

**KOOPERATION VON P53 UND RB2/P130
IN DER INDUKTION
ZELLULÄRER SENESZENZ**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Heike Julia Helmbold
aus Tübingen

Hamburg 2006

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Deppert
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Hahn

Tag der Disputation: 27.07.06

Diese Arbeit wurde am Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg in der Abteilung für Tumorstudiologie durchgeführt und von Herrn PD Dr. Wolfgang Bohn betreut.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Helmbold H, Deppert W, Bohn W: Regulation of Cellular Senescence by Rb2/p130. *Oncogene Reviews* 2006. *In press*.

Kapic A, Helmbold H, Reimer R, Klotzsche O, Deppert W, Bohn W: Cooperation between p53 and p130(Rb2) in induction of cellular senescence. *Cell Death Differ.* 2006 Feb;13(2):324-34.

Speidel D, Helmbold H, Deppert W: Dissection of transcriptional and non-transcriptional p53 activities in the response to genotoxic stress. *Oncogene.* 2006 Feb 9;25(6):940-53.

für meine Eltern

<u>INHALTSVERZEICHNIS</u>	1
INHALTSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
ZUSAMMENFASSUNG	8
ABSTRACT	9
I. EINLEITUNG	10
I.1. Steuerung der Zellzyklusphasen durch Zykline und Zyklin-abhängige Kinasen (CDK)	11
I.1.1. G ₀ /G ₁ Phase	11
I.1.2. S Phase	15
I.1.3. G ₂ und M Phase	17
I.2. Funktionen des Tumorsuppressors p53 in der Regulation des Zellzyklus	18
I.3. Negative Regulation des Übergangs der G₁ in die S Phase	21
I.3.1. CDK-Inhibitoren	21
I.3.2. Negative Regulation der CDK-Aktivität durch Phosphorylierung	24
I.4. Onkogenese durch Deregulation der G₁ Phase	26
II. PROBLEMSTELLUNG	28
III. MATERIAL	30
III.1. Zelllinien	30
III.1.1. Eukaryotische Zelllinien	30
III.1.2. Prokaryotische Zelllinien	30
III.2. Plasmide	30
III.3. siRNA Sequenzen	31
III.4. Oligonukleotide	31

III.5. Normalseren	32
III.6. Antikörper	32
III.6.1. Primäre Antikörper	32
III.6.2. Sekundäre, enzymgekoppelte Antikörper	33
III.6.3. Sekundäre Fluorochrom-gekoppelte Antikörper	33
III.7. Fluoreszenzfarbstoff für die DNA Färbung	33
III.8. Molekulargewichtstandards	33
III.9. Enzyme	34
III.10. Chemikalien und andere Materialien	34
III.11. Puffer und Lösungen	36
III.12. Verbrauchsmaterialien	40
III.13. Geräte	41
IV. METHODEN	43
IV.1. Arbeiten mit prokaryotischen Zellen	43
IV.1.1. LB-Medium und Agarplatten	43
IV.1.2. Herstellung transformationskompetenter Bakterien	43
IV.1.3. Transformation von <i>E. coli</i> DH5 α mit Plasmiden	44
IV.1.4. Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> Zellen	44
IV.1.5. Glyzerolkultur transformierter Bakterien	46
IV.2. Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	46
IV.2.1. Kultivierung von eukaryotischen Zellen	46
IV.2.2. Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen	46
IV.2.3. β -Galaktosidase Test	47
IV.2.4. Immunfluoreszenzmarkierung	47
IV.2.5. BrdU-Einbau	48
IV.2.6. TUNEL Test	49

IV.2.7.	Durchflusszytometrie	49
IV.2.8.	Bestrahlung von Zellen mit ultraviolettem Licht	50
IV.2.9.	Transfektion von Expressionsplasmiden	51
IV.2.10.	Transfektion von siRNA	51
IV.3.	Proteinanalytische Methoden	52
IV.3.1.	Zellyse	52
IV.3.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration	53
IV.3.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	53
IV.3.4.	Western Blot	54
IV.3.5.	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membran	54
IV.3.6.	ECL Reaktion	55
IV.3.7.	Ablösen von Antikörperkomplexen von der Nitrozellulose-Membran	55
IV.4.	Nukleinsäure-analytische Methoden	56
IV.4.1.	Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)	56
IV.4.2.	Phenol/Chloroform Extraktion und DNA-Präparation	57
IV.4.3.	Agarose Gelelektrophorese	58
IV.4.4.	Restriktionsspaltung von Nukleinsäuren	58
IV.4.5.	DNA Extraktion aus Agarosegelen	59
IV.4.6.	5' Dephosphorylierung von DNA Fragmenten	59
IV.4.7.	5' Phosphorylierung von PCR-Fragmenten zur Klonierung	59
IV.4.8.	DNA-Ligation	60
IV.4.9.	Blau-Weiß Selektion	60
IV.4.10.	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	61
IV.4.11.	Sequenzierung	62
IV.4.12.	RNA Präparation	63
IV.4.13.	RT-PCR	64
IV.4.14.	Herstellen von siRNA	64

V.	ERGEBNISSE	66
V.1.	Die Expression von Wildtyp p53^{Val135} führt zu zellulärer Seneszenz	66
V.1.1.	Durch die Expression der p53 ^{Val135} Wildtyp-Form wird ein stabiler G1 Arrest induziert	66
V.1.2.	Der G1 Arrest ist unabhängig von der Änderung der Kulturbedingungen	69
V.1.3.	Der Arrest ist durch die Repression von Zyklin A und die Akkumulation von Zyklin E gekennzeichnet	71
V.1.4.	Im Arrest akkumulieren die CDK-Inhibitoren p21 ^{CIP1} und p27 ^{KIP1}	74
V.1.5.	Die Aktivierung des Arrests führt zu qualitativen und quantitativen Veränderungen in der Expression der Retinoblastom-Proteine	76
V.1.6.	Die arretierten Zellen zeigen Merkmale der Seneszenz	78
V.2.	Die Inaktivierung von Wildtyp p53 in arretierten C6D10-5 Zellen führt zu S Phase-Aktivität, nicht aber zur Proliferation der Zellen	80
V.2.1.	Die p53 Wildtyp-Form ist essentiell, um den G1/S Arrest aufrecht zu erhalten	80
V.2.2.	Nach Inaktivierung von Wildtyp p53 zeigen C6D10-5 Zellen S Phase-Aktivität	84
V.2.3.	Inaktivierung von p53 führt nicht zu Proliferation, sondern zu Apoptose	88
V.2.4.	Senescente C6D10-5 Zellen akkumulieren DNA Schäden, die eine mögliche Ursache für die Induktion der Apoptose darstellen	92
V.3.	Die Wildtypform von p53^{Val135} kooperiert mit Rb2/p130 in der Aufrechterhaltung des seneszenten Wachstumsarrests	94
V.3.1.	Die Inaktivierung der Retinoblastom-Proteine in arretierten Zellen durch E1A-12S führt zu vermehrter S Phase-Aktivität	94
V.3.2.	Die Reduzierung von Rb2/p130 durch spezifische siRNA reicht aus, um den Wachstumsarrest aufzuheben	97
V.3.3.	Die Repression des <i>Zyklin A</i> Promoters durch Rb2/p130 ist essentiell für die Aufrechterhaltung des Arrests	101
V.3.4.	Die Expression von ektoem Zyklin A ist ausreichend für die Aufhebung des seneszenten Wachstumsarrests	103

