstehen durch genetische Veränderungen aus Proto-Onkogenen, die Schlüsselfunktionen in proliferationsstimulierenden Signalwegen innehaben. Zu der Gruppe der Proto-Onkogene zählen Rezeptoren für Wachstumsfaktoren (z.B. erb) als auch die Wachstumsfaktoren (z.B. sis) selbst, Proteine der Signaltransduktion (z.B. ras) sowie Transkriptionsfaktoren (z.B. fos, myc). Der Wechsel vom Protoonkogen zum Onkogen erfolgt häufig durch eine Deletion regulatorischer Domänen dieser Proteine (z.B. erb) oder durch Amplifikation der Gene (z.B. mdm2, EGF-R). Onkogene lassen Zellen von externen Signalen (Wachstumsfaktoren) unabhängig werden, erhalten also gegenüber den Proto-Onkogenen einen Funktionsgewinn („gain of function“). Da Onkogene auch in Gegenwart des entsprechenden nicht-mutierten Proto-Onkogens wirksam werden, werden sie auch als dominante Onkogene bezeichnet (B. Alberts und J. D. Watson, 1994).

Im Gegensatz zu den Onkogenen kodieren Tumorsuppressorgene für Proteine, welche negativ regulierend in die Zellproliferation eingreifen. Ihre Existenz macht sich erst durch den Funktionsverlust („loss of function“) der Gene bemerkbar. In der Regel wird die Tumorbildung nur dann begünstigt, wenn beide Allele inaktiv sind. Häufig wird zuerst eines der beiden Allele durch eine Punktmutation inaktiviert; der Verlust des zweiten, gesunden Allels erfolgt durch Deletion („loss of heterozygosity“ [LOH]). Zwei Tumorsuppressoren haben herausragende Bedeutung: p53 (Gottlieb und Oren, 1996; Ko und Prives, 1996) und das Retinoblastom-Genprodukt pRB (Hateboer et al., 1996). Während pRB als „gatekeeper“ im G1/S-Übergang des Zellzyklus fungiert, wirkt p53 in übergeordneter Funktion als „guardian of the genome“ (siehe 4.3.2).

Die Inaktivierung pRB- und p53-kontrollierter Signalwege spielt eine Schlüsselrolle in der Entstehung der meisten menschlichen Tumore. Humane Tumore zeigen ein umfangreiches Spektrum von p53 Mutationen, wie Deletionen, Insertionen, Punktmutationen und den Verlust der Heterozygotie (LOH). Sie lassen sich in über 60% aller humanen Tumore nachweisen und bilden damit die häufigste mit Krebs assoziierte Veränderung eines einzelnen Gens (Hollstein et al., 1991). Die hohe klinische Relevanz des p53-Status zeigt sich darin, dass Mutationen im p53-Gen und die Überexpression des mutierten p53-Proteins in Mamma-, Lungen- und kolorektalen Karzinomen mit einer ungünstigen Prognose und einer geringen 5-Jahres-Überlebens-Rate für die betroffenen Patienten korreliert (Kern et al., 1989; Zeng et al., 1994).

4.2 Der Tumorsuppressor p53

Das nukleäre Phosphoprotein p53 wurde erstmals 1979 aus Immunpräzipitaten des großen T-Antigens von SV-40 (Simian Virus 40) transformierten Nagerzellen isoliert (Lane und Crawford, 1979). Es zeigte sich, dass p53 mit einer Reihe anderer viraler Onkoproteine assoziieren kann (Sarnow et al., 1982). Da p53 in Tumorzellen überexprimiert wird (Crawford et al., 1981) und zudem direkt an der Immortalisierung und Transformation beteiligt ist (Eliyahu et al., 1984; Parada et al., 1984; Wolf et al., 1984a; Wolf et al., 1984b) wurde p53 zunächst als Onkogen klassifiziert. Spätere Untersuchungen zeigten jedoch, dass die ursprünglichen Transformationsexperimente mit einer mutierten p53 cDNA durchgeführt worden waren (Hinds et al., 1989) und dass p53 sowohl in verschiedenen Tumorzelllinien (Rotter und Wolf, 1985; Wolf und Rotter, 1985) als auch in humanen Primärtumoren durch Mutation inaktiviert ist (Masuda et al., 1987). Zugleich konnte der Nachweis erbracht werden, dass Wildtyp p53 in der Lage ist, das Tumorwachstum zu unterdrücken (Baker et al., 1990; Casey et al., 1991; Chen et al., 1990; Chen et al., 1991; Finlay et al., 1989). Diese Befunde gaben den Ausschlag, *p53* endgültig als Tumorsuppressorgen zu klassifizieren.

4.2.1 Struktur und biochemischen Aktivitäten von p53

Das *p53*-Gen lokalisiert beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (Isobe et al., 1986) und bei der Maus auf Chromosom 11 (Czosnek et al., 1984). Es weist eine Größe von 20 bzw. 12,5 kb auf (Bienz et al., 1984; Lamb und Crawford, 1986). Rechnerisch ergibt sich für das Protein ein Molekulargewicht von 43,5 kDa. In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese läuft p53 jedoch auf der Höhe von 53 kDa. Dieses aberrante Laufverhalten, das dem Protein seinen Namen gab (Oren, 1985), ist auf eine Anhäufung von

helixbrechenden Prolin-Resten im Aminoterminus und auf posttranslationale Modifikationen zurückzuführen.

p53 hat eine Reihe unterschiedlicher biochemischer Aktivitäten, die sich den drei großen Domänen des Proteins zuordnen lassen (siehe Abb 1): (i) der sauren aminoterminalen Domäne, (ii) der zentralen, proteolyse-resistenten Kerndomäne und (iii) der basischen carboxyterminalen Domäne.

Der Aminoterminus (N-Terminus) des p53 Proteins (AS 1~100) enthält die aus zwei Untereinheiten bestehende transkriptionelle Aktivierungsdomäne (AS 1-43 und AS 40-83) (Fields und Jang, 1990; Raycroft et al., 1990). Unter den Zielgenen ist eine eindeutige p53-relevante Funktion nur für *p21/Waf1/Cip1*, *mdm2*, *GADD45*, und *bax* beschrieben (Ko und Prives, 1996). Die prolinreiche Region (AS 61-94) mit 5-fach wiederholtem PXXP-Motif (P=Prolin; X=beliebige AS) überlagert teilweise mit der zweiten Untereinheit der Transaktivierungsdomäne und scheint für die p53-abhängige Modulation des Wachstums und Induktion der Apoptose bedeutsam zu sein (Walker und Levine, 1996).

Der Aminoterminus von p53 interagiert mit einer Vielzahl zellulärer und viraler Proteine (Ko und Prives, 1996). Zu den zellulären Bindungspartnern gehören Komponenten des basalen Transkriptions-Initiationskomplexes TFIID (Lu und Levine, 1995; Seto et al., 1992; Thut et al., 1995), wie z.B. das TATA-Box-Bindungsprotein (TBP) oder der TBP-assoziierte Faktor (TAF). Daneben binden mehrere Untereinheiten des TFIID-Komplexes, die an der Transkription und DNA-Reparatur beteiligt sind (Wang et al., 1995; Xiao et al., 1994). Weitere Bindungspartner beteiligen sich an DNA-Replikation (RPA) (Dutta et al., 1993; Li und Botchan, 1993) und DNA-Rekombination (Rad51) (Sturzbecher et al., 1996). Im Aminoterminus (AS 17-27) liegt auch der Bindungsort für Mdm2 (*murine double minute chromosome-2*). Mdm2 ist mit p53 durch einen autoregulatorischen Rückkopplungsmechanismus (Feedbackloop) verknüpft und vermittelt sowohl den Kernexport als auch die Degradation von p53 im Zytoplasma (siehe Abb.1 und Kap. 4.3) (Brown et al., 1993; Chen et al., 1993; Picksley und Lane, 1993). Zu den wichtigsten viralen Proteinen, die am Aminoterminus von p53 binden, zählt das adenovirale E1B 55kD (Sarnow et al., 1982) und das E6-Protein der humanen Papillomviren 16 und 18 (Scheffner et al., 1990; Werness et al., 1990) (siehe Kap. 4.3.2.1).

Die zentrale hydrophobe Region von p53 (AS 100 bis 297) beinhaltet neben der sequenzspezifischen DNA-Bindungsdomäne (Bargonetti et al., 1993; Halazonetis et al., 1993; Pavletich et al., 1993; Wang et al., 1993) auch die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität des Proteins (Mummenbrauer et al., 1996). Sie ist hochkonserviert und zeigt innerhalb der Vertebraten ausgeprägte Sequenzhomologien in den Bereichen II bis V (siehe Abb.1)

(Mechali et al., 1990; Soussi et al., 1990; Zakut-Houri et al., 1985). Mehr als 90% aller »Missense«-Mutationen, die in menschlichen Tumoren identifiziert werden konnten, betreffen diese DNA-Bindungsdomäne (Hollstein et al., 1991; Levine et al., 1991). Besonders häufig sind die Aminosäuren der Position 175, 248 und 273 mutiert (hot-spot-Mutationen) (Deppert, 1994; Donehower und Bradley, 1993), welche alle in den konservierten Regionen II bis IV lokalisieren (Levine et al., 1991) (siehe Abb.1). Innerhalb dieser hochkonservierten Bereiche befinden sich Aminosäuren, die mit der DNA direkt in Kontakt treten und damit die sequenzspezifische DNA-Bindung vermitteln.

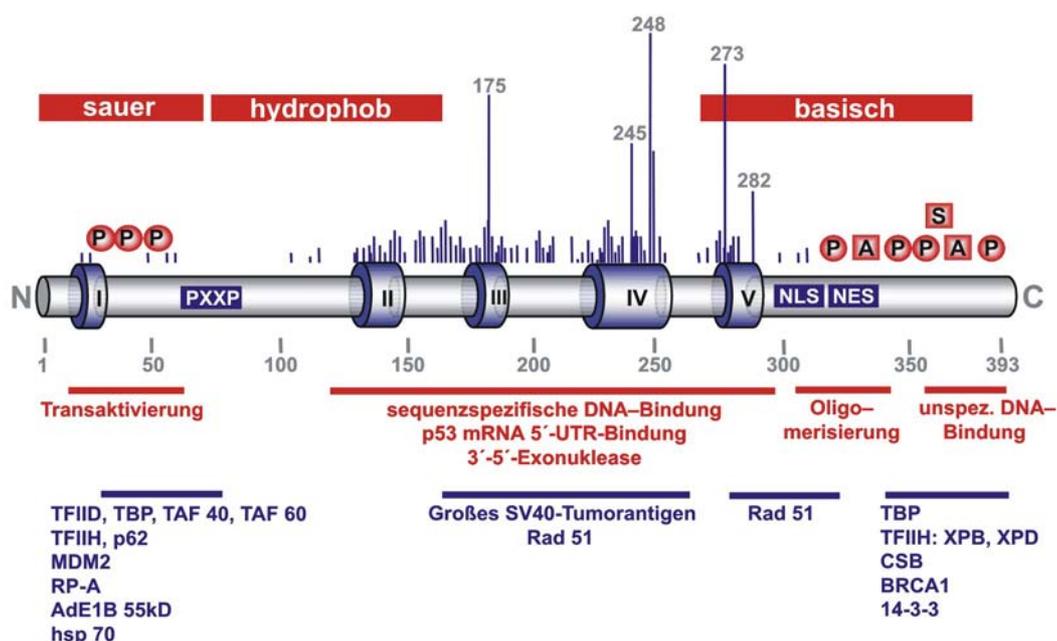


Abbildung 1: Struktur des Tumorsuppressors p53. Das Protein gliedert sich in drei funktionelle Domänen, die unterschiedliche biochemische Eigenschaften aufweisen (—). Römische Ziffern kennzeichnen die phylogenetisch konservierten Sequenzen (I-V). Vier der fünf konservierten Regionen (II-V) finden sich in der zentralen Domäne. Senkrechte Balken über dem Molekül markieren Aminosäuren, die in humanen Tumoren mutiert sind, wobei die Höhe der Balken mit der Häufigkeit des Vorkommens der Mutation korreliert. Phosphorylierungsstellen sind mit »P«, Azetylierungsstellen mit »A« und Sumoylierungsstellen mit »S« angegeben. Blaue Balken (—) zeigen spezifische Interaktionsstellen mit anderen Proteinen. Bezeichnungen siehe Abkürzungsverzeichnis.

Der Carboxyterminus (C-Terminus) von p53 (AS 297-393) weist eine amphipathische helikale Struktur auf und ist über eine flexible »Linker«-Region (AS 300-325) mit der zentralen Kerndomäne verbunden. Der Linkerregion benachbart liegt die Oligomerisierungsdomäne (AS 325-356). Sie ermöglicht die Ausbildung eines Tetramers aus zwei p53 Dimeren (Sturzbecher et al., 1992). Innerhalb der Oligomerisierungsdomäne liegen die Kernlokalisierungssignale (NLS) 1 bis 3, von denen NLS 1 das bedeutendste ist (Shaulsky et al., 1990; Shaulsky et al., 1991a; Shaulsky et al., 1991c) und ein Kernexportsignal (NES; AS 340-351) (Stommel et al., 1999). Letzteres ist im p53 Tetramer maskiert (Middeler et al.,

1997). Der C-Terminus fungiert als negative Regulator-domäne für die sequenzspezifische DNA-Bindung der Kerndomäne (Anderson et al., 1997; Hupp et al., 1992), bindet selbst unspezifisch einzel- und doppelsträngige DNA (Bakalkin et al., 1995; Steinmeyer und Deppert, 1988; Wang et al., 1993) und kann zueinander komplementäre Einzelstränge von DNA und/oder RNA enzymatisch hybridisieren (Bakalkin et al., 1994; Brain und Jenkins, 1994; Nedbal et al., 1997; Oberosler et al., 1993).

4.2.2 Biologische Funktionen von p53

Wildtyp p53 tritt in normalem Gewebe in äußerst geringen Mengen von ungefähr 1.000-10.000 Molekülen pro Zelle auf (Patschinsky und Deppert, 1990). Wahrscheinlich befinden sich diese p53-Moleküle in einem transkriptionsinaktiven, latenten Status und benötigen ein exogenes Signal, um in den aktiven Zustand zu wechseln (Kastan et al., 1991a; Kastan et al., 1991b). Die Aktivierung kann durch Phosphorylierung von AS 378 im Carboxyterminus von p53 durch die Proteinkinase C (PKC) ausgelöst werden. Sie induziert eine Konformationsänderung des Proteins und ermöglicht damit die sequenzspezifische DNA-Bindung (Hupp et al., 1995). Gleichzeitig wird die unspezifische DNA-Bindung blockiert (Hoffmann et al., 1998). Durch Phosphorylierung aminoterminaler Serine und/oder Threonine durch DNA-abhängige Protein-Kinasen, Casein-Kinasen, ATM-Protein (ataxia telangiectasia), Jun-Kinase und/oder mitogen aktivierte Protein-Kinasen (MAP-Kinasen) werden Stabilität und transkriptionelle Aktivität von p53 gesteigert bzw. reguliert (Fiscella et al., 1993; Giaccia und Kastan, 1998; Hall et al., 1996; Mayr et al., 1995; Meek, 1998; Shieh et al., 1997; Unger et al., 1999).

Eine Aktivierung von p53 kann durch direkte Schädigung der DNA (ionisierende Strahlung, UV Strahlung, genotoxische Chemikalien), wie auch durch generalisierte Stressbedingungen wie z.B. Hypoxie (Graeber et al., 1994), hohe Temperaturen (Matsumoto et al., 1994) oder suboptimale Zellkulturbedingungen (z.B. Entzug von Serum) ausgelöst werden. Schon ein einziger DNA-Doppelstrangbruch reicht aus, um eine p53 Aktivierung zu induzieren und führt zu einer erhöhten Halbwertszeit und einer Akkumulation von p53 im Zellkern (Kastan et al., 1991a).

Das aktivierte p53 transaktiviert eine Reihe von Zielgenen, deren Funktion es in letzter Konsequenz ist, zu verhindern, dass ein genetischer Schaden an die Tochterzellen weitergegeben wird und sich als Mutation manifestiert. p53 erreicht dies, indem es die Zellen im Zyklus arretiert und dadurch Spielraum für eine DNA-Reparatur schafft oder die geschädigte Zelle in den programmierten Zelltod (Apoptose) führt (Lane et al., 1994).

4.2.2.1 Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose durch p53

Inwieweit nach Schädigung der DNA ein Zellzyklus-Arrest oder die Apoptose induziert wird, wird sowohl durch den zellulären Hintergrund (Li und Ho, 1998; White, 1996), als auch durch exogene Faktoren, wie z.B. Wachstumsfaktoren, beeinflusst (Canman et al., 1995; Haupt und Oren, 1996; Midgley et al., 1995).

Das prominenteste Gen, das in Verbindung mit der Induktion eines Zellzyklusarrests von p53 aktiviert wird, ist *p21^{waf1/cip1}*. p21 kodiert für einen Inhibitor cyclin-abhängiger Kinasen (Cdk: cyclin dependent kinase) (el-Deiry et al., 1994; el-Deiry et al., 1993; Xiong et al., 1993). Das Protein interagiert mit Cyclin D1/Cdk4/6- und Cyclin E/Cdk2-Komplexen, die beide das Retinoblastomgenprodukt pRb phosphorylieren und damit die Progression der Zelle von der G₁-Phase in die S-Phase ermöglichen. Werden die Cyclin-Cdk-Komplexe durch p21 inaktiviert, so werden die Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus arretiert (Kuerbitz et al., 1992). Unabhängig davon komplexiert p21 auch mit PCNA (proliferating cell nuclear antigen) und blockiert damit direkt die DNA-Replikation, nicht aber die Funktion von PCNA in der DNA-Reparatur (Li et al., 1994; Waga et al., 1994). Ein weiteres Gen, welches unter der transkriptionellen Kontrolle von p53 steht und Einfluss auf den Zellzyklus ausübt, ist GADD45 (growth arrest DNA damage). GADD45 bildet ebenfalls Komplexe mit PCNA und beteiligt sich an der Exzisionsreparatur geschädigter DNA (Kastan et al., 1992; Smith et al., 1994). p53 ist auch in der Lage, Zellen durch transkriptionelle Aktivierung des Signalübertragungsfaktors 14.3.3σ im G₂/M-Übergang zu arretieren (Hermeking et al., 1997; Schwartz et al., 1997; Stewart et al., 1995). 14.3.3σ bindet die phosphorylierte Form der Phosphatase Cdc25 und sequestriert diese im Zytoplasma (Yang et al., 1999; Zeng und Piwnica-Worms, 1999). Dadurch, dass Cdc25 blockiert wird, unterbleibt die Aktivierung der cyclin-abhängigen Kinase Cdk1 und damit der Übergang der Zellen von der G₂-Phase in die Mitose (Sanchez et al., 1997) (siehe Abb. 2).

Neben einer Arretierung der Zellen im Zellzyklus im G₁/S- oder G₂/M-Übergang ist p53 auch in der Lage Apoptose zu induzieren. Das Gleichgewicht zwischen apoptose-fördernden Proteinen (z.B. Bax) und apoptose-hemmenden Proteinen (z.B. Bcl-2) bestimmt maßgeblich, ob Apoptose eingeleitet wird (Lowe et al., 1993; Oltvai et al., 1993). p53 aktiviert die Expression von *bax* während es gleichzeitig die *bcl-2* Expression reprimiert (Miyashita et al., 1994; Miyashita und Reed, 1995). Bax destabilisiert die Mitochondrienmembran, setzt Cytochrom C frei und aktiviert damit eine Kaskade apoptotischer Proteasen (Caspasen) (Bennett et al., 1998; Cohen, 1997; Eskes et al., 1998; Goping et al., 1998; Schuler et al., 2000; Schuler und Green, 2001). Neben der Transaktivierung von pro-apoptotischen Genen induziert p53 eine Reihe von Genen, deren Produkte das Redox-Potential der Zelle steuern

und dadurch an der Kontrolle von apoptotischen Vorgängen beteiligt sind (Polyak et al., 1997). p53 kann auch unabhängig von seiner Funktion als Transaktivator Apoptose induzieren (Chen et al., 1996; Haupt et al., 1995; Wagner et al., 1994). Der Ablauf dieses Vorgangs ist allerdings noch nicht klar definiert (White, 1996) (siehe Abb. 2).

4.2.2.2 Beteiligung von p53 an der DNA-Reparatur

Die Eigenschaft von p53 einzelsträngige DNA zu binden, wie sie nach DNA-schädigenden Ereignissen auftritt, legt eine direkte Beteiligung von p53 an Reparaturprozessen nahe (Steinmeyer und Deppert, 1988). Zudem bindet p53 an Überhänge von Doppelstrangbrüchen (Bakalkin et al., 1995), an fehlerhaft gepaarten Basen (Lee et al., 1995) oder an Rekombinationsintermediate, die bei Reparaturvorgängen auftreten (Lee et al., 1997). Bei der Exzision fehlerhafter DNA-Abschnitte könnte möglicherweise die 3`-5` Exonuklease-Aktivität von p53 eine Rolle spielen (Jabbur et al., 2000; Janus et al., 1999b; Mummenbrauer et al., 1996). Fehlt p53, so ist die Reparatur zellulärer DNA beeinträchtigt (Ford and Hanawalt, 1995; Smith et al., 1995). p53 interagiert außerdem mit einer Reihe von Proteinen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind (XPB/D: Xeroderma Pigmentosum B/D Protein; XSB: Cockayne`s Syndrome B Protein) und beeinflusst die Helikase-Aktivität dieser Proteine (Wang et al., 1994; Xiao et al., 1994).

Das „dual role model of p53“ impliziert, dass nicht nur dem aktiviertem, sondern auch dem „nicht-aktivierten“, latenten p53, eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität zukommt. Latentes p53 ist möglicherweise direkt an der Reparatur von endogenen DNA-Schäden beteiligt, um Fehler in DNA-Reparaturprozessen und in der DNA-Replikation zu verhindern (Janus et al., 1999a) (siehe Abb. 2). Latentem p53 wird auch eine Kontrollfunktion in Prozessen der Rekombination zugeschrieben. Während die homologe Rekombination in der Meiose zur Variabilität des Erbguts beiträgt, muss sie in der Mitose unterdrückt werden. Der Verlust von funktionellem p53 führt zu einer erhöhten Rekombinationsrate (Bertrand et al., 1997; Mekeel et al., 1997), während die Überexpression von Wildtyp p53 die Rekombinationsrate um etwa den Faktor 100 erniedrigt (Wiesmuller et al., 1996).

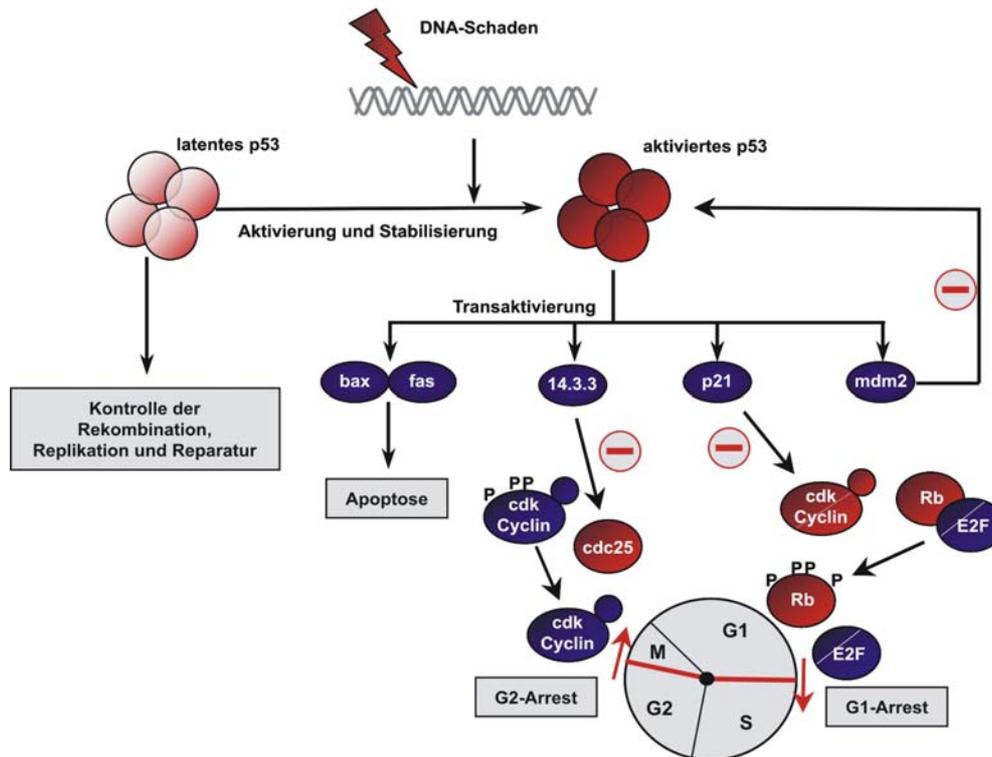


Abbildung 2: Funktion von p53. Das p53 Protein entfaltet seine tumorsuppressive Wirkung auf zwei verschiedenen Wegen. Inaktives p53 wird durch DNA-Schäden aktiviert und induziert in Folge Gene, die an der Zellzykluskontrolle und dem programmierten Zelltod (Apoptose) beteiligt sind. Im latenten Zustand kontrolliert p53 die Genauigkeit von DNA-Replikation, -Rekombination und -Reparatur.

4.3 Inaktivierung von p53

Die bisher beschriebenen Eigenschaften von p53 verdeutlichen mit welchen Mechanismen der Tumorsuppressor p53 genetische Schäden erkennen und die Proliferation von genetisch veränderten Zellen verhindern kann und damit den Organismus vor einer unkontrollierten Proliferation solcher Zellen schützt. Es ist daher verständlich, dass es bei der Progression von Tumoren häufig zu einer Inaktivierung von p53 kommt (Carson und Lois, 1995). Zwei Wege der Inaktivierung werden hierbei besprochen: (a) die Inaktivierung durch Mutation und (b) die Inaktivierung durch epigenetische Mechanismen.

4.3.1 Inaktivierung von p53 durch Mutation

Missense Mutationen, die die zentrale DNA-bindende Domäne betreffen, stellen die häufigste Mutationsform von p53 dar (siehe Abb. 1). Die Mutationen lassen sich in 2 Klassen einteilen: »Klasse I«-Mutationen betreffen Aminosäuren (248W und 273H), die den

Kontakt von p53 mit der DNA vermitteln (DNA-Kontaktmutanten); »Klasse II«-Mutationen (175H und 245D) führen zu einer Änderung der Tertiärstruktur des p53 Proteins (Konformations-Mutanten). Beide „Mutations-Klassen“ führen zu einer verringerten DNA-Bindungsaktivität oder heben diese vollständig auf und blockieren damit die transkriptionelle Aktivität von p53.

In Bezug auf die biologischen Aktivitäten manifestieren sich Mutationen in einem Verlust wildtyp-spezifischer Funktionen von p53: mutiertes p53 ist nicht mehr in der Lage, Zellen im G1/S-Übergang zu arretieren und hat damit die wachstumssuppressiven Eigenschaften verloren (Baker et al., 1990; Diller et al., 1990). Ebensowenig kann es den tumorigenen Phänotyp von Tumorzellen revertieren (Chen et al., 1990; Mercer et al., 1990) oder die Immortalisierung oder Transformation von primären Fibroblasten durch zelluläre oder virale Onkogene hemmen (Eliyahu et al., 1989; Finlay et al., 1989).

Die biologische *in vivo* Relevanz einer Mutation in p53 wird am Li-Fraumeni-Syndrom deutlich (Li und Fraumeni, 1969). Diese Erkrankung beruht auf einem vererbaren Defekt im p53 Gen, welcher auf Klasse I Mutationen, oder Klasse II Mutationen zurückzuführen ist (Iavarone et al., 1992; Malkin, 1993; Malkin, 1994; Srivastava et al., 1990; Toguchida et al., 1992). Betroffene Familien zeigen eine hohe Prädisposition für die Entwicklung von Tumoren. Die weitreichende Bedeutung von p53 Mutationen in der Keimbahn wurde durch die Entwicklung eines p53 „Knockout“-Mausmodells eindrucksvoll bestätigt (Donehower et al., 1992). Mäuse, in denen das p53-Gen gezielt ausgeschaltet ist, weisen zwar keine Entwicklungsstörungen auf, zeigen jedoch bereits innerhalb von sechs Monaten multiple Tumore (Donehower et al., 1992; Jacks et al., 1994).

Mit der Inaktivierung durch Mutation werden p53 abhängige Kreisläufe aufgehoben werden. MDM2 kann durch mt-p53 nicht mehr hochreguliert werden; folglich zeigt mutp53 eine wesentlich längere Halbwertszeit als wt-p53 (Finlay et al., 1988; Hinds et al., 1990). Auch die Exonuklease-Aktivität wird durch Mutationen in der zentralen Domäne aufgehoben (Mummenbrauer et al., 1996). Zudem wird durch die veränderte Tertiärstruktur die Interaktion von p53 mit zellulären und viralen Proteinen blockiert: mt-p53 ist weder in der Lage an den Transkriptionsfaktor TBP (Seto et al., 1992) noch an das große T-Antigen des SV40 Virus zu binden (Halevy et al., 1990; Jenkins et al., 1988).

Führen zusätzlich Mutationen in anderen Tumorsuppressorgenen (z.B. in *rb*) zu einem vollständigen Verlust der Zellzykluskontrolle, so kann eine »gain of function«-Mutation in p53 mit dominant-negativen, onkogenen Eigenschaften die Tumorentstehung begünstigen. Die Existenz einer intrinsischen onkogenen Eigenschaft von mt-p53 konnte durch eine mt-p53 induzierte Transformation p53-negativer Zelllinien bewiesen werden. mt-p53 verursacht

eine verstärkte Proliferation (Dittmer et al., 1993), erhöht die Tumorigenität (Shaulsky et al., 1991b) und steigert das Metastasierungspotential (Pohl et al., 1988). Mäuse, die homozygot für eine p53 Mutation sind, entwickeln wesentlich früher Tumore und besitzen eine deutlich schlechtere Prognose, als p53 defiziente knockout Mäuse, was ebenfalls auf eine onkogene Wirkung von mt-p53 hindeutet (Harvey et al., 1995). Ein für mt-p53 neuartiger Funktionsgewinn, ist die spezifische Bindung an MAR-Elemente („matrix attachment region“) der DNA (Will et al., 1998), mit der die Genexpression beeinflusst werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass mt-p53 die Transkription zellulärer und viraler Gene stimulieren kann (Dittmer et al., 1993).

4.3.2 Inaktivierung von p53 durch epigenetische Mechanismen

Mutationen (siehe Kap. 4.3.1) stellen nicht den einzigen Weg dar, mit dem die tumorsupprimierende Wirkung von p53 aufgehoben werden kann. Tumore enthalten häufig intakte *wt-p53* Allele, jedoch sind Mechanismen fehlreguliert, die die Aktivität von p53 kontrollieren. Zwei Mechanismen können zu einer Ausschaltung von *wt-p53* führen: (a) die Inaktivierung von *wt-p53* durch verstärkte Degradation und (b) die Inaktivierung von *wt-p53* durch Kernausschluss.

4.3.2.1 Inaktivierung durch verstärkte Degradation

Ein epigenetischer Mechanismus der Inaktivierung von p53 besteht in der Komplexierung mit zellulären oder viralen Proteinen, die p53 verstärkt der Degradation zuleiten. Hier spielt das zelluläre Protein Mdm2 eine zentrale Rolle. Es komplexiert p53, transportiert es aus dem Zellkern und führt es der ubiquitinabhängigen, proteosomalen Degradation im Zytoplasma zu (Honda et al., 1997; Momand et al., 2000). Da *mdm2* selbst ein Zielgen von p53 ist, wird auf diese Weise die Funktion von p53 über einen negativen Rückkopplungsmechanismus reguliert (Otto und Deppert, 1993; Picksley und Lane, 1993). Mdm2 erhält onkogene Eigenschaften, wenn es durch Überexpression p53 konstitutiv eliminiert (Momand et al., 1992). Dies trifft auf etwa 40–60% aller Osteo-Sarkome, sowie auf 30% der Weichteil-Sarkome zu (Cordon-Cardo et al., 1994; Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997; Oliner et al., 1992). *In vivo* Experimente haben gezeigt, dass durch Einbringen von Mdm2-blockierenden Peptiden die suppressiven Funktionen von *wt-p53* in diesen Tumoren aktiviert werden können (Chen et al., 1998).

Den gleichen Mechanismus der p53-Inaktivierung verfolgen Tumoviren. Das virale Onkoprotein E6 der humanen Papilloma Viren (HPV) Typ 16 und 18, das E1B55kD-Protein sowie das E4orf6 Protein der Adenoviren binden *wt-p53* (Huibregtse et al., 1991; Steegenga

et al., 1998; Steegenga et al., 1996) und führen den Tumorsuppressor über den ubiquitinabhängigen Abbauweg einer verstärkten proteolytischen Degradation zu (Scheffner et al., 1993; Scheffner et al., 1990). Damit verhindern sie die Akkumulation von p53 im Zellkern, was für die Entfaltung seiner tumorsuppressiven Aktivität erforderlich ist (Scheffner et al., 1990). Weitere virale Interaktionspartner, die zu einer Inaktivierung von wt-p53 führen, sind das virale SV40 T-Antigen des Simian Virus (Jenkins et al., 1988; Montenarh et al., 1986; Montenarh und Quaiser, 1989; Tan et al., 1986), das „Epstein-Barr nuclear antigen-5“ (EBNA-5) (Szekely et al., 1993), sowie das HBx-Protein des Hepatitis B Virus (Truant et al., 1995).

4.3.2.2 Inaktivierung durch Kernausschluss

In fast allen undifferenzierten Neuroblastomen und etwa in 30% der inflammatorischen Mammakarzinome wird Wildtyp-p53 überexprimiert und akkumuliert im Zytoplasma (Moll et al., 1995a; Moll et al., 1992). In gleicher Weise zeigen einige Glioblastome (Ali et al., 1994; Sembritzki et al., 2002) und einzelne Zellen in Retinoblastomen eine zytoplasmatische Akkumulation von wt-p53 (Schlamp et al., 1997). Zelllinien, die aus undifferenzierten Neuroblastomen isoliert wurden und wt-p53 im Zytoplasma akkumulieren, sind nicht in der Lage, als Reaktion auf genotoxischen Stress einen Zellzyklusarrest einzuleiten. p53 bleibt in diesen Zellen nach moderater Bestrahlung transkriptionell inaktiv (Moll et al., 1996). Erst bei höherer Strahlendosis kommt es zu einer Translokation des Proteins in den Zellkern, einer Transaktivierung von p21 und einem p53-vermittelten Wachstumsarrest.

Die Akkumulation des Proteins im Zytoplasma ist auf mehreren Wegen denkbar: (a) durch eine Maskierung der Kernlokalisierungssignale (NLS), so dass das Protein für Kerntransportproteine nicht mehr zugänglich ist, (b) durch eine kontinuierliche Stimulation des Kernexports und (c) durch eine Komplexierung mit zytoplasmatischen Proteinen, die zu einer »aktiven« Verankerung des Proteins im Zytoplasma führt.

(a) Inaktivierung durch Maskierung des NLS

Liang und Mitarbeiter zogen die Möglichkeit eines gestörten Kernimports als Ursache für die zytoplasmatische Akkumulation von wt-p53 in Betracht. Sie identifizierten im Carboxyterminus von p53 eine Domäne (AS 326-355), die offensichtlich mit der Linkerregion und dem anschließenden NLS 1 in Wechselwirkung treten kann (Liang und Clarke, 1999; Liang et al., 1998). Wurde diese Domäne deletiert, so wurde die Bindungsfähigkeit von p53 an das Kernimportprotein Importin α abgeschwächt, wodurch p53 verstärkt im Zytoplasma der Zellen sequestriert wurde. Die Domäne AS 326-355 von p53 wurde deshalb als *cytoplasmic sequestration domaine* (CSD) bezeichnet. Denkbar ist,

dass durch den engen Kontakt der CSD mit dem Anfangsbereich des Carboxyterminus von p53 die subzelluläre Lokalisation von p53 gesteuert bzw. reguliert werden kann. Wird der Sequenzbereich vor dem NLS I von Proteinen maskiert, so wird der regulierende Einfluß der CSD unterbrochen und Importin α nicht mehr gebunden, was zur Folge hätte, dass p53 im Zytoplasma zurückgehalten wird und somit nicht als Transkriptionsfaktor im Zellkern aktiv sein kann.

(b) *Inaktivierung durch beschleunigten Kernexport*

Alternativ muss ein beschleunigter Kernexport von p53 als Ursache für die zytoplasmatische Lokalisation in Betracht gezogen werden. Diese Hypothese gründet sich auf die Tatsache, dass innerhalb der Tetramerisierungsdomäne von p53 ein Kernexportsignal liegt, das sehr große Homologien zu Kernexportsignalen anderer Proteine aufweist und einen Mdm2-unabhängigen Kernexport ermöglicht. Wird dieses Signal durch einen Aminosäureaustausch zerstört (Leucin gegen Alanin in den Positionen 348 und 350), akkumuliert p53 schließlich im Zellkern (Stommel et al., 1999). Allerdings ist dieses Signal nur zugänglich, wenn p53 als Monomer vorliegt. Inwieweit die Aktivierung dieses Signals die primäre Ursache für die zytoplasmatische Lokalisation von wt-p53 ist, ist umstritten. Zytoplasmatisches wt-p53 in Neuroblastomzelllinien liegt im Komplex mit Mdm2 und dem Glukokortikoidrezeptor vor (Sengupta et al., 2000; Sengupta und Wasyluk, 2001). Dies spricht gegen einen Mdm2-unabhängigen Kernexport und eher für eine gestörte Degradation (Lu et al., 2000; Zaika et al., 1999).

(c) *Inaktivierung durch zytoplasmatische Verankerung*

Beobachtungen an der C6 Gliomzelllinie der Ratte, die mit einer temperatursensitiven Mutante von p53 (tsp53^{Val-135}) transfiziert wurden, zeigten, dass p53 sowohl in Mutanten- als auch in Wildtypform in diesen Zellen nur dann zytoplasmatisch lokalisiert war, wenn diese Zellen Vimentinfilamente als Bestandteil ihres Zytoskeletts enthielten (Klotzsche et al., 1998). In vimentinnegativen Zellen lag tsp53 nur im Zellkern vor. Wurden vimentinnegative Zellen mit einem exogenen Mausvimentin komplettiert, so lokalisierte tsp53 wiederum im Zytoplasma. Dies weist auf eine Beteiligung von Vimentin an der Verankerung von p53 im Zytoplasma hin. Da p53 in diesen Zellen nicht direkt an Vimentin gebunden ist, muss davon ausgegangen werden, dass diese Interaktion unter Beteiligung von Brückenproteinen stattfindet. Inwieweit u.U. Mdm2, Parc, oder der Glukokortikoidrezeptor die Bindung von tsp53 an Vimentin vermittelt, ist noch ungeklärt. Untersuchungen an menschlichen Glioblastomen zeigten eine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Vimentinexpression und der Anwesenheit zytoplasmatischen wt-p53 in Tumorzellen. Dies muss als Hinweis gewertet werden, dass die vimentinabhängige zytoplasmatische

Lokalisation nicht ein auf das C6 Zellsystem beschränktes Phänomen ist, sondern auch auf die Situation in menschlichen Tumoren zutrifft (Sembritzki et al., 2002).

4.4 Problemstellung

4.4.1 Fragestellung

Die bisher beschriebenen Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die zytoplasmatische Akkumulation von wt-p53 in Tumorzellen auf die Bindung an zytoplasmatische Strukturen zurückzuführen ist. Die Suche nach Wegen, die Wechselwirkung von wt-p53 mit zytoplasmatischen Proteinen zu stören, ist daher von besonderem Interesse für die Tumorthherapie. Ein Ansatz wäre nun, nach Interaktionspartnern von p53 in diesem Geschehen zu suchen und diese gezielt auszuschalten. Hier müssen speziesspezifische und/oder gewebsspezifische Unterschiede berücksichtigt werden. Ein alternativer Ansatz, der hier verfolgt wird, besteht darin, Domänen in p53 zu identifizieren, über die das p53-Protein im Zytoplasma verankert wird. Möglicherweise gibt es einen oder mehrere genau umschriebene Sequenzbereiche in p53, die für seine zytoplasmatische Retention verantwortlich sind. Die Kenntnisse über die Existenz entsprechender Domänen ist lückenhaft.

Vorliegende Daten weisen auf eine Beteiligung des Carboxyterminus von p53 an der zytoplasmatischen Verankerung. Wurden Neuroblastomzellen mit einem carboxyterminalen p53 Peptid (DD1=AS 302–392) transfiziert, so akkumulierte das endogene wt-p53 im Zellkern. Offensichtlich konnte p53 durch das carboxyterminale Fragment aus der zytoplasmatischen Verankerung gelöst werden (Ostermeyer et al., 1996). Endogenes zytoplasmatisches Wildtyp p53 konnte mit dem carboxyterminal bindenden monoklonalen Antikörper pAb421, der den Bereich von AS 372 bis 382 erkennt, nicht detektiert werden. Möglicherweise ist dieser Bereich durch die Bindung anderer Proteine maskiert. Für eine Beteiligung des C-Terminus von p53 spricht auch die Beobachtung, dass der Verlust der AS 326-355 zu einem abgeschwächten Kernimport führt (Liang und Clarke, 1999). Möglicherweise ist auch eine Maskierung carboxyterminal gelegener Phosphorylierungsstellen für die zytoplasmatische Retention von p53 verantwortlich (Knippschild et al., 1995).

4.4.2 Zielsetzung und experimentelles Modell

Ziel der Arbeit war es, Domänen von p53 zu identifizieren, die für die zytoplasmatische Verankerung des Proteins essentiell sind. Zur Realisierung dieses Ziels sollten bestimmte Sequenzabschnitte der temperatursensitiven Mutante $\text{tsp53}^{\text{Val 135}}$ deletiert oder einzelne AS in regulatorischen Domänen ausgeschaltet werden. Die Bedeutung des jeweils betroffenen

Bereichs für die zytoplasmatische Verankerung sollte anhand der subzellulären Lokalisation des mutierten Tumorsuppressors erfasst werden. Diese Arbeiten sollten mit der temperatursensitiven Mutante p53^{Val-135} (tsp53) durchgeführt werden (Eliyahu et al., 1985; Finlay et al., 1988; Hinds et al., 1989).

Dabei weist diese tsp53-Mutante bei 39°C Mutantenkonformation auf und lokalisiert in stabil transfizierten Zellen im Zytoplasma (Gannon et al., 1990). Sie zeigt unter diesen Bedingungen keine wachstumssuppressiven Eigenschaften, und ermöglicht damit die Etablierung stabil transfizierter Zelllinien. Nach einem Wechsel auf die permissive Temperatur (30°C) nimmt das Protein seine Wildtypkonformation an und akkumuliert innerhalb weniger Stunden im Zellkern. tsp53 entfaltet nun seine wachstumssuppressive Wirkung und kann die transformierenden Eigenschaften von Onkogenen wie *ras* oder *myc* unterdrücken (Martinez et al., 1991; Michalovitz et al., 1990). Es kommt zur Aktivierung von p53-Zielgenen, wie *p21waf1*, *mdm2* oder *bax*, die, je nach zellulärem System, einen Zellzyklusarrest oder die Apoptose induzieren (Martinez et al., 1991). Nach längerer Kultivierung bei 30°C progressieren einzelne Zellen und wachsen zu klonalen Foci aus. Charakteristisch für diese progressierenden Zellen ist, dass tsp53 nun in seiner Wildtypkonformation im Zytoplasma lokalisiert (Knippschild et al., 1996b); d.h. tsp53 kann sowohl in Mutanten- als auch in Wildtypform zytoplasmatisch verankert werden kann.

Die Funktionalität verschiedener tsp53 Mutanten in Bezug auf die Verankerung sollte am Subklon C6D8 der C6 Gliomzelllinie der Ratte (Bohn et al., 1993; Röser et al., 1991) überprüft werden. Dieser Klone exprimiert kein endogenes p53, ist jedoch in der Lage, exogenes tsp53 unter Beteiligung des Intermediärfilamentproteins Vimentin im Zytoplasma zurückzuhalten (Klotzsche et al., 1998). Die Verankerung von tsp53 im Zytoplasma ist nicht von seiner Proteinkonformation abhängig. Der zytoplasmatischen Retention von tsp53 in Wildtyp- und Mutantenkonformation liegt offensichtlich der gleiche Mechanismus zugrunde.

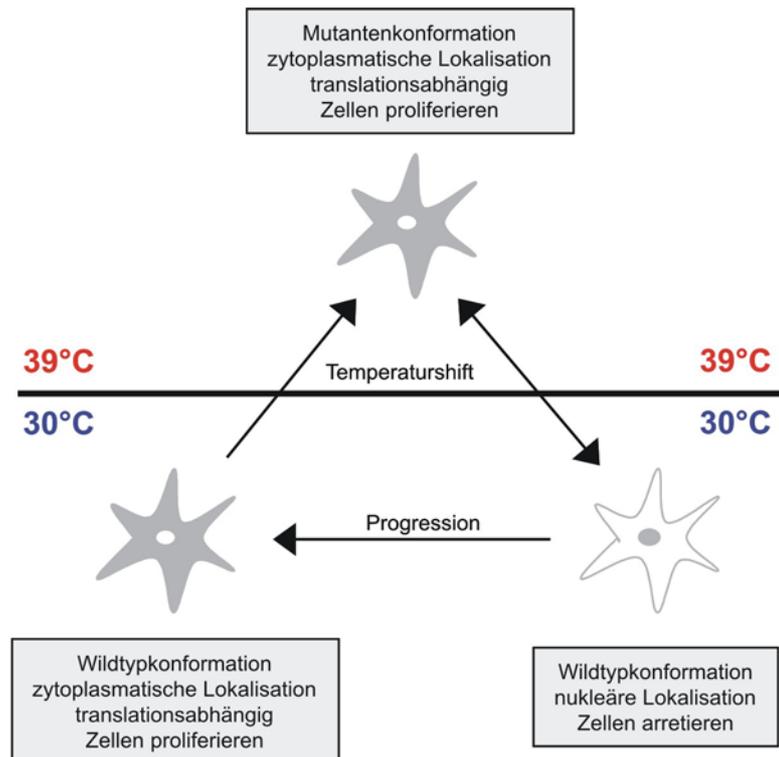


Abbildung 3: Subzelluläre Lokalisation und Funktion der temperatursensitiven Mutante $tsp53^{val135}$. $tsp53^{val135}$ liegt bei 39°C in Zellen in seiner Mutantenkonformation vor und ist im Zytoplasma sequestriert. Durch einen Temperaturshift der Zellen auf 30°C gelangt $tsp53^{val135}$ wieder in den Zellkern, liegt in Wildtypkonformation vor und vermittelt einen Wachstumsarrest. Nach längerer Kultivierung der Zellen bei 30°C überkommen die Zellen ihren Wachstumsarrest und bilden einzelnen klonale Focis aus. $tsp53^{val135}$ liegt im Zytoplasma in Wildtypkonformation vor.

5 Material & Methoden

5.1 Material

5.1.1 Eukaryontische Zelllinien

- C6D8 (Roser et al., 1991):

Der Klon C6D8 ist ein Subklon der Rattengliomzelllinie C6 (Benda et al., 1968).

5.1.2 Bakterienstämme

Die Klonierungen wurden mit den *E.coli* Stämme DH5 α (Hanahan, 1983) und XL1-Blue (Bullock et al., 1987) durchgeführt. In den in vitro-Mutagenese-Experimenten wurde der reparaturdefiziente *E.coli*-Stamm NM522 mutS (Pharmacia Biotech) verwendet.

5.1.3 Antikörper

- Primäre Antikörper (monoklonal)

IgG-Maus anti **p53** (pAb 248) (Yewdell et al., 1986)

IgG-Maus anti **p53** (pAb 242) (Yewdell et al., 1986)

IgG-Maus anti **p53** (pAb 240) (Gannon et al., 1990)

IgG-Maus anti **p53** (pAb 421) Aszites (Harlow et al., 1981)

- Brückenantikörper

IgG-Kaninchen anti Maus-IgG ; affinitätsgereinigt (DAKO, Glostrup – Dänemark)

IgG-Ziege anti Kaninchen-IgG ; affinitätsgereinigt (Sigma, München)

- Markierte Antikörper und Verbindungen

IgG-Ziege anti Kaninchen-IgG / FITC-konjugiert (Miles Yeda, Rehovot – Israel)

IgG-Ziege anti Maus-IgG / FITC-konjugiert (Dianova, Hamburg)

IgG-Esel anti Maus-IgG / TexasRed-konjugiert (Jackson Immuno Research Laboratories,
West Grove; Pennsylvania – USA)

IgG-Schaf anti DIG-peroxidase (Anti-DIG-POD) (Boehringer Mannheim)

5.1.4 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	Alle verwendeten Restriktionsendonukleasen sowie die dazugehörigen Puffer wurden von Boehringer Mannheim oder New England Biolabs (NEB), Schwalbach bezogen
T4 Polynukleotidkinase	New England Biolabs, Schwalbach
Shrimp alkalische Phosphatase (SAP)	Boehringer Mannheim
FPLCpure [®] T4 DNA Ligase	Pharmacia Biotech

5.1.5 Vektoren

Die verwendeten Vektoren basieren auf dem Plasmid pBr322 (Bolivar et al., 1977; Sutcliffe, 1978). Die in den Vektor einklonierten Gene stehen unter retroviraler Transkriptionskontrolle.

- pLXSN (Clontech):

Das Plasmid pLXSN (5874bp) besitzt ein Neomycin-Resistenzgen. Das Resistenzgen steht unter transkriptioneller Kontrolle des myeloproliferativen Sarkomvirus Promotors. Die Restriktion mit *EcoRI* führt zur Linearisierung des Plasmids. Über diese Restriktionsschnittstelle wurde die für das temperatursensitive p53 kodierende murine cDNA (pLXSN^{Val-135}p53) eingefügt. Die temperatursensitive Mutante von p53 wurde freundlicherweise von Fr. Prof. V. Rotter, Weizmann Institut, Israel, zur Verfügung gestellt.

- pLTRcG9 (Eliyahu et al., 1985):

Der pLTRcG9-Vektor (ca.9800bp) ist ein eukaryontischer Expressionsvektor für murines *tsp53*^{Val-135}. Die temperatursensitive p53 Mutante unterscheidet sich von Wildtyp p53 durch einen Aminosäureaustausch von Alanin zu Valin an der Position 135. Das *tsp53*-Gen wurde als Chimäre aus p53 cDNA und genomischer p53 DNA kloniert und steht unter transkriptioneller Kontrolle des murinen Harvey Sarkomvirus Promotors. Die Restriktion mit *Sall* führt zur Linearisierung des Plasmids.

- pCI-neo (Promega):

Der eukaryontische Expressionsvektor pCI-neo (5474bp) enthält den Simian Virus 40 Promotor und besitzt ein Neomycin vermittelndes Resistenzgen. Einklonierte Gensequenzen stehen unter transkriptionaler Kontrolle des humanen Zytomegalievirus Promotors. Die Restriktion mit *EcoRI* führt zur Linearisierung des Plasmids.

- pRC / RSV (Invitrogen):

Der eukaryontische Expressionsvektor (7179bp) enthält einen Rous Sarkomvirus (RSV) Promotor und ein Neomycinresistenzgen. Durch Restriktion mit *EcoRI* wird das Plasmid linearisiert.

- pRC / RSV-17kT (Scheidig, 1999):

Dieser Vektor enthält die cDNA für das SV40 17kT.

- pUC19 (Messing, 1983):

Dieser prokaryontische Expressionsvektor (2686bp) wurde zur Klonierung der verschiedenen c-terminalen Mutationsfragmente eingesetzt. Das Plasmid wird mit *XbaI* linearisiert.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit die folgenden *tsp53* Expressionsvektoren kloniert: pCI-neo *tsp53*, pCI-neo *tsp53+17kT*, pCI-neo *tsp53/Δn-ATG41*, pCI-neo *tsp53/Δc-TGA308*, pCI-neo *tsp53/Δc-TGA357* und pCI-neo *tsp53/P_{mut}-312ala*. Die in diesen Expressionsvektor eingefügten carboxyterminalen Fragmente von *p53* besitzen eine chimäre Sequenz; sie beinhalten die Intronabschnitte 2-5. Durch die Integration dieser Intronsequenzen konnte die genomische Integrität sowie die Stabilität der mRNA erhöht werden. Zudem ist eine stabilere Expression der entsprechenden Proteine in den eukaryontischen Zelllinien erreicht worden.

5.1.6 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von MWG, München, oder TIB MOLBIOL, Berlin, synthetisiert, falls keine anderweitigen Angaben vorliegen. Zu allen aufgeführten Oligonukleotiden wurde auch der entsprechende Gegenstrang synthetisiert.

Mutagenese Primer:

- *tsp53 /Δc-TGA308* 5`-GCA-AAG-AGA-GCG-CTG-CCC-ACC-TGA-ACA-AGC-GCC-TCT-CCC-CCG-3`
- *tsp53 /Δc-TGA357* 5`-C-CAT-GCT-ACA-GAG-GAG-TCT-TGA-GAC-GCA-GGG-CTC-ACT-CC-3`
- *tsp53/P_{mut}-312ala* 5`-G-CCC-ACC-TGC-ACA-AGC-GCC-GCT-CCC-CCG-CAA-AAG-AAA-AAA-CC-3`

Selektions Primer für die *in vitro* Mutagenese (Pharmacia Biotech):

- *ScaI / MluI U.S.E.* Primer 5`-CTG-TGA-CTG-ACG-CGT-CAA-CCA-AGT-C-3`

p53 Sequenzierprimer:

- SeqPr mup53 / 248 für 3` 5`-ATT-ATC-CTT-ACC-ATC-ATC-ACA-3`
- i.v.M. SeqPr mu/ Δ c-tsp53 für 3` 5`-GCC-TGC-CCT-GGG-AGA-GAC-CGC-CG-3`
- SeqPr pCI neo/ Δ n-tsp53 für 3` 5`-ATT-AGA-GAA-GAC-TCT-TGC-3`

5.1.7 Molekulargewichtsstandards

Zur Ermittlung des Molekulargewichts von Proteinen und zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurden folgende Standards verwendet:

- **Protein-Standard I** (Prestained SDS-PAGE Standards - Broad Range, Bio-Rad)

Myosin	200 kDa
β -Galactosidase	116 kDa
Bovine Serum Albumin	85 kDa
Ovalbumin	49 kDa
Carbonic anhydrase	38 kDa
Soybean trypsin inhibitor	32 kDa
Lysozyme	20 kDa
Aprotinin	7 kDa

- **Protein-Standard** (Prestained Marker, Sigma – München)

Bovine Serum Albumin	66 kDa
Ovalbumin	45 kDa
Glucosedehydrogenase	36 kDa
Carboanhydrase	29 kDa
Trypsinogen	24 kDa
Trypsinogeninhibitor	20 kDa
α -Lactalbumin	14 kDa

- **DNA-Längenmarker** (Lambda-DNA mit *HindIII* restringiert)

23kbp - 9,4kbp – 6,7kbp – 4,4kbp – 2,3kbp – 2,0kbp

- **DNA-Längenmarker** (1Kb Plus DNA-Ladder, Gibco)

12kbp – 5,0kbp – 2,0kbp – 1,65kbp – 1,0kbp – 850bp – 650bp – 500bp – 400bp - 300bp – 200bp – 100bp

- **DNA-Längenmarker** (100bp DNA-Ladder, Gibco)

1,5kbp – 1,4kbp – 1,3kbp – 1,2kbp – 1,1kbp – 1,0kbp – 900bp – 800bp – 700bp – 600bp – 500bp - 400bp

5.1.8 Chemikalien und Biochemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien (siehe Methodenteil) waren vom Reinheitsgrad „zur Analyse“ und wurden, falls im Text nicht gesondert erwähnt, von folgenden Firmen bezogen:

Amersham, Braunschweig
Bayer, Leverkusen
Biochrom, Berlin
Boehringer, Mannheim
Difco, Detroit - USA
Fluka, Neu Ulm
Gibco BRL, Berlin
Merck AG, Darmstadt
Pharmacia Fine Chemicals AG, Uppsala – Schweden
Riedel de Häen, Bad Seelze
Serva Feinbiochemika, Heidelberg

5.1.9 Geräte

Analysenwaage PM460	(Mettler, Gießen)
Brutschrank für Bakterien	(Heraeus, Hamburg)
Brutschrank für Zellkultur	(Heraeus, Hamburg)
Brutschrank für Zellkultur	(New Brunswick Scientific, Edison; New York USA)
Digital Color Printer Mavigraph	(Sony, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop Universal	(Zeiss, Jena)
Fluoreszenzmikroskop Leica DM IRB	(Leica, Wetzlar)
Fotoautomatik MC63	(Zeiss, Jena)
Gelelektrophoresekammer für DNA	(Gibco BRL, Berlin)
Gelelektrophoresekammer für Proteine	(Hoefler, München)
Geltrockner Modell 583	(Bio-Rad, München)
Lichtmikroskop Labovert	(Leica, Wetzlar)
Netzgerät PowerPac 3000	(Biorad, München)
pH-Meter PHM82	(Radiometer, Kopenhagen; Dänemark)
Rotor Sorvall SS34	(DuPont Inst., Bad Homburg)
Rotor Sorvall SW27	(DuPont Inst., Bad Homburg)
Rotor Sorvall HB4	(DuPont Inst., Bad Homburg)

Röntgenfilmentwicklermaschine	(Fuji, Hamburg)
Schüttler MS-1 Minishaker	(IKA, Wilmington, North Carolina; USA)
Sterilwerkbank HA2448GS	(Bio-Flow, Meckenheim)
Ultraschall Sonifier B12	(Branson, Danbury; Connecticut – USA)
UV-Spektrometer Ultrospec III	(Pharmacia, Uppsala – Schweden)
Wasserbad Typ 1003	(GFL, Burgwedel)
Western-Blot-Apperatur Mini Trans Blot	(Bio-Rad, München)
Zentrifuge Sorvall RC-5B	(DuPont Inst., Bad Homburg)
Zentrifuge 5415 C	(Eppendorf, Hamburg)
Zentrifuge Rotanta 96R	(Hettich, Tuttlingen)

5.1.10 Filme und Fotochemikalien

B & W Printing Pack UPC-1020	(Sony, Deutschland)
Röntgenfilm Kodak BIOMAX™ MR	(Kodak, Rochester – USA)
Röntgenfilm Kodak X-OMAT™ MR	(Kodak, Rochester – USA)

5.1.11 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Deckgläser Ø 12mm	(Menzel-Gläser, Braunschweig)
Einfrierröhrchen	(Nunc, Roskilde – Dänemark)
Filterpapier Whatman 3MM	(Schleicher und Schuell, Dassel)
Gewebekulturschalen Ø 6cm / Ø 9cm	(Nunc, Roskilde – Dänemark)
24-well Gewebekulturplatten	(Nunc, Roskilde – Dänemark)
Ionenaustauscher-Säule Nucleobond Ax	(Macherey-Nagel, Düre)
Mikrodialysemembran Type VS (0,25µm)	(Millipore, Eschborn)
Nitrocellulosemembran Hybond-C Super	(Amersham, Braunschweig)
Objektträger	(Menzel-Gläser, Braunschweig)

5.1.12 Computer-Software

Photoshop 5.0	(Adobe Acrobat)
Endnote6.0	(Berkley, Californien)
Microsoft Office 97	(Microsoft)
PowerScan software TCS NT™ Version 1.6.5	(Leica, Wetzlar)
TCS NT™ software	(Leica, Wetzlar)
Vektor NTI, Version 4.0	(InforMax Inc.)
Windows NT™ for workstation	(Microsoft)

5.2 Methoden

5.2.1 Zellkultur

5.2.1.1 Prokaryontische Zellkultur

5.2.1.1.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien (Hanahan, 1983)

Zur Präparierung von transformationskompetenten Bakterienzellen wurde die sogenannte Mehrionentechnik angewandt. Dazu wurden Bakterien (DH5 α bzw. NM522 mutS) auf LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelkolonien wurden gepickt und in einer 5 ml Übernachtkultur angezogen. 50 ml Ψ Broth wurden mit 1,0 ml der Übernachtkultur angeimpft und bei 37°C auf einem Schüttler bei 280 rpm bis zu einer OD₅₅₀ 0.22 ($\leq 0,3$) angezüchtet. Die Bakteriensuspension wurde auf sterile Zentrifugenröhrchen verteilt und 15 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 4°C zentrifugiert (3000rpm; 10 min.; SS34-Rotor, Sorvall), das erhaltene Sediment in 12 ml eiskaltem Tfb I Puffer resuspendiert, und erneut 15 – 30 min. auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren der Röhrchen bei 4°C (3000rpm; 10 min.; SS34-Rotor, Sorvall) sowie vorsichtiges resuspendieren der Bakterien in eiskaltem Tfb II Puffer, erfolgte eine weitere Inkubationsphase der Bakteriensuspension für 15 min. auf Eis im Kühlraum. Anschließend wurden die Bakterien in autoklavierte Eppendorf-Reaktionsgefäße à 150 μ l aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der so gewonnenen transformationskompetenten Bakterien erfolgte anschließend bei -70°C.

- LB-Medium: 1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Bacto Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, in H₂O, mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt, autoklaviert.
- LB-Amp-Medium: LB-Medium mit 0,01% (w/v) Ampicillin
- LB-Agarplatten: LB-Medium mit 1,5% Agar für Agarplatten
- LB-Amp-Agarplatten: LB-Agarplatten mit 0,01% (w/v) Ampicillin
- Ψ Broth: 100 ml LB-Medium, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂, mit KOH auf pH 7,6 eingestellt, autoklaviert.
- Tfb I: 100 mM RbCl, 50 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂, 30 mM KAc, 15% (v/v) Glycerol mit Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt, sterilfiltriert.
- Tfb II: 10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerol mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt, sterilfiltriert.

5.2.1.1.2 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA (Kaiser und Hogness, 1960)

Die bei -70°C gelagerten transformationskompetenten Bakterienzellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Etwa 100 ng Plasmid-DNA (oder 10 μl eines Ligationsansatzes) wurden mit 150 μl kompetenter *E.coli*-Bakterien (DH5 α bzw. NM522 mutS) vorsichtig gemischt und 30 min. auf Eis inkubiert. Es folgte für 45sec. ein Temperaturschock bei 42°C . Nach Zugabe von 1 ml ampicillinfreiem LB-Medium wurden die Zellen bei 37°C für 90 min. inkubiert. Diese Phase erlaubte die Ausprägung der plasmidkodierte Antibiotikaresistenz. 50 μl der Bakterienzellsuspension wurden auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

Mit Zellen einzelner Kolonien wurden 5 ml ampicillinhaltiges LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. 500 μl der Über-Nacht-Kultur wurden mit 500 μl sterilem Glycerin gemischt und bei -70°C konserviert.

5.2.1.2 Eukaryontische Zellkultur

5.2.1.2.1 Erhaltungszellkultur

Die Kultivierung der Rattengliomazellen C6D8 erfolgte in Gewebekulturschalen (\varnothing 9 cm) mit 10 ml Kulturmedium bei 39°C bzw. 30°C in einer 5%igen CO_2 -Atmosphäre. Nach dem Absaugen des Mediums, wurden die subkonfluent gewachsenen Kulturen (max. 80% Konfluenz) mit 1 ml vorgewärmtem Trypsin/EDTA für etwa 3 min. bei 37°C inkubiert. Nach dem Lösen der adhären Zellen vom Boden der Kulturschale wurde die Zellsuspension 1:10 bis 1:5 in frisches, vorgewärmtes Zellkulturmedium verdünnt und ausgesät.

- Zellkulturmedium: DMEM (PAA Laboratories, Linz – Österreich) 13,37 g, NaHCO_3 3,7 g, FCS (PAA Laboratories, Linz – Österreich) 10% ad 1000ml H_2O , mit Essigsäure pH 6,9 eingestellt, sterilfiltriert.
- Trypsin / EDTA: 0,5 mM EDTA (pH 8,0), 0,05% Trypsin in PBS, steril filtriert.

5.2.1.2.2 Einfrieren und Auftauen von Mammaliazellen

Die ahärent wachsenden C6D8 Zellen wurden in \varnothing 9 cm Gewebekulturschalen bei 37°C bis zu 80-90%iger Konfluenz expandiert. Zum Einfrieren wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin abgelöst, mit 10 ml Zellkulturmedium gewaschen und sedimentiert (5 min. bei 1000 rpm). Das gewonnene Zellsediment wurde in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert und in

Kryoröhrchen schrittweise über 24 Stunden in flüssigem Stickstoff abgesenkt. Für eine kurzzeitige Lagerung (max. 3 Monate) genügte das Einfrieren der Zellen bei -70°C .

Das Auftauen erfolgte bei 37°C , wonach die Zellen vorsichtig mit 10 ml vorgewärmtem Medium gewaschen und anschließend in Gewebekulturschalen ausgesät wurden.

Zur Vorbereitung von *in situ* Immunfluoreszenzmarkierungen der Zellen wurden diese auf Deckgläschen (\varnothing 12 mm) bis zu 50%iger Konfluenz expandiert.

- Einfriermedium: DMEM 2 x konzentriert, 45,5% FCS, 0,5% NaHCO_3 , 11% DMSO

5.2.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.2.1 *Minipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien (Birnboim und Doly, 1979)*

Für die Präparation von Plasmiden im Analyseverfahren wurde das »QiaVac Manifold« Vakuumsystem und der DNA-Minipräparationskit von Qiagen verwendet. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakterien und einer anschließenden Aufreinigung der Lysate mittels Anionenaustausch-Chromatographie. Dazu wurden 5 ml LB-Amp-Medium mit einer Einzelzellkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm im Schüttler inkubiert. 1,5 ml dieser Übernachtskultur wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in einer Eppendorfschüttelfuge (6000 rpm, 1 min. bei RT) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakteriensediment in 250 μl P1 Puffer (+ RNase) (Qiagen) resuspendiert. Durch Zugabe von 250 μl P2 Puffer (Qiagen) wurden die Bakterien lysiert und die Proteine denaturiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurden zur Neutralisation 500 μl Puffer N3 (Qiagen) dazugegeben und der Ansatz durch vorsichtiges Invertieren durchmischt. Im Anschluß daran wurden die denaturierten Bestandteile bei 4°C sedimentiert (Eppendorfschüttelfuge; 10 min. 10.000 x g) und der Überstand in die Filterstrips überführt, die in eine »QiaVac« Vakuumkammer gespannt wurden. Nach Anlegen eines Vakuums wurden die Überstände durch die Anionenaustauschfilter gesogen, wobei die DNA im Filter gebunden wurde. Nach mehreren Waschrufen (1 x mit je 1 ml PB Puffer (Qiagen) und 2 x mit je 1 ml PE Puffer (Qiagen)) wurde die DNA mit je 100 μl 10 mM Tris/HCl pH 8.5 eluiert. Jeweils 5 μl wurden für einen Restriktionsverdau eingesetzt.

- DNA Mini-Präparations Kit: Mini-Preparation Kit (Qiagen, Hilden)
- Elutionspuffer: 10mM Tris/HCl, pH8.5 eingestellt.

5.2.2.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Um Plasmid-DNA in größeren Mengen zu gewinnen wurde ein Maxi-Präparationskit (Qiagen) verwendet. Zur DNA-Plasmid Gewinnung wurden zunächst 5 ml antibiotikahaltiges LB-Medium in einem sterilen 10 ml Plastikröhrchen mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und ca. 10 Std. bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Von dieser Startkultur wurden etwa 100 µl benutzt, um 250 ml (für »high copy«-Plasmide) bzw. 500 ml (für »low copy«-Plasmide) LB-Amp-Kulturmedium anzuimpfen. Diese wurde über Nacht bei den gleichen Bedingungen inkubiert wie die Startkultur. Die Bakteriensuspension wurde abzentrifugiert (Sorvall RC-5B-Zentrifuge, GSA-Rotor, 6500 rpm, 7 min., 4°C) und das Sediment in 12 ml eiskaltem Puffer S1 (+ RNase A) resuspendiert. Weitere 12 ml des Puffers S2 wurden dazugegeben und 5 min. bei RT inkubiert. Nach weiterer Zugabe von 12 ml Puffer S3 und Mischen wurde die Lösung 5 min. auf Eis belassen. Zur Sedimentierung der Zelltrümmer wurde der Ansatz 45 min. bei 4°C und 12.000 rpm (HB4-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen Faltenfilter filtriert, bevor er auf eine mit 5 ml Puffer N2 äquilibrierte NUCLEOBOND AX500-Säule (Macherey & Nagel) aufgebracht wurde. Bei dieser Säule handelte es sich um einen Anionen-Austauscher auf der Basis von Silica-Gel. Nach dem Waschen mit zweimal 12 ml Puffer N3 erfolgte die Elution der Plasmid-DNA mit zweimal 6ml Puffer N5. Die DNA wurde mit 0,7 Vol. Isopropanol bei RT gefällt und durch Zentrifugation (HB4-Rotor, 12.000 rpm, 30 min., 4°C) sedimentiert. Abschließend wurde sie mit 70% EtOH gewaschen und nach kurzem Trocknen in pyrogenfreiem sterilem Wasser aufgenommen.