VI. DISKUSSION	108
VI.1. Schlüsselfunktion von p21^{CIP1} in der Induktion zellulärer Seneszenz	110
VI.2. Die Familie der Retinoblastom-Proteine	111
VI.3. Veränderte Expression der Retinoblastom-Proteine im seneszenten Arrest	113
VI.4. Deregulierte Expression von Zyklin E durch Abwesenheit von pRb/p105	116
VI.5. Induktion zellulärer Seneszenz durch Rb2/p130-vermittelte Repression des <i>Zyklin A</i> Promotors	118
VI.6. Irreversibilität des Arrests durch p53-unabhängige Apoptose	120
VI.7. Kooperation von p53 und Rb2/p130 zur Kontrolle des G1/S Übergangs bei defektem p16^{INK4A}-pRb/p105 Signalweg	122
VII. LITERATURVERZEICHNIS	126
VIII. SICHERHEITSTECHNISCHE DATEN	147
VIII.1. Gefahrenstoffe	147
VIII.2. Verzeichnis der Gefahrensymbole	148
VIII.3. Verzeichnis der R- und S- Sätze	148
DANKSAGUNG	152

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

APC	Anaphase <i>Promoting</i> Komplex
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	<i>alternative reading frame</i>
ATM	Ataxia telangiectasia <i>mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	ATM- <i>related</i>
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CAK	CDK-aktivierende Kinase
cdk	cyclin dependent kinase
cDNA	<i>copy</i> DNA
ChIP	Chromatin Immunpräzipitation
Cip	CDK <i>inhibitory protein</i>
DAPI	4,6 Diamidino-2-phenylidol
ddNTPs	Didesoxynukleotide
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxynukleotide
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E1A	<i>early region 1 A</i>
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	Fötale Kälberserum
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
hBRM/BRG1	Mitglieder der SWI/SNF Familie
HDAC	Histon-Deacetylase
HEPES	(N-2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'(2-ethansulfonsäure)
hnRNA	heterogene nukleäre RNA
HP1	Heterochromatin Protein 1
HPV	humanes Papillomvirus
IgG	Immunglobulin G
INK4	<i>Inhibitors of cdk4</i>

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Kip	<i>Kinase inhibitory protein</i>
LB	Luria-Bertani
MCS	<i>multiple cloning site</i>
Mdm2	<i>Murine double minute 2</i>
MPF	Mitose <i>Promoting</i> Faktor
OD	optische Dichte
p.a.	<i>pro analysis</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PGS	Protein G Sepharose
PI	Propidiumiodid
Rb	Retinoblastoma
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	<i>reverse transcriptase</i> PCR
SA- β -Gal	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase
SCF	Skp1-Cullin-F box Proteinkomplex
scr	<i>scrambled</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
SOB	<i>super optimal broth</i>
SOC	<i>super optimal broth, catabolite repression</i>
Suv39H1	<i>suppressor of variegation 3-9 homolog 1</i>
SV40	Simian Virus 40
SWI/SNF	<i>switch/sucrose nonfermenting</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N' Tetramethyl ethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP nick end labeling</i>
UV	Ultraviolette Strahlung
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

ZUSAMMENFASSUNG

Defekte in der Zellzykluskontrolle und in der DNA-Reparatur führen zu deregulierter Proliferation und genetischer Instabilität. Die Dysregulation der G1 Phase ist häufig das initiale Ereignis in der Tumorentstehung, fast immer ist dabei der $p16^{INK4A}$ -pRb und/oder der ARF-p53 Signalweg in seiner Funktion gestört. Die Inaktivierung der Signalwege erfolgt meistens durch Mutation oder Deletion der Tumorsuppressorgene $p16^{INK4A}$, *ARF* und *p53*. In der Therapie von Tumoren mit solchen genetischen Veränderungen kann die Reaktivierung der Signalwege durch Rekonstitution der inaktivierten Proteine eine Möglichkeit darstellen, die Kontrolle über die entgleiste Proliferation wiederherzustellen.

Ein Subklon der $p16^{INK4A}$, *ARF* und *p53* negativen Rattenglioblastom-Zelllinie C6, der stabil mit der temperatursensitiven Mutante p53 Val135 transfiziert ist, wurde zur detaillierten Analyse der durch p53 reaktivierten Signalwege genutzt. Die Expression von Wildtyp p53 in dieser Zelllinie führt zu einem stabilen Arrest in der späten G1 Phase, in dem die Zellen Merkmale zellulärer Seneszenz ausprägen. Der Arrest wird durch die p53-abhängige Transaktivierung von *p21* induziert und ist durch die Akkumulation von Zyklin E und die Repression der Zyklin A-Expression charakterisiert. Die Induktion des Wachstumsarrests führt zu einem Wechsel in der Expression der Retinoblastom-Proteine von pRb/p105 und p107 in proliferierenden Zellen zu Rb2/p130 in den arretierten Zellen. Die Akkumulation der hypophosphorylierten Form von Rb2/p130 in seneszenten C6 Zellen ist für die Aufrechterhaltung des Arrests von essentieller Bedeutung. Die direkte Interaktion von Rb2/p130 mit dem *Zyklin A* Promotor hat die transkriptionelle Repression der Zyklin A Expression zur Folge. Nach Inaktivierung von p53 in seneszenten C6 Zellen sind diese in der Lage, erneut Zyklin A zu exprimieren und aus dem G1 Arrest in die S Phase überzugehen. Eine Proliferation der Zellen wird jedoch durch die Induktion des programmierten Zelltods unterbunden. Die Ursache dafür liegt vermutlich in der Akkumulation von DNA-Schäden während des Wachstumsarrests und in einer aberranten Mitose.

Die Aufklärung dieses Signalwegs ist von großer Bedeutung für die Therapie von Apoptose-resistenten Tumoren, welche Wildtyp p53 exprimieren und einen Defekt im $p16^{INK4A}$ -pRb Signalweg aufweisen. Durch die Kooperation von p53 mit Rb2/p130 kann in $p16^{INK4A}$ und *ARF* negativen Tumorzellen ein stabiler, seneszenten Arrest induziert werden, durch den das Wachstum der Tumore unterdrückt wird.

Schlagnworte: p53, Rb2/p130, zelluläre Seneszenz

ABSTRACT

Defects in cell cycle control and in DNA repair lead to a deregulated proliferation and genetic instability of cells. The dysregulation in G1 phase of the cell cycle is often the initial event in tumor development, and in almost every case the p16^{INK4A}-pRb and/or the ARF-p53 signaling pathway is disrupted. The inactivation of these pathways mostly occurs by mutation or deletion of the tumor suppressor genes *p16^{INK4A}*, *ARF*, and *p53*. For tumor therapy, the reactivation of these signalling pathways by reconstitution of inactivated proteins might be a possibility to regain the control of a deregulated proliferation.

A subclone of the *p16^{INK4A}*, *ARF* and *p53* negative rat glioblastoma cell line C6, which is stably transfected with the temperature-sensitive mutant p53 Val135, has been used for detailed analysis of pathways reactivated by functions of p53. The expression of wildtype p53 in the C6 glioblastoma cell line leads to a stable arrest in late G1, with cells developing characteristic features of cellular senescence. The arrest is induced by the p53-dependent transactivation of *p21*, and is characterized by the accumulation of cyclin E and the repression of cyclin A expression. Induction of the growth arrest leads to a change in the retinoblastoma protein expression from pRb/p105 and p107 in cycling cells to Rb2/p130 in arrested cells. Accumulation of the hypophosphorylated form of Rb2/p130 in senescent C6 cells is of fundamental importance in the maintenance of the arrest. Direct interaction of Rb2/p130 with the *cyclin A* promoter results in transcriptional repression of cyclin A expression. After inactivation of p53, senescent C6 cells are able to newly express cyclin A and to pass from the G1 arrest into S phase. However, proliferation of these cells is prevented by the induction of programmed cell death, likely due to accumulation of DNA damage during the arrest and to aberrant mitosis.

Elucidation of this signaling pathway is of major importance for the therapy of apoptosis-resistant tumors which express wildtype p53 and show defects in the p16^{INK4A}-pRb signaling pathway. The cooperation of p53 and Rb2/p130 induces a stable senescent arrest in *p16^{INK4A}* and *ARF* negative tumor cells, suppressing the growth of these tumors.

Key words: p53, Rb2/p130, cellular senescence

I. EINLEITUNG

Die Fähigkeit, sich selbst replizieren zu können, ist eine grundlegende Eigenschaft des Lebens. Auf zellulärer Ebene spiegelt sie sich in einem hoch organisierten Prozess wider, der mit der G1 Phase startet und über DNA-Replikation zur Teilung der Zelle führt. Zeitpunkt und Ort der Zellteilung müssen strikt geregelt werden, um die Integrität des Organismus zu bewahren und Tumorentstehung zu vermeiden.

Mammalia-Zellen besitzen ein komplexes System molekularer Sensoren und Signalwege, mit dem sie der Gefahr der Tumorentstehung entgegensteuern können. Durch dieses System können beispielsweise aberrante mitogene Signale, die verstärkte Proliferation vermitteln, oder auch DNA Schäden, welche die Integrität des Genoms gefährden, erfasst werden. Dieser onkogene Stress aktiviert in der Zelle Signalwege, welche die Proliferation unterbrechen und die geschädigte Zelle durch einen permanenten Wachstumsarrest oder durch Apoptose aus dem Zellverband eliminieren.

Proteine, die hier eine Schlüsselfunktion besitzen, und damit die Entstehung von Tumoren unterbinden können, werden als Tumorsuppressoren bezeichnet. Zur Gruppe der Tumorsuppressoren gehören zum Beispiel die Zellzyklus-Regulatoren p53 und pRb/p105, die Kinase-Inhibitoren p27^{KIP1} und p16^{INK4A} und Proteine, welche in die Erkennung und Reparatur von DNA-Schäden involviert sind, wie ATM und BRCA-1 und -2 (Hanahan and Weinberg 2000). Durch die Funktionen der Tumorsuppressoren kann die Proliferation der Zelle an bestimmten Kontrollpunkten des Zellzyklus gestoppt werden. Da die Tumorsuppressoren in einem Netzwerk aus Signalproteinen wirken, führt ihre Aktivität in Abhängigkeit von den kooperierenden Faktoren zu einem transienten oder permanenten Zellzyklusarrest oder aber zu Apoptose.

Mutationen in Tumorsuppressor-Genen inaktivieren das kontrollierende Netzwerk aus Signalwegen und führen zu unkontrollierter Proliferation. Zusätzlich fördern Proto-Onkogene, die nach Mutationen in ihren Regulator- oder Strukturregionen verstärkt transkribiert werden und damit zu einer übermäßigen Aktivität des exprimierten Proteins führen, ein aberrantes Zellwachstum. Bekannte Proto-Onkogene sind zum Beispiel der Wachstumsfaktor PDGF, der Wachstumsfaktor-Rezeptor HER2/neu, das Signalprotein Ras und der Transkriptionsfaktor Myc.

Mehrere genetische Veränderungen von verschiedenen Zellzyklus-Regulatoren sind notwendig, um die Kontrolle über den Zellzyklus außer Kraft zu setzen und aus normalen Zellen Tumorzellen entstehen zu lassen (Hahn and Weinberg 2002).