- DNA-Präparations Kit: Maxi-Preparation Kit (Qiagen, Hilden)
- S1 Puffer: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg RNase A / ml, pH 8,0.
- S2 Puffer: 200 mM NaOH, 1% SDS.
- S3 Puffer: 2,8 M K-Acetat, pH 5,1.
- N2 Puffer: 100 mM Tris, 15% Ethanol, 900 mM KCl, pH 6,3 mit H₃PO₄.
- N3 Puffer: 100 mM Tris, 15% Ethanol, 1150 mM KCl, pH 6,3 mit H₃PO₄.
- N5 Puffer: 100 mM Tris, 15% Ethanol, 1000 mM KCl, pH 8,5 mit H₃PO₄.

5.2.2.3 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur spektroskopischen Konzentrationsbestimmung wurde ein kleines Volumen der DNA-Lösung (5-50 µl) mit TE-Puffer auf 400 µl verdünnt. In einer Quarzküvette wurde die optische Dichte (OD) der Lösung bei 230, 260 und 280 nm gegen TE-Puffer bestimmt (Shimadzu DioSpec-1601E). Saubere DNA, ohne Proteinkontamination, hat einen OD₂₆₀/OD₂₃₀ Quotienten von 1,8 –2,0. Der Absorbtionskoeffizient für die Bestimmung der

entsprechenden Konzentration liegt für ds-DNA bei 50 µg/ml, für ss-DNA bei 40 µg/ml und für Oligonukleotide bei 20 µg/ml (Maniatis et al., 1982).

Alternativ konnten DNA-Mengen im Ethidiumbromid gefärbten 1%igen-Agarosegel abgeschätzt werden. Dabei wurden die Fluoreszenzintensitäten von DNA-Banden mit denen von bekannten DNA-Mengen verglichen.

- TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 eingestellt.

5.2.2.4 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind in der Lage, doppelsträngige DNA an für sie spezifischen, meist palindromen Sequenzen zu schneiden. Die für einen Restriktionsverdau benötigte Enzymmenge richtete sich nach der zu schneidenden DNA-Menge. 1 Unit (U) ist definiert als die Enzymmenge, die 1 µg DNA in einem 50 µl Ansatz in ca. einer Stunde vollständig schneidet. Der Restriktionsverdau wurde für 1 bis 4 Stunden bei der für das Restriktionsenzym optimalen Temperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Überprüfung der Restriktion im Agarosegel sowie eine Reinigung der geschnittenen DNA.

5.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese (Ausubel, 1992)

Zur analytischen und präparativen Auftrennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Diese Auftrennungsmethode beruht darauf, daß linearisierte DNA-Fragmente im Agarosegel umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Länge des DNA-Fragments, der Agarose-Konzentration und der angelegten Spannung. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in 0,8 bis 1,5%igen Agarosegelen mit der Abmessung 80 x 90 x 7 mm. Die Agarose wurde in TAE-Puffer, der auch als Laufpuffer diente, durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen der Gellösung auf etwa 60°C wurde 1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben.

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die DNA-Proben mit 1/10 Vol. 10x DNA-Probenpuffer versetzt. Parallel zu den Proben wurden standardisierte DNA-Längenmarker (100bp und/oder 1000bp Leiter, Pharmacia) aufgetrennt, die zur Abschätzung der DNA-Fragmentlänge in den Proben dienten. Die Separation erfolgte bei konstant 90V. Die Detektion der DNA erfolgte über UV-Licht der Wellenlänge 254 nm; die bildgebende Dokumentation mit der „digit-STORE“-Anlage (INTAS).

- TAE: 40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0.

- 10x DNA-Probenpuffer: 100 mM EDTA pH 8,0, 50% Glycerin, 1% SDS, 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol.

5.2.2.6 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennte DNA-Fragmente wurden aus dem Gel mit Hilfe des »Qiaex II Agarose Gel Extraction-Kit« (Qiagen) eluiert. Dazu wurde die gewünschte DNA-Bande unter UV-Licht identifiziert, mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dieser Arbeitsschritt mußte sehr zügig ablaufen, um Strangbrüche und Mutationen der DNA durch UV-Licht zu verhindern. Nach Zugabe des dreifachen Volumens vom Puffer QX1 wurden 15 µl QIAEX Glasmilchsubstrat hinzugegeben und das Ganze durch Erhitzen bei 50°C für 10 min. geschmolzen. Zwischenzeitlich wurde die Lösung mehrmals durch leichtes Vortexen erneut durchmischt. Nach Zentrifugation und Abnahme des Überstands wurde das Pellet in 1x mit 500 µl Puffer QX1 und 2x mit je 500 µl Puffer PE gewaschen. Das Pellet wurde anschließend getrocknet und die gebundene DNA durch Zugabe von 20 µl 10 mM Tris / HCl (pH 8,5) eluiert.

- DNA-Extraktion: Qiaex II Agarose Gel Extraction-Kit (Qiagen, Hilden)

5.2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten (Ausubel, 1992)

Zur Ligation von DNA Enden wurde der »Rapid Ligation Kit« (Boehringer, Mannheim) verwendet. Dazu wurden Vektor-DNA und DNA-Fragmente in 1x DNA Verdünnungspuffer in einem Gesamtvolumen von 10 µl aufgenommen. Vektor-DNA und DNA-Fragment wurden dabei im Verhältnis 1:1, 1:3 und 1:5 eingesetzt. Für 100 ng Vektor-DNA wurde die Menge des einzusetzenden DNA-Fragmentes durch die Formel errechnet:

$$\frac{100 \text{ ng Vektor-DNA} \times \text{Insert [Kb]}}{\text{Vektor-DNA [Kb]}} \times \text{molares Verhältnis [1/x]} = \text{Insert}$$

Zu dem Ansatz wurden 10 µl 2x T4 DNA Ligasepuffer gegeben. Abschließend wurde 1 µl der T4 DNA-Ligase zum Gesamtansatz hinzugefügt. Nach leichtem Durchmischen wurde der Reaktionsansatz für 5 min. bei RT inkubiert und konnte anschließend direkt zur Transformation eingesetzt werden.

5.2.2.8 Kinasierung der Primer

Die Kinasierung dient dazu, eine reaktive Phosphatgruppe an das 5'-Ende des Primers anzuhängen, um den bindenden Nukleotiden Energie bereit zustellen. Zur Kinasierung am 5'-Ende wurden 100 pmol des Primers eingesetzt. Zu diesem Ansatz wurden noch 3 µl 10x T4 Polynukleotid-Kinase Puffer sowie 10 mM ATP hinzugefügt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit ddH₂O auf ein Volumen von 28 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 2 µl T4 Polynukleotid-Kinase wurde der Ansatz für 30 min. bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsstopp der Kinasierung erfolgte durch Erhitzen der Proben für 10 min. bei 65°C. Die kinasierten Primer konnten anschließend direkt zur *in vitro* Mutagenese eingesetzt werden.

5.2.2.9 In vitro Mutagenesereaktion (Pharmacia)

Das *in vitro*-Mutageneseverfahren bietet die Möglichkeit, in isolierte DNA-Moleküle spezifische Mutationen zu erzeugen. Die möglichen biologischen Funktionen eines DNA-Bereiches werden analysiert, indem man diesen zuerst gezielt mutiert, in eine geeignete Empfängerzelle einbringt und anschließend die biologischen Auswirkungen der eingefügten Mutation untersucht. Bei diesem Verfahren ist es möglich, durch entsprechende Primer gezielt Punktmutationen auf dem inklonierten DNA-Fragment einzuführen. Voraussetzung für diese Methode ist einzelsträngige DNA (pUC19), sowie ein Mutations- und Selektionsprimer. Der Selektionsprimer soll auf dem Einzelstrang eine vorhandene, bekannte Restriktionsschnittstelle in eine neuartige Restriktionsschnittstelle auf dem neu synthetisierten DNA-Strang erzeugen. Der Mutationsprimer hingegen soll gezielt eine neue Plasmid-DNA Mutation in das inklonierte DNA-Fragment einfügen. Die *in-vitro* Mutagenese läßt sich in fünf aufeinanderfolgende Schritte unterteilen:

Im ersten Schritt erfolgte die Anlagerung der Primer an die einzelsträngige Plasmid-DNA, sowie, durch Zugabe von Nukleotiden, die Neusynthese des zweiten DNA-Stranges, welcher sowohl eine Mutation auf dem inklonierten DNA-Fragment als auch eine Mutation für eine neue Restriktionsschnittstelle beinhaltet. Im darauf folgenden Schritt erfolgte die Selektion für den neu synthetisierten DNA-Strang durch Restriktion mit einem für die neue Restriktionsschnittstelle spezifischen Enzym. Durch die Transformation der nicht verdauten Plasmid-DNA in einen reparaturdefizienten *E.coli* Stamm (NM522 mutS) im dritten Schritt wurde vermieden, dass die Bakterien die gesetzten Mutationen durch DNA-Reparaturmechanismen korrigierten. Als nächster Schritt erfolgte die Minipräparation mit anschließendem zweiten Restriktionsverdau, um eine erneute Selektion für den mutationstragenden DNA-Strang vorzunehmen. Die abschließende Transformation in *E.coli*

DH5 α und das Ausplattieren auf LB-Amp-Agarplatten führte zum Wachstum von Einzelkolonien, die die gewünschten Mutationen in ihrem Plasmid integriert hatten.

5.2.2.9.1 *In-vitro* Mutagenese Primer

Bei der Auswahl der *in-vitro* Mutagenese Primer sollte darauf geachtet werden, daß die Primer komplementär zum vorliegenden DNA-Einzelstrang sind, eine mittlere Länge von 20 bis 30 Nukleotiden haben und dass sowohl der Mutations- als auch der Selektionsprimer eine ähnliche Hybridisierungstemperatur aufweisen. Die Hybridisierungs-Temperatur (AT = „Annealing“-Temperatur) eines Primers kann nach folgender Formel abgeschätzt werden (Suggs et al., 1981):

$$[(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4] - 10 = AT$$

Die durch den Selektionsprimer neu eingefügte Restriktionsschnittstelle dient zur Differenzierung zwischen mutiertem und nicht-mutiertem DNA Strang mittels Restriktionsverdau.

5.2.2.9.2 *Durchführung der In-vitro* Mutagenese

Zur Durchführung der *in-vitro* Mutagenese wurden 40 ng der Plasmid-DNA (pUC19) in einem 20 μ l Gesamtansatz in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zugabe von jeweils 1,25 pmol des Selektionsprimers (Pharmacia) als auch des Mutationsprimers wurde zum Ansatz noch 1/10 Vol. des 10x »One-Phor-All« (OPA) Puffers hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde schließlich mit ddH₂O auf das Endvolumen von 20 μ l aufgefüllt und für 10 min. bei 100°C im Heizblock denaturiert. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min. auf Eis gestellt, herausgenommen und 30 min. bei RT inkubiert, so dass in dieser Phase die Primer mit der einzelsträngigen Plasmid-DNA hybridisieren konnten. Die Zugabe von 7 μ l des Nukleotid-Mixes und 3 μ l des Reaktions-Mixes (jeweils Pharmacia), sowie die Inkubation für 50 bis 60 min. bei 37°C im Brutschrank, ermöglichte die Synthese des mutierten, komplementären DNA-Stranges. Der Reaktionsstop erfolgte durch 15 minütiges Erhitzen des Ansatzes bei 85°C. Der komplette Reaktionsansatz konnte direkt für die erste Selektion eingesetzt werden.

Durch einen Restriktionsverdau des nicht mutierten DNA-Stranges erfolgte die Selektion zwischen den mutierten und *nicht*-mutierten komplementären Plasmid-Strängen. Zum Mutageneseansatz wurden 10 μ l des 10x konzentrierten OPA-Puffers hinzugefügt und mit ddH₂O auf ein Volumen von 48 μ l gebracht. Nach Zugabe von 2 μ l des benötigten Enzyms wurde der Reaktionsansatz für zwei bis vier Stunden bei 37°C inkubiert.

Zur Transformation in den reparaturdefizienten *E.coli* Stamm (NM522 mutS) wurden 20 µl des Restriktionsverdau eingesetzt. In einer Übernachtskultur bei 37°C im Schüttler (180 rpm) erfolgte die Vervielfältigung des mutierten Plasmids.

Durch Minipräparation konnte die gewonnene Plasmid-DNA einem zweiten Selektionsschritt zugeführt werden, um die restliche *nicht*-mutierte DNA zu eliminieren. Dazu wurde die unverdaute, zirkuläre, mutierte DNA erneut transfiziert (15 µl), diesmal jedoch in den *E.coli* Stamm DH5α. Nach Ausprägung der plasmidkodierten Ampicillinresistenz wurden 150 µl, 100 µl und 75 µl der Bakteriensuspension auf ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Einzelkolonien wurden gepickt und in einer 5 ml (LB-Amp-Medium) Übernachtskultur bei 37°C und 180 rpm im Schüttler angezogen. Die Bakteriensuspension wurde direkt für eine Minipräparation verwendet, um einen abschließenden Kontrollrestriktionsverdau vorzunehmen. Wurden die gesetzten Mutationen in die Plasmid-DNA integriert, wurden 250 ml LB-Amp-Medium mit 250 µl der Übernachtskultur über Nacht im Schüttler (37°C; 180 rpm) expandiert, um eine Maxipräparation durchzuführen.

- Mutagenese Kit: in-vitro Mutagenesis Reaction Kit (Pharmacia, Uppsala – Schweden)

5.2.2.10 Sequenzierung von DNA (Sanger et al., 1977)

Die klonierten C- und N-terminalen cDNA-Fragmente von p53 wurden nach dem »ABI PRISM Cycle Sequencing« Protokoll der Firma PE Applied Biosystems sequenziert. Damit können Sequenzen von bis zu 650 Nukleotiden gelesen werden. Zur Analyse kürzerer DNA-Fragmente wurde die Sanger-Technik zur enzymatischen DNA-Sequenzierung mit dem »2.0 DNA Sequencing Kit« der Firma Amersham/USB (Braunschweig) gewählt. Mit diesem Prinzip der Sequenzierung werden nach gelelektrophoretischer Auftrennung und direkter Exposition auf den Röntgenfilm Leseraten von nur 100 bis maximal 200 Nukleotiden erreicht.

5.2.2.10.1 Sequenzierung nach dem »ABI PRISM Cycle Sequencing« Protokoll

In einem 20 µl Gesamtansatz wurden jeweils 400 ng der entsprechenden Plasmid DNA, 2 µl »BigDye« Lösung, 6 µl »Half Term« Lösung und 15 pmol des entsprechenden Sequenzierprimers vermischt. Die Ansätze wurden anschließend in einem PCR-Thermocycler (Primus 96, MWG) mit folgendem Temperaturprogramm amplifiziert:

	Temperatur	Zeit
Denaturierung	96°C	10 sec.
Hybridisierung	52°C	5 sec.
Synthese	60°C	4 min.
Zyklen	25	

Tabelle 1: PCR-Syntheseprotokoll:

Danach wurde die DNA mit 80 µl 75%igem Isopropanol gefällt und nach 15 min. bei 14.000 rpm für 30 min präzipitiert. Das Sediment wurde mit weiteren 250 µl 75%igem Isopropanol gewaschen, erneut zentrifugiert, luftgetrocknet und zur Elektrophorese auf einem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer geladen.

5.2.2.10.2 Sequenzierung mit dem »2.0 DNA Sequencing Kit« der Firma Amersham

In der Sequenzierreaktion wird mit einer chemisch modifizierten T7-DNA-Polymerase radioaktiv-markierte, zur Matrize komplementäre DNA neu synthetisiert. Die Polymerase-Reaktion wurde in vier getrennten Reaktionen durchgeführt. Als Substrat wurden die vier in der DNA vorkommenden, radioaktiv-markierten 2`-Desoxy-Nukleosid-5`-Triphosphate (³⁵S-dNTPs) eingesetzt. Als weiteres Substrat wurde jedem Reaktionsansatz jeweils ein unterschiedliches 2`,3`-Dideoxy-Nukleosid-5`-Triphosphat (ddNTP) beigefügt. Der Einbau eines dieser Dideoxy-Nukleotide führt zum DNA-Syntheseabbruch, da die für die Kettenverlängerung benötigte 3`-Hydroxyl-Gruppe in den Dideoxy-Nukleotiden (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) fehlt. Auf diese Weise wird in jedem Reaktionsansatz die Synthese selektiv bei G, A, T, oder C terminiert.

Zur Denaturierung der DNA wurden 5 µg Plasmid-DNA in 32 µl TE-Puffer mit 8 µl 2M NaOH für 15 min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 7µl 3M Na-Acetat und 3 Vol. Ethanol für 2 bis 18 Std. bei -20°C neutralisiert und präzipitiert. Nach der Zentrifugation (20.000 x g) wurde das DNA-Sediment zweimal mit 70%igem reinem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 7 µl ddH₂O aufgenommen. Nach der Denaturierung wurde die DNA mit 2 µl 5x »Rxn«-Puffer und 1 µl Primer in einer Endkonzentration von 1 pmol/µl versetzt. Die Hybridisierung des Sequenz-Primers (i.v. i.M. SeqPr mu/Δc-tsp53) an die denaturierte DNA erfolgte durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 65°C für 2 min.. Nach anschließendem langsamem Abkühlen auf 30°C wurden die Proben auf Eis bis zu ihrer weiteren Verarbeitung gelagert. Für die daran anschließende

DNA-Kettenverlängerungsreaktion wurde zum Primer-DNA-Gemisch 1 µl DTT, 2 µl Labeling Mix und 0,5 µl α [³⁵S]dATP (5 µCi) hinzugefügt. Die 5-minütige Inkubation bei RT wurde durch die Zugabe von 2 µl T7-Polymerase gestartet. Je 3,5 µl aus jedem Reaktionsansatz wurden zu 2,5 µl der auf 37°C vorgewärmten vier Didesoxy-Nukleotide (A, C, G, T) gegeben und für weitere 5 min. bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl einer Stop-Lösung konnten die Reaktionsansätze bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert werden.

Die elektrophoretische Auftrennung der aus den Sequenzier-Reaktionen hervorgegangenen DNA-Fragmente erfolgte im denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoffgel der Größe 50 x 35 x 0,4 cm³. Die Gele enthielten 6% (w/v) Polyacrylamid (Gibco), 7M Harnstoff zur Denaturierung der DNA in 1x TBE-Puffer. Nach Lösen des Harnstoffs durch Erwärmen auf 60°C im Wasserbad wurde die Lösung über einen Faltenfilter gereinigt, um Verunreinigungen des Gels vorzubeugen. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 35µl TEMED und 45 mg Ammoniumperoxodisulfat zu 100 ml Gellösung initiiert. Vor dem luftblasenfreien Gießen wurden die Glasplatten sorgfältig mit Spülmittel und 70%igem Ethanol gereinigt und mit je 1 ml Repelsilan (2% (v/v) Dichlormethylsilan in 1,1,1-Trichlorethan) auf den Innenseiten silanisiert.

Das polymerisierte Gel wurde in die Sequenzkammer eingespannt und nach dem Befüllen mit 1x TBE als Laufpuffer erfolgte ein Vorlauf für 30 min. bei 90W. Die DNA-Proben wurden für 2 min. bei 80°C hitzedenaturiert und 5 µl aus jedem Reaktionsansatz direkt in die Taschen des Gels aufgetragen. Dauer der elektrophoretische Auftrennung betrug etwa 1,5 bis 2,5 Std.. Anschließend wurde das Gel auf Whatman-Papier übertragen und unter Vakuum bei 80°C für 60 min. getrocknet. Die Expositionszeit für die Autoradiographie betrug zwischen einem und fünf Tagen.

- TBE-Puffer: 89 mM Tris-Borat; 2 mM EDTA; pH 8,3 eingestellt.

5.2.3 Zellbiologische Methoden

5.2.3.1 *Transfektion von Expressionsvektoren in eukaryontische Zellen*

5.2.3.1.1 *Transiente Transfektion mit »SuperFect« Transfektions Reagenz (Qiagen)*

Das »SuperFect« Transfektions Reagenz ist ein käufliches polykationisches Lipidreagenz, welches die DNA in Liposomen einschließt und durch Endozytose über die Zellmembran aufgenommen wird.

Die zu transfizierenden Mammaliazellen wurden am Vorabend so ausgesät, dass sie am nächsten Tag in subkonfluenter Dichte vorlagen (5×10^5 Zellen pro 6cm-Gewebekulturschale je Ansatz). Die Inkubation über Nacht erfolgte bei 37°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre. 5 µg Vektor-DNA wurden in serum- und antibiotikafreiem Zellkulturmedium (DMEM) auf ein Volumen von 150 µl verdünnt. Anschließend wurden 30 µl des »SuperFect« Transfektions Reagenz hinzugegeben, vorsichtig gemischt und für 5 bis 10 min. bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationsphase wurde das Kulturmedium von den Platten abgesaugt und die Zellen zweimal mit je 4 ml sterilem PBS gewaschen. Zum Transfektionsansatz fügte man 1 ml serumhaltiges Kulturmedium zu und transferierte die Lösung auf die Zellen. Die Inkubation erfolgte für 2 bis 3 Std. bei 37°C in einer 5%igen CO₂-Atmosphäre. Abschließend wurde der Überstand des Mediums vorsichtig abgesaugt, die Zellen nochmals mit 4 ml sterilem PBS gewaschen und 5 ml frisches Kulturmedium mit Serum und Antibiotika hinzugegeben.

- PBS-Puffer: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄
- Transfektions Kit: Superfect Transfections Kit (Qiagen, Hilden)

5.2.3.1.2 *Stabile Transfektion durch Elektroporation*

Die stabile Transfektion der Mammaliazellen mit den p53-Konstrukten erfolgte mittels Elektroporation. Bei diesem Verfahren wird die Zellmembran der in Suspension vorliegenden Empfängerzellen durch kurze elektrische Pulse hoher Feldstärke für hochmolekulare Moleküle durchlässig gemacht. Für die stabile Transfektion wurden 7 bis 12 µg DNA, bei einer Doppeltransfektion 18 bis 21 µg DNA des zirkulären Expressionsvektors eingesetzt. Für Doppeltransfektionen wurden äquimolare Konzentrationen an Plasmid-DNA

eingesetzt, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass jeweils beide Expressionsvektoren auf die Zelle übertragen werden.

Die zu transfizierenden Zellen wurden am Tag zuvor in einer 10 cm Gewebekulturschale so ausgesät, dass sie am darauffolgenden Tag zu etwa 80% konfluent gewachsen waren. Die Zellen wurden mit 2 ml Trypsin/EDTA vom Kulturschalenboden abgelöst, mit frischem Zellkulturmedium gewaschen und in diesem mit einer Zelldichte von 1×10^7 Zellen/ml suspendiert. 400 μ l der Zellsuspension wurden in einer Elektroporationsküvette mit etwa 7 bis 12 μ g Plasmid-DNA vermischt, und einem elektrischen Puls von 260V und 1050 μ F ausgesetzt. Diese Parameter lieferten für die Subklone C6D8 und C6D10 der C6 Ratten-Gliomzellen den besten Transfektionserfolg bei niedrigster Mortalität (Baum et al., 1994). Die Zellen wurden unmittelbar nach der Transfektion in 10 ml frischem, antibiotikafreiem Zellkulturmedium aufgenommen und die Anzahl der überlebenden Zellen durch die Trypanblaufärbung bestimmt. Anschließend wurden 1×10^5 , 1×10^4 und 1×10^3 Zellen pro 10 cm Gewebekulturschale ausgesät und bei 39 °C kultiviert.

Durch den Kernfarbstoff Trypanblau, der durch die Plasmamembran in die Zellen eindringt und von lebenden Zellen aktiv durch Exozytose wieder ausgeschleust wird, ist eine Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen möglich. Die Zellkerne toter Zellen verfärben sich blau, während lebende Zellen nicht angefärbt werden. Die Färbung erfolgte durch Zugabe der 0,4%igen Trypanblaulösung (Gibco BRL, Berlin) zu den Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 2 bis 5 min. wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet.

5.2.3.2 Klonierung und Etablierung der stabil transfizierten Mammaliazellen

Die Selektion auf Neomycin begann 48 Stunden nach der Transfektion und wurde bei 39°C durchgeführt. Dem Kulturmedium wurde Geneticin (G418[®]) in einer Endkonzentration von 400 μ g/ml zugesetzt. Diese Konzentration erwies sich als günstig, um die nicht transfizierten C6D8 Zellen spezifisch abzutöten, ohne die transfizierten Zellen maßgeblich zu schädigen (Bohn et al., 1996; Etzrodt, 1996). Alle 2 bis 3 Tage wurde das Selektionsmedium erneuert. Unter diesem Selektionsdruck wurden die Zellen für 7 bis 14 Tage gehalten, bis alle nicht transfizierten Zellen abgestorben waren und auf dem Boden der Kulturschale einzelne Zellkolonien sichtbar wurden. Die gewachsenen Kolonien wurden mit Hilfe von Klonierungszyklindern (\varnothing 3-4 mm) mit je 100 μ l Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturschalen gelöst, in eine 24-Well-Gewebekulturplatte mit je 1 ml Zellkulturmedium überführt und als Subklon etabliert. Von erfolgreich transfizierten Klonen wurden Zellen als Referenz in flüssigem Stickstoff eingefroren.

5.2.3.3 Zytoplasmatische Extraktion

Auf Deckgläsern kultivierte Zellen wurden kurz in PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte 3 min. in Extraktionspuffer, wodurch der lösliche Anteil des Zytoplasmas herausgelöst wurde, das Zytoskelett mit assoziierten Proteinen aber erhalten blieb (Hartwig, 1992). Anschließend wurden die Deckgläser in physiologischem Puffer bzw. dem entsprechenden Extraktionspuffer ohne Detergenz für 5 min. gewaschen, um die Präparate von restlichen löslichen Zellbestandteilen und dem Detergenz zu befreien.

Die Zytoskelette wurden für 10 min. mit 1%igem Paraformaldehyd fixiert. Um freie Aldehydgruppen des Fixativs abzusättigen wurden die Proben anschließend für 10 min. mit 50 mM Glycin in PBS inkubiert.

- Extraktionspuffer: 80 mM PIPES, 130 mM NaOH, 4% PEG 6000, 1 mM MgCl₂, 4 mM EGTA, 0,5% Triton X-100 (Biorad, München), 1% Trasylol, 10 µg/ml Leupeptin, mit NaOH pH 6,8 eingestellt.
- Waschpuffer: 25 mM HEPES, 29 mM NaCl, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,96 mM NaHPO₄, 4 mM EGTA, 1% Trasylol, 10 µg/ml Leupeptin, mit NaOH pH 7,3 eingestellt.
- Extraktionspuffer (Niedrigsalzpuffer): 30 mM Tris, 4% PEG 6000, 1 mM MgCl₂, 4 mM EGTA, 0,5% Triton X-100, 1% Trasylol, 10µg/ml Leupeptin, 100 mM NaCl, mit HCl pH 7,0 eingestellt.

5.2.3.4 Immunfluoreszenzmarkierung

Zelluläre Proteine lassen sich mit fluorochrom-gekoppelten Antikörpern *in situ* markieren, um ihre strukturelle Anordnung in der Zelle zu analysieren (Wang und Beckner, 1992). Im ersten Schritt werden die Antigene mit dem antigen-spezifischen Antikörper inkubiert. Im zweiten Schritt wird mit einem Brückenantikörpern inkubiert, die speziesspezifisch gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers gerichtet ist. Die eigentliche Fluoreszenzmarkierung erfolgt anschließend mit einem Antikörper, die mit einem Fluorochrom konjugiert ist und aus der gleichen Spezies stammt wie der primäre Antikörper. Das Fluorochrom wird im Fluoreszenzmikroskop mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, um so das markierte Antigen nachzuweisen.

Eine Vorinkubation der fixierten Zellen für 20-30 min. (1:100 verdünnt) aus der gleichen Spezies wie der fluoreszenzmarkierte Antikörper diente zur Unterdrückung einer unspezifischen Reaktion desselben.

Die Zellen wurden nach kurzem Spülen in PBS in eiskaltem Azeton bzw. nach Membranextraktion in Paraformaldehyd für mind. 20 min. bzw. 10 min. (s.o. 5.2.3.3) fixiert. Die fixierten Zellen wurden mit normalem Serum der gleichen Spezies wie der primäre Antikörper inkubiert, um unspezifische Bindungen zu unterdrücken. Die Zellen wurden dann

45 min. mit dem primären und anschließend jeweils 20 min. mit dem Brückenantikörper und dem markierten Antikörper bei RT inkubiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Proben für jeweils 20 min. in PBS gewaschen.

Die Zellen wurden auf Objektträgern in einem Tropfen Mounting-Medium eingebettet. Die Präparate konnten dann unter dem Fluoreszenzmikroskop mit der dem Fluorochrom entsprechenden Anregungswellenlänge ausgewertet werden.

Primärer Antikörper	Bezeichnung	eingesetzte Verdünnung
Maus IgG α p53	pAb 248	1:200
Maus IgG α p53	pAb 421	1:1000
Maus IgG α p53	pAb 240	1:100
Brückenantikörper		
Kaninchen α Maus IgG		1:500
Markierte Antikörper		
Ziege α Kaninchen IgG FITC		1:100
Esel α Maus IgG TR		1:200

Tabelle 2: Verwendung der Antikörper für Immunfluoreszenz-Detektion

- Mounting-Medium: 5% Polyvinylalkohol (25/140), 10% Glycerin in PBS, autoklaviert und steril filtriert.

5.2.4 Proteinbiochemische Methoden

5.2.4.1 Herstellung der Protein-Rohlysate

Die Zellen einer subkonfluent bewachsenen 10 cm Gewebekulturschale wurden vom Medium befreit und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in 200 μ l SDS-Probenpuffer von der Kulturschalen abgeschabt und durch Ultraschall homogenisiert. Die Proben wurden bis zu ihrer Verwendung bei -20°C eingefroren.

- SDS-Probenpuffer: 60 mM Tris/HCl pH 6,8, 2% SDS, 25% (v/v) Glycerol, 10% (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,1% (v/w) Bromphenolblau.

5.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

5.2.4.2.1 Absorption bei 280 nm (Peterson, 1983)

Zur schnellen Ermittlung des Proteingehaltes wurde die Absorption bei 280 nm gemessen. Näherungsweise entspricht eine OD₂₈₀ von 1 einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml.

5.2.4.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976)

Proteinlösungen, die keine Detergentien enthielten, wurden mit der Methode nach Bradford quantifiziert. Diese Methode basiert auf der Reaktion von Coomassie® brilliant blue G-250 mit Proteinen zu einem blauen, anionischen Farbstoff und der daraus resultierenden Veränderung im Absorptionsmaximum. Dabei bleibt der Extinktionskoeffizient bis zum Erreichen des Sättigungsbereiches bei einem linearen Anstieg über einen großen Konzentrationsbereich konstant. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe wurde eine Eichkurve erstellt. 10 µl der zu quantifizierenden Proteinlösung wurde mit Wasser auf 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Farbreagenzlösung durchmischt. Nach 10 min. Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen und die Konzentration an der erstellten Eichkurve abgelesen.

5.2.4.2.3 Proteinbestimmung mit »Bicinchoninic Acid Reagent« (Smith et al., 1985)

Verwendet wurde dazu der BCA-Protein Assay Kit der Firma Pierce Chemical Company. Zunächst wurde eine ausreichende Menge an Reaktionslösung aus 50 Volumen Lösung A und 1 Volumen Lösung B frisch angesetzt. Das Gesamtvolumen errechnete sich durch die Anzahl der Proben zuzüglich Eichreihe und Leerwert x 200 µl.

Anschließend wurden je 10 µl der zu messenden Probe, sowie die Ansätze der Eichreihe, in eine Küvette gegeben und mit jeweils 400 µl der Reaktionslösung vermischt. Die mit Parafilm überzogenen Küvetten wurden 30 min. bei 37°C inkubiert. Das BCA-Reagenz bildete in Anwesenheit von Protein einen violetten Farbkomplex, dessen Intensität proportional zum Proteingehalt der Probe ist. Nach dem Abkühlen der Proben auf RT wurde die Absorption photometrisch bei 562 nm bestimmt und die erhaltenen Probenwerte mit denen der Eichreihe abgeglichen.

- BCA-Arbeitslösung: 2% Lösung B in Lösung A
- BCA-Lösung A: BCA und Natriumtetrat in basischem Carbonatpuffer (Pierce, Rockford – USA)
- BCA-Lösung B: 4% CuSO₄ (Pierce, Rockford – USA)

5.2.4.3 Angleichen der Proteinkonzentration in den Zellysaten

Um Proben untereinander vergleichen zu können, wurden die Extrakte mit Probenpuffer auf gleichen Proteingehalt pro Volumeneinheit eingestellt.

5.2.4.4 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

Proteine wurden in einer diskontinuierlichen Elektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel in SDS-Probenpuffer für 5 min. auf 95°C erhitzt. Dadurch kommt es zu einer vollständigen Denaturierung der Proteine und, durch Bindung von SDS an die Proteine zu einer gleichmäßigen Ladungsverteilung. Die Proteine bewegen sich deshalb weitgehend unabhängig von ihrer Aminosäuresequenz. Für die SDS-Page wurde das Gelsystem von Laemmli mit Gelen der Größe 80 x 80x 0,5 mm benutzt.

Das verwendete Gelsystem besteht aus einem Trenngel, welches mit einem 4%igen Sammelgel überschichtet ist. Vor dem Gießen der Gele wurden 0,75% einer 10%igen wässrigen Lösung von Ammoniumpersulfat (APS) und 0,05% TEMED hinzugefügt, wodurch die Gele innerhalb von 30 min. voll auspolymerisierten. Im großporigen Sammelgel, dessen pH-Wert zwei Einheiten niedriger war als der des Trenngels, kam es an der Trennschicht zwischen beiden Gelen zu einer Fokussierung der Proteine. Im höherprozentigen Trenngel erfolgte anschließend die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht in verschiedene Banden.

- Trenngel: 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 8-12,5% Acrylamid-Stammlösung; 0,1% SDS; 0,05% TEMED (Sigma, München); 0,075% Ammoniumpersulfat
- Sammelgel: 125 mM Tris/HCl pH 6,8; 4% Acrylamid; 0,1% SDS; 0,2% TEMED; 0,1% Ammoniumpersulfat
- Acrylamid-Stammlösung: 30% Acrylamid / Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1 (National Diagnostics, Atlanta – USA)
- Elektrophorese-Puffer: 25 mM Tris-Base, 200mM Glycin, 1% (w/v) SDS
- Proteinstandard: SDS7B (Sigma, München)

5.2.4.5 Western Blot und Antikörper-Detektion von transferierten Proteinen

Der Transfer von Proteinen erfolgte in einer BioRad Nassblotapparatur (BioRad). Die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine PVDF- (Immobilon-P, Millipore) oder eine Nitrozellulose-Membran (Hybond-C-Super, 0,45 µm; Amersham Buchler KG) erfolgte elektrophoretisch (Towbin et al., 1979).