I.1. Steuerung der Zellzyklusphasen durch Zykline und Zyklin-abhängige Kinasen (CDK)

Der Zellzyklus der Mammalia-Zellen ist eine Abfolge von vier hoch organisierten Phasen: der G1 Phase (*gap 1*), der S Phase (DNA Synthese), der G2 Phase (*gap 2*) und der M Phase (Mitose) (Abbildung 1). Wenn Zellen die Proliferation aufgrund von fehlenden mitogenen Signalen oder durch spezifische antimitogene Signale einstellen, gehen sie aus dem Zellzyklus in einen ruhenden Zustand, die Go Phase. Nach Schlüsselereignissen, wie zum Beispiel DNA-Schaden oder unvollendeter DNA-Replikation, kann der Zellzyklus an bestimmten Kontrollpunkten unterbrochen werden. Die Zelle kann dadurch überwachen, ob vorausgegangene Abläufe, die für die Zellteilung benötigt werden, korrekt beendet wurden. So wird die nächste Phase erst dann gestartet, wenn die vorherige erfolgreich beendet wurde.

I.1.1. Go/G1 Phase

Mammalia-Zellen haben eine in ihrer Dauer variable G1 Phase, in der Wachstumsfaktoren und die Verfügbarkeit von Nährstoffen bestimmen, ob die Zelle die DNA Replikation aufnimmt und sich teilt oder den Zellzyklus verlässt, um temporär oder permanent in der Ruhephase Go zu verweilen (Abbildung 1) . Wenn die Zelle von mitogen-abhängigem Wachstum in der frühen G1 Phase zu Wachstumsfaktor-unabhängiger Progression in die S Phase übergeht, ist sie festgelegt, den Zellzyklus bis zur nächsten G1 Phase zu durchlaufen. Der Punkt, an dem die Entscheidung zwischen dem Verweilen in der Ruhephase oder dem Durchlaufen des Zellzyklus bis zur nächsten Zellteilung getroffen wird, wird als Restriktionspunkt bezeichnet (Abbildung 1). Er markiert den Übergang von mitogen-abhängiger zu mitogen-unabhängiger Kinase-Aktivität (Pardee 1989).

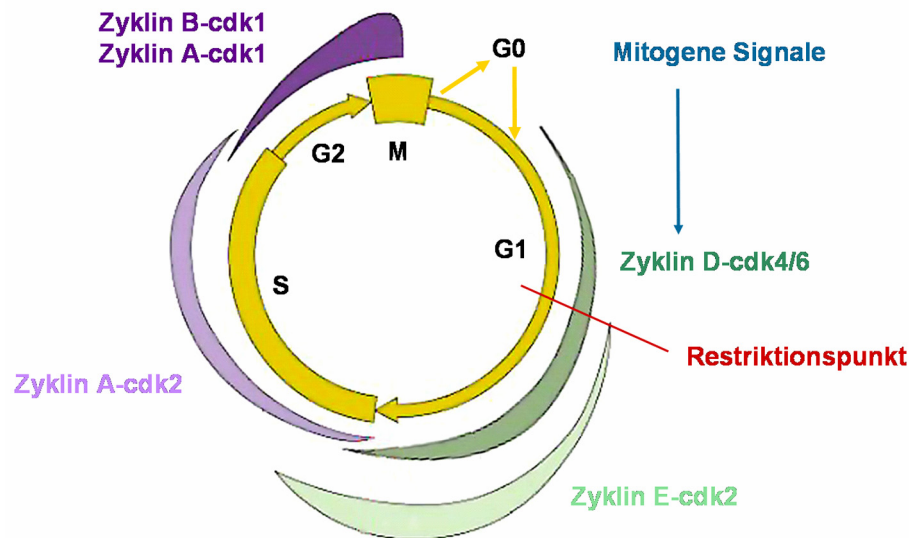


Abbildung 1: Expression der verschiedenen Zyklone in den 4 Phasen des Zellzyklus.

Ruhende Zellen (G0) werden durch mitogene Stimuli angeregt, in den Zellzyklus einzutreten. In Folge der mitogenen Signale werden in der frühen G1 Phase zunächst D-Typ Zyklone exprimiert, die mit den Kinasen cdk4 beziehungsweise cdk6 einen aktiven Komplex bilden. In der späten G1 Phase wird dann Zyklin E exprimiert, welches im Komplex mit cdk2 für den Übergang der G1 in die S Phase sorgt. In der S Phase werden D- und E-Typ Zyklone degradiert und es kommt zur Expression von Zyklin A. Zyklin A-cdk2 Komplexe regeln das Durchlaufen der S Phase und werden in G2 durch Zyklin A-cdk1 Komplexe abgelöst. Der Eintritt und das Durchlaufen der Mitose werden durch Zyklin B-cdk1 Komplexe gesteuert. Zyklin A und Zyklin B werden am Ende der Mitose degradiert, so dass unmittelbar nach Ende der Zellteilung keine Zyklone und somit keine CDK-Aktivität vorhanden ist (nach Klug SW and Cummings MR: Concepts of Genetics, 6th edition. Pearson Higher Education).

Die positive Regulation des Zellzyklus ist abhängig von der Expression spezifischer G1 Phase Zyklone, die zusammen mit Zyklin-abhängigen Kinasen einen aktiven heterodimeren Komplex bilden. Die Kinase-Aktivität dieser Komplexe wird durch die Zyklone reguliert, da diese Zellzyklus-abhängig exprimiert werden (Abbildung 1) (Evans et al. 1983). Die verschiedenen Zyklin-abhängigen Kinasen werden während des gesamten Zellzyklus konstitutiv exprimiert und bilden die katalytische Untereinheit des Zyklin-cdk Komplexes. Zyklin-abhängige Kinasen sind Serin/Threonin Kinasen (Nigg 1995) und phosphorylieren im Komplex mit den entsprechenden Zyklonen ihre Substrate.

D-Typ Zyklone werden in der frühen G1 Phase exprimiert (Abbildung 1) und integrieren externe, mitogene Signale in den Zellzyklus (Aktas et al. 1997). Ihre Transkription steht am Ende des Ras/Raf/MAPK Signalwegs (Malumbres and

Pellicer 1998). Über den Ras/PI3K/AKT Signalweg wird die Translation der D-Typ Zyklone unterstützt und gleichzeitig ihre Halbwertszeit erhöht (Abbildung 2). Zyklin D1 besitzt eine kurze Halbwertszeit, da es permanent aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert wird, wo es durch Ubiquitinierung und proteasomale Degradierung abgebaut wird. Die Ausschleusung aus dem Zellkern wird durch die Kinase GSK-3 β vermittelt, die nach Aktivierung des Ras/PI3K/AKT Signalwegs in ihrer Aktivität inhibiert wird, wodurch sich Zyklin D1 anreichern kann (Diehl et al. 1998; Marshall 1999; Alt et al. 2000). Die drei D-Typ Zyklone D1, D2 und D3 zeigen eine hohe Sequenzhomologie, werden spezifisch in verschiedenen Geweben exprimiert und sind in ihren Aufgaben wahrscheinlich redundant.

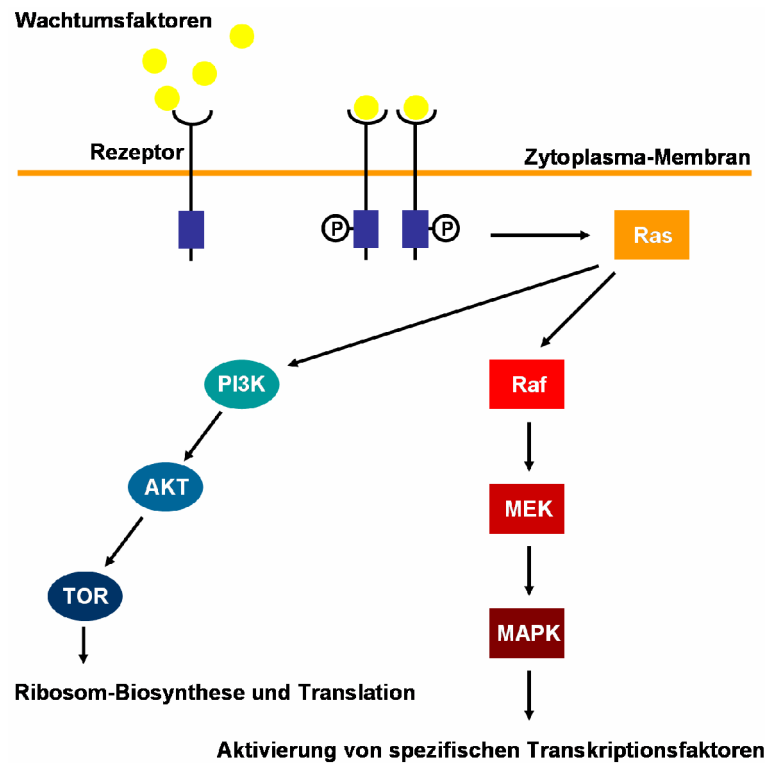


Abbildung 2: Aktivierung des Zellzyklus durch mitogene Stimuli. Durch die Aktivierung der MAP-Kinase (MAPK) kommt es zur Aktivierung von latenten Transkriptionsfaktoren im Zellkern, die unter anderem zur Transkription von D-Typ Zyklinen führt. Die Expression der D-Typ Zyklone wird durch die Ras/PI3K/AKT Kaskade unterstützt, die den Initiationsfaktor der Translation eIF4E aktiviert und außerdem durch Phosphorylierung einer ribosomalen Untereinheit zur Akkumulation von Ribosomen führt, die eine effiziente Translation während des Zellzyklus gewährleisten.

Die durch mitogene Stimuli in der frühen G1 Phase angereicherten D-Typ Zyklone bilden mit den Zyklin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (cdk4 und cdk6, im Folgenden als cdk4/6 bezeichnet) aktive Komplexe (Sherr 1993). Anschließend wird in der mittleren bis späten G1 Phase Zyklin E exprimiert und bildet funktionelle Komplexe mit der Zyklin-abhängigen Kinase 2 (cdk2). Durch die Phosphorylierung von spezifischen Substraten tragen diese Zyklin-cdk Komplexe zum Fortschreiten des Zellzyklus bei (Abbildung 1).

Das wichtigste Substrat der Zyklin-cdk Komplexe in der G1 Phase ist das Retinoblastom-Protein pRb/p105. In der hypophosphorylierten Form bindet es E2F Transkriptionsfaktoren und inaktiviert sie dadurch (Morgan 1997; Adams 2001; Trimarchi and Lees 2002). Zusätzlich sind pRb/p105-E2F Komplexe zusammen mit weiteren Proteinen wie Histon-Deacetylasen (HDAC's) und Nukleosom *Remodeling* Komplexen (hBRM/BRG1), die durch pRb/p105 rekrutiert werden, an der aktiven Repression von einigen Promotoren beteiligt (Harbour and Dean 2000). Im Verlauf des Zellzyklus wird pRb/p105 sequentiell durch die verschiedenen phasenspezifischen Zyklin-cdk Komplexe phosphoryliert und dadurch inaktiviert (Buchkovich et al. 1989; Chen et al. 1989; Mihara et al. 1989). Durch die Kinase-Aktivität der Zyklin D-cdk4/6 Komplexe wird pRb/p105 zunächst nur teilweise phosphoryliert. Die Repression der gebundenen E2F Faktoren und die Inhibierung von Promotoren wird partiell aufgehoben und führt zur Expression von Zyklin E in der mittleren bis späten G1 Phase (Abbildung 1) (Harbour et al. 1999; Morris and Dyson 2001). Durch die Regulation des *Zyklin E* Promotors trägt cdk4/6 Aktivität zur Bildung von aktiven, heterodimeren Komplexen aus Zyklin E und cdk2 in der späten G1 Phase bei (Zhang et al. 2000). Diese Komplexe sind an der sukzessiven Phosphorylierung von pRb/p105 beteiligt und leiten dadurch den Übergang der G1 in die S Phase ein (Lundberg and Weinberg 1998; Harbour et al. 1999; Ezhevsky et al. 2001). Die cdk2-Aktivität ist für den Übergang aus der G1 in die S Phase unbedingt notwendig, denn dominant-negative Mutanten von cdk2 sind in der Lage, Zellen in G1 zu arretieren (van den Heuvel and Harlow 1993). Die Phosphorylierung von pRb/p105 durch Zyklin E-cdk2 Aktivität hebt die Inaktivierung der E2F Transkriptionsfaktoren vollständig auf und erlaubt die Expression von Zyklin A (Harbour et al. 1999; Zhang et al. 2000). Die Aktivierung der E2F Transkriptionsfaktoren durch Zyklin E-cdk2 führt außerdem zur Expression verschiedener Proteine, die in die DNA-Synthese involviert sind, wie zum Beispiel Cdc25A, DHFR, Thymidinkinase, Thymidylatsynthetase, Cdc6, ORC1, DNA Polymerase α und PCNA (Dyson 1998; Wu et al. 2001). Da Zyklin E im Übergang in die S Phase durch SCF-vermittelte

Ubiquitinierung und proteasomale Degradierung abgebaut wird, bildet Zyklin A in der S Phase die regulatorische Untereinheit von cdk2 (Clurman et al. 1996; Koepp et al. 2001).