Kurz vor dem Ende des Gellaufs wurden jeweils 6 auf die entsprechende Gelgröße zurechtgeschnittene Whatman-Papiere in Transferpuffer äquilibriert. Die ebenfalls zurechtgeschnittene PVDF-Membran wurde kurz in Methanol aktiviert, 5 min. in ddH₂O gewaschen und ebenfalls im Transferpuffer äquilibriert. Nach dem Gellauf wurde das Gel auf einen vorbereiteten Stapel aus einem Pufferkissen, 3 Lagen Whatman-Papier und der Membran gelegt. Darauf wurden wiederum 3 Lagen Whatman-Papier und ein Pufferkissen gelegt. Dieses »Sandwich« wurde mit der Membranseite zur Kathode in der Blotapparatur fixiert und die Proteine 60 bis 90 min. bei konstant 60V auf die Membran transferiert. Wurde für den Proteintransfer eine Nitrozellulose-Membran verwendet, konnte der Erfolg der Proteinübertragung durch die Amidoschwarz-Färbung kontrolliert werden. Hierzu wurde die Membran in etwa 200 ml H₂O eingetaucht und anschließend noch 500 µl Amidoschwarz-Färbelösung hinzugegeben.

Vor der Immundetektion von Proteinen auf der Membran (Burnette, 1981) wurde diese dreimal für 10 min. in TBS-Tween Puffer geschwenkt, um das Amidoschwarz auszuwaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran anschließend für 30 min. bei RT oder bei 4°C über Nacht in TBS-Tween-Puffer mit 2% BSA inkubiert.

Der Nachweis der Proteine erfolgte mit monoklonalen bzw. affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörpern (siehe Tab. 3), wobei das Peroxidase-anti-Peroxidase-(PAP)-Verfahren angewandt wurde (Bratthauer, 1999). Dieses führt zu einer erhöhten Sensitivität und Spezifität der Markierung, da Kreuzreaktionen des Peroxidase-gekoppelten Antikörpers vermieden werden. Hierzu wurde die Membran nach der Inkubation des primären Antikörpers mit einem Brückenantikörper inkubiert, der gegen den primären Antikörper gerichtet war. In einem dritten Markierungsschritt wurden Antikörper eingesetzt, die aus der selben Spezies wie die primären Antikörper stammten, und so von freien Bindungsstellen des Brückenantikörpers gebunden werden konnten. Diese Antikörper waren spezifisch gegen Peroxidase gerichtet und mit dieser als Antigen-Antikörper-Komplex assoziiert und abgesättigt.

Für die Markierung wurden die Antikörper in 10ml TBS-Tween-Puffer verdünnt und die Membran in den Antikörperlösungen geschwenkt. Die primären Antikörper wurden mit 2% BSA über Nacht, die Brückenantikörper für 45 min. und die Peroxidase-gekoppelten Antikörper für 30 min. mit der Membran inkubiert. Nach jedem Markierungsschritt wurde die Membran dreimal für 10 min. in 20 ml TBS-Tween gewaschen.

Die gekoppelte Peroxidase war in der Lage, den Farbstoff Luminol zu oxidieren, so dass über eine Chemolumineszenz-Reaktion Photonen abgegeben wurden, die zur Schwärzung

eines auf die Membran aufgelegten Röntgenfilms führten und damit die Protein-Banden sichtbar machten. Die Membran schwenkte man dafür 1 min. in ECL-Reagenz (Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:1) und exponierte sie anschließend gegen einen Röntgenfilm. Die Expositionszeiten lagen je nach Intensität der Chemolumineszenz zwischen 20 sek. und 5 min..

Primäre Antikörper	Bezeichnung	eingesetzte Verdünnung
Maus IgG α p53	pAb248	1:500
Maus IgG α p53	pAb242	1:200
Maus IgG α p53	pAb240	1:500
Maus IgG α p53	pAb421	1:10.000
Maus IgG α p21	SX118 (Santa Cruz)	1:100
Maus IgG α mdm2	PAb2A10	1:30
Brückenantikörper		
Kaninchen IgG α Maus IgG		1:500
Peroxidaseantikörper		
Maus IgG α Peroxidase		1:20.000

Tabelle 3: Verwendung der Antikörper für Immuno-Westernblots

- Transferpuffer Naßblott: 0,1% (w/v) SDS, 20% (v/v) Isopropanol, 20mM Tris-Acetat pH 8,3.
- Amidoschwarz-Färbelösung: 50% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,1% Amidoschwarz
- 10x TBS: 0,2 M Tris-Base, 1,37 M NaCl.
- TBS-Tween: 10% (v/v) 10x TBS, 0,01% (v/v) Tween, mit HCl pH 7,6.
- Blockierungspuffer: *TBS-Tween*, 2% *BSA*.
- ECL-Lösung A: 2,5 mM Luminol, 0,4 mM Paracumarsäure, 100 mM Tris / HCl pH 8,5.
- ECL-Lösung B: 30 µl H₂O₂, 100 mM Tris / HCl pH 8,5.
- Röntgenfilm: Kodak XOMAT (Sigma, München)

6 Ergebnisse

6.1 Herstellung von tsp53 Mutanten

Ziel der Arbeit war es, Domänen von p53 zu identifizieren, die für die zytoplasmatische Verankerung des Proteins essentiell sind. Dazu sollten bestimmte Sequenzabschnitte der temperatursensitiven Mutante tsp53^{Val 135} deletiert oder einzelne AS in regulatorischen Domänen ausgeschaltet werden. Die Bedeutung des jeweils betroffenen Bereichs für die zytoplasmatische Verankerung sollte anhand der subzellulären Lokalisation des mutierten Tumorsuppressors erfasst werden. In diese Studien sollten sowohl der Carboxyterminus als auch der Aminoterminus einbezogen werden.

6.1.1 Herstellung carboxyterminaler Deletionsmutanten von tsp53

Durch Einfügen eines Stopcodons sollten zwei carboxyterminale Deletionsmutanten generiert werden:

1. eine Mutante mit Verlust der C-terminalen regulatorischen Domäne, die etwa 30 AS umfasst; dieser Mutante fehlt auch der Serinrest 382, der von der PKC phosphoryliert wird und darüber die Funktion der zentralen, DNA-bindenden Domäne beeinflusst,
2. eine Mutante, der der gesamte Carboxyterminus fehlt; dadurch werden alle funktionellen Domänen des C-Terminus, und zwar die Kernimport- und Kernexportsignale, sowie die Oligomerisierungsdomäne, eliminiert.

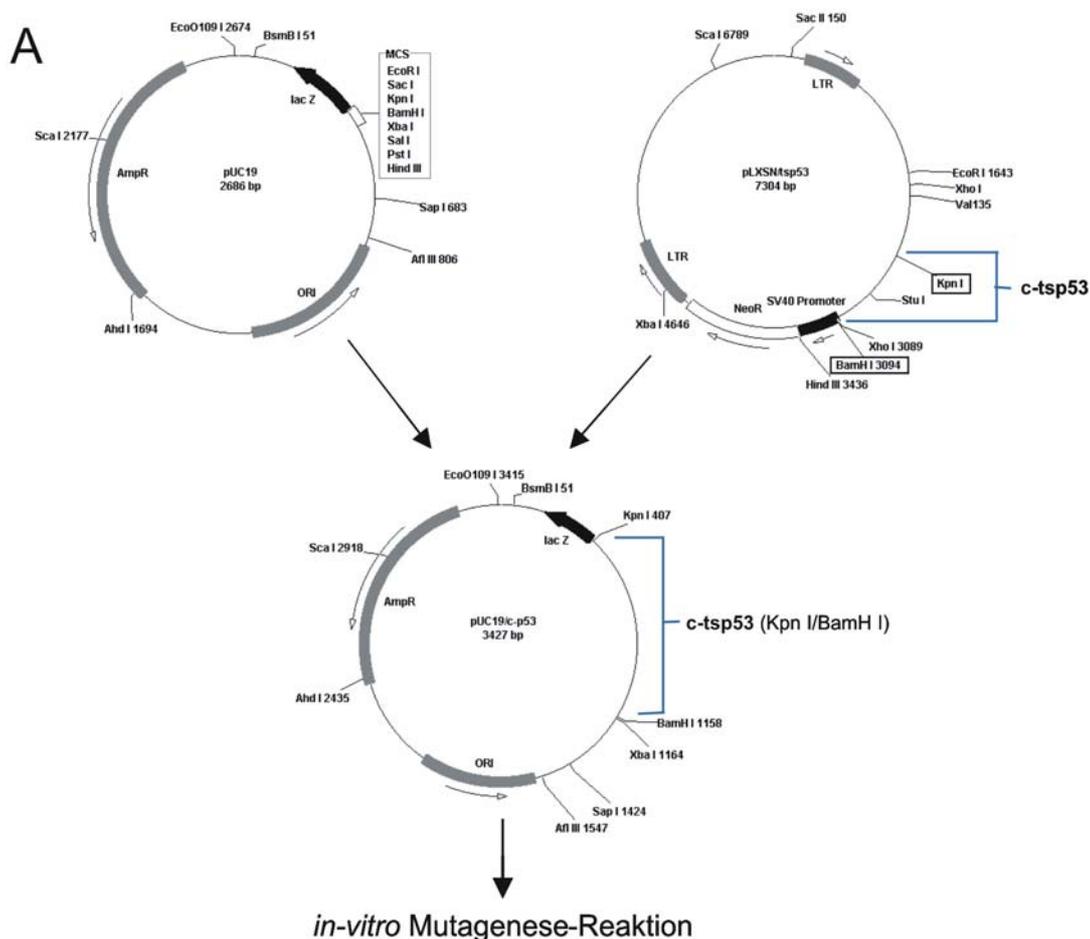
Beide Mutanten sollten durch *in-vitro* Mutagenese hergestellt werden, indem die Codons für die Aminosäure (AS) 308 bzw. AS 357 in Stop-Codons umgewandelt werden.

Zunächst wurde der Anteil der tsp53 cDNA, der für den carboxyterminalen Bereich von AS 237 bis AS 390 kodiert, aus dem Expressionsvektor pLXSN/RS-tsp53¹ über einen Restriktionsverdau (Kpn1 / BamH1) ausgeschnitten, über ein Agarosegel aufgereinigt, eluiert und in den Vektor pUC19 kloniert (siehe Abb. 4A). Über einen Kontrollverdau mit Kpn1 und Xba1 wurde die Integration des cDNA-Fragmentes (Δ c-tsp53) in pUC19 überprüft. Die rechnerisch ermittelten Fragmentgrößen für die verschiedenen Banden der

¹ Der Expressionsvektor pLXSN/RS-tsp53 wurde freundlicherweise von Fr. Prof. Dr. Varda Rotter (Weizmann Institute of Science, Rohovot, Isreal) zur Verfügung gestellt.

einzelnen Spuren stimmten mit den entsprechenden Bandenhöhen im Agarosegel überein (siehe Abb. 4B). Dies bestätigte den Erfolg der Klonierung. In Spur 1 sieht man als untere Bande das aus dem pUC19-Vektor ausgeschnittene p53-cDNA-Fragment aus dem 3'-Bereich (735bp). Die darüber laufende Bande, etwa bei 2,7kb, entspricht dem pUC19-Vektor ohne das tsp53-cDNA Fragment (siehe Abb. 4; vgl. Spur 1 und 3). In Spur 2 wurde der linearisierte pUC19/ Δ c-tsp53-Vektor aufgetragen, der auf einer Höhe von etwa 3,4kb läuft (siehe Abb. 4B Spur 2).

Durch die beiden entsprechenden Mutationsprimer sowie dem Selektionsprimer wurden die gewünschten Mutationen in die Plasmid-DNA von pUC19/ Δ c-tsp53 eingeführt. Während der Selektionsprimer die auf pUC19 lokalisierte Restriktionsstelle ScaI in die Restriktionsschnittstelle MluI überführte, fügte der Mutationsprimer den gewünschten Basenaustausch auf dem einklonierten cDNA-Abschnitt von tsp53 ein und generierte so ein Stop-Codon. Über spezifische Restriktionsenzyme wurde in aufeinanderfolgenden Selektionsschritten die mutierte Plasmid-DNA aufgereinigt und isoliert.



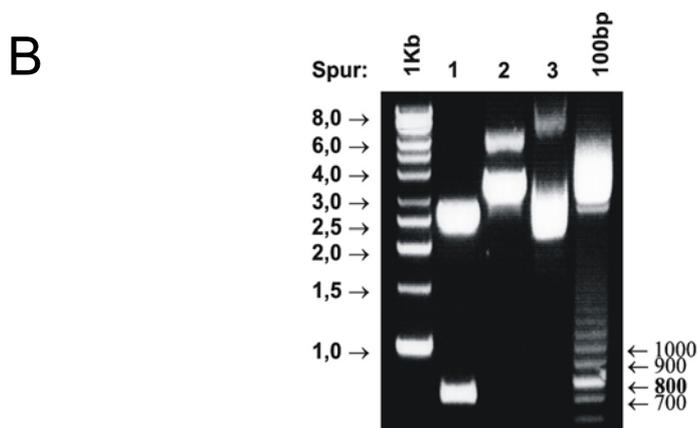


Abbildung 4: (A; Seite 53) Klonierungsstrategie für die Herstellung der *tsp53*-Konstrukte durch die *in-vitro* Mutagenese. Aus dem Vektor pLXSN/*tsp53* wurde über einen Endonukleaseverdau mit KpnI und BamHI der Carboxyterminus von *tsp53* ausgeschnitten und das aufgereinigte Fragment in den Vektor pUC19 nach Linearisierung mit den gleichen Endonukleasen einkloniert. **(B)** Kontrolle der Integration des carboxyterminalen *tsp53*-Fragmentes in den pUC19-Vektor. Jeder Restriktionsansatz enthielt 1µg Plasmid-DNA. Als Kontrolle wurden 0,5µg eines 1kb Markers und eines 100bp Markers auf das Gel aufgetragen. **Spur 1** zeigt pUC19/ Δ -*tsp53* nach dem Verdau mit Kpn1 und Xba1, das ausgeschnittene carboxyterminale *tsp53*-Fragment (735bp) und den linearisierten pUC19-Vektor (2,0kb). In **Spur 2** wurde als Kontrolle der linearisierte pUC19/ Δ -*tsp53* Vektor auf das Gel aufgetragen (3,4kb) und in **Spur 3** der leere linearisierte pUC19-Expressionsvektor.

Der Erfolg der *in-vitro* Mutagenese wurde durch einen Restriktionsverdau der Plasmide überprüft (siehe Abb. 5A+B). Hierbei wird ausgenutzt, dass das Enzym MluI die Plasmid-DNA nur schneiden kann, wenn die durch den Selektionsprimer erzeugte Punktmutation innerhalb der Restriktionsschnittstelle auf dem Expressionsvektor pUC19 integriert ist. Gleichzeitig geht dabei die ScaI Enzymschnittstelle verloren. Im Endonukleaseverdau mit ScaI und/oder MluI kann somit differenziert werden, welcher Klon die Mutation der Enzymschnittstelle durch den Selektionsprimer in seine Plasmid-DNA integriert hat. Wie aus Abbildung 5 ersichtlich ist, war in den Klonen 1 bis 4 das Stopcodon an Aminosäureposition 308 erfolgreich eingeführt worden, da ScaI die Plasmid-DNA nicht schneiden konnte (siehe Abb. 5A/a). Die Plasmid-DNA pUC19/ Δ -*tsp53* der Klone 1 bis 4 zeigte im Agarosegel die gleiche Laufhöhe wie die ungeschnittene Plasmid-DNA. Die Veränderung der Restriktionsstelle lieferte somit einen Hinweis dafür, dass die gewünschte Mutation auf dem einklonierten *tsp53*-cDNA Fragment etabliert worden war. Die nachfolgende Sequenzierung ergab, dass die Plasmid-DNA von Klon 1, nicht aber von Klon 2 das gewünschte Stopcodon enthielt.

Für die Einführung des Stopcodons an Aminosäureposition 357 in die Plasmid-DNA pUC19/ Δ -*tsp53* wurde in gleicher Weise vorgegangen wie für das Einbringen des Stopcodons an Aminosäureposition 308. Auch hier zeigte nur ein Teil der Klone die für die Selektion erforderliche MluI-Restriktionsstelle (Abb. 5B/a Klone 5 bis 7). Der gewünschte Basenaustausch an Aminosäureposition 357 konnte in Klon Nummer 5, nicht aber in Klon

Nummer 8 nachgewiesen werden. In letzterem war an der entsprechenden Position die Sequenz für Wildtyp53 (wt-p53) vorhanden (siehe Abb. 5B/b).

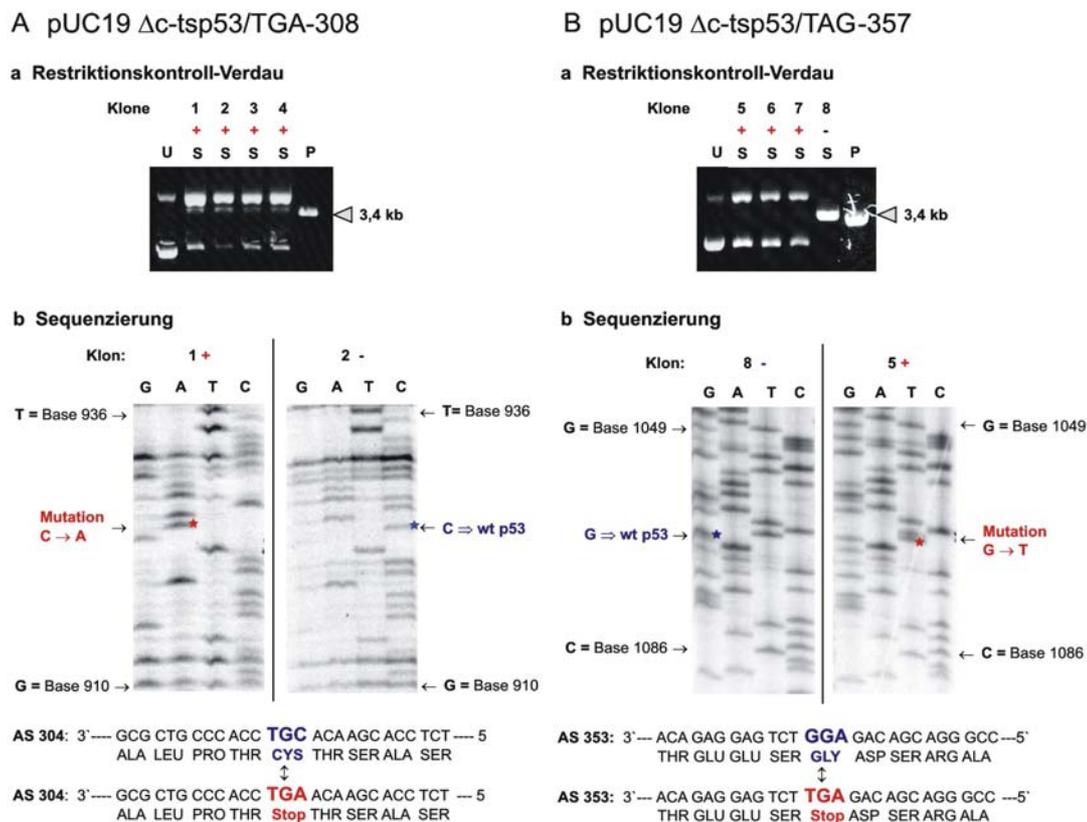


Abbildung 5: Kontrolle der *in-vitro* Mutagenese der carboxyterminalen Mutanten pUC19 Δ c-tsp53/TGA-308 und pUC19 Δ c-tsp53/TGA-357. Die Abbildungen **A** und **B** zeigen die carboxyterminalen Deletionsmutanten von tsp53. Die Integration der Mutationen in die Plasmid-DNA wurde über einen Restriktionsendonukleaseverdau **a**, sowie durch Sequenzierung des mutierten tsp53-Fragmentes überprüft **b**. Für den Restriktionsverdau wurden ca. 0,5 μ g Plasmid-DNA eingesetzt und mit Sca1 (**S**) geschnitten. Positive Klone sind mit einem roten Pluszeichen (+), negative Klone mit einem blauen Minuszeichen (-) markiert. Die jeweils mit U und P bezeichneten Spuren zeigen pUC19/ Δ c-tsp53 in linearisierter (**P**) sowie in ungeschnittener Form (**U**). Durch die *in-vitro* Mutagenese wurde die Erkennungssequenz durch den Selektionsprimer von Sca1 in eine Mlu1 Schnittstelle konvertiert, d.h. positive Klone liegen nach einem Restriktionsverdau mit Sca1 in ungeschnittener, nach einem Restriktionsverdau mit Mlu1 (3,4kb) in linearisierter Form vor. In den Abbildungen b sind die zu den sequenzierten Klonen zugehörigen Sequenzgele und der entsprechende Sequenzabschnitt dargestellt. Über den Sequenzgelen stehen die jeweiligen Klonnummern sowie die Reihenfolge der aufgetragenen Nukleotide (G = Guanin; A = Adenin; T = Thymin; C = Cytosin): Die im Sequenzgel mit einem blauen Stern (\star) gekennzeichnete Base steht für die ursprüngliche, die mit einem roten Stern gekennzeichnete (\star) für die neu eingeführte Base.

6.1.2 Etablierung einer carboxyterminalen Punktmutation in AS 312 von tsp53

Die Punktmutante von tsp53, die die Bezeichnung P_{mut}312ala erhielt, wurde ebenfalls über *in-vitro* Mutagenese generiert. In dieser tsp53-Mutante wurde durch einen

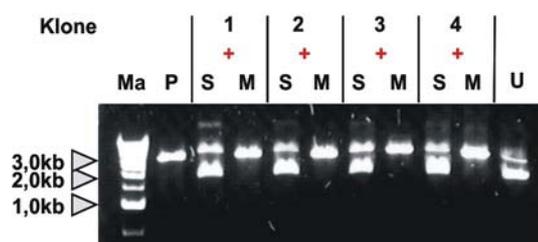
Nukleotidaustausch an der Base 937 die Aminosäure Serin an Position 312 gegen Alanin ausgetauscht. Somit wurde eine potentielle Phosphorylierungsstelle in der carboxyterminalen Linkerregion von p53 eliminiert.

In gleicher Weise wie in Kapitel 6.1.1 beschrieben, wurde der Erfolg der *in-vitro* Mutagenese über Restriktionsverdau und Sequenzierungen kontrolliert, um die Integration der gewünschten Punktmutation zu überprüfen. Alle vier der in Abbildung 6 gezeigten Klone mit dem Expressionvektor pUC19/ Δ c-tsp53 konnten nach der Mutagenese mit dem Restriktionsenzym Mlu1 linearisiert werden. Sca1 konnte hingegen die entsprechende Plasmid-DNA nicht schneiden. Im Agarosegel konnte nach dem Restriktionsverdau mit Mlu1 eine Bande auf einer Höhe von 3,4kb nachgewiesen werden, welche der Laufhöhe von linearisierter Plasmid-DNA pUC19/ Δ c-tsp53 entsprach (siehe Abb. 6A, Spuren M und P). Die Restriktionsanalyse mit Sca1 bestätigte, dass die gewünschte Punktmutation durch den Selektionsprimer auf der Plasmid-DNA integriert war, da diese Endonuklease die Plasmid-DNA nicht linearisieren konnte und im Agarosegel als ungeschnittene Plasmid-DNA nachweisbar war (siehe Abb. 6A Spuren S und U). Die Sequenzierung von Klon 3 bestätigte schließlich den Basenaustausch in Codon 937 von tsp53, der auf Proteinebene einen Wechsel von Serin nach Alanin zur Folge hat (siehe Abb. 6B).

Für die weitere Etablierung der carboxyterminalen tsp53 Mutanten, wurde aus jeweils einem der positiven Klone die entsprechend mutierte cDNA aus pUC19/ Δ c-tsp53 durch einen Restriktionsverdau mit Kpn1 und Xba1 ausgeschnitten, aufgereinigt und anschließend aus dem Agarosegel eluiert. Das cDNA-Fragment wies eine Größe von ca. 740kb auf (Daten nicht gezeigt).

pUC19 tsp53/ Δ c-P_{mut}312ala

A Restriktionskontrollverdau



B Sequenzierung

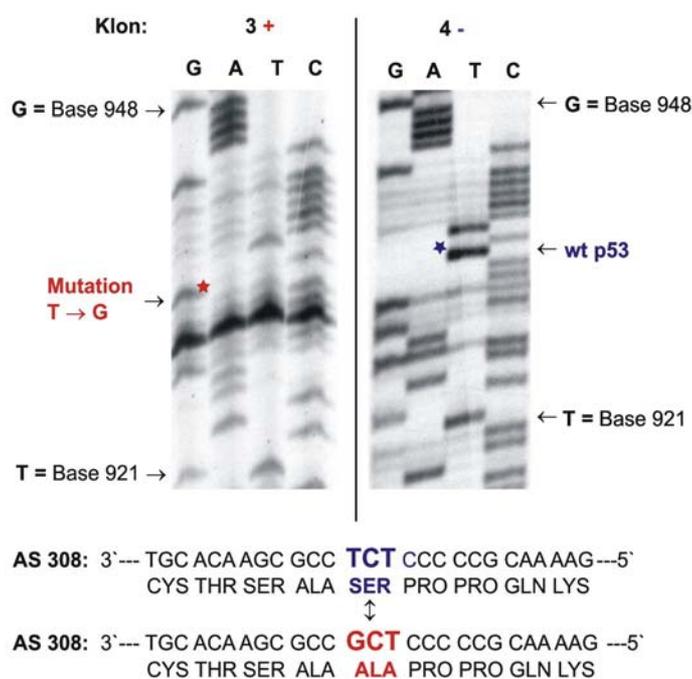


Abbildung 6: Selektionsanalysen und Sequenzierungskontrollen der carboxyterminalen Punktmutante pUC19 tsp53/ Δ c-P_{mut}312ala. Die Selektion positiver Klone für die veränderte Restriktionsschnittstelle wurde über einen Restriktionsendonukleaseverdau mit Mlu1 und Sca1 überprüft. Positive Klone für die veränderte Restriktionsstelle sind in der Abbildung **A** mit einem roten Pluszeichen gekennzeichnet. Für den Restriktionsansatz wurden ca. 0,5 μ g Plasmid-DNA eingesetzt und mit Sca1 (S) und Mlu1 (M) geschnitten. Die mit **U** und **P** bezeichneten Spuren zeigen pUC19/ Δ c-tsp53 in linearisierter (**P**) sowie in ungeschnittener (**U**) Form. Zur Größenkontrolle der ausgeschnittenen Fragmente wurden 0,5 μ g eines 1kb Markers (**MA**) aufgetragen. In Abbildung **B** sind Sequenzgels von Klonen abgebildet, die für den Selektionsprimer positiv waren. Über den Sequenzgelausschnitt ist die Nummer des jeweils sequenzierten Klons, sowie die Reihenfolge der aufgetragenen Nukleotide dargestellt. (G = Guanin; A = Adenin; T = Thymin; C = Cytosin). Rechts und links vom Sequenzausschnitt sind die entsprechenden Basennummern von p53 angegeben. Ein blauer Stern (\star) kennzeichnet die Wildtypbase in p53, ein roter Stern (\star) kennzeichnet die neu eingeführte Base in der mutierten DNA.

6.1.3 Klonierungsstrategie zur Herstellung von eukaryontischen Expressionsvektoren für carboxyterminal mutiertes *tsp53*

Die durch *in-vitro* Mutagenese hergestellten cDNAs von *tsp53* wurden in einer 3-fach Ligation in den eukaryontischen Expressionsvektor pCI-neo einkloniert. Dazu wurde der Expressionsvektor mit EcoR1 und Xba1 linearisiert. Es ist bekannt, dass die *tsp53*-Expression von Vektoren mit chimärer p53 DNA, welche also die Intronsequenzen enthält, stabiler ist. Deshalb wurde für die Klonierung der Expressionsvektor pLTRcG9-*tsp53* verwendet, der eine chimäre *tsp53* Sequenz enthält. Aus diesem wurde ein DNA Fragment durch Restriktionsenzymverdau mit EcoR1 und Kpn1 isoliert, welches die Intronsequenzen 2 bis 5 enthielt (siehe Abb. 7). Dieses chimäre DNA-Fragment wies eine Fragmentgröße von etwa 1,9kb auf. Für die 3-fach Ligation wurden die einzelnen *tsp53* Fragmente, das nicht mutierte DNA Fragment aus dem 5'-Bereich und das mutierte aus dem 3'-Bereich, in äquimolarem Mengen der linearisierten Vektor-DNA von pCI-neo zugesetzt.

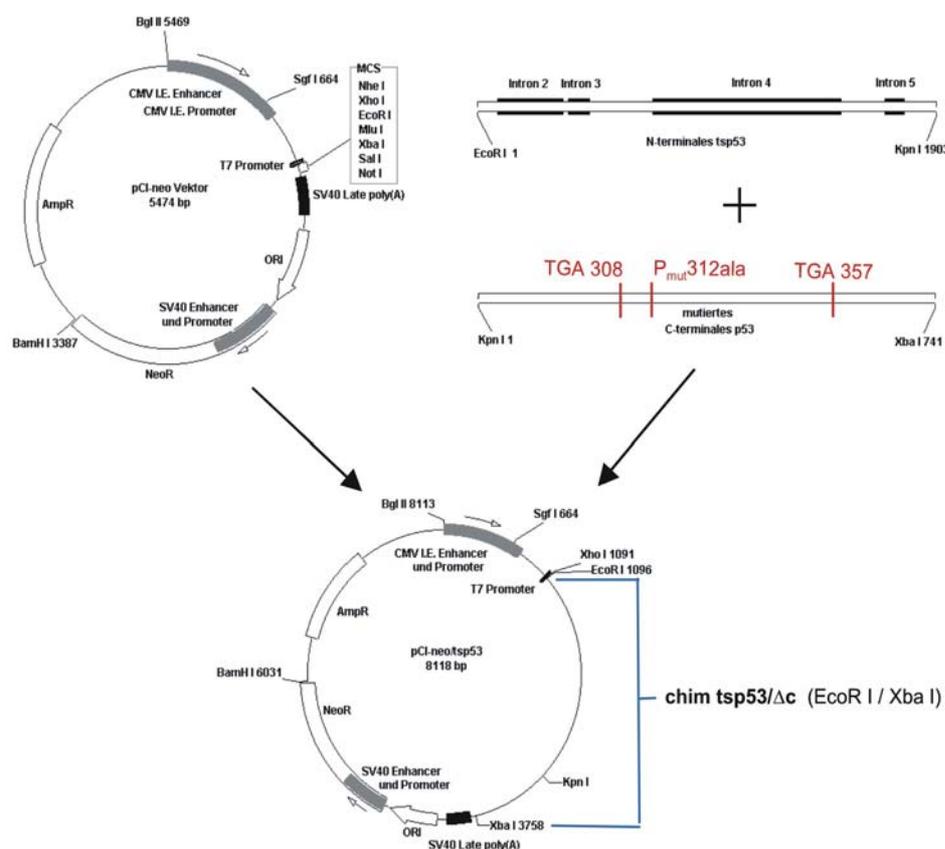


Abbildung 7: Klonierungsstrategie für die Herstellung von eukaryontischen Expressionsvektoren, die für ein carboxyterminal mutiertes *tsp53* kodieren. Die in der Abbildung dargestellten 5' und 3' gelegenen *tsp53*-DNA-Fragmente (rechts oben), stammen zum einen aus der *in-vitro* Mutagenese (Carboxyterminus) zum anderen aus dem pLTRcG9-*tsp53* Vektor (Aminoterminal). Das 3' gelegene Fragment wurde mit Kpn1 und Xba1 aus dem Vektor pLTRcG9-*tsp53* ausgeschnitten; das 5' gelegene Fragment wurde über EcoR1 und Kpn1 aus diesem Vektor (pUC19/c-p53) ausgeschnitten und mutiert. Der pCI-neo Expressionsvektor wurde zur Vorbereitung der Klonierung mit EcoR1 und Xba1 linearisiert. Durch eine Dreifachligation wurden die *tsp53* Fragmente in den Vektor einkloniert.

Im folgendem Restriktionsverdau wurde überprüft, ob die DNA Fragmente in der richtigen Reihenfolge und Anordnung in den pCI-neo Vektor integriert wurden. Eine erfolgreiche Integration sollte nach dem Restriktionsverdau zu einem spezifischen Bandenmuster im Agarosegel führen. Die zu erwartenden und errechneten Banden sind in der Tabelle 4 aufgeführt.

Enzym	Anzahl der Fragmente	Größe der einzelnen Fragmente	Gesamtgröße des Vektors
EcoR1	2	2,6 und 5,5kb	8,1kb
Xho1	2	2,6 und 5,5kb	8,1kb
Kpn1	3	0,7, 1,9 und 5,5kb	8,1kb
Xba1	1	linearisiert	8,1kb

Tabelle 4: In der dargestellten Tabelle sind die Anzahl sowie die jeweiligen Größen der einzelnen Fragmente aufgeführt, wie sie bei regelrechter Integration und Anordnung im Agarosegel nachzuweisen sein sollten. Für die Restriktionsanalysen wurde jeweils 1µg der entsprechenden tsp53-Form eingesetzt und mit den folgenden Enzymen verdaut: **EcoR1**, **Xba1**, **Kpn1**, und **Xho1**.

Für tsp53 „Voller-Länge“ konnte eine erfolgreiche Umklonierung in den Vektor pCI-neo nachgewiesen werden (siehe Abb. 8A). Alle untersuchten Klone zeigten nach der Restriktion mit EcoR1 und Xba1 die erwarteten bzw. errechneten Banden im Agarosegel (vgl. Tab. 4). Für die mutierten tsp53 DNAs konnte für die unterschiedlichen Formen jeweils mindestens ein Klon identifiziert werden, der die gewünschten Fragmente in der richtigen Reihenfolge enthielt (siehe Abb. 8B Klon 1; 8C Klon 3 und 8D Klon 1). Die restlichen Klone hatten die jeweiligen Fragmente entweder nicht in den Vektor integriert (siehe Abb. 8B Klon 2 bis 4; 8C Klon 1,2 und 4) oder wiesen nach der Restriktion eine falsche Laufhöhe im Agarosegel auf (siehe Abb. 8D Klon 2 bis 4).

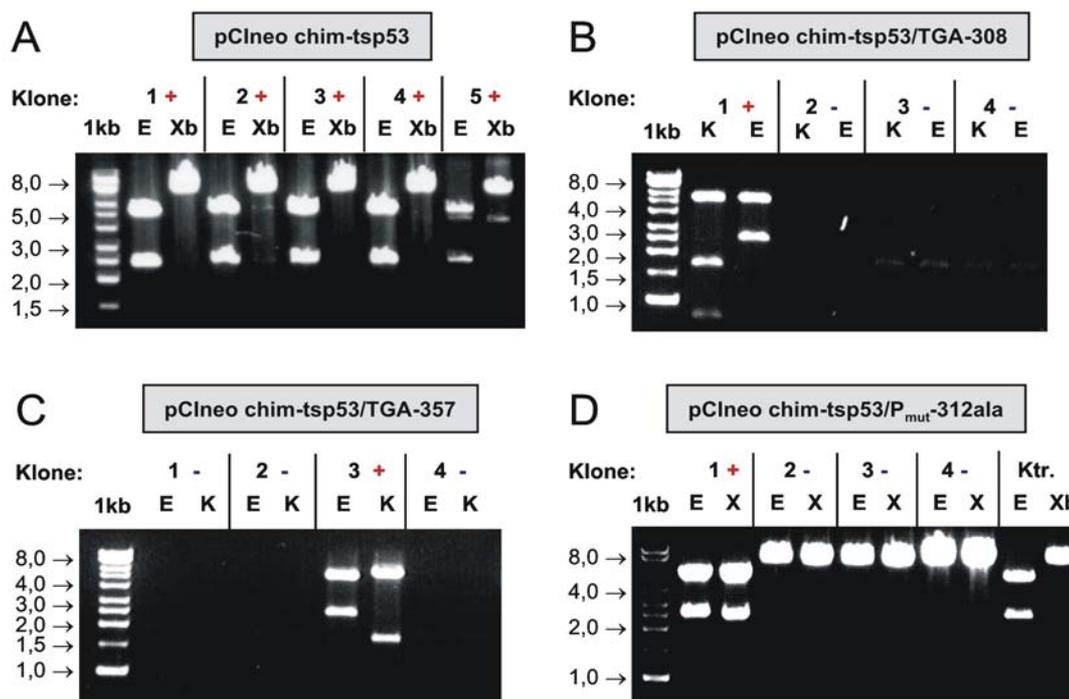


Abbildung 8: Kontrolle der Umklonierung in den pCI-neo Expressionsvektor durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen. Für die Auftrennung in den 1%-igen Agarosegelen wurden jeweils 0,5 – 1,0µg Vektor-DNA eingesetzt. Die Restriktionsanalysen der verschiedenen *tsp53*-Mutanten, in den Abbildungen (A) bis (D), wurden mit den Endonukleasen EcoR1 (E), Kpn1 (K), Xba1 (Xb) und Xho1 (Xh) durchgeführt. Positive Klone zeigten nach der Restriktion ein spezifisches Bandenmuster. Mit EcoR1 und Xho1 werden neben einem 5,4kb großen Fragment auch ein 2,7kb großes Fragment, mit Kpn1 werden 3 Fragmente mit den Größen 0,7kb, 1,9kb und 5,5kb ausgeschnitten und mit Xba1 soll nach erfolgreicher Ligation der Vektor linearisierte werden und eine Gellaufhöhe von 8,1kb besitzen. In der jeweils linken Spur im Agarosegel wurden 0,5µg eines 1kb-Markers aufgetragen. Für folgende *tsp53*-Konstrukte konnte eine erfolgreiche Umklonierung in den pCI-neo Vektor nachgewiesen werden: pCI-neo/*chim-tsp53*, *chim-tsp53/Δc-TGA308*, *chim-tsp53/Δc-TGA357* und *chim-tsp53/P_{mut}-312ala*

6.1.4 Klonierungsstrategie zur Herstellung von eukaryontischen Expressionsvektoren für aminoterminal mutiertes *tsp53*

Für die Generierung einer aminoterminal verkürzten Mutante von *tsp53* wurde aus dem pLTRcG9-Vektor mit den Restriktionsenzymen Xho1 und Kpn1 ein DNA Fragment ausgeschnitten, welches für den aminoterminalen Bereich von *tsp53* kodiert. Dieses Fragment besteht aus chimärer DNA, enthält also neben den Exonsequenzen von *tsp53* auch die Intronsequenzen 2 bis 5. Durch den Verdau mit Xho1 wurden die beiden im Exon 2 gelegenen Startcodons deletiert und damit ein im Exon 3 gelegenes Startcodon (AS 41) aktiviert. Das carboxyterminale cDNA Fragment wurde wie für die Synthese der carboxyterminalen *tsp53*-Mutanten aus dem Expressionsvektor pLXSN/*tsp53* über einen Restriktionsverdau mit den Enzymen Kpn1 und Xba1 isoliert und aufgereinigt. Dieses enthält ausschließlich reine cDNA.

6.1.4.1 Klonierung der aminoterminal mutierten cDNA in den eukaryontischen Expressionsvektor pCI-neo

Über eine Dreifachligation wurden das 3' verkürzte chimäre DNA Fragment mit dem carboxyterminal kodierenden cDNA Fragment in den pCI-neo Expressionsvektor einkloniert, der zuvor über die Restriktionsenzyme XhoI und XbaI linearisiert worden war (siehe Abb. 9). Der so geschaffene Vektor erhielt die Bezeichnung pCI-neo/ Δ n-tsp53ATG41.

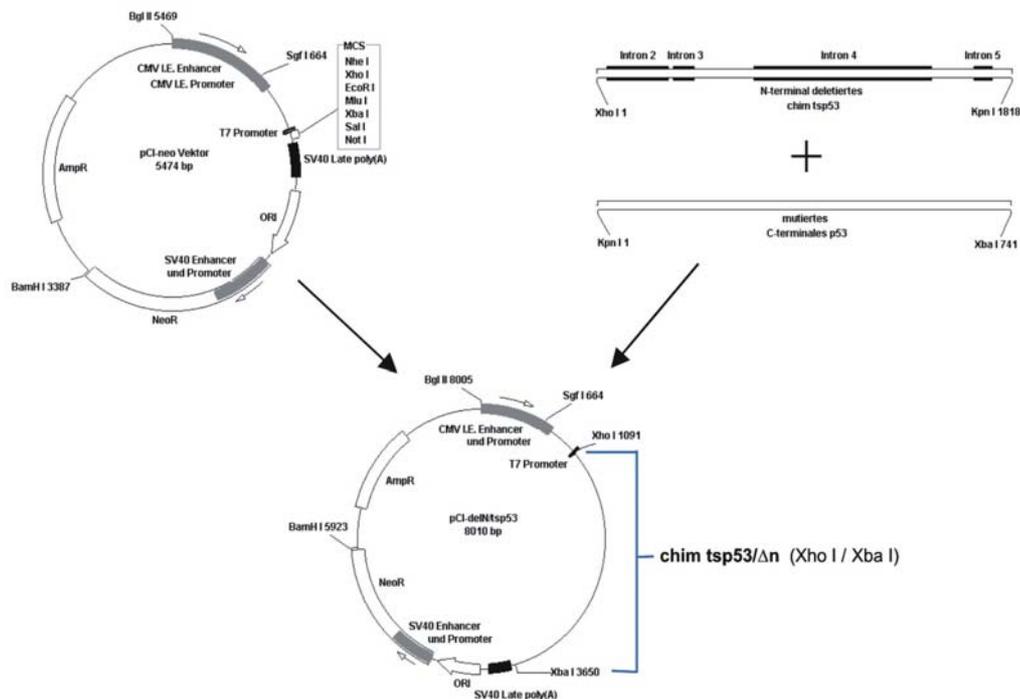


Abbildung 9: Klonierungsstrategie für einen eukaryontischen Expressionsvektor, der für ein aminoterminal verkürztes tsp53 kodiert (pCI-neo/tsp53 Δ n-ATG41). Die Etablierung der aminoterminal verkürzten tsp53 Variante erfolgte durch einen Verdau mit Restriktionsendonukleasen und anschließender Ligation. Die chimäre, 3' verkürzte tsp53-DNA (enthält die Intronsequenzen 2 bis 5) wurde aus dem Expressionsvektor pLTRcG9 mit **Xho1** und **Kpn1** ausgeschnitten und aufgereinigt. Der fehlende 5'-Bereich wurde aus dem Expressionsvektor pLXSN/tsp53 über die Endonukleasen **Kpn1** und **Xba1** ausgeschnitten. Für die Ligation wurden, der zuvor mit **Xho1** und **Xba1** linearisierte pCI-neo Expressionsvektor, sowie die beiden tsp53 Fragmente, im äquimolaren Verhältnis zum linearisierten pCI-neo-Expressionsvektor eingesetzt.

Der Erfolg der Dreifachligation wurde zunächst durch einen Verdau mit Restriktionsendonukleasen überprüft. Während beim pCI-neo/chim-tsp53 Expressionsvektor, der für ein tsp53 „Voller-Länge“ kodiert, nach der Restriktion mit XhoI ein ca. 100bp großes Fragment entstand (ohne Abbildung), konnte dieses nach einem Verdau der 5' deletierten chimären DNA mit XhoI nicht nachgewiesen werden (siehe Abb. 10). Wie aus der Abbildung 10 ersichtlich, ist nach dem Restriktionsverdau der DNA für das aminoterminal verkürzte tsp53 keine Bande unterhalb der 500bp Marke in der zweiten Spur zu erkennen (siehe Abb. 10). Der Expressionsvektor für das aminoterminal deletierte tsp53

wurde durch den Enzymverdau lediglich linearisiert. Die errechnete Laufhöhe im Agarosegel für den Vektor pCI-neo/ Δ n-tsp53ATG41 liegt bei ca. 8,0kb, eine Bande auf entsprechender Höhe konnte im Agarosegel nachgewiesen werden (siehe Abb. 10, Spur 2).

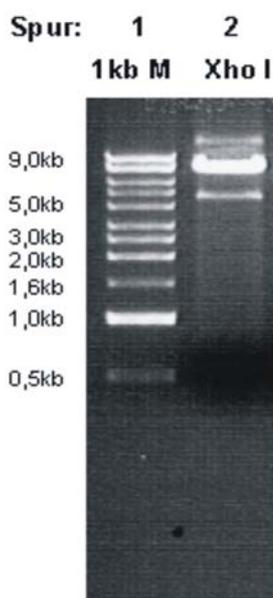


Abbildung 10: Kontrolle der Dreifachligation, sowie Nachweis der aminoterminal verkürzten Mutante pCI-neo/tsp53 Δ n-ATG41. Für den Restriktionsverdau des Vektors mit Xho1 wurden etwa 0,5-1,0 μ g Vektor-DNA eingesetzt. In **Spur 1** wurden 0,5 μ g eines 1kb-Markers aufgetragen. In **Spur 2** ist der mit Xho1 linearisierte aminoterminal trunkierte Vektor nachweisbar. Die Laufhöhe von ca. 8,0kb entspricht der errechneten Größe für diese tsp53-Mutante. Ein 100bp großes Fragment ist im Gel nicht nachweisbar.

Das Ergebnis dieses Enzymverdaus weist lediglich auf das Fehlen des aminoterminal kodierenden Sequenzbereiches von tsp53 hin. Das Insert musste zusätzlich vom 5' Ende her sequenziert werden. Der 5' gelegene Sequenzierungsprimer wurde dabei so ausgewählt, dass das amplifizierte Fragment einen kurzen Sequenzausschnitt des pCI-neo Expressionsvektor einschließlich der „multiple cloning site“ (MCS) beinhaltet. In der Abbildung 11A ist die Sequenz von der Base 1010 des Expressionsvektors pCI-neo bis zur Restriktionsschnittstelle Xho1 in der „Multiple cloning site“ wiedergegeben. Nach der Xho1 Schnittstelle beginnt die Sequenz der chimären tsp53-DNA. Das erste Codon in der tsp53 Sequenz entspricht der Aminosäure 14 (GAG = Glutamin) (siehe Abb. 11A+B). Zur Überprüfung, dass es sich bei der in Abbildung 11A wiedergegebenen Sequenz tatsächlich um die chimäre DNA des aminoterminal verkürzten tsp53 handelt, wurde zum Vergleich die vollständige, aminoterminal, chimäre DNA Sequenz von tsp53 aufgeführt (siehe Abb. 11B). Im Vergleich beider Sequenzen ist festzustellen, dass der Sequenzbereich vor der Xho1 Schnittstelle, der die beiden Startcodons beinhaltet, in der aminoterminalen Mutante fehlt

(siehe Abb. 11A+B). Für die Expression des aminoterminal verkürzten *tsp53*-Proteins wird also das in der *p53*-Sequenz an der Aminosäureposition 41 lokalisierte Startcodon ATG (Methionin) ausgenutzt (siehe Abb. 11B).

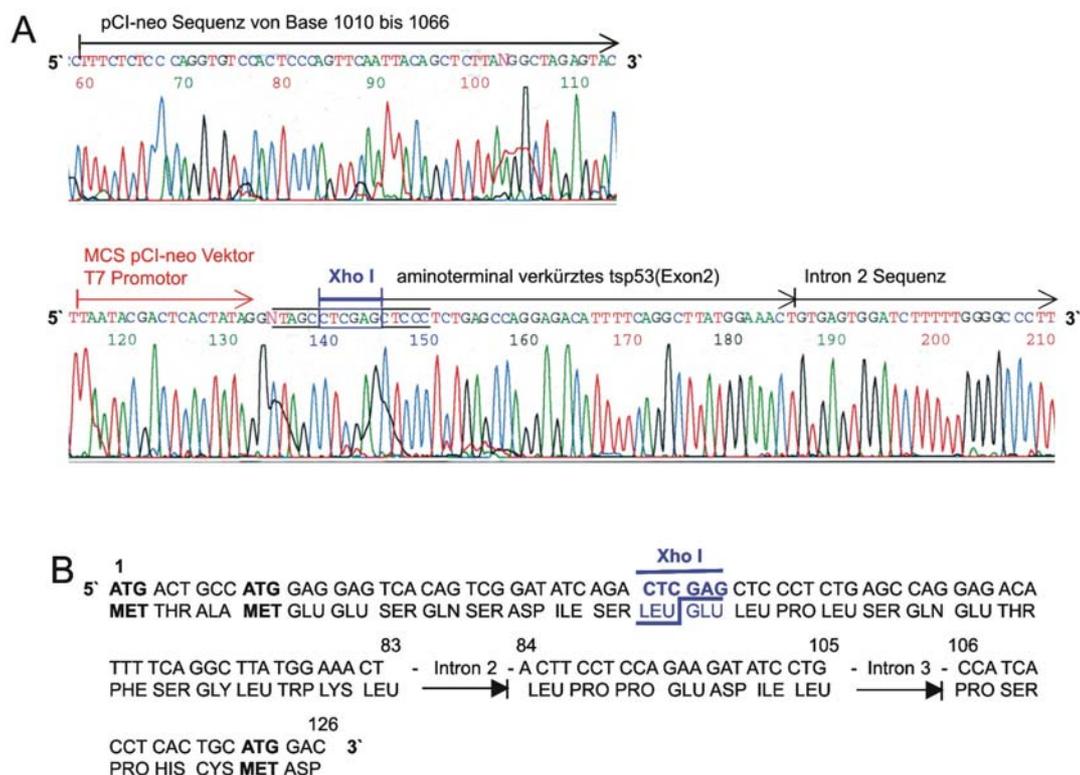


Abbildung 11: Sequenzierung der Deletionsmutante pCI-neo/ Δ n *tsp53*-ATG41. In **Abbildung A** ist ein Sequenzausschnitt des pCI-neo Expressionsvektors dargestellt, der sowohl die Sequenz der T7 Polymerase sowie die „multiple cloning site“ (MCS) bis zur Restriktionsschnittstelle Xho1 enthält (blau). Nach der Xho1 Restriktionsschnittstelle beginnt die *p53* Sequenz der aminoterminal verkürzten *tsp53* Form ab Aminosäureposition 14 (Glutamin). In **Abbildung B** ist die vollständige *tsp53*-Sequenz im 3'-Bereich wiedergegeben. Blau ist die Restriktionsschnittstelle, mit der die verkürzte Form von *tsp53* in den pCI-neo Expressionsvektor inkloniert wurde. Das 5'-Ende wurde durch die Restriktion abgeschnitten und ist somit nicht mehr in der Sequenzanalyse der Abbildung A nachweisbar.

6.1.5 Merkmale der amino- und carboxyterminalen *tsp53* Mutanten

Die Ergebnisse zeigen, dass pCI-neo Expressionsvektoren generiert wurden, die für ein *tsp53* „Voller-Länge“ *tsp53* und für verschiedene carboxyterminale und aminoterminalen Mutanten von *tsp53* kodieren. Unter anderem wurden Konstrukte hergestellt, die ein Stopcodon an Aminosäureposition 308 bzw. 357 enthalten, ein Konstrukt, das in Aminosäureposition 312 eine Punktmutation enthält, sowie ein aminoterminales Konstrukt, welches das Startcodon, das an Aminosäureposition 41 lokalisiert, ausnutzt. Die einzelnen *tsp53*-Formen weisen unterschiedliche Eigenschaften auf, die in Tabelle 5 zusammengefasst sind.

Name der p53-Mutante	Größe	Eigenschaften
tsp53	➤ AS 1 bis 390	<ul style="list-style-type: none"> ➤ temperatursensitiv ➤ vollständiges p53
tsp53/ Δ c-TGA308	➤ AS 1 bis 308	<ul style="list-style-type: none"> ➤ temperatursensitiv ➤ Fehlen aller auf dem Carboxyterminus von p53 gelegenen funktionellen Domänen, wie <ul style="list-style-type: none"> ▪ den Kernlokalisierungssignalen 1-3 (NLS 1-3) ▪ Kernexportsignal (NES) ▪ Tetramerisierungsdomäne ▪ neg. regulatorischen Domäne
tsp53/ Δ c-TGA357	➤ AS 1 bis 357	<ul style="list-style-type: none"> ➤ temperatursensitiv ➤ enthält NLS 1, NES und die Tetramerisierungsdomäne ➤ Fehlen von NLS 2 und 3 ➤ Fehlen der negativ regulatorischen Domäne ➤ Fehlen des Epitopes für pAb421
tsp53/ Δ n-ATG41	➤ AS 41 bis 390	<ul style="list-style-type: none"> ➤ temperatursensitiv ➤ Fehlen der Bindungsdomäne für MDM2 ➤ partielle Deletion der Transaktivierungsdomäne
tsp53/P _{mut} 312ala	➤ AS 1 bis 390	<ul style="list-style-type: none"> ➤ temperatursensitiv ➤ Aminosäureaustausch an Position 312 von Serin zu Alanin ➤ Verlust einer Phosphorylierungsstelle in der Linker-Region

Tabelle 5: Eigenschaften der Deletionsmutanten von tsp53

Alle tsp53-Konstrukte haben den gleichen Expressionsvektor zur Grundlage, eine notwendige Voraussetzung, um vergleichende Analysen über die Funktion der einzelnen Mutanten durchführen zu können. Nach erfolgter Klonierung in den Expressionsvektor pCI-neo wurden die kodierenden Abschnitte sowohl für tsp53 „Volle-Länge“ als auch für die amino- und carboxyterminal trunkierten tsp53 Proteine erneut sequenziert. Für alle in den pCI-neo Vektor einklonierten tsp53-Formen konnte die Integration der jeweiligen Mutation erneut nachgewiesen werden (Daten nicht aufgeführt).

6.2 Reaktionsmuster der tsp53-Mutanten mit p53-spezifischen Antikörpern

Im folgendem wurde überprüft, inwieweit die amino- bzw. carboxyterminal verkürzten tsp53 Formen (chim tsp53-TGA357; chim tsp53 Δ n-ATG41) in eukaryontischen Zellen zur

Expression gebracht werden konnten. Im Vergleich dazu wurde die Expression des nicht-trunkierten *tsp53*-Proteins als Referenz herangezogen. Dazu wurden die Plasmide transient in C6D8 Zellen eingebracht. 24 bis 48 Stunden nach Transfektion wurden die Proteinlysate der Kulturen gewonnen, im SDS-Gel aufgetrennt und im Westernblot auf die Expression von p53 überprüft. p53 wurde mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern detektiert: (i) mit pAb240, der in der zentralen Domäne von p53 bindet und die Mutantenkonformation von p53 erkennt, (ii) mit pAb242, der mit dem Aminoterminus von p53 reagiert und (iii) mit pAb421, der im Carboxyterminus von p53 bindet.

Grundsätzlich konnte festgestellt werden, dass alle *tsp53*-Konstrukte in den transient transfizierten Zellen exprimiert werden konnten (siehe Abb. 12). Der Verlust der einzelnen Proteindomänen konnte durch das differenzierte Reaktionsmuster domänenspezifischer Antikörper im Westernblot (Abb.12) bestätigt werden. Der carboxyterminal bindende Antikörper pAb241 detektierte die aminoterminal verkürzte Mutante *tsp53/Δn-ATG41*, nicht jedoch die carboxyterminal verkürzte Mutante *tsp53/Δc-TGA357*. Die Reaktion mit dem aminoterminalen Antikörper pAb242 verhielt sich genau umgekehrt. Die Punktmutante *tsp53/P_{mut}312ala* reagierte mit Antikörpern im Westernblot wie das *tsp53* „Voller-Länge“ (Daten für *tsp53/P_{mut}312ala* nicht aufgeführt). Westernblotanalysen, bei denen p53 mit Hilfe des monoklonalen Antikörper pAb240 detektiert wurde, ergaben, dass die Deletionsmutanten *tsp53/Δc-TGA357* und *tsp53/Δn-ATG41* im Vergleich zum *tsp53*-Protein voller Länge in der SDS-PAGE schneller liefen (siehe Abb. 12). Das aminoterminal trunkierte Protein *tsp53/Δn-ATG41* zeigte im SDS-Polyacrylamidgel unerwartet ein wesentlich niedrigeres Molekulargewicht als die carboxyterminale Mutante *tsp53/Δc-TGA357*, obwohl aminoterminal wesentlich weniger Aminosäuren deletiert wurden.

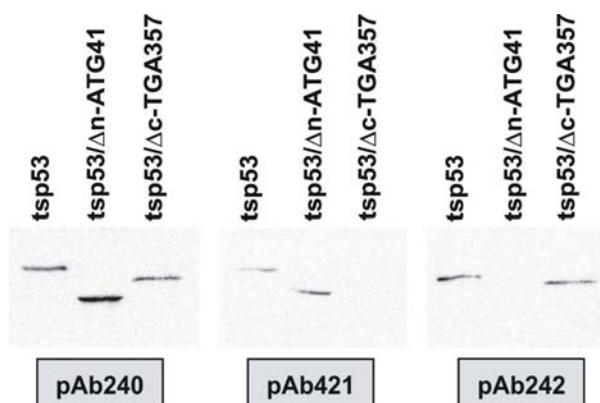


Abbildung 12: Westernblotanalyse der verkürzten *tsp53*-Proteine *tsp53/Δn-ATG41* und *tsp53/Δc-TGA357* im Vergleich zum *tsp53* „Voller-Länge“. Die Proteinlysate wurden in äquivalenten Konzentrationen auf ein 10%-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurden die verschiedenen *tsp53*-Konstrukte mit den p53 spezifischen Antikörpern pAb240, pAb242 und pAb421 nachgewiesen.

Zusätzlich wurde die Expression von tsp53 nach transienter Transfektion von C6D8-Zellen anhand von Immunfluoreszenzmarkierungen überprüft. Wie schon in den Westernblotanalysen konnte das tsp53 „Volle-Länge“ (siehe Abb.13A-C) sowohl mit dem amino- (pAb242) als auch dem carboxyterminal (pAb421) bindenden Antikörpern detektiert werden. Desgleichen ließ es sich mit dem in der zentralen Domäne von p53 bindenden p53-Antikörper pAb240 nachweisen. p53 lokalisierte in den Zellen zum überwiegenden Teil im Zytoplasma (siehe Abb.13A-C). In gleicher Weise konnte auch die Punktmutante tsp53/P_{mut}312ala mit allen p53-Antikörpern detektiert werden (Daten nicht aufgeführt).

Das aminoterminal trunkeerte tsp53 Protein konnte nach transienter Transfektion erwartungsgemäß in der Immunfluoreszenz nur durch Antikörper nachgewiesen werden, die in der zentralen Domäne und im Carboxyterminus von p53 binden (siehe Abb. 13G-I). Der gegen den Aminoterninus von p53 gerichtete Antikörper pAb242 konnte das aminoterminal deletierte tsp53-Protein nicht detektieren (siehe Abb. 13I). Diese Beobachtung ist konform zu den im Westernblot erzielten Ergebnissen. Das aminoterminal trunkeerte tsp53-Protein lokalisierte in den transient transfizierten Zellen wie das tsp53 „Volle-Länge“ ebenfalls zum größten Teil im Zytoplasma (siehe Abb. 13G und H).

Die carboxyterminale Mutante tsp53/ Δ c-TGA357 ist durch den Verlust der negativ regulatorischen Domäne gekennzeichnet, in der das Epitop für den carboxyterminalen Antikörper pAb421 lokalisiert. Das c-terminal trunkeerte tsp53-Protein konnte, wie zu erwarten, nicht durch den carboxyterminal bindenden Antikörper pAb421 nachgewiesen werden (siehe Abb. 13E). Antikörper, die gegen die zentrale Domäne bzw. den Aminoterninus von p53 gerichtet sind, konnten das verkürzte tsp53-Protein in der Immunfluoreszenz detektieren (siehe Abb. 13D und F). Das c-terminal trunkeerte Protein lokalisierte in den transient transfizierten C6D8-Zellen überwiegend im Zytoplasma (siehe Abb. 13 D und F). Für die carboxyterminale Deletionsmutante tsp53/ Δ c-TGA308 wurde das gleiche Verteilungsmuster in der Immunfluoreszenz wie für die Mutante tsp53/ Δ c-TGA357 nachgewiesen (Daten nicht aufgeführt).

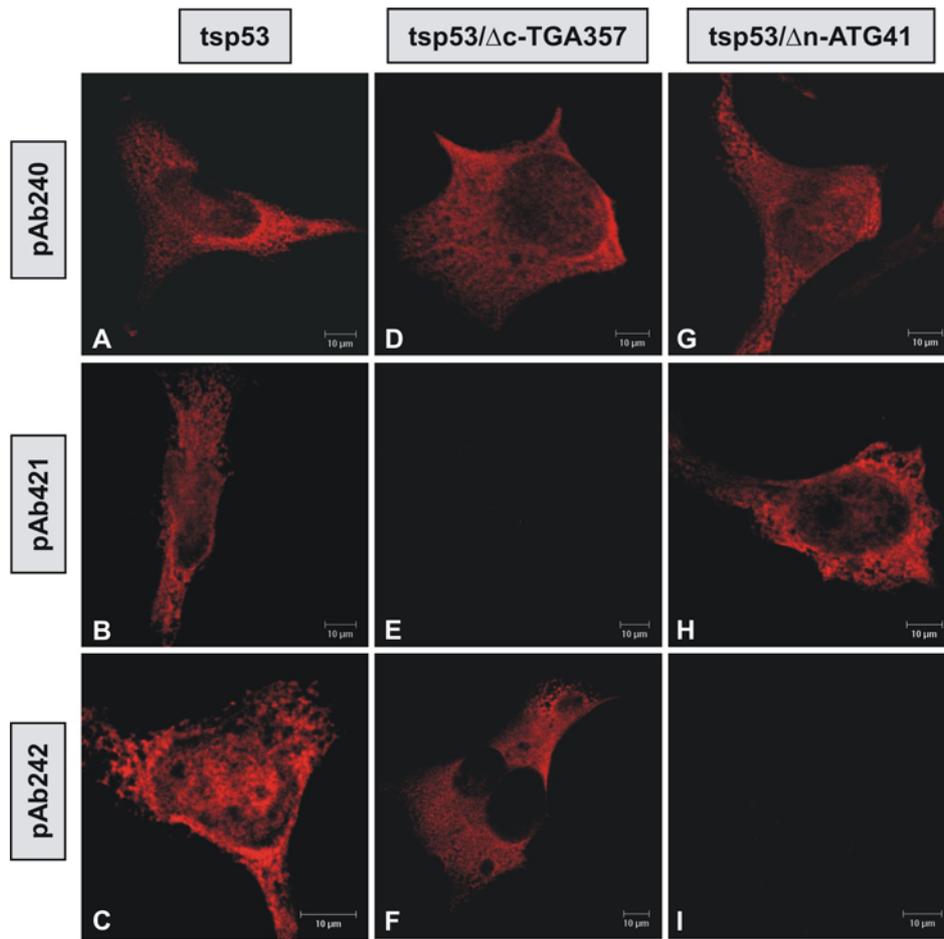


Abbildung 13: Detektion von *tsp53* und *tsp53*-Mutanten in der Immunfluoreszenz mit den p53-Antikörpern pAb240, pAb421 und pAb242 nach transienter Transfektion von C6D8-Zellen. Die Zellen wurden bei 37°C für ca. 48 Std. kultiviert und anschließend in eiskaltem Azeton fixiert. Der verwendete sekundäre Antikörper war TR (Texas-Red) gekoppelt.

6.3 Subzelluläre Lokalisation der *tsp53*-Mutanten in C6D8 Zellen nach transienter Transfektion

Die *tsp53*-Konstrukte wurden über transiente Transfektionen in den Subklon C6D8 eingebracht, um Auswirkungen der jeweiligen Mutation auf die subzelluläre Lokalisation von *tsp53* zu bestimmen. Die Zellen wurden bei permissiver als auch nicht-permissiver Temperatur kultiviert. Zum Nachweis der p53 Mutanten wurden die Antikörper pAb240 und pAb248 verwendet.

6.3.1 Lokalisation bei nicht-permissiver Temperatur (39°C)

Wie aus Abbildung 14 ersichtlich, lokalisieren das *tsp53* „Voller-Länge“ wie auch alle *tsp53*-Mutanten, außer der Mutante *tsp53/Δc-TGA308*, bei der nicht-permissiven Temperatur (39°C) in homogener Verteilung im Zytoplasma (siehe Abb. 14A-E)

Die carboxyterminal trunkeerte Mutante *tsp53/Δc-TGA308* bildete im Zytoplasma Aggregate (siehe Abb. 14B). Sie resultieren vermutlich aus der fehlerhaften Faltung des Proteins, hervorgerufen durch den Verlust des gesamten C-Terminus. Außerdem können durch die aberrante Faltung Domänen, die mit anderen Proteinen interagieren, maskiert sein.

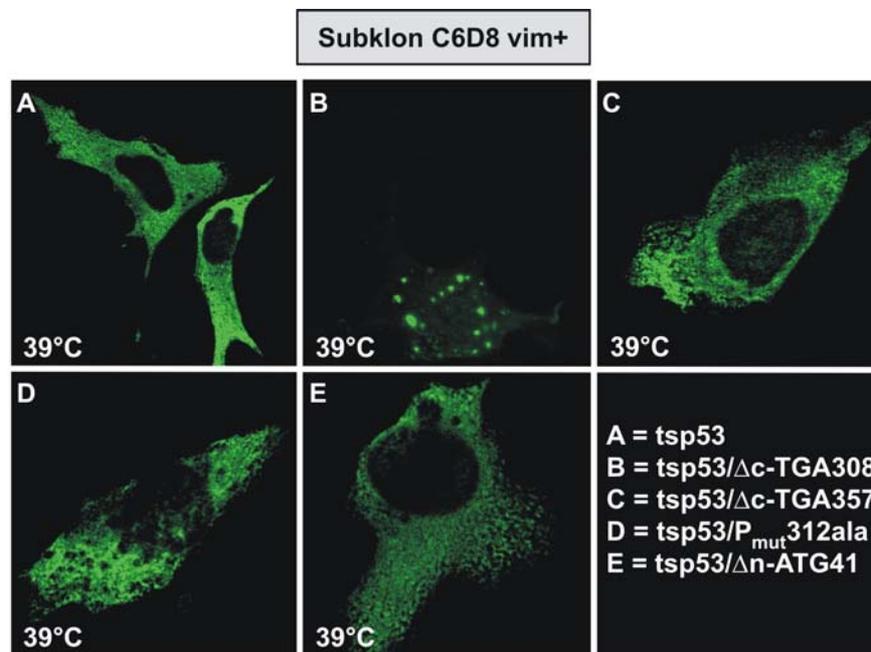


Abbildung 14: Subzelluläre Lokalisation der *tsp53* Mutanten bei nicht-permissiver Temperatur (39°C) in C6D8 Zellen nach transienter Transfektion. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 72h bei 39°C inkubiert, anschließend in eiskaltem Azeton fixiert und für die Immunfluoreszenz mit dem p53 spezifischen Antikörper pAb248 markiert.

6.3.2 Lokalisation nach Wechsel auf die permissive Temperatur (30°C)

tsp53 „Volle-Länge“ nimmt bei einem Wechsel auf die permissive Temperatur (30°C) die Wildtypkonformation an und transloziert in den Zellkern. Die Eigenschaft der Temperatursensitivität in der Konformation von p53 beruht auf einem Aminosäureaustausch an Position 135 von Alanin zu Valin (Hinds et al., 1989). Es sollte nun geklärt werden, inwieweit die eingeführten Mutationen diese Eigenschaft der konformationsabhängigen subzellulären Lokalisation Mutationen veränderte.

tsp53 „Volle-Länge“, wie auch die Punktmutante *tsp53/P_{mut}312ala* und die aminoterminal verkürzte Form *tsp53/Δn-ATG41* zeigten nach einem Wechsel von der nicht-permissiven (39°C) auf die permissive Temperatur (30°C) eine Lokalisation im Zellkern (siehe Abb. 15A, D und E). Diese Mutanten behielten also die Temperaturabhängigkeit der subzellulären Lokalisation von *tsp53* bei. Auch die Mutante *tsp53/Δc-TGA308* akkumulierte trotz fehlender NLS's nach dem Wechsel auf 30° C zum Teil im Zellkern (siehe Abb. 15B).

Zytoplasmatische Aggregate waren nicht mehr zu beobachten (Abb.15B; vergleiche mit Abb.14B).

Eine andere subzelluläre Verteilung zeigte die carboxyterminal trunke Mutante *tsp53/Δc-TGA357*. In dieser Mutante sind das dominierende Kernlokalisationsignal (NLS 1) und die Tetramerisierungsdomäne, in der ein Kernexportsignal von p53 liegt, erhalten. Trotzdem lokalisierte diese *tsp53*-Mutante auch bei permissiver Temperatur ausschließlich im Zytoplasma (siehe Abb.15C). D.h., dieses Protein entsprach in seinem Verhalten nicht dem des „Volle-Länge“ *tsp53*.