I.1.2 S Phase

In der S Phase erfolgt die exakte Replikation der DNA. Das humane Genom besitzt ca. 60 000 Replikations-Startpunkte, die in Abständen von 100 000 bis 150 000 Basenpaaren auftreten und von denen aus sich die Replikationsgabeln bidirektional fortbewegen. Die Replikations-Startpunkte sind meistens nicht gleichzeitig aktiv: DNA in lockerem Euchromatin wird früh und DNA in dicht gepacktem Heterochromatin wird spät repliziert (Pollard TD and Earnshaw WC 2002: Cell Biology, 1st Edition. Elsevier Science). Um abzusichern, dass nach der Zellteilung jeder Teil des Chromosoms exakt nur ein Mal pro Zellzyklus repliziert wird, müssen die Replikations-Startpunkte gleichmäßig verteilt sein und dürfen nicht noch einmal aktiviert werden, wenn sie bereits aktiv waren. Der mehrfachen Replikation pro Startpunkt wird vorgebeugt, indem die Bindung und die anschließende Aktivierung von Proteinen, die die DNA-Replikation initiieren, getrennte Vorgänge sind. Bereits ab der frühen G1 Phase bildet sich an den Replikations-Startpunkten der zu duplizierenden DNA ein Präreplikations-Komplex aus den Initiator-Proteinen ORC, Cdc6, Cdt1 und Mcm2-7, durch den die Lizenz zur Replikation gegeben wird (Coleman et al. 1996; Maiorano et al. 2000a; Maiorano et al. 2000b; Natale et al. 2000; Nishitani et al. 2000; Tatsumi et al. 2000; Dhar et al. 2001; Kreitz et al. 2001). Die Bildung der Präreplikations-Komplexe findet statt, bevor cdk2 mit Zyklin E aktive Komplexe bilden kann.

Durch die Expression von Zyklin E, A und B und entsprechende cdk2-beziehungsweise cdk1-Aktivität wird ab der späten G1 Phase bis zum Ende der Mitose der erneute Aufbau von Präreplikations-Komplexen unterbunden, wodurch gewährleistet wird, dass jeder Replikations-Startpunkt nur ein einziges Mal abgelesen wird (Kelly and Brown 2000; Bell and Dutta 2002) (Abbildung 3). Durch Zyklin E-cdk2 Aktivität wird die DNA Polymerase α -Primase an die Replikations-Startpunkte rekrutiert und schafft durch Synthese eines RNA-DNA Primers die Möglichkeit zur DNA-Replikation. Durch Zyklin A-cdk2 vermittelte Inaktivierung der DNA-Polymerase α -Primase wird die Re-Replikation der DNA unterbunden und die Elonga-

tion durch die Polymerase δ in Kooperation mit PCNA ermöglicht (Voitenleitner et al. 1997; Bashir et al. 2000; Walter and Newport 2000; Zou and Stillman 2000). Die Zyklin A-vermittelte Relokalisation von Cdc6 in das Zytoplasma sichert zusätzlich ab, dass sich erst nach erfolgter Mitose neue Präreplikations-Komplexe an den Replikations-Startpunkten bilden (Jiang et al. 1999; Petersen et al. 1999; Petersen et al. 2000).

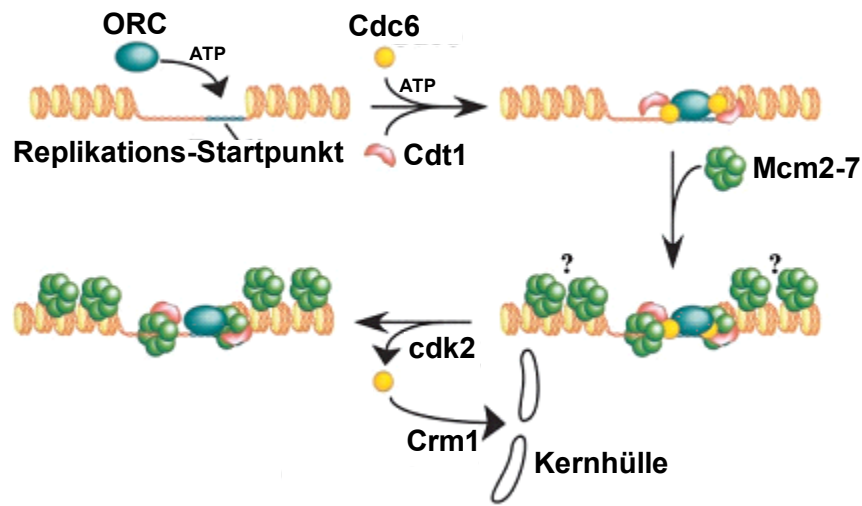


Abbildung 3: Bildung des Präreplikations-Komplexes in der G1 Phase. In der frühen G1 Phase bildet sich der Präreplikations-Komplex aus ORC, Cdc6, Cdt1 und Mcm Proteinen. Der Präreplikations-Komplex liegt nur in der G1 Phase bei Abwesenheit von cdk2- und cdk1-Aktivität vor und gibt die Lizenz, die DNA Replikation zu starten. Die Initiation der DNA Replikation ist dann abhängig von cdk2- beziehungsweise cdk1-Aktivität, wodurch gleichzeitig der Präreplikations-Komplex in einen Postreplikations-Komplex übergeht und dadurch die Re-Replikation innerhalb einer S-Phase unterbunden wird (Bell and Dutta 2002).

Parallel zur Replikation der DNA findet in der S Phase mit Hilfe der cdk2-Aktivität die Verdoppelung des Centrosoms statt. Die Duplikation des Centrosoms muss streng kontrolliert werden, um die genetische Stabilität der Zelle aufrecht zu erhalten (Meraldi et al. 1999; Hinchcliffe and Sluder 2002).