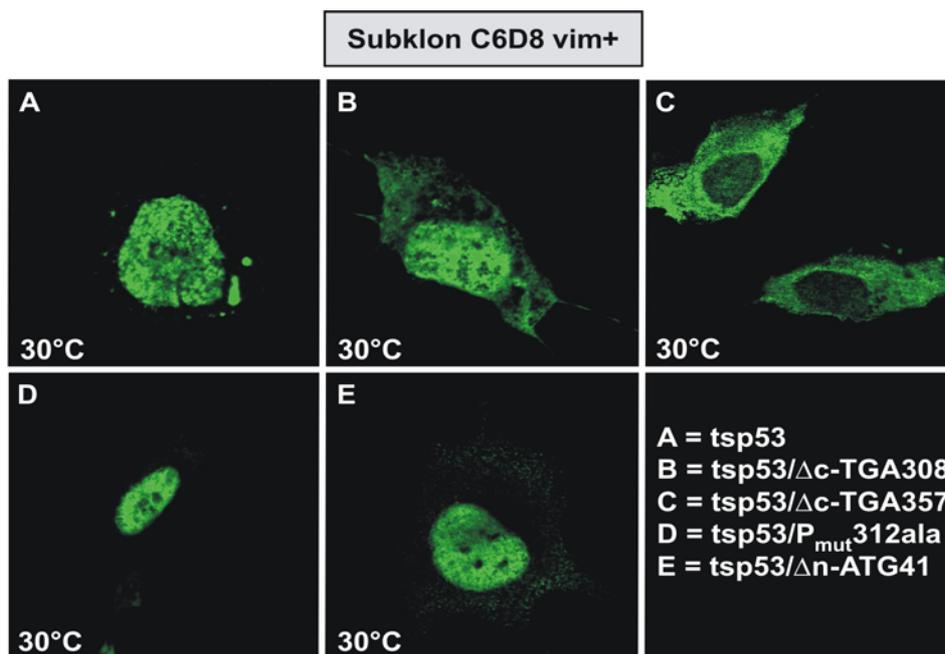


Abbildung 15: Subzelluläre Lokalisation der *tsp53* Mutanten in C6D8 Zellen bei permissiver Temperatur (30°C) nach transienter Transfektion. Nach der Transfektion wurden die Zellen des C6D8 Subklons bei 39°C bis zu 50%iger Konfluenz auf Deckgläsern kultiviert. Die Zellen wurden für weitere 48h auf 30°C überführt, anschließend in eiskaltem Azeton fixiert und für die Immunfluoreszenz mit dem Antikörper pAb248 (FITC) markiert.

6.4 Herstellung stabil transfizierter Zelllinien mit den *tsp53*-Mutanten in C6D8 Zellen

In der transienten Transfektion können kurzfristig sehr hohe Proteinmengen exprimiert werden, was zu einer aberranten Lokalisation des Proteins führen kann. Um diesen Faktor auszuschließen wurden mit den *tsp53*-Konstrukten stabil transfizierte Zelllinien etabliert.

6.4.1 Wahl des *tsp53* Konstruktes und Optimierung der Transfektionsbedingungen

Es wurden verschiedene *tsp53* Konstrukte unter der Kontrolle unterschiedlicher Promotoren eingesetzt. Zur Optimierung der Transfektionsbedingungen wurden mehrere Transfektionsarten auf ihre Effizienz hin überprüft.

Alle *tsp53*-Konstrukte lagen als reine cDNA-Sequenz oder als chimäre Konstrukte im pCI-neo Expressionsvektor vor. Als Transfektionsmethode wurden die Kalziumphosphat-Methode, Transfektionsreagenzien auf Liposomen-Basis und die Elektroporation eingesetzt. Die Vorversuche zeigten, dass in Analogie zu früheren Beobachtungen (Etzrodt, 1996) die höchste Transfektionsrate mit Elektroporation erzielt wurde. Die durch die Elektroporation bedingte Mortalität betrug bei allen Versuchen konstant 35%. Die Selektion positiver Klone durch Behandlung mit dem Antibiotikum Geneticin griff nach 7-15 Tagen und war nach 3½ bis 4 Wochen abgeschlossen. Von den resistenten Klonen wurden jeweils 8 bis 24 Klone isoliert.

Zu Beginn wurden die Transfektionen mit einem pCI-neo Expressionsvektor durchgeführt, der eine reine cDNA-Sequenz von *tsp53* enthielt. Mit diesem Vektor zeigte sich, dass nur 1-2% der isolierten Klone das *tsp53*-Protein exprimierten. Zudem war die Anzahl *tsp53*-exprimierender Zellen in den positiven Klonen sehr gering. Um die Zahl exprimierender Zellen zu erhöhen, wurde eine Doppeltransfektion mit dem *tsp53* cDNA Vektor und einem Vektor, der für das kleine T-Antigen 17kT des SimianVirus 40 (SV40) kodiert, durchgeführt. Für 17kT ist bekannt, dass es in der Lage ist, die Stabilität von p53 zu erhöhen (persönliche Mitteilung von K. Scheidig; unveröffentlichte Daten). Allerdings konnte durch die Kotransfektion mit dem 17kT-Expressionsvektor die Zahl *tsp53* exprimierender Zellen nicht gesteigert werden.

In einem alternativen Ansatz wurde nun versucht, stabil transfizierte Linien mit einem pCI-neo Vektor zu generieren, der ein chimäres *tsp53* Konstrukt enthielt, bestehend aus einem 5'Bereich mit genomischer DNA, die die Intronsequenzen 2 bis 5 enthielt, und einer 3'gelegenen cDNA-Sequenz. Nach der Transfektion mit diesem Expressionsvektor zeigte ein wesentlich höherer Anteil der Kolonien eine Expression von *tsp53*. Auch lag die Anzahl der exprimierenden Zellen in den Kolonien höher und zwar in einem Bereich zwischen 10 und 90%. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die Etablierung stabiler Zelllinien generell nur pCI-neo Vektoren verwendet, welche die chimäre *tsp53* DNA enthielten.

C6D8 (vim+)	Kolonien 5x10 ⁴ Zellen	Anzahl p53-exprimierender Kolonien
➤ tsp53+17kT	23	48%
➤ tsp53	24	67%
➤ tsp53/Δn-ATG41	19	63%
➤ tsp53/Δc-TGA308	9	0,5 bis 1%
➤ tsp53/Δc-TGA357	14	21%
➤ tsp53/P _{mut} 312ala	14	43%

Tabelle 6: Stabile Transfektion der vimentinpositiven C6D8-Zellen mit chimären tsp53 Konstrukten; tsp53 + 17kT: Ko-Transfektion mit 17kT Expressionsvektor. Pro 10cm Gewebekulturschale wurden 1x10⁶ bzw. 1.10⁵ Zellen ausgesät und bei 37°C für 3 Tage ohne Antibiotikum inkubiert. Nach 72h wurde mit der Selektion der Zellen durch Zugabe von 400µg/ml Geneticin begonnen. Die Expression der tsp53-Proteine wurden durch Immunfluoreszenzmarkierung mit dem p53-Antikörper pAb248 (FITC) ermittelt.

Nach Transfektion mit dem Expressionsvektor, der für die aminoterminal deletierte Mutante tsp53/Δn-ATG41 kodiert, zeigten 63% der isolierten Kolonien eine Expression des trunkeierten Proteins. Dies entsprach etwa der gleichen Anzahl von Kolonien, wie sie nach Transfektion mit *tsp53* „Volle –Länge“ (67%) ermittelt wurden (siehe Tab. 6). Die Anzahl exprimierender Kolonien, die für die Phosphorylierungsmutante tsp53/P_{mut}312ala ermittelt wurde, lag mit 44% um ca. 20% niedriger. Für die carboxyterminale Mutante tsp53/Δc-TGA357 konnte lediglich in 21% der gewachsenen Kolonien eine Proteinexpression nachgewiesen werden. Für die carboxyterminale Mutante tsp53/Δc-TGA308 konnten keine stabil exprimierenden Klone etabliert werden. Diese Zellen starben nach etwa 4-5 Wochen in Kultur (siehe Tab. 6).

6.4.2 Subzelluläre Lokalisation der tsp53-Mutanten in stabil transfizierten C6D8 Zellen bei nicht-permissiver Temperatur

Jeweils 8 bis 24 Klone wurden isoliert und auf die Expression der jeweiligen Mutante und ihrer subzellulären Lokalisation untersucht (siehe Tab. 7 und Abb. 16). Die Lokalisation der tsp53 Mutanten in der Immunfluoreszenz erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper pAb240. Die nicht tabellarisch aufgeführten Klon-Nummern der einzelnen tsp53-Mutanten, zeigten in der Immunfluoreszenzmarkierung keine Expression und wurden aus diesem Grund nicht weiter in der Tabelle erwähnt.

Die C6D8 Kolonien, die *tsp53* „Volle-Länge“ exprimierten, konnten hinsichtlich der subzellulären Lokalisation von p53 in zwei Klassen eingeteilt werden. In fünf der zwölf Klone wurde bei der nicht-permissiven Temperatur (39°C) eine starke zytoplasmatische p53-Lokalisation in der Immunfluoreszenz nachgewiesen, die die vorhandene Kernfluoreszenz des Proteins übertraf (siehe Tab. 7 und Abb. 16A). In den restlichen 7 Klonen zeigte sich eine heterogene Verteilung des p53-Proteins, wobei das Protein zu etwa gleichen Anteilen im Zellkern und Zytoplasma detektierbar war. Diese Zellen zeigten eine geringere Intensität in der Fluoreszenzfärbung.

Unter den 23 isolierten Klonen, die mit *tsp53* „Volle-Länge“ und *17kT* ko-transfiziert worden waren, konnte in elf Fällen eine Expression von *tsp53* nachgewiesen werden. Sieben der elf isolierten Klone zeigten eine zytoplasmatische Lokalisation des *tsp53*-Proteins, welche das nukleäre Signal deutlich übertraf (siehe Tab. 7 und Abb. 16B). In drei Klonen war eine gleichstarke nukleäre und zytoplasmatische Fluoreszenzmarkierung nachzuweisen. Ein Klon zeigte eine überwiegend nukleäre Akkumulation des *tsp53*-Proteins bei nicht-permissiver Temperatur.

Unter den isolierten Klonen, die mit *tsp53/Δn-ATG41* transfiziert worden waren, konnte in sieben der 19 überprüften Kolonien eine *tsp53* Expression in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Fünf der sieben Klone zeigten bei der nicht-permissiven Temperatur eine Akkumulation des trunkierten *tsp53*-Proteins im Zellkern (siehe Tab. 7 und Abb. 16C). Zwei Klone zeigten eine gleichmässige Verteilung des aminoterminal deletierten p53-Proteins in Zytoplasma und Zellkern, allerdings war das Fluoreszenzsignal in diesen Zellen äußerst gering.

Unter den positiven 14 Klonen, die man nach Transfektion mit dem *tsp53/Δc-TGA357* Konstrukt erhielt, wiesen nur 4 eine deutliche Expression des deletierten Proteins auf. Sie zeichneten sich durch ein einheitliches subzelluläres Verteilungsmuster aus. In allen Klonen lokalisierte das Protein der Mutante *tsp53/Δc-TGA357* bei nicht-permissiver Temperatur im Zytoplasma. Die zytoplasmatische Fluoreszenz war wesentlich intensiver als die Kernfluoreszenz (siehe Tab. 7 und Abb. 16D).

Für die carboxyterminal kodierende *tsp53* Mutante *tsp53/Δc-TGA308* konnten keine stabil exprimierenden Klone etabliert werden. Nach Isolation einzelner Foci konnte nur anfänglich eine geringe p53 Expression nachgewiesen werden. Die Zellen starben nach ca. 4 bis 5 Wochen im Selektionsmedium ab.

chim tsp53			chim tsp53+17kT			chim tsp53/ Δ n-ATG 41		
Klon-Nr.	tsp53-Verteilung		Klon-Nr.	tsp53-Verteilung		Klon-Nr.	tsp53-Verteilung	
	Zyto.	Nu.		Zyto.	Nu.		Zyto.	Nu.
4	+++	+	18	+++	+	10	+	++++
9	+++	+	19	+++	+	12	+	+++
17	+++	+	15	++	+	14	+	+++
21	+++	+	23	++	+	18	+	+++
14	++	+	14	+	-	13	+	++
2	±	±	16	+	-	15	±	±
5	±	±	22	+	-	19	±	±
7	±	±	3	+	++			
8	±	±	5	±	±			
16	±	±	11	±	±			
18	±	±	12	±	±			
22	±	±						

chim tsp53/P _{mut} -312ala			chim tsp53/ Δ c-TGA308			chim tsp53/ Δ c-TGA357		
Klon-Nr.	tsp53-Verteilung		Klon-Nr.	tsp53-Verteilung		Klon-Nr.	tsp53-Verteilung	
	Zyto.	Nu.		Zyto.	Nu.		Zyto.	Nu.
3	+	+++	Es ließen sich keine stabilen Klone etablieren			2	+++	+
4	+	++				6	+++	+
7	+	++				4	++	+
8	+	++				9	++	+
14	+	++						
2	±	±						

Tabelle 7: Subzelluläre p53-Proteinverteilung von tsp53 Voller-Länge bzw. von den tsp53-Mutanten in den stabil transfizierten vimentinpositiven C6D8-Zellen. Die Zellen wurden mit Azeton fixiert und die subzelluläre Verteilung des tsp53-Proteins durch Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen Antikörper pAb240 analysiert. Plus (+) und Minus (-) bezeichnet die Intensität der Fluoreszenz in Zellkern (Nu.) und Zytoplasma (Zyto.). Klone in denen eine inhomogene subzelluläre p53 Verteilung überwiegt, d.h. tsp53 ist sowohl im Zellkern wie auch im Zytoplasma gleich stark nachzuweisen, wurden mit einem kombinierten Plus-Minus Zeichen (±) gekennzeichnet.

Von den 14 getesteten Kolonien, die mit dem p53-Konstrukt tsp53/P_{mut}312ala transfizierten wurden, zeigten 4 der isolierten Klone eine starke Akkumulation des tsp53 Proteins im Zellkern. Lediglich ein Klon zeigte zusätzlich zur nukleären Akkumulation eine zytoplasmatische Färbung des p53-Proteins in der Immunfluoreszenz (siehe Tab. 7 und Abb. 16E).

Von den stabil transfizierten C6D8-Zellen wurde jeweils ein repräsentativer Klon für weitere Experimente in Kultur gehalten. Folgende Klone wurden dazu ausgewählt: tsp53-9 (Klon-Nr.: 9), tsp53/ Δ n-ATG41-14 (Klon-Nr.: 14), tsp53/ Δ c-TGA357-2 (Klon-Nr.: 2) und tsp53/P_{mut}312ala-3 (Klon-Nr.: 3). Da die Kotransfektion mit dem 17kT Expressionsvektor

nicht zu einer verstärkten Expression von *tsp53* geführt hatte, wurden diese Klone in die weiteren Experimente nicht mehr mit einbezogen.

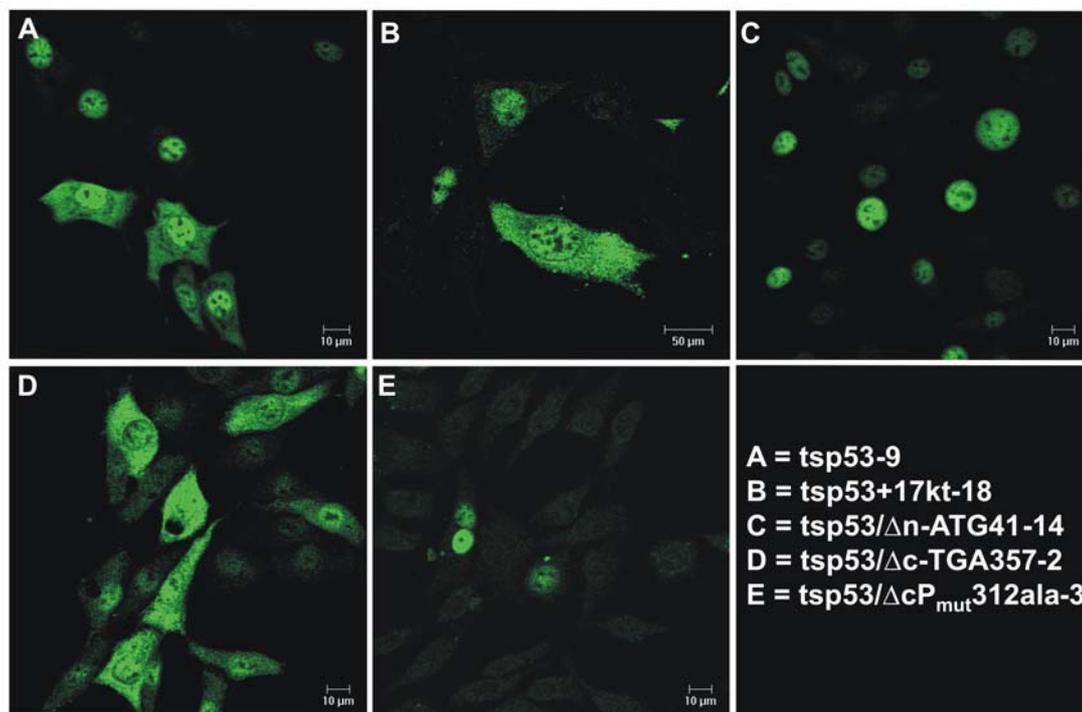


Abbildung 16: Expression von *tsp53*-Konstrukten in stabil transfizierten C6D8-Zellen. Nach Fixierung in eiskaltem Azeton wurden die Proteine mit dem Antikörper pAb240 detektiert.

6.4.3 „Steady-state-level“ der trunkierten *tsp53*-Formen in stabil transfizierten C6D8 Zellen bei nicht-permissiver Temperatur

Um Aussagen über die Expressionsstärke der *tsp53* Mutanten in den einzelnen Klonen zu erhalten, wurden Proteinlysate hergestellt und im Westernblot auf die Expression getestet. Die Lysate wurden dazu auf gleiche Proteinkonzentrationen angeglichen. Als Negativkontrolle wurde ein Proteinlysat der *p53* negativen Parentalzelllinie C6D8 eingesetzt (siehe Abb. 17A Spur 1 und Abb. 17B und C Spur 6).

(i) Detektion mit dem Antikörper pAb240

Mit dem Antikörper pAb240, der in der zentralen Domäne von *p53* bindet und damit alle *tsp53* Mutanten erkennt, zeigten sich in den Lysaten der einzelnen Linien z. T. unterschiedlich hohe Mengen an *tsp53*. *tsp53-9* „Volle-Länge“ und die Punktmutante *tsp53/P_{mut}312ala-3* waren in den ausgewählten Klonen etwa in äquivalenten Mengen vorhanden (Abb. 17A Spur 2 und 3). Die aminoterminal Mutante *tsp53/Δn-ATG41-14* zeigte im Vergleich dazu eine etwas höhere Proteinexpression (siehe Abb. 17A Spur 6),

während die carboxyterminale Mutante *tsp53/Δc-TGA357-2* nur eine etwa halb so starke Expression aufwies (Abb. 17A Spur 4). Für den Klon *tsp53/Δc-TGA308-6* konnte nur ein äußerst schwaches Signal erhalten werden (Abb. 17A Spur 5).

Die Punktmutante *tsp53/P_{mut}312ala-3* zeigte, wie erwartet, das gleiche Laufverhalten wie das *tsp53* „Volle-Länge“ des Klons *tsp53-9*. Die Bande des Klons *tsp53/Δc-TGA357-2* lag etwas niedriger, bei etwa 50kDa. Bei etwa 47kDa konnte das aminoterminal verkürzte *tsp53*-Protein im SDS-Gel nachgewiesen werden. (siehe Abb. 17A Spur 2 bis 6).

(ii) Detektion mit dem carboxyterminal bindenden Antikörper pAb421

Mit pAb421 ließen sich das *tsp53* „Volle-Länge“ des Klons *tsp53-9*, die Punktmutante *tsp53/P_{mut}312ala* sowie das aminoterminal trunkeerte Protein des Klons *tsp53/Δn-ATG41-14* detektieren (siehe Abb. 17B Spur 1 bis 3). Die Intensität der Signale im Westernblot war in allen Fällen etwa gleich stark, was auf vergleichbare steady-state-level in der Proteinexpression der einzelnen *tsp53*-Varianten hinwies (siehe Abb. 17B Spur 1 bis 3). Die beiden carboxyterminal trunkeerten Proteine, *tsp53/Δc-TGA357-2* und *tsp53/Δc-TGA308-6*, denen beiden das Epitop für den Antikörper pAb421 fehlt, konnten im Westernblot erwartungsgemäss nicht detektiert werden (siehe Abb. 17B Spur 4 und 5).

(iii) Detektion mit dem aminoterminal bindenden Antikörper pAb248

Mit dem Antikörper pAb248, der im Aminotermminus von p53 (AS 43 bis 52) bindet, sollten alle Varianten des p53-Proteins nachweisbar sein. Entsprechend konnte das *tsp53* „Volle-Länge“ des Klons *tsp53-9*, die Punktmutante im Klon *tsp53/P_{mut}312ala-3*, als auch die aminoterminal trunkeerte Form im Klon *tsp53/Δn-ATG41-14* mit diesem Antikörper im Westernblot detektiert werden (siehe Abb. 17C Spur 1 bis 3). Dabei zeigte sich für das aminoterminal deletierte Protein ein etwa 2 bis 3-fach stärkeres Signal im Westernblot (siehe Abb. 17C Spur 1 und 3), als für alle anderen *tsp53*-Konstrukte. Für die carboxyterminale Deletionsmutante *tsp53/Δc-TGA357-2* konnte lediglich ein äußerst schwaches Signal mit diesem Antikörper im Westernblot nachgewiesen werden (siehe Abb. 17C Spur 5).

Die Ergebnisse zeigen, dass der steady state-level carboxyterminaler Deletionsmutanten von *tsp53* in den stabil transfizierten Zellen bei nicht-permissiver Temperatur sehr stark eingeschränkt ist.

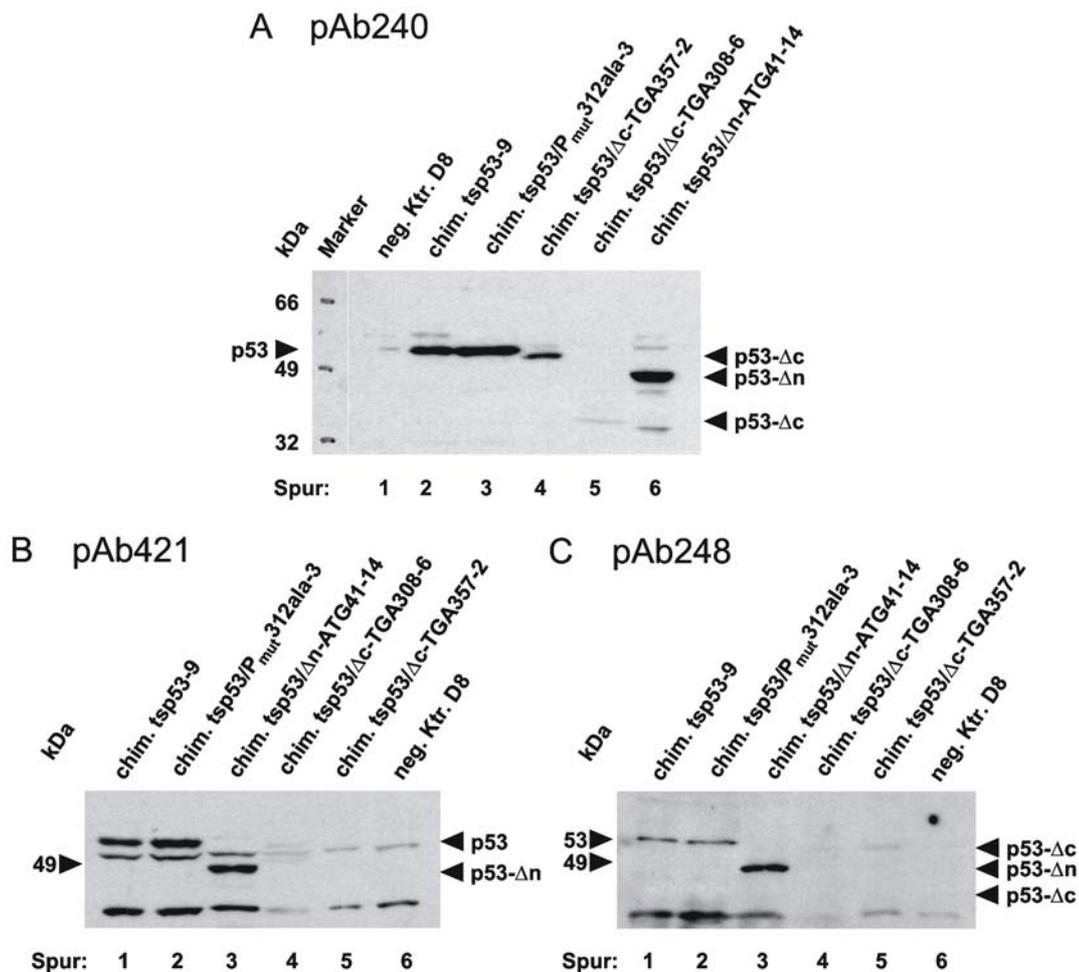


Abbildung 17: Westernblot-Analysen der mit den verschiedenen *tsp53*-Konstrukten stabil transfizierten C6D8-Zellen. **A** zeigt die *tsp53*-Proteinedetektion mit dem in der zentralen Domäne bindenden Antikörper pAb240, **B** mit dem carboxyterminal bindenden Antikörper pAb421 und **C** mit dem aminoterminal bindenden Antikörper pAb248. Die Gesamtproteinmengen in den aufgetragenen Proben wurden angeglichen.

6.4.4 „Steady-state-level“ der *tsp53*-Mutanten in stabil transfizierten C6D8 Zellen nach Wechsel auf die permissive Temperatur

tsp53 liegt bei 39°C in Mutantenkonformation vor. In dieser Konformation zeigt es eine verlängerte Halbwertszeit von ca. 8 Stunden. Nach Überführen auf 32°C nimmt *tsp53* die Wildtypkonformation an und zeigt nun eine Halbwertszeit von ca. 30min. (Gannon und Lane, 1991). Entsprechend verringert sich der „Steady-state-level“ des Proteins bei der permissiven Temperatur. Im folgenden Abschnitt sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit der steady-state-level der Mutantenproteine von *tsp53* nach Überführen der Zellen auf permissive Temperatur in entsprechender Weise reduziert wird.

Zu verschiedenen Zeiten nach dem Wechsel auf die permissive Temperatur wurden von den stabil transfizierten C6D8-Zellen der einzelnen Klone Zelllysate hergestellt. Die

Parentalzelllinie der C6D8-Zellen, die kein *tsp53* exprimiert, diente als Negativkontrolle. 10µg Gesamtprotein jeder Probe wurden unter denaturierenden Bedingungen in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine im Immuno-Westernblot mit den monoklonalen Antikörper pAb248 detektiert (siehe Abb. 18).

Die Kontrolllysate der C6D8 Zellen zeigten im Westernblot keine Bande mit diesem Antikörper (siehe Abb. 18A). Für den Klon *tsp53-9*, der *tsp53* „Volle-Länge“ exprimiert, konnte mit zunehmender Zeit nach dem Temperaturwechsel eine kontinuierliche Reduktion der p53 Menge festgestellt werden (siehe Abb. 18B Spur 1-4). Nach 48 Std. bei permissiver Temperatur waren nur noch geringe Mengen des *tsp53*-Proteins auf dem Blot detektierbar. Wie für das *tsp53* „Volle- Länge“ konnte auch für die Mutante *tsp53/P_{mut}312ala* des Klons 3 eine kontinuierliche Reduktion des Signals über die Zeit nach dem Temperaturwechsel nachgewiesen werden. Insgesamt zeigte sich aber ein wesentlich schwächeres Signal als bei dem *tsp53* „Volle-Länge“ (siehe Abb. 18D Spur 1-4).

Überraschenderweise stieg der steady state level des carboxyterminal trunkierten *tsp53/Δc-TGA357* nach dem Wechsel auf die permissive Temperatur kontinuierlich an (siehe Abb. 18E Spur 1-4). Proteinlysate des *tsp53/Δn-ATG41-14* zeigten 6 Std. nach dem Temperaturwechsel auf 30°C hingegen nur ein schwaches Signal (Abb. 18D; Spur 2-4). Das Maximum der p53 Expression wurde nach 24 Std. erreicht, anschließend verringerte sich die Menge an exprimiertem p53 wieder (siehe Abb. 18C Spur 3+4).

Die Ergebnisse geben einen Anhalt, dass die Punktmutante *tsp53/P_{mut}312ala* sich bei permissiver Temperatur ähnlich wie das *tsp53* „Volle-Länge“ verhält und verstärkt degradiert wird. Der Anstieg des steady state levels der Mutante *tsp53/Δc-TGA357* lässt vermuten, dass die Degradation dieses Proteins bei permissiver Temperatur verringert ist.

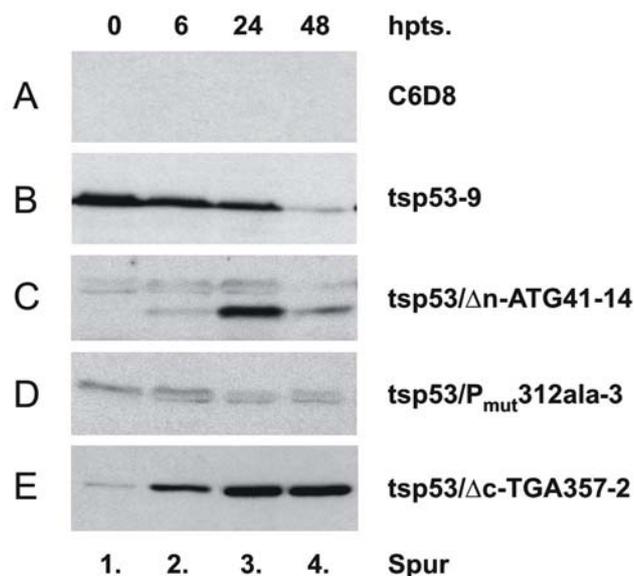


Abbildung 18: Detektion von tsp53 in Lysaten der Klone C6D8 (tsp53 negativ) (A), tsp53-9 (tsp53 „Volle-Länge“) (B), tsp53/Δn-ATG41-14 (C), tsp53/P_{mut}312ala-3 (D) und tsp53/Δc-TGA357-2 (E). Die Linien wurden bei 39°C kultiviert und für 6, 24 und 48Std. auf die permissive Temperatur überführt. Die Zellen wurden lysiert und 10µg Gesamtprotein in einem 10%igen Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrozellulose transferiert und p53 auf der Membran mit dem monoklonalen Antikörper pAb248 nachgewiesen. Die primären Antikörper wurden mit Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörpern über eine enzymatische Chemolumineszenzreaktion detektiert.

6.4.5 Subzelluläre Lokalisation der tsp53 Mutanten bei permissiver Temperatur und Assoziation mit zellulären Strukturen

Im Folgenden wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die Mutationen von tsp53 die Interaktion mit Kernstrukturen und dem Zytoskelett beeinflussen. Dazu wurden die stabil transfizierten C6D8-Zellen von der permissiven auf die nicht-permissive Temperatur gebracht und anschließend mit nicht-ionischen Detergenzien *in situ* lysiert. Mit der Extraktion gehen sämtliche Membranen und zytosolischen Bestandteile verloren, während das Zytoskelett mit assoziierten Proteinen sowie der Zellkerne weitgehend erhalten bleiben.

tsp53 „Volle-Länge“ des Klons tsp53-9 wurde bei der permissiven Temperatur ausschließlich im Zellkern detektiert. Nach dem Wechsel auf die nicht-permissive Temperatur translozierte das Protein in das Zytoplasma (siehe Abb. 19A und B). Zytoplasmatisches p53 blieb auch nach der Extraktion der Zellen in der nicht-löslichen Fraktion. Dies war konform zu früheren Beobachtungen (Klotzsche et al., 1996), die zeigten, dass tsp53 am Zytoskelett verankert wird (siehe Abb. 19C). Der nukleäre Anteil des tsp53-Proteins, der nach dem Temperaturwechsel von 30°C auf 39°C in nicht-lysierten Zellen zu

beobachten war, konnte nach der Extraktion der Zellen nicht mehr detektiert werden (siehe Abb. 19B und C).

Die carboxyterminale Deletionsmutante *tsp53/Δc-TGA357-2* lokalisierte bei permissiver Temperatur in nicht extrahierten Zellen überwiegend im Zytoplasma (siehe Abb. 19D). Der Temperaturwechsel von der permissiven auf die nicht-permissive Temperatur zeigte keine Veränderung der subzellulären Verteilung des Proteins (siehe Abb. 19E). Es blieb in diesen Zellen auch nach der Lysis der Zellen im zytoplasmatischen Kompartiment erhalten, ein Indiz für seine Verankerung am Zytoskelett (siehe Abb. 19F).

Demgegenüber wurde die aminoterminal verkürzte *tsp53*-Mutante, *tsp53/Δn-ATG41-14*, bei permissiver Temperatur ausschließlich im Zellkern detektiert (siehe Abb. 19G). Nach dem Wechsel auf die nicht-permissive Temperatur ließ sich bei dieser Mutante keine Änderung in der subzellulären Verteilung des Proteins nachweisen (siehe Abb. 19H). Das Protein ließ sich nicht aus dem Zellkern extrahieren, lag also offensichtlich im Zellkern in nicht löslicher Form vor und war möglicherweise an das Chromatin gebunden (siehe Abb. 19I).

C6D8-Zellen, die die carboxyterminale Punktmutante *tsp53/P_{mut}312ala-3* exprimierten, zeigten bei permissiver Temperatur ebenfalls eine ausschliesslich nukleäre Lokalisation des p53-Proteins (Abb. 19J). Diese Verteilung blieb auch nach dem Temperaturwechsel auf 39°C erhalten (Abb. 19K). Die Assoziation mit Strukturen des Zellkerns konnte auch durch Extraktion mit dem nicht-ionischen Detergenz nicht aufgehoben werden (siehe Abb. 19L), so dass auch diese Punktmutante offensichtlich an unlösliche Kernstrukturen gebunden wird.