I.1.3. G₂ und M Phase

Während der G₂ Phase wird die replizierte DNA auf vollständige und korrekte Replikation überprüft und die Mitose vorbereitet. Die Aktivität von cdk1 ist die treibende Kraft für den Übergang aus der G₂ Phase in die Mitose. In der G₂ Phase befindet sich cdk1 im Komplex mit Zyklin A und Zyklin B (Pines and Hunter 1990). Zyklin A-cdk1 Aktivität unterstützt das Auslösen des Übergangs aus der G₂ Phase in die Prophase der Mitose (Abbildung 1). Zyklin B akkumuliert in der späten S und der G₂ Phase (Abbildung 1) (Pines and Hunter 1990), und bildet einen aktiven Komplex mit cdk1, der auch als MPF (*Mitosis Promoting Factor*) bekannt ist (Masui and Markert 1971; Smith and Ecker 1971; Gautier et al. 1990). Für den Eintritt der Zellen in die Mitose ist aktives Zyklin B-cdk1 notwendig. Zyklin B-cdk1 phosphoryliert die nukleären Lamine, wodurch sie depolymerisieren und die Kernhülle zusammenbricht (Peter et al. 1990; Ward and Kirschner 1990; Collas 1999). APC (*Anaphase Promoting Complex*) ist ebenfalls ein Substrat von Zyklin B-cdk1 Komplexen und wird zu Beginn der Anaphase durch cdk1-vermittelte Phosphorylierung aktiviert (Zachariae and Nasmyth 1999; Rudner and Murray 2000; Peters 2002). Die Aktivität der APC Ubiquitin-Ligase reguliert zusammen mit weiteren Kontrollproteinen die korrekte Trennung der Schwesterchromatide. Nach erfolgreicher Trennung dekondensieren die voneinander getrennten Chromosomen und werden jeweils von einer neugebildeten Kernhülle umgeben (Nasmyth 1999; Uhlmann 2001).

Am Ende der Mitose werden regulatorische Proteine durch APC ubiquitiniert und so für die proteasomale Degradierung markiert. Im Gegensatz zu Zyklin D und E, die nach Phosphorylierung von dem SCF Komplex als Substrat erkannt, ubiquitiniert und proteasomal degradiert werden, sind die Zykline A und B Substrate der APC Ubiquitin-Ligase und werden in der späten Anaphase ubiquitiniert und der Degradation zugeführt (Jackson et al. 2000; Murray 2004) (Abbildung 4). Das bedeutet, dass unmittelbar nach der Mitose durch die vollständige Degradierung der Zykline keine CDK-Aktivität möglich ist, und externe Signale entscheiden, ob die Zelle erneut in den Zellzyklus eintritt oder in der Ruhephase (Go) verweilt.

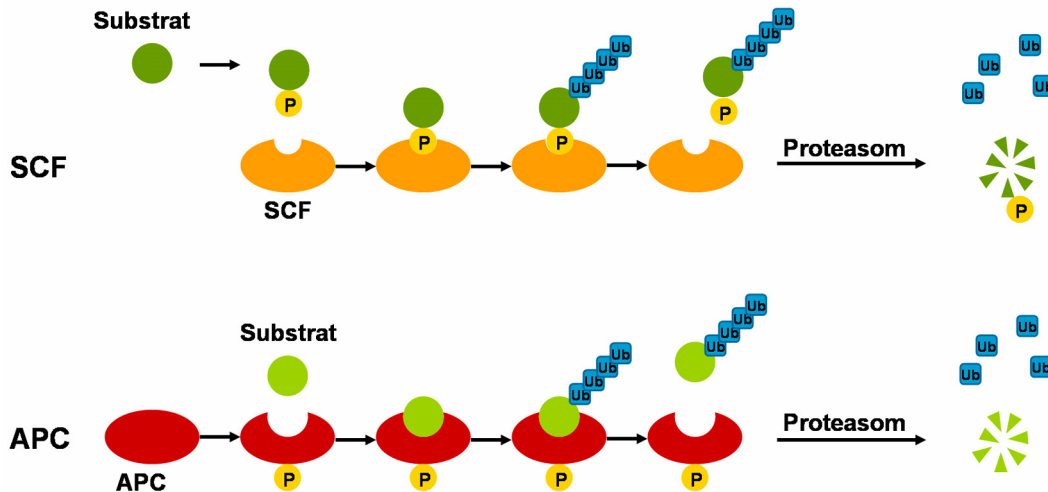


Abbildung 4: Protein-Abbau durch SCF- und APC-Ubiquitin-Ligasen während des Zellzyklus. Der Abbau von Proteinen, die von SCF erkannt und ubiquitiniert werden, wird durch die Phosphorylierung der Substrate reguliert (zum Beispiel Phosphorylierung von Zyklin D und Zyklin E durch Zyklin A-cdk2 Aktivität während der S Phase). Der SCF Komplex ist während des gesamten Zellzyklus aktiv und führt verschiedenste Proteine der Degradierung zu. Im Gegensatz dazu ist APC nur in der Mitose aktiv und muss zunächst durch Zyklin B-cdk1-abhängige Phosphorylierung aktiviert werden. Eine Phosphorylierung der Substrate von APC ist für die Erkennung nicht notwendig (Murray 2004).

I.2. Funktionen des Tumorsuppressors p53 in der Regulation des Zellzyklus

Der Tumorsuppressor p53 ist entscheidend an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt und hilft die genetische Stabilität der Zelle aufrecht zu erhalten. Die Bedeutung des Tumorsuppressor-Proteins p53 für die genomische Integrität der Zelle spiegelt sich in der Häufigkeit seiner Inaktivierung in humanen Tumoren wider (Olivier et al. 2002). In mehr als 50 % der humanen Tumore ist *p53* von einer Mutation betroffen, und viele Tumore mit intaktem *p53* Gen weisen Veränderungen in Genen auf, deren Produkte mit p53 interagieren oder sich in Signalwegen mit p53 befinden (Vogelstein et al. 2000; Sherr and McCormick 2002). Etwa 95 % der *p53* Mutationen liegen in der DNA Bindungsdomäne und weisen auf die zentrale Funktion des Tumorsuppressors p53 als Transkriptionsfaktor hin (Abbildung 5). Die onkogene Form von p53 ist in 75 % aller Fälle ein Protein mit normaler Länge, in welchem eine einzige Aminosäure in der zentralen Domäne verändert ist. Unter den Mutationen, die besonders häufig auftreten (sogenannte *hot spot* Mutationen)

(Abbildung 5) gibt es DNA Kontakt-Mutationen (R248 und R273), durch die der direkte Kontakt zur DNA aufgehoben wird, und Struktur-Mutationen (R175, G245, R249 und R282), durch die die stabilisierende Struktur um die DNA Kontaktstellen aufgehoben wird und p53 eine Mutanten-Konformation annimmt. Struktur-Mutationen wie zum Beispiel V143A können einen temperatursensitiven Phänotyp ausprägen, so dass sie je nach umgebender Temperatur an die DNA binden können oder nicht (Bullock and Fersht 2001).

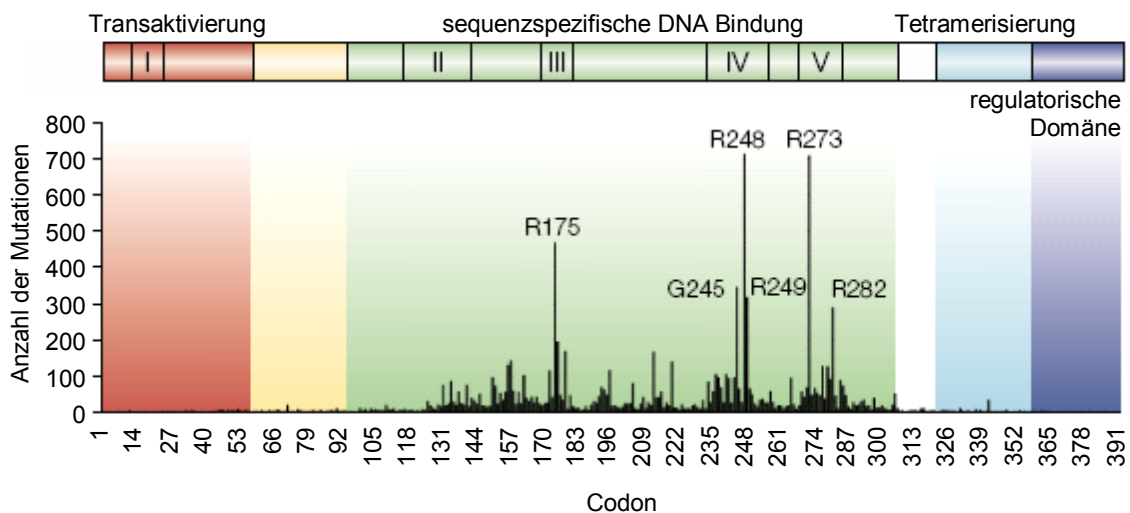


Abbildung 5: Häufigkeit und Verteilung von p53 Mutationen. p53 besitzt eine Amino-terminale Transaktivierungsdomäne (rot), eine zentrale DNA Bindungsdomäne (grün), eine Oligomerisierungsdomäne (hellblau) und eine Carboxy-terminale regulatorische Domäne (dunkelblau). Stark konservierte Bereiche sind in den Feldern I-V dargestellt. Das Histogramm stellt die Häufigkeit der in humanen Tumoren auftretenden Mutationen von p53 dar, wovon 95 % in der zentralen, DNA-bindenden Domäne liegen. Sechs *hot spot* Mutationen sind darunter zu erkennen (Bullock and Fersht 2001).

Unter normalen Bedingungen hat das p53 Protein eine Halbwertszeit von ca. 20 Minuten (Oren et al. 1981; Reich et al. 1983) und liegt in sehr geringen Mengen im Zellkern vor. Die geringe Halbwertszeit von p53 resultiert aus einer Rückkopplung, in der p53 seinen negativen Regulator Mdm2 direkt transkriptionell aktiviert (Wu et al. 1993). Durch die Bindung von Mdm2 an den N-Terminus von p53 wird die Bindungsstelle von transkriptionellen Ko-Aktivatoren maskiert und gleichzeitig die Ubiquitinierung und damit proteasomale Degradierung von p53 katalysiert (Momand et al. 1992; Juven-Gershon and Oren 1999; Wadgaonkar and Collins 1999; Zhang and Xiong 2001). Ist p53 durch eine Mutation nicht mehr in der

Lage, transkriptionell aktiv zu werden, kann es auch seinen negativen Regulator Mdm2 nicht mehr induzieren, wodurch sich die Halbwertszeit von mutiertem p53 deutlich verlängert und große Mengen von mutiertem p53 in der Zelle akkumulieren.

Die Aktivierung des Tumorsuppressor-Proteins p53 erfolgt durch DNA-Schaden, Onkogen-Aktivierung, Hypoxie und weitere Stress-Signale (Levine 1997; Giaccia and Kastan 1998). Durch Stress- oder Schadenssignale wird die Mdm2-vermittelte Degradierung von p53 gehemmt und die Halbwertszeit auf mehrere Stunden verlängert. So wird nach DNA-Schaden der N-Terminus von p53 in der Nähe der Mdm2 Bindungsstelle durch ATM, ATR und Chk1, Chk2 phosphoryliert und dadurch die Interaktion mit Mdm2 unterbunden (Giaccia and Kastan 1998; Jayaraman and Prives 1999; Prives and Hall 1999; Carr 2000). Das Tumorsuppressor-Protein ARF, welches durch onkogene Stimuli wie Ras oder Myc aktiviert wird, bindet direkt an Mdm2. Durch diese Interaktion wird die Ubiquitin-Ligase Aktivität von Mdm2 inhibiert und Mdm2 aus dem Nukleoplasma in die Nukleoli verlagert, so dass ein Abbau von p53 durch Mdm2 nicht mehr möglich ist (Bates et al. 1998a; Kamijo et al. 1998; Pomerantz et al. 1998; Honda and Yasuda 1999; Sherr and Weber 2000).

Zusätzlich zur Stabilisierung durch Mdm2-Inaktivierung wird p53 Carboxy-terminal modifiziert (Phosphorylierungen, Acetylierungen, Glykosylierungen, Ribosylierungen, Sumoylierungen) und dadurch in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor aktiviert (Shaw et al. 1996; Gu and Roeder 1997; Vaziri et al. 1997; Gostissa et al. 1999; Rodriguez et al. 1999; Simbulan-Rosenthal et al. 1999).

Akkumulierendes und modifiziertes p53 bindet als Homotetramer an spezifische DNA Sequenzen und aktiviert die Transkription seiner Zielgene, deren Produkte einen Zellzyklusarrest in G1 oder G2 (zum Beispiel p21^{CIP1} und 14-3-3 σ) oder den programmierten Zelltod (Apoptose) (zum Beispiel Bax, NOXA