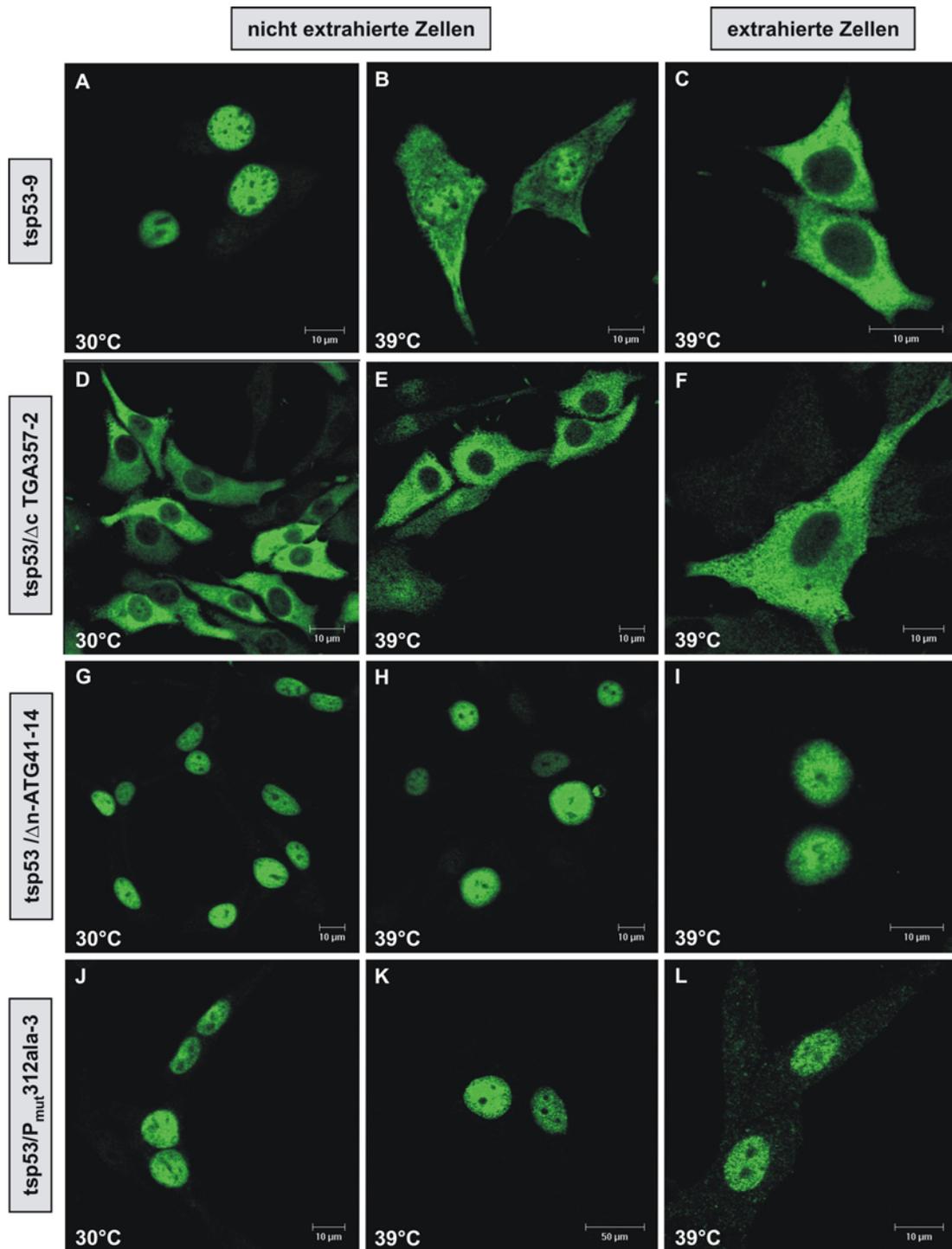


Abbildung 19: Subzelluläre Verteilung der einzelnen tsp53-Formen in den C6D8-Zellen nach Temperaturwechsel und Extraktion. Die Zellen der einzelnen Varianten von tsp53 wurden bis zu einer 40-50%igen Konfluenz bei nicht-permissiver Temperatur kultiviert und im Anschluss daran direkt fixiert; alternativ wurden die Zellen mit Extraktionspuffer (0,5% Triton X-100) für 3-4min. lysiert und anschließend in 2%igen Paraformaldehyd fixiert. p53 wurde mit dem monoklonalen Antikörper pAb248 detektiert. Der verwendete sekundäre Antikörper war FITC-gekoppelt.

Daraus kann gefolgert werden, dass sowohl der Aminoterminus als auch der Carboxyterminus die subzelluläre Lokalisation von tsp53 entscheidend beeinflussen. Während der Verlust des Aminoterminus und der Verlust der Phosphorylierungsstelle in AS312 zu einer konstitutiven Kernlokalisierung führen, bedingt der Verlust des

Carboxyterminus eine konstitutive zytoplasmatische Verankerung des p53-Proteins. Ein funktioneller Carboxyterminus ist also erforderlich, um p53 aus der Verankerung lösen zu können. Der negativ regulatorischen Domäne kommt hier offensichtlich besondere Bedeutung zu.

7 Diskussion

Die Regulation der subzellulären Verteilung von p53 spielt eine wichtige Rolle für die Steuerung seiner Aktivität. Bei Vorgängen der Differenzierung scheint der Kernausschluss von p53 ein adäquates Mittel zu sein, das Protein vorübergehend in einem funktionslosen Zustand zu halten und es bei Bedarf schnell in ausreichender Menge zu aktivieren (Aladjem et al., 1998; Inagaki et al., 1994; Takahashi und Suzuki, 1994). So ist ein Kernausschluss von p53 in normalem Brustgewebe, das während der Laktation differenziert, zu beobachten (Moll et al., 1992). In neuronalen Zellen akkumuliert p53 zum Ende der Differenzierung ebenfalls im Zytoplasma und ist in fehdifferenzierten Zellen an der Induktion der Apoptose beteiligt (Eizenberg et al., 1996).

Auch in der pathologischen Situation der Tumorgenese spielt der Kernausschluss von p53 eine wichtige Rolle. Da eine nukleäre Lokalisation des Proteins Voraussetzung für die Entfaltung der tumorsuppressiven Eigenschaft ist, führt eine zytoplasmatische Sequestrierung zu einer funktionellen Inaktivierung von p53 und begünstigt die Progression von Tumoren (Moll et al., 1996; Shaulsky et al., 1991a; Shaulsky et al., 1991c). Tumore, die Wildtyp p53 im Zytoplasma sequestrierten, entwickeln sich häufig in Geweben, in denen schon während des normalen Differenzierungsprozesses ein Kernausschluss von p53 zu beobachten ist. Fast alle undifferenzierten Neuroblastome, einige Glioblastome, einzelne Zellen in invasiven Retinoblastomen, sowie 30% der entzündlichen Mammakarzinome weisen eine zytoplasmatische Akkumulation von Wildtyp p53 auf (Ali et al., 1994; Moll et al., 1995b; Moll et al., 1992; Schlamp et al., 1997).

Ziel dieser Arbeit war es nun, Domänen von p53 einzugrenzen, die die zytoplasmatische Retention von p53 bestimmen. Dies sollte anhand der temperatursensitiven Mutante von p53 (tsp53^{val135}) geschehen, die nicht nur in ihrer Mutantenkonformation, sondern auch in ihrer Wildtypkonformation im Zytoplasma verankert wird. Letzteres bedingt, dass ihre wachstumssuppressiven Eigenschaften damit unterbunden werden (Knippschild et al., 1996b; Martinez et al., 1991; Martinez et al., 1997).

Die für die Transfektionen verwendete Gliomzelllinie C6 (Benda et al., 1971) exprimiert kein endogenes p53 und bot sich daher als experimentelles System an, um Eigenschaften von p53-Mutanten zu analysieren. Bisherige Untersuchungen an dem tsp53 exprimierenden Subklon C6D8 zeigten eine eindeutige Verankerung von tsp53 mit dem Intermediärfilament Vimentin im Zytoplasma. Als mögliche Bindungsdomänen in p53 kamen sowohl amino- als auch carboxyterminale Bereiche von p53 in Frage. Auch können posttranslationale

Modifikationen (Gu und Roeder, 1997; Meek, 1997; Sakaguchi et al., 1998; Shaw, 1996; Simbulan-Rosenthal et al., 1999), insbesondere reversible Phosphorylierungen, einen entscheidenden Einfluss auf die Interaktion von p53 mit zellulären Proteinen besitzen (Gannon und Lane, 1991). Allerdings konnte bislang kein bestimmter Abschnitt ursächlich für die Retention von p53-Protein im Zytoplasma verantwortlich gemacht werden (Liang und Clarke, 1999; Ostermeyer et al., 1996).

7.1 Die Rolle des Aminoterminus von tsp53 für die zytoplasmatische Verankerung

Um die Bedeutung des Aminoterminus von p53 für die zytoplasmatische Verankerung zu charakterisieren, wurde die aminoternale tsp53 Mutante, tsp53/ Δ n-ATG41 generiert. In der transienten Transfektion zeigte sich, dass die Mutante die temperaturabhängige Verlagerung des Proteins vom Zytoplasma in den Zellkern beibehalten hatte. Unter restriktiven Temperaturbedingungen (39°C) wurde das Protein ausschließlich im Zytoplasma der C6D8-Zellen nachgewiesen. Nach dem Wechsel auf die permissive Temperatur (30°C) translozierte das deletierte p53 Protein in den Zellkern. An diesen Experimenten zeigte sich, dass sich die aminoternale tsp53 Mutante in Bezug auf die subzelluläre Verteilung wie das tsp53 „Volle-Länge“ verhält. (Klotzsche et al., 1998).

In der transienten Transfektion kommt durch Aufnahme einer erhöhten Anzahl von DNA-Molekülen in die Zelle meist zu einer deutlichen Überexpression des exogenen Proteins. In einem alternativen Ansatz wurden deshalb C6D8 Zellen (Klon 14) etabliert, die das Protein der aminoternalen Mutante tsp53/ Δ n-ATG41 stabil exprimieren. Hier allerdings zeigte sich, dass die n-terminale Mutante, auch bei der restriktiven Temperatur im Zellkern akkumulierte.

Der Kernexport von p53 erfolgt hauptsächlich über die Bindung von p53 an Mdm2 (Knippschild et al., 1996b; Lu et al., 2000; Rodriguez-Lopez et al., 2001). Für den Mdm2 vermittelten Kernexport ist eine Phosphorylierung von p53 an Threonin 18 erforderlich, die wiederum vom Phosphorylierungsstatus an Serin15 abhängt (Dumaz et al., 1999). Durch die aminoternale Deletion ist der MDM2-Bindungsort in tsp53/ Δ n-ATG41 verlorengegangen. Das deletierte tsp53 Protein kann folglich nicht mehr an Mdm2 binden und aus dem Zellkern exportiert werden (Gu et al., 2001; Lain et al., 1999; Lu et al., 2000; O'Keefe et al., 2003) und akkumuliert vermutlich deshalb konstitutiv im Zellkern. Zudem wird damit p53 nicht mehr ausreichend der Degradation im Zytoplasma zugeführt. Entsprechend zeigten die C6 Zellen in Westernblotanalysen nach dem Wechsel auf die permissive Temperatur einen

Anstieg in der Proteinmenge des aminoterminal verkürzten tsp53, wohingegen die Menge des tsp53 „Volle-Länge“ abnahm.

Alternativ könnte auch der Wegfall von aminoterminal lokalisierten Phosphorylierungs- bzw. Azetylierungsstellen von p53 die nukleäre Akkumulation der Mutante begünstigen. Posttranslationale Modifikationen des Aminoterminus von p53 besitzen einen entscheidenden Einfluss auf die zytoplasmatische Lokalisation bzw. Retention von p53. Aus der Literatur ist bekannt, dass das p53 Molekül durch Casein-Kinasen an den aminoterminalen Serinresten 4, 6 und 9 sowohl *in-vitro* als auch *in vivo* phosphoryliert werden kann (Knippschild et al., 1997; Milne et al., 1992a). Knippschild et al. konnten in MethA und Clone6 Zellen Unterschiede im Phosphorylierungsstatus aufzeigen, und mit unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation des p53 Proteins in Verbindung bringen (Knippschild et al., 1996a; Knippschild et al., 1996b).

Der Aminoterminus beinhaltet außer der Mdm2-Bindungsdomäne auch ein Kernexportsignal (NES) (AS11-27). Ob dieses aminoterminal Kernexportsignal tatsächlich funktionell ist, ist bislang noch nicht eindeutig geklärt. Es wurde gezeigt, dass das NES nach Auslösen von DNA-Schäden an zwei Stellen phosphoryliert wird und dadurch mit dem carboxyterminal lokalisierten NES interagiert (Zhang und Xiong, 2001). Offensichtlich reicht entgegen früherer Annahmen das carboxyterminale NES alleine nicht aus, um darüber eine Akkumulation des Proteins im Zytoplasma auszulösen.

7.2 Die Rolle des Carboxyterminus von tsp53 Mutanten für die zytoplasmatische Verankerung

Untersuchungen mehrerer Autoren geben Anhaltspunkte dafür, dass der Carboxyterminus von p53 an der Retention des Proteins im Zytoplasma eine Schlüsselrolle spielt. Eine definierte Verankerungsregion konnte auf dem p53 Protein allerdings bislang nicht identifiziert werden. Als Verankerungsdomänen kommen die Tetramerisierungsdomäne, die Region, die von dem Antikörper pAb421 erkannt wird, und der Bereich um das NLS1 in Betracht (Liang et al., 1998; Ostermeyer et al., 1996).

7.2.1 Der carboxyterminalen Deletionsmutante tsp53/ Δ c-TGA308 fehlt eine für die zytoplasmatische Verankerung essentielle Domäne

Der hier generierten carboxyterminalen Mutante, der Mutante *tsp53/Δc-TGA308* fehlen die Kernlokalisierungssignale 1 bis 3, die Tetramerisierungsdomäne sowie die negativ regulatorische Domäne. Shaulsky et al. zeigten, dass für den Kernimport zumindest das Kernlokalisierungssignal 1 vorhanden sein muss (Shaulsky et al., 1990). Der Verlust aller Kernlokalisierungssignale auf p53 führt zwangsläufig zur zytoplasmatischen Akkumulation des Proteins. Entsprechend war das C-terminal verkürzte *tsp53*-Protein nach transientscher Transfektion und Kultivierung der C6-Zellen bei nicht-permissiver Temperatur im Zytoplasma der Zellen detektierbar, bildete dort jedoch Aggregate. Mit Verlust des basisch wirkenden Carboxyterminus gehen hydrophile Domänen verloren. Dies verstärkt die Wirkung der hydrophoben Domänen und begünstigt dadurch die Aggregation des Proteins. Weitergehende funktionelle Studien ließen sich mit dieser Deletionsmutante nicht durchführen. Stabil transfizierte Zellen gingen in einen Wachstumsarrest und starben nach etwa 4-5 Wochen in Kultur ab. Offensichtlich wirkt diese Mutante zytotoxisch.

7.2.2 Der Verlust der negativ regulatorischen Domäne führt zu konstitutiver zytoplasmatischer Verankerung

Differenziertere Aussagen ließen sich mit der carboxyterminalen Mutante *tsp53/Δc-TGA357* erhalten. Dieser Mutante fehlt mit den letzten 30 Aminosäuren die gesamte negativ regulatorische Domäne, sowie die Kernlokalisierungssignale 2 und 3. Das Hauptkernlokalisierungssignal 1, und damit die Bindungsdomäne für das Kernimportprotein Importin α (Kim et al., 2000), sind erhalten. Ebenso die Tetramerisierungsdomäne mit dem darin verborgenen Kernexportsignal und natürlich auch der für den Kernexport essentielle Aminoterminus. Insofern sollten für diese Mutante sowohl der Kernimport als auch der Kernexport funktionell sein und es war zu erwarten, dass sich diese Mutante in der temperaturabhängigen subzellulären Verlagerung wie das *tsp53* „Volle-Länge“ verhalten würde.

Wie die Daten zeigen, lokalisierte die Mutante in der transienten Transfektion bei nicht-permissiver Temperatur im Zytoplasma und verhielt sich damit wie *tsp53* „Volle-Länge“. Überraschenderweise translozierte das verkürzte Protein nach Wechsel auf die permissive Temperatur nicht wie letzteres in den Zellkern. Es wurde ausschließlich im Zytoplasma nachgewiesen. Unwahrscheinlich ist, das hierfür der Verlust der Kernlokalisierungssignale 2 und 3 (NLS 2 und 3) verantwortlich ist. NLS 1 ist, wie bereits oben beschrieben, alleine in der Lage, einen Kerntransport von p53 zu vermitteln (Shaulsky et al., 1990; Shaulsky et al., 1991c). Eine alternative Ursache für die zytoplasmatische Retention dieser C-terminalen Mutante bei restriktiven Wachstumsbedingungen könnte die Überexpression des Proteins

aufgrund der hohen Anzahl an DNA-Kopien sein, die nach transienter Transfektion in den Zellen vorliegt.

Um dies auszuschließen wurden C6D8-Zellen hergestellt, die das C-terminal verkürzte tsp53-Protein stabil exprimieren. Immunfluoreszenz-Untersuchungen zeigten, dass auch in den stabil exprimierenden C6D8-Zellen das deletierte tsp53-Protein tsp53/ Δ c-TGA357 bei permissiver Temperatur im Zytoplasma der Zellen lokalisierte. Western Blots machten deutlich, dass die Menge an cytoplasmatischem tsp53/ Δ c-TGA357 sogar zunahm. In den Extraktionsversuchen eluierte die Mutante nicht mit der löslichen Fraktion, sondern blieb an die Zytoskelettfraction gebunden.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die herausragende Rolle des Carboxyterminus für die zytoplasmatische Verankerung von p53. Sie gehen konform mit Beobachtungen anderer Autoren an Neuroblastomzelllinien, in denen zytoplasmatisch sequestriertes wt-p53 nach Transfektion eines C-terminalen p53-Peptides (DD1 Δ AS 302-390) aus der Verankerung gelöst werden konnte (Ostermeyer et al., 1996). p53 akkumulierte anschließend im Zellkern. Liang und Mitarbeiter zeigten, dass Mutationen im Bereich zwischen den Aminosäuren 326 und 350 zu einer Akkumulation des Proteins im Zellkern führten. Daraus lässt sich der Schluß ziehen, dass die zytoplasmatische Lokalisation bzw. Verankerung von p53 Mutationen im Sequenzbereich zwischen AS 326 bis 355 nicht toleriert (Liang und Clarke, 1999). Die tsp53-Mutante tsp53/ Δ c-357TGA entspricht diesen Vorgaben. Somit liegt die für die zytoplasmatische Retention von p53 verantwortliche Domäne in einem Bereich des Carboxyterminus, der bis hin zur Tetramerisierungsdomäne (AS 290-357) reicht.

7.2.3 Der Phosphorylierungsstatus der c-terminalen Linkerregion beeinflusst die zytoplasmatische Verankerung

Eine besondere Rolle in der zytoplasmatischen Sequestrierung spielt offensichtlich die Linkerregion zwischen der DNA-bindenden Region und dem Carboxyterminus von p53. Liang et al. wiesen nach, dass schon ein einziger Aminosäureaustausch in Position 305, und zwar von Lysin gegen Alanin, ausreicht, um p53 im Zytoplasma zu akkumulieren. Wurden zusätzlich die AS 326-350 deletiert, so akkumulierte p53 wieder im Zellkern (Liang et al., 1998). Allerdings können die Ergebnisse in Abhängigkeit von der verwendeten Zelllinie variieren. In SAOS-2 Zellen lokalisierte mt-p53³⁰⁵ zum Teil auch im Zellkern. Offensichtlich ist nicht nur die Mutation, sondern auch der zelluläre Hintergrund für diesen regulatorischen Prozess entscheidend.

Die Linkerregion enthält mit Serin 309 einen Phosphorylierungsort und besitzt damit potentiell regulatorische Eigenschaften für die Funktion von p53. Knippschild et al. zeigten, dass zytoplasmatisch lokalisiertes tsp53 in Clone 6 Zellen in Aminosäureposition Serin 309 nicht phosphoryliert war, trotz nachweisbarer Kinaseaktivität (Knippschild et al., 1995). Welche Kinase Serin 309 phosphoryliert, ist nicht bekannt. *In-vitro* kann p53 durch verschiedene Proteinkinasen aktiviert werden. Dazu gehören unter anderem die Casein Kinase I (CK I), die Casein Kinase II (CK II), die MAP-Kinase und die Proteinkinase C (PKC). Diese Kinasen sind in der Lage, p53 in unterschiedlichen Bereichen des Amino- und Carboxyterminus zu phosphorylieren (Delphin und Baudier, 1994; Meek, 1994; Milne et al., 1994; Milne et al., 1992a; Milne et al., 1992b; Rolley und Milner, 1994).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Aminosäure Serin in Position 312 gegen Alanin ausgetauscht. In der transienten Transfektion lokalisierte diese Mutante in C6D8-Zellen bei nicht-permissiver Temperatur überwiegend im Zytoplasma. Nach Wechsel auf die permissive Temperatur wurde das Protein im Zellkern nachgewiesen. Dies führte zuerst zu dem Schluss, dass AS 312 keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von p53 besitzt. In stabil transfizierten C6D8-Zellen lokalisierte die Mutante allerdings, unabhängig von der Temperatur, im Zellkern. Offensichtlich wirkt sich die konstitutive Kernlokalisierung des mutierten tsp53-Proteins in der stabilen Transfektion nicht als Selektionsnachteil aus; möglicherweise deshalb, weil es transkriptionell nicht mehr aktiv ist und keine wachstumssuppressiven Eigenschaften aufweist. So kann die Kernlokalisierung auch bei nicht-permissiver Temperatur toleriert werden.

Die Ergebnisse mit der aminoterminalen Mutante und der Mutante tsp53/P_{mut}312ala zeigen auch, dass ein vollständiger Carboxyterminus allein nicht ausreicht, um eine zytoplasmatische Verankerung auszulösen. Die konstitutive Verankerung der carboxyterminalen Mutante tsp53/ Δ c-357TGA lässt vermuten, dass die Verankerung über die regulatorische Domäne reguliert wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die zytoplasmatische Lokalisation von p53 wahrscheinlich nicht alleine Ausdruck der Aktivität einer bestimmten Domäne ist. Veränderungen sowohl im Amino- als auch im Carboxyterminus, also von der Funktion her völlig unterschiedlicher Domänen von p53, können zur gleichen subzellulären Lokalisation des Proteins führen. Dies lässt den Schluss zu, dass die subzelluläre Lokalisation einer Mutante nicht nur die spezifische Struktur des Proteins reflektiert, sondern auch durch den Funktionsstatus der Mutante bestimmt wird. *In-vivo* Untersuchungen sollten zeigen, inwieweit in Tumoren auf bestimmte Mutanten in der carboxy- und aminoterminalen

Domäne selektiert wird und dies mit einer bestimmten subzellulären Lokalisation von p53 korreliert.

8 Literaturverzeichnis

- Aladjem, M. I., Spike, B. T., Rodewald, L. W., Hope, T. J., Klemm, M., Jaenisch, R., and Wahl, G. M. (1998). ES cells do not activate p53-dependent stress responses and undergo p53-independent apoptosis in response to DNA damage. *Curr Biol* 8, 145-155.
- Ali, I. U., Schweitzer, J. B., Ikejiri, B., Saxena, A., Robertson, J. T., and Oldfield, E. H. (1994). Heterogeneity of subcellular localization of p53 protein in human glioblastomas. *Cancer Res* 54, 1-5.
- Anderson, M. E., Woelker, B., Reed, M., Wang, P., and Tegtmeyer, P. (1997). Reciprocal interference between the sequence-specific core and nonspecific C-terminal DNA binding domains of p53: implications for regulation. *Mol Cell Biol* 17, 6255-6264.
- Ausubel, F. M. (1992). Short protocols in molecular biology : a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. Greene Pub Associates ; Wiley, Brooklyn, NY.
- Bakalkin, G., Selivanova, G., Yakovleva, T., Kiseleva, E., Kashuba, E., Magnusson, K. P., Szekely, L., Klein, G., Terenius, L., and Wiman, K. G. (1995). p53 binds single-stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the middle domain. *Nucleic Acids Res* 23, 362-369.
- Bakalkin, G., Yakovleva, T., Selivanova, G., Magnusson, K. P., Szekely, L., Kiseleva, E., Klein, G., Terenius, L., and Wiman, K. G. (1994). p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 413-417.
- Baker, S. J., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Paraskeva, C., Markowitz, S., Willson, J. K., Hamilton, S., and Vogelstein, B. (1990). p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 50, 7717-7722.
- Bargonetti, J., Manfredi, J. J., Chen, X., Marshak, D. R., and Prives, C. (1993). A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein. *Genes Dev* 7, 2565-2574.
- Baum, C., Forster, P., Hegewisch-Becker, S., and Harbers, K. (1994). An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines. *Biotechniques* 17, 1058-1062.
- Benda, P., Lightbody, J., Sato, G., Levine, L., and Sweet, W. (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161, 370-371.
- Benda, P., Someda, K., Messer, J., and Sweet, W. H. (1971). Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. *J Neurosurg* 34, 310-323.
- Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S. W., Luzio, J. P., Simari, R., and Weissberg, P. (1998). Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* 282, 290-293.
- Bertrand, P., Rouillard, D., Boulet, A., Levalois, C., Soussi, T., and Lopez, B. S. (1997). Increase of spontaneous intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells expressing a mutant p53 protein. *Oncogene* 14, 1117-1122.
- Bienz, B., Zakut-Houri, R., Givol, D., and Oren, M. (1984). Analysis of the gene coding for the murine cellular tumour antigen p53. *Embo J* 3, 2179-2183.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bohn, W., Etzrodt, D., Foisner, R., Wiche, G., and Traub, P. (1996). Cytoskeleton architecture of C6 rat glioma cell subclones whole mount electron microscopy and immunogold labeling. *Scanning Microsc Suppl* 10, 285-293; discussion 293-284.

- Bohn, W., Roser, K., Hohenberg, H., Mannweiler, K., and Traub, P. (1993). Cytoskeleton architecture of C6 rat glioma cell subclones differing in intermediate filament protein expression. *J Struct Biol* 111, 48-58.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L., and Boyer, H. W. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2, 95-113.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brain, R., and Jenkins, J. R. (1994). Human p53 directs DNA strand reassociation and is photolabelled by 8-azido ATP. *Oncogene* 9, 1775-1780.
- Bratthauer, G. L. (1999). The peroxidase-antiperoxidase (PAP) method and other all-immunologic detection methods. *Methods Mol Biol* 115, 191-201.
- Brown, D. R., Deb, S., Munoz, R. M., Subler, M. A., and Deb, S. P. (1993). The tumor suppressor p53 and the oncoprotein simian virus 40 T antigen bind to overlapping domains on the MDM2 protein. *Mol Cell Biol* 13, 6849-6857.
- Bullock, W. O., Fernandez, J. N., and Short, J. M. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *Bio-Techniques* 5, 376.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112, 195-203.
- Canman, C. E., Gilmer, T. M., Coutts, S. B., and Kastan, M. B. (1995). Growth factor modulation of p53-mediated growth arrest versus apoptosis. *Genes Dev* 9, 600-611.
- Carson, D. A., and Lois, A. (1995). Cancer progression and p53. *Lancet* 346, 1009-1011.
- Casey, G., Lo-Hsueh, M., Lopez, M. E., Vogelstein, B., and Stanbridge, E. J. (1991). Growth suppression of human breast cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene. *Oncogene* 6, 1791-1797.
- Chen, J., Marechal, V., and Levine, A. J. (1993). Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol* 13, 4107-4114.
- Chen, L., Agrawal, S., Zhou, W., Zhang, R., and Chen, J. (1998). Synergistic activation of p53 by inhibition of MDM2 expression and DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 195-200.
- Chen, P. L., Chen, Y. M., Bookstein, R., and Lee, W. H. (1990). Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science* 250, 1576-1580.
- Chen, X., Ko, L. J., Jayaraman, L., and Prives, C. (1996). p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev* 10, 2438-2451.
- Chen, Y. M., Chen, P. L., Arnaiz, N., Goodrich, D., and Lee, W. H. (1991). Expression of wild-type p53 in human A673 cells suppresses tumorigenicity but not growth rate. *Oncogene* 6, 1799-1805.
- Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326 (Pt 1), 1-16.
- Cordon-Cardo, C., Latres, E., Drobnjak, M., Oliva, M. R., Pollack, D., Woodruff, J. M., Marechal, V., Chen, J., Brennan, M. F., and Levine, A. J. (1994). Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 54, 794-799.
- Crawford, L. V., Pim, D. C., Gurney, E. G., Goodfellow, P., and Taylor-Papadimitriou, J. (1981). Detection of a common feature in several human tumor cell lines--a 53,000-dalton protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 41-45.

-
- Czosnek, H. H., Bienz, B., Givol, D., Zakut-Houri, R., Pravtcheva, D. D., Ruddle, F. H., and Oren, M. (1984). The gene and the pseudogene for mouse p53 cellular tumor antigen are located on different chromosomes. *Mol Cell Biol* *4*, 1638-1640.
 - Delphin, C., and Baudier, J. (1994). The protein kinase C activator, phorbol ester, cooperates with the wild-type p53 species of Ras-transformed embryo fibroblasts growth arrest. *J Biol Chem* *269*, 29579-29587.
 - Deppert, W. (1994). The yin and yang of p53 in cellular proliferation. *Semin Cancer Biol* *5*, 187-202.
 - Diller, L., Kassel, J., Nelson, C. E., Gryka, M. A., Litwak, G., Gebhardt, M., Bressac, B., Ozturk, M., Baker, S. J., Vogelstein, B., and et al. (1990). p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas. *Mol Cell Biol* *10*, 5772-5781.
 - Dittmer, D., Pati, S., Zambetti, G., Chu, S., Teresky, A. K., Moore, M., Finlay, C., and Levine, A. J. (1993). Gain of function mutations in p53. *Nat Genet* *4*, 42-46.
 - Donehower, L. A., and Bradley, A. (1993). The tumor suppressor p53. *Biochim Biophys Acta* *1155*, 181-205.
 - Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* *356*, 215-221.
 - Dumaz, N., Milne, D. M., and Meek, D. W. (1999). Protein kinase CK1 is a p53-threonine 18 kinase which requires prior phosphorylation of serine 15. *FEBS Lett* *463*, 312-316.
 - Dutta, A., Ruppert, J. M., Aster, J. C., and Winchester, E. (1993). Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. *Nature* *365*, 79-82.
 - Eizenberg, O., Faber-Elman, A., Gottlieb, E., Oren, M., Rotter, V., and Schwartz, M. (1996). p53 plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of central nervous system-associated cells. *Mol Cell Biol* *16*, 5178-5185.
 - el-Deiry, W. S., Harper, J. W., O'Connor, P. M., Velculescu, V. E., Canman, C. E., Jackman, J., Pietenpol, J. A., Burrell, M., Hill, D. E., Wang, Y., and et al. (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* *54*, 1169-1174.
 - el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* *75*, 817-825.
 - Eliyahu, D., Michalovitz, D., Eliyahu, S., Pinhasi-Kimhi, O., and Oren, M. (1989). Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 8763-8767.
 - Eliyahu, D., Michalovitz, D., and Oren, M. (1985). Overproduction of p53 antigen makes established cells highly tumorigenic. *Nature* *316*, 158-160.
 - Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D., and Oren, M. (1984). Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* *312*, 646-649.
 - Eskes, R., Antonsson, B., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Richter, C., Sadoul, R., Mazzei, G., Nichols, A., and Martinou, J. C. (1998). Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *J Cell Biol* *143*, 217-224.
 - Etzrodt, D. (1996). Untersuchungen zur Komplettierung des Zytoskelettsystems durch Vimentininduktion und -transfektion in intermediärfilamentfreien Zellen der Ratte-Gliazelllinie C6. Dissertation.
 - Fields, S., and Jang, S. K. (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* *249*, 1046-1049.
-

-
- Finlay, C. A., Hinds, P. W., and Levine, A. J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 57, 1083-1093.
 - Finlay, C. A., Hinds, P. W., Tan, T. H., Eliyahu, D., Oren, M., and Levine, A. J. (1988). Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 8, 531-539.
 - Fiscella, M., Ullrich, S. J., Zambrano, N., Shields, M. T., Lin, D., Lees-Miller, S. P., Anderson, C. W., Mercer, W. E., and Appella, E. (1993). Mutation of the serine 15 phosphorylation site of human p53 reduces the ability of p53 to inhibit cell cycle progression. *Oncogene* 8, 1519-1528.
 - Ford, J. M., and Hanawalt, P. C. (1995). Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8876-8880.
 - Gannon, J. V., Greaves, R., Iggo, R., and Lane, D. P. (1990). Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *Embo J* 9, 1595-1602.
 - Gannon, J. V., and Lane, D. P. (1991). Protein synthesis required to anchor a mutant p53 protein which is temperature-sensitive for nuclear transport. *Nature* 349, 802-806.
 - Giaccia, A. J., and Kastan, M. B. (1998). The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 12, 2973-2983.
 - Goping, I. S., Gross, A., Lavoie, J. N., Nguyen, M., Jemmerson, R., Roth, K., Korsmeyer, S. J., and Shore, G. C. (1998). Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol* 143, 207-215.
 - Gottlieb, T. M., and Oren, M. (1996). p53 in growth control and neoplasia. *Biochim Biophys Acta* 1287, 77-102.
 - Graeber, T. G., Peterson, J. F., Tsai, M., Monica, K., Fornace, A. J., Jr., and Giaccia, A. J. (1994). Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol Cell Biol* 14, 6264-6277.
 - Gu, J., Nie, L., Kawai, H., and Yuan, Z. M. (2001). Subcellular distribution of p53 and p73 are differentially regulated by MDM2. *Cancer Res* 61, 6703-6707.
 - Gu, W., and Roeder, R. G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90, 595-606.
 - Halazonetis, T. D., Davis, L. J., and Kandil, A. N. (1993). Wild-type p53 adopts a 'mutant'-like conformation when bound to DNA. *Embo J* 12, 1021-1028.
 - Halevy, O., Michalovitz, D., and Oren, M. (1990). Different tumor-derived p53 mutants exhibit distinct biological activities. *Science* 250, 113-116.
 - Hall, S. R., Campbell, L. E., and Meek, D. W. (1996). Phosphorylation of p53 at the casein kinase II site selectively regulates p53-dependent transcriptional repression but not transactivation. *Nucleic Acids Res* 24, 1119-1126.
 - Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
 - Harlow, E., Crawford, L. V., Pim, D. C., and Williamson, N. M. (1981). Monoclonal antibodies specific for simian virus 40 tumor antigens. *J Virol* 39, 861-869.
 - Hartwig, J. H. (1992). Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation. *J Cell Biol* 118, 1421-1442.
 - Harvey, M., Vogel, H., Morris, D., Bradley, A., Bernstein, A., and Donehower, L. A. (1995). A mutant p53 transgene accelerates tumour development in heterozygous but not nullizygous p53-deficient mice. *Nat Genet* 9, 305-311.

- Hateboer, G., Kerkhoven, R. M., Shvarts, A., Bernards, R., and Beijersbergen, R. L. (1996). Degradation of E2F by the ubiquitin-proteasome pathway: regulation by retinoblastoma family proteins and adenovirus transforming proteins. *Genes Dev* 10, 2960-2970.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-299.
- Haupt, Y., and Oren, M. (1996). p53-mediated apoptosis: mechanisms and regulation. *Behring Inst Mitt*, 32-59.
- Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Vousden, K. H., and Oren, M. (1995). Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev* 9, 2170-2183.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1, 3-11.
- Hinds, P., Finlay, C., and Levine, A. J. (1989). Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J Virol* 63, 739-746.
- Hinds, P. W., Finlay, C. A., Quartin, R. S., Baker, S. J., Fearon, E. R., Vogelstein, B., and Levine, A. J. (1990). Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes. *Cell Growth Differ* 1, 571-580.
- Hoffmann, R., Craik, D. J., Pierens, G., Bolger, R. E., and 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.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49-53.
- Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420, 25-27.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M., and Howley, P. M. (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *Embo J* 10, 4129-4135.
- Hupp, T. R., Meek, D. W., Midgley, C. A., and Lane, D. P. (1992). Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* 71, 875-886.
- Hupp, T. R., Sparks, A., and Lane, D. P. (1995). Small peptides activate the latent sequence-specific DNA binding function of p53. *Cell* 83, 237-245.
- Iavarone, A., Matthay, K. K., Steinkirchner, T. M., and Israel, M. A. (1992). Germ-line and somatic p53 gene mutations in multifocal osteogenic sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4207-4209.
- Inagaki, T., Matsuwari, S., Takahashi, R., Shimada, K., Fujie, K., and Maeda, S. (1994). Establishment of human oral-cancer cell lines (KOSC-2 and -3) carrying p53 and c-myc abnormalities by geneticin treatment. *Int J Cancer* 56, 301-308.
- Isobe, M., Emanuel, B. S., Givol, D., Oren, M., and Croce, C. M. (1986). Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 320, 84-85.
- Jabbur, J. R., Huang, P., and Zhang, W. (2000). DNA damage-induced phosphorylation of p53 at serine 20 correlates with p21 and Mdm-2 induction in vivo. *Oncogene* 19, 6203-6208.
- Jacks, T., Remington, L., Williams, B. O., Schmitt, E. M., Halachmi, S., Bronson, R. T., and Weinberg, R. A. (1994). Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* 4, 1-7.
- Janus, F., Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Wiesmuller, L., Grosse, F., and Deppert, W. (1999a). The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cell Mol Life Sci* 55, 12-27.

- Janus, F., Albrechtsen, N., Knippschild, U., Wiesmuller, L., Grosse, F., and Deppert, W. (1999b). Different regulation of the p53 core domain activities 3'-to-5' exonuclease and sequence-specific DNA binding. *Mol Cell Biol* 19, 2155-2168.
- Jenkins, J. R., Chumakov, P., Addison, C., Sturzbecher, H. W., and Wade-Evans, A. (1988). Two distinct regions of the murine p53 primary amino acid sequence are implicated in stable complex formation with simian virus 40 T antigen. *J Virol* 62, 3903-3906.
- Kaiser, A. D., and Hogness, D. S. (1960). The transformation of *Escherichia coli* with deoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage lambda-dg. *J Mol Biol* 2, 392-415.
- Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Craig, R. W. (1991a). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51, 6304-6311.
- Kastan, M. B., Radin, A. I., Kuerbitz, S. J., Onyekwere, O., Wolkow, C. A., Civin, C. I., Stone, K. D., Woo, T., Ravindranath, Y., and Craig, R. W. (1991b). Levels of p53 protein increase with maturation in human hematopoietic cells. *Cancer Res* 51, 4279-4286.
- Kastan, M. B., Zhan, Q., el-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B., and Fornace, A. J., Jr. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 71, 587-597.
- Kern, S. E., Fearon, E. R., Tersmette, K. W., Enterline, J. P., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Vogelstein, B., and Hamilton, S. R. (1989). Clinical and pathological associations with allelic loss in colorectal carcinoma [corrected]. *Jama* 261, 3099-3103.
- Kim, I. S., Kim, D. H., Han, S. M., Chin, M. U., Nam, H. J., Cho, H. P., Choi, S. Y., Song, B. J., Kim, E. R., Bae, Y. S., and Moon, Y. H. (2000). Truncated form of importin alpha identified in breast cancer cell inhibits nuclear import of p53. *J Biol Chem* 275, 23139-23145.
- Klotzsche, O., Etzrodt, D., Hohenberg, H., Bohn, W., and Deppert, W. (1998). Cytoplasmic retention of mutant *tsp53* is dependent on an intermediate filament protein (vimentin) scaffold. *Oncogene* 16, 3423-3434.
- Knippschild, U., Kolzau, T., and Deppert, W. (1995). Cell-specific transcriptional activation of the *mdm2*-gene by ectopically expressed wild-type form of a temperature-sensitive mutant p53. *Oncogene* 11, 683-690.
- Knippschild, U., Milne, D., Campbell, L., and Meek, D. (1996a). p53 N-terminus-targeted protein kinase activity is stimulated in response to wild type p53 and DNA damage. *Oncogene* 13, 1387-1393.
- Knippschild, U., Milne, D. M., Campbell, L. E., DeMaggio, A. J., Christenson, E., Hoekstra, M. F., and Meek, D. W. (1997). p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by the delta and epsilon isoforms of casein kinase 1 and enhances the level of casein kinase 1 delta in response to topoisomerase-directed drugs. *Oncogene* 15, 1727-1736.
- Knippschild, U., Oren, M., and Deppert, W. (1996b). Abrogation of wild-type p53 mediated growth-inhibition by nuclear exclusion. *Oncogene* 12, 1755-1765.
- Ko, L. J., and Prives, C. (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 10, 1054-1072.
- Kubbutat, M. H., Jones, S. N., and Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299-303.
- Kuerbitz, S. J., Plunkett, B. S., Walsh, W. V., and Kastan, M. B. (1992). Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7491-7495.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lain, S., Xirodimas, D., and Lane, D. P. (1999). Accumulating active p53 in the nucleus by inhibition of nuclear export: a novel strategy to promote the p53 tumor suppressor function. *Exp Cell Res* 253, 315-324.

-
- Lamb, P., and Crawford, L. (1986). Characterization of the human p53 gene. *Mol Cell Biol* 6, 1379-1385.
 - Lane, D. P., and Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261-263.
 - Lane, D. P., Lu, X., Hupp, T., and Hall, P. A. (1994). The role of the p53 protein in the apoptotic response. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 345, 277-280.
 - Lee, S., Elenbaas, B., Levine, A., and Griffith, J. (1995). p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell* 81, 1013-1020.
 - Lee, S. E., Mitchell, R. A., Cheng, A., and Hendrickson, E. A. (1997). Evidence for DNA-PK-dependent and -independent DNA double-strand break repair pathways in mammalian cells as a function of the cell cycle. *Mol Cell Biol* 17, 1425-1433.
 - Lees-Miller, S. P., Sakaguchi, K., Ullrich, S. J., Appella, E., and Anderson, C. W. (1992). Human DNA-activated protein kinase phosphorylates serines 15 and 37 in the amino-terminal transactivation domain of human p53. *Mol Cell Biol* 12, 5041-5049.
 - Levine, A. J., Momand, J., and Finlay, C. A. (1991). The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351, 453-456.
 - Li, F. P., and Fraumeni, J. F., Jr. (1969). Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 71, 747-752.
 - Li, G., and Ho, V. C. (1998). p53-dependent DNA repair and apoptosis respond differently to high- and low-dose ultraviolet radiation. *Br J Dermatol* 139, 3-10.
 - Li, M., Chen, D., Shiloh, A., Luo, J., Nikolaev, A. Y., Qin, J., and Gu, W. (2002a). Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* 416, 648-653.
 - Li, M., Luo, J., Brooks, C. L., and Gu, W. (2002b). Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J Biol Chem* 277, 50607-50611.
 - Li, R., and Botchan, M. R. (1993). The acidic transcriptional activation domains of VP16 and p53 bind the cellular replication protein A and stimulate in vitro BPV-1 DNA replication. *Cell* 73, 1207-1221.
 - Li, R., Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., and Stillman, B. (1994). Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature* 371, 534-537.
 - Liang, S. H., and Clarke, M. F. (1999). A bipartite nuclear localization signal is required for p53 nuclear import regulated by a carboxyl-terminal domain. *J Biol Chem* 274, 32699-32703.
 - Liang, S. H., Hong, D., and Clarke, M. F. (1998). Cooperation of a single lysine mutation and a C-terminal domain in the cytoplasmic sequestration of the p53 protein. *J Biol Chem* 273, 19817-19821.
 - Lowe, S. W., Schmitt, E. M., Smith, S. W., Osborne, B. A., and Jacks, T. (1993). p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* 362, 847-849.
 - Lu, H., and Levine, A. J. (1995). Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5154-5158.
 - Lu, W., Pochampally, R., Chen, L., Traidej, M., Wang, Y., and Chen, J. (2000). Nuclear exclusion of p53 in a subset of tumors requires MDM2 function. *Oncogene* 19, 232-240.
 - Malkin, D. (1993). p53 and the Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 66, 83-92.
 - Malkin, D. (1994). p53 and the Li-Fraumeni syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1198, 197-213.

- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Martinez, J., Georgoff, I., and Levine, A. J. (1991). Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature-sensitive p53 protein. *Genes Dev* 5, 151-159.
- Martinez, J. D., Craven, M. T., Joseloff, E., Milczarek, G., and Bowden, G. T. (1997). Regulation of DNA binding and transactivation in p53 by nuclear localization and phosphorylation. *Oncogene* 14, 2511-2520.
- Masuda, H., Miller, C., Koeffler, H. P., Battifora, H., and Cline, M. J. (1987). Rearrangement of the p53 gene in human osteogenic sarcomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7716-7719.
- Matsumoto, H., Shimura, M., Omatsu, T., Okaichi, K., Majima, H., and Ohnishi, T. (1994). p53 proteins accumulated by heat stress associate with heat shock proteins HSP72/HSC73 in human glioblastoma cell lines. *Cancer Lett* 87, 39-46.
- Mayr, G. A., Reed, M., Wang, P., Wang, Y., Schweds, J. F., and Tegtmeyer, P. (1995). Serine phosphorylation in the NH2 terminus of p53 facilitates transactivation. *Cancer Res* 55, 2410-2417.
- Mechali, M., Almouzni, G., Andeol, Y., Moreau, J., Vriza, S., Leibovici, M., Hourdry, J., Geraudie, J., Soussi, T., and Gusse, M. (1990). Genes and mechanisms involved in early embryonic development in *Xenopus laevis*. *Int J Dev Biol* 34, 51-59.
- Meek, D. W. (1994). Post-translational modification of p53. *Semin Cancer Biol* 5, 203-210.
- Meek, D. W. (1997). Post-translational modification of p53 and the integration of stress signals. *Pathol Biol (Paris)* 45, 804-814.
- Meek, D. W. (1998). Multisite phosphorylation and the integration of stress signals at p53. *Cell Signal* 10, 159-166.
- Mekeel, K. L., Tang, W., Kachnic, L. A., Luo, C. M., DeFrank, J. S., and Powell, S. N. (1997). Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. *Oncogene* 14, 1847-1857.
- Mercer, W. E., Amin, M., Sauve, G. J., Appella, E., Ullrich, S. J., and Romano, J. W. (1990). Wild type human p53 is antiproliferative in SV40-transformed hamster cells. *Oncogene* 5, 973-980.
- Messing, J. (1983). New M13 vectors for cloning. *Methods Enzymol* 101, 20-78.
- Michalovitz, D., Halevy, O., and Oren, M. (1990). Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell* 62, 671-680.
- Middeler, G., Zerf, K., Jenovai, S., Thulig, A., Tschodrich-Rotter, M., Kubitscheck, U., and Peters, R. (1997). The tumor suppressor p53 is subject to both nuclear import and export, and both are fast, energy-dependent and lectin-inhibited. *Oncogene* 14, 1407-1417.
- Midgley, C. A., and Lane, D. P. (1997). p53 protein stability in tumour cells is not determined by mutation but is dependent on Mdm2 binding. *Oncogene* 15, 1179-1189.
- Midgley, C. A., Owens, B., Briscoe, C. V., Thomas, D. B., Lane, D. P., and Hall, P. A. (1995). Coupling between gamma irradiation, p53 induction and the apoptotic response depends upon cell type in vivo. *J Cell Sci* 108 (Pt 5), 1843-1848.
- Milne, D. M., Campbell, D. G., Caudwell, F. B., and Meek, D. W. (1994). Phosphorylation of the tumor suppressor protein p53 by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 269, 9253-9260.
- Milne, D. M., Palmer, R. H., Campbell, D. G., and Meek, D. W. (1992a). Phosphorylation of the p53 tumour-suppressor protein at three N-terminal sites by a novel casein kinase I-like enzyme. *Oncogene* 7, 1361-1369.

- Milne, D. M., Palmer, R. H., and Meek, D. W. (1992b). Mutation of the casein kinase II phosphorylation site abolishes the anti-proliferative activity of p53. *Nucleic Acids Res* 20, 5565-5570.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B., and Reed, J. C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799-1805.
- Miyashita, T., and Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299.
- Moll, U. M., LaQuaglia, M., Benard, J., and Riou, G. (1995a). Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4407-4411.
- Moll, U. M., Ostermeyer, A. G., Ahomadegbe, J. C., Mathieu, M. C., and Riou, G. (1995b). p53 mediated tumor cell response to chemotherapeutic DNA damage: a preliminary study in matched pairs of breast cancer biopsies. *Hum Pathol* 26, 1293-1301.
- Moll, U. M., Ostermeyer, A. G., Haladay, R., Winkfield, B., Frazier, M., and Zambetti, G. (1996). Cytoplasmic sequestration of wild-type p53 protein impairs the G1 checkpoint after DNA damage. *Mol Cell Biol* 16, 1126-1137.
- Moll, U. M., Riou, G., and Levine, A. J. (1992). Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7262-7266.
- Momand, J., Wu, H. H., and Dasgupta, G. (2000). MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* 242, 15-29.
- Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., and Levine, A. J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69, 1237-1245.
- Montenarh, M., Kohler, M., and Henning, R. (1986). Complex formation of simian virus 40 large T antigen with cellular protein p53. *J Virol* 60, 761-764.
- Montenarh, M., and Quaiser, A. (1989). Two different protein-protein interactions in oligomeric complexes of SV40 large T antigen with the cellular oncoprotein p53. *Oncogene* 4, 379-382.
- Mummenbrauer, T., Janus, F., Muller, B., Wiesmuller, L., Deppert, W., and Grosse, F. (1996). p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell* 85, 1089-1099.
- Nedbal, W., Frey, M., Willemann, B., Zentgraf, H., and Sczakiel, G. (1997). Mechanistic insights into p53-promoted RNA-RNA annealing. *J Mol Biol* 266, 677-687.
- Nikolaev, A. Y., and Gu, W. (2003). PARC: a potential target for cancer therapy. *Cell Cycle* 2, 169-171.
- Nikolaev, A. Y., Li, M., Puskas, N., Qin, J., and Gu, W. (2003). Parc: a cytoplasmic anchor for p53. *Cell* 112, 29-40.
- Oberosler, P., Hloch, P., Ramsperger, U., and Stahl, H. (1993). p53-catalyzed annealing of complementary single-stranded nucleic acids. *Embo J* 12, 2389-2396.
- O'Keefe, K., Li, H., and Zhang, Y. (2003). Nucleocytoplasmic shuttling of p53 is essential for MDM2-mediated cytoplasmic degradation but not ubiquitination. *Mol Cell Biol* 23, 6396-6405.
- Oliner, J. D., Kinzler, K. W., Meltzer, P. S., George, D. L., and Vogelstein, B. (1992). Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 358, 80-83.
- Oltvai, Z. N., Milliman, C. L., and Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619.

- Oren, M. (1985). The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochim Biophys Acta* 823, 67-78.
- Ostermeyer, A. G., Runko, E., Winkfield, B., Ahn, B., and Moll, U. M. (1996). Cytoplasmically sequestered wild-type p53 protein in neuroblastoma is relocated to the nucleus by a C-terminal peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15190-15194.
- Otto, A., and Deppert, W. (1993). Upregulation of mdm-2 expression in Meth A tumor cells tolerating wild-type p53. *Oncogene* 8, 2591-2603.
- Parada, L. F., Land, H., Weinberg, R. A., Wolf, D., and Rotter, V. (1984). Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* 312, 649-651.
- Patschinsky, T., and Deppert, W. (1990). Phosphorylation of p53 in primary, immortalised and transformed Balb/c mouse cells. *Oncogene* 5, 1071-1076.
- Pavletich, N. P., Chambers, K. A., and Pabo, C. O. (1993). The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev* 7, 2556-2564.
- Peterson, G. L. (1983). Determination of total protein. *Methods Enzymol* 91, 95-119.
- Picksley, S. M., and Lane, D. P. (1993). The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? *Bioessays* 15, 689-690.
- Pohl, J., Goldfinger, N., Radler-Pohl, A., Rotter, V., and Schirmacher, V. (1988). p53 increases experimental metastatic capacity of murine carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 8, 2078-2081.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389, 300-305.
- Raycroft, L., Wu, H. Y., and Lozano, G. (1990). Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science* 249, 1049-1051.
- Rodriguez-Lopez, A. M., Xenaki, D., Eden, T. O., Hickman, J. A., and Chresta, C. M. (2001). MDM2 mediated nuclear exclusion of p53 attenuates etoposide-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Mol Pharmacol* 59, 135-143.
- Rolley, N., and Milner, J. (1994). Specific DNA binding by p53 is independent of mutation at serine 389, the casein kinase II site. *Oncogene* 9, 3067-3070.
- Roser, K., Bohn, W., Giese, G., and Mannweiler, K. (1991). Subclones of C6 rat glioma cells differing in intermediate filament protein expression. *Exp Cell Res* 197, 200-206.
- Rotter, V., and Wolf, D. (1985). Biological and molecular analysis of p53 cellular-encoded tumor antigen. *Adv Cancer Res* 43, 113-141.
- Sakaguchi, K., Herrera, J. E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C. W., and Appella, E. (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* 12, 2831-2841.
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H., and Elledge, S. J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* 277, 1497-1501.
- Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, C. A., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M., and Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 265, 687-695.
- Sarnow, P., Ho, Y. S., Williams, J., and Levine, A. J. (1982). Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell* 28, 387-394.

- Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D., and Howley, P. M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495-505.
- Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., and Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63, 1129-1136.
- Schlamp, C. L., Poulsen, G. L., Nork, T. M., and Nickells, R. W. (1997). Nuclear exclusion of wild-type p53 in immortalized human retinoblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* 89, 1530-1536.
- Schuler, M., Bossy-Wetzel, E., Goldstein, J. C., Fitzgerald, P., and Green, D. R. (2000). p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *J Biol Chem* 275, 7337-7342.
- Schuler, M., and Green, D. R. (2001). Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* 29, 684-688.
- Schwartz, D., Almog, N., Peled, A., Goldfinger, N., and Rotter, V. (1997). Role of wild type p53 in the G2 phase: regulation of the gamma-irradiation-induced delay and DNA repair. *Oncogene* 15, 2597-2607.
- Sembritzki, O., Hagel, C., Lamszus, K., Deppert, W., and Bohn, W. (2002). Cytoplasmic localization of wild-type p53 in glioblastomas correlates with expression of vimentin and glial fibrillary acidic protein. *Neuro-oncol* 4, 171-178.
- Sengupta, S., Vonesch, J. L., Waltzinger, C., Zheng, H., and Wasyluk, B. (2000). Negative cross-talk between p53 and the glucocorticoid receptor and its role in neuroblastoma cells. *Embo J* 19, 6051-6064.
- Sengupta, S., and Wasyluk, B. (2001). Ligand-dependent interaction of the glucocorticoid receptor with p53 enhances their degradation by Hdm2. *Genes Dev* 15, 2367-2380.
- Seto, E., Usheva, A., Zambetti, G. P., Momand, J., Horikoshi, N., Weinmann, R., Levine, A. J., and Shenk, T. (1992). Wild-type p53 binds to the TATA-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 12028-12032.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben-Ze'ev, A., and Rotter, V. (1990). Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 10, 6565-6577.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Peled, A., and Rotter, V. (1991a). Involvement of wild-type p53 protein in the cell cycle requires nuclear localization. *Cell Growth Differ* 2, 661-667.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., and Rotter, V. (1991b). Alterations in tumor development in vivo mediated by expression of wild type or mutant p53 proteins. *Cancer Res* 51, 5232-5237.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Tosky, M. S., Levine, A. J., and Rotter, V. (1991c). Nuclear localization is essential for the activity of p53 protein. *Oncogene* 6, 2055-2065.
- Shaw, P. H. (1996). The role of p53 in cell cycle regulation. *Pathol Res Pract* 192, 669-675.
- Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91, 325-334.
- Simbulan-Rosenthal, C. M., Rosenthal, D. S., Luo, R., and Smulson, M. E. (1999). Poly(ADP-ribosylation) of p53 during apoptosis in human osteosarcoma cells. *Cancer Res* 59, 2190-2194.
- Smith, M. L., Chen, I. T., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C. Y., Gilmer, T. M., Kastan, M. B., O'Connor, P. M., and Fornace, A. J., Jr. (1994). Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* 266, 1376-1380.
- Smith, M. L., Chen, I. T., Zhan, Q., O'Connor, P. M., and Fornace, A. J., Jr. (1995). Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene* 10, 1053-1059.

-
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
 - Soussi, T., Caron de Fromental, C., and May, P. (1990). Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 5, 945-952.
 - Srivastava, S., Zou, Z. Q., Pirolo, K., Blattner, W., and Chang, E. H. (1990). Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 348, 747-749.
 - Stad, R., Little, N. A., Xirodimas, D. P., Frenk, R., van der Eb, A. J., Lane, D. P., Saville, M. K., and Jochemsen, A. G. (2001). Mdmx stabilizes p53 and Mdm2 via two distinct mechanisms. *EMBO Rep* 2, 1029-1034.
 - Steegenga, W. T., Riteco, N., Jochemsen, A. G., Fallaux, F. J., and Bos, J. L. (1998). The large E1B protein together with the E4orf6 protein target p53 for active degradation in adenovirus infected cells. *Oncogene* 16, 349-357.
 - Steegenga, W. T., van Laar, T., Riteco, N., Mandarino, A., Shvarts, A., van der Eb, A. J., and Jochemsen, A. G. (1996). Adenovirus E1A proteins inhibit activation of transcription by p53. *Mol Cell Biol* 16, 2101-2109.
 - Steinmeyer, K., and Deppert, W. (1988). DNA binding properties of murine p53. *Oncogene* 3, 501-507.
 - Stewart, N., Hicks, G. G., Paraskevas, F., and Mowat, M. (1995). Evidence for a second cell cycle block at G2/M by p53. *Oncogene* 10, 109-115.
 - Stommel, J. M., Marchenko, N. D., Jimenez, G. S., Moll, U. M., Hope, T. J., and 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.
 - Sturzbecher, H. W., Brain, R., Addison, C., Rudge, K., Remm, M., Grimaldi, M., Keenan, E., and Jenkins, J. R. (1992). A C-terminal alpha-helix plus basic region motif is the major structural determinant of p53 tetramerization. *Oncogene* 7, 1513-1523.
 - Sturzbecher, H. W., Donzelmann, B., Henning, W., Knippschild, U., and Buchhop, S. (1996). p53 is linked directly to homologous recombination processes via RAD51/RecA protein interaction. *Embo J* 15, 1992-2002.
 - Suggs, S. V., Wallace, R. B., Hirose, T., Kawashima, E. H., and Itakura, K. (1981). Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 6613-6617.
 - Sutcliffe, J. G. (1978). pBR322 restriction map derived from the DNA sequence: accurate DNA size markers up to 4361 nucleotide pairs long. *Nucleic Acids Res* 5, 2721-2728.
 - Szekely, L., Selivanova, G., Magnusson, K. P., Klein, G., and Wiman, K. G. (1993). EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5455-5459.
 - Takahashi, K., and Suzuki, K. (1994). DNA synthesis-associated nuclear exclusion of p53 in normal human breast epithelial cells in culture. *Oncogene* 9, 183-188.
 - Tan, T. H., Wallis, J., and Levine, A. J. (1986). Identification of the p53 protein domain involved in formation of the simian virus 40 large T-antigen-p53 protein complex. *J Virol* 59, 574-583.
 - Thut, C. J., Chen, J. L., Klemm, R., and Tjian, R. (1995). p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science* 267, 100-104.
 - Toguchida, J., Yamaguchi, T., Dayton, S. H., Beauchamp, R. L., Herrera, G. E., Ishizaki, K., Yamamuro, T., Meyers, P. A., Little, J. B., Sasaki, M. S., and et al. (1992). Prevalence and

spectrum of germline mutations of the p53 gene among patients with sarcoma. *N Engl J Med* 326, 1301-1308.

- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Truant, R., Antunovic, J., Greenblatt, J., Prives, C., and Cromlish, J. A. (1995). Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 leads to inhibition by HBx of p53 response element-directed transactivation. *J Virol* 69, 1851-1859.
- Unger, T., Sionov, R. V., Moallem, E., Yee, C. L., Howley, P. M., Oren, M., and Haupt, Y. (1999). Mutations in serines 15 and 20 of human p53 impair its apoptotic activity. *Oncogene* 18, 3205-3212.
- Waga, S., Hannon, G. J., Beach, D., and Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369, 574-578.
- Wagner, A. J., Kokontis, J. M., and Hay, N. (1994). Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21waf1/cip1. *Genes Dev* 8, 2817-2830.
- Walker, K. K., and Levine, A. J. (1996). Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15335-15340.
- Wang, H., and Beckner, S. K. (1992). A colorimetric method for detection of specific ligand binding. *Anal Biochem* 204, 59-64.
- Wang, X. W., Yeh, H., Schaeffer, L., Roy, R., Moncollin, V., Egly, J. M., Wang, Z., Freidberg, E. C., Evans, M. K., Taffe, B. G., and et al. (1995). p53 modulation of TFIID-associated nucleotide excision repair activity. *Nat Genet* 10, 188-195.
- Wang, Y., Reed, M., Wang, P., Stenger, J. E., Mayr, G., Anderson, M. E., Schwedes, J. F., and Tegtmeyer, P. (1993). p53 domains: identification and characterization of two autonomous DNA-binding regions. *Genes Dev* 7, 2575-2586.
- Wang, Z., Svejstrup, J. Q., Feaver, W. J., Wu, X., Kornberg, R. D., and Friedberg, E. C. (1994). Transcription factor b (TFIIB) is required during nucleotide-excision repair in yeast. *Nature* 368, 74-76.
- Werness, B. A., Levine, A. J., and Howley, P. M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248, 76-79.
- White, E. (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 10, 1-15.
- Wiesmuller, L., Cammenga, J., and Deppert, W. W. (1996). In vivo assay of p53 function in homologous recombination between simian virus 40 chromosomes. *J Virol* 70, 737-744.
- Will, K., Warnecke, G., Albrechtsen, N., Boulikas, T., and Deppert, W. (1998). High affinity MAR-DNA binding is a common property of murine and human mutant p53. *J Cell Biochem* 69, 260-270.
- Wolf, D., Admon, S., Oren, M., and Rotter, V. (1984a). Abelson murine leukemia virus-transformed cells that lack p53 protein synthesis express aberrant p53 mRNA species. *Mol Cell Biol* 4, 552-558.
- Wolf, D., Harris, N., and Rotter, V. (1984b). Reconstitution of p53 expression in a nonproducer Ab-MuLV-transformed cell line by transfection of a functional p53 gene. *Cell* 38, 119-126.
- Wolf, D., and Rotter, V. (1985). Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 790-794.

- Xiao, H., Pearson, A., Coulombe, B., Truant, R., Zhang, S., Regier, J. L., Triezenberg, S. J., Reinberg, D., Flores, O., Ingles, C. J., and et al. (1994). Binding of basal transcription factor TFIID to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Mol Cell Biol* 14, 7013-7024.
- Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., and Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-704.
- Yang, J., Winkler, K., Yoshida, M., and 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.
- Yewdell, J. W., Gannon, J. V., and Lane, D. P. (1986). Monoclonal antibody analysis of p53 expression in normal and transformed cells. *J Virol* 59, 444-452.
- Zaika, A., Marchenko, N., and Moll, U. M. (1999). Cytoplasmically "sequestered" wild type p53 protein is resistant to Mdm2-mediated degradation. *J Biol Chem* 274, 27474-27480.
- Zakut-Houri, R., Biernacki, B., Givol, D., and Oren, M. (1985). Human p53 cellular tumor antigen: cDNA sequence and expression in COS cells. *Embo J* 4, 1251-1255.
- Zeng, Y., and Piwnicka-Worms, H. (1999). DNA damage and replication checkpoints in fission yeast require nuclear exclusion of the Cdc25 phosphatase via 14-3-3 binding. *Mol Cell Biol* 19, 7410-7419.
- Zeng, Z. S., Sarkis, A. S., Zhang, Z. F., Klimstra, D. S., Charytonowicz, E., Guillem, J. G., Cordon-Cardo, C., and Cohen, A. M. (1994). p53 nuclear overexpression: an independent predictor of survival in lymph node-positive colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 12, 2043-2050.
- Zhang, Y., and Xiong, Y. (2001). A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* 292, 1910-1915.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Struktur des Tumorsuppressors p53.	12
Abbildung 2:	Funktion von p53.	16
Abbildung 3:	Subzelluläre Lokalisation und Funktion der temperatursensitiven Mutante tsp53 ^{val135} .	24
Abbildung 4:	Kontrolle der Integration des carboxyterminalen tsp53-Fragmentes in den pUC19-Vektor.	52
Abbildung 5:	Kontrolle der <i>in-vitro</i> Mutagenese der carboxyterminalen Mutanten pUC19 Δc-tsp53/TGA-308 und pUC19 Δc-tsp53/TGA-357.	53
Abbildung 6:	Selektionsanalysen und Sequenzierungskontrollen der carboxyterminalen Punktmutante pUC19 tsp53/Δc-P _{mut} 312ala.	55
Abbildung 7:	Klonierungsstrategie für die Herstellung von eukaryontischen Expressionsvektoren, die für ein carboxyterminal mutiertes tsp53 kodieren.	56
Abbildung 8:	Kontrolle der Umklonierung in den pCI-neo Expressionsvektor durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen.	58
Abbildung 9:	Klonierungsstrategie für einen eukaryontischen Expressionsvektor, der für ein aminoterminal verkürztes tsp53 kodiert (pCI-neo/tsp53 Δn-ATG41).	59
Abbildung 10:	Kontrolle der Dreifachligation, sowie Nachweis der aminoterminal verkürzten Mutante pCI-neo/tsp53 Δn-ATG41.	60
Abbildung 11:	Sequenzierung der Deletionsmutante pCI-neo/Δn tsp53-ATG41.	61
Abbildung 12:	Westernblotanalyse der verkürzten tsp53-Proteine tsp53/Δn-ATG41 und tsp53/Δc-TGA357 im Vergleich zum tsp53 „Volle-Länge“.	63
Abbildung 13:	Detektion von tsp53 und tsp53-Mutanten in der Immunfluoreszenz mit den p53-Antikörpern pAb240, pAb421 und pAb242 nach transienter Transfektion von C6D8-Zellen.	65
Abbildung 14:	Subzelluläre Lokalisation der tsp53 Mutanten bei nicht-permissiver Temperatur (39°C) in C6D8 Zellen nach transienter Transfektion.	66
Abbildung 15:	Subzelluläre Lokalisation der tsp53 Mutanten in C6D8 Zellen bei permissiver Temperatur (30°C) nach transienter Transfektion.	67
Abbildung 16:	Expression von <i>tsp53</i> -Konstrukten in stabil transfizierten C6D8-Zellen.	72
Abbildung 17:	Westernblot-Analysen der mit den verschiedenen tsp53-Konstrukten stabil transfizierten C6D8-Zellen.	74
Abbildung 18:	Detektion von tsp53 in Lysaten der Klone C6D8 (tsp53 negativ) (A), tsp53-9 (tsp53 „Volle-Länge“) (B), tsp53/Δn-ATG41-14 (C), tsp53/P _{mut} 312ala-3 (D) und tsp53/Δc-TGA357-2 (E).	76
Abbildung 19:	Subzelluläre Verteilung der einzelnen tsp53-Formen in den C6D8-Zellen nach Temperaturwechsel und Extraktion.	78

10 Anhang

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN:

- NAME: Thorsten Eismann
- ANSCHRIFT: Nelly-Sachs Str. 42
89134 Blaustein
Tel.: 0731/5097820
- GEBURTSTAG: 4. Juni 1971
- GEBURTSORT: Erlenbach a/M
- STAATSANGEHÖRIGKEIT: deutsch
- FAMILIENSTAND: ledig

SCHULAU SBILDUNG:

- 1978 – 1980 Grunds chule Peterstrasse, in Wuppertal
- 1980 – 1982 Grunds chule Vallintin Ballmann, in Obernburg a/M
- 1982 – 1992 Herman-Staudinger Gymnasium, in Erlenbach a/M
Abschluss: Abitur

WEHR- UND ZIVILD IENST:

- Jun. 1992 – Jul. 1992 Wehrdienst in der Bundeswehrkaserne Veitshöchheim
- Jul. 1992 – Sep. 1993 Zivildienst im Kreiskrankenhaus Miltenberg a/M

STUDIUM:

- NOV. 1993 – SEP 1995 Medizin an der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg (Herbst 1995: ärztliche Vorprüfung)
- OKT. 1995 – MAI 2003 Medizin an der Universität in Hamburg
Frühjahr 1997 1ster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Frühjahr 2002 2ter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Frühjahr 2003 3ter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Praktisches Jahr (April`02 bis April`03):

STIPENDIEN:

- OKT. 1997 – OKT. 1999 Stipendiat der Werner-Otto-Stiftung

BERUF:

- SEIT SEP. 2003 Angestellt im Universitätsklinikum Ulm, in der Abteilung für Viszeral- und Transplantationschirurgie, bei Fr. Prof. Dr. Henne-Bruns als Assistenzarzt

Blaustein, den

(Th. Eismann)

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

(Th. Eismann)

Danksagung

Mein erster Dank gilt ganz besonders Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert, ohne dessen Einsatz und durch seine, mir zur Verfügung gestellten Möglichkeiten, die Bearbeitung dieses Themas innerhalb dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Die große Geduld sowie die vielen kleinen und GROßEN Denkanstöße haben sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen und somit den Weg zu diesem Ziel geebnet.

Ebenfalls einen sehr großen Dank richte ich an Herrn PD Dr. Wolfgang Bohn, der durch seine vielen kontroversen und regen Diskussionen einen erheblichen Anteil bei der und in der Durchführung dieser Arbeit beigetragen hat. Dank gilt auch der immer freundschaftlichen und zugleich kompetenten Betreuung, in denen diese Arbeit entstand sowie der von Ihnen sehr angenehm geschaffenen Atmosphäre.

Mein ganz ganz besonderer Dank geht an Dr. Oliver Klotzsche. Ohne seine stetige Geduld, seine ständige Erklärungsbereitschaft, seine hervorragenden Motivationskünste, seine immer neuen Ideen und seine Vermittlung experimenteller Techniken, haben diese Arbeit zu dem werden lassen. Dafür nochmals meinen besten Dank, Oliver!

Weiterhin möchte ich Martin Stöter danken, der sich mühevoll durch sehr viel geduldiges Papier hat quälen dürfen und durch dessen konstruktive Diskussionen die Arbeit in den letzten Wochen und Monaten stets vorrangetrieben wurde. Dafür auch Dir besten Dank!

Meiner Freundin Nadine Huber danke ich, die mich nicht nur beim Schreiben und den unzähligen Korrekturen stets motiviert hat, sondern auch in schwierigen und stressigen Zeiten gezeigt hat, dass es auch andere wichtige Dinge zu erleben gibt, ausserhalb der Medizin bzw. Wissenschaft. Danke für deine oftmals überbeanspruchte Geduld und dass Du bei all den durchgemachten Höhen und Tiefen mir stets einen großen Rückhalt gegeben hast. DANKE!

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken für die Ermöglichung dieses Studiums, durch das ich somit den Einstieg und das Interesse an der Wissenschaft gefunden habe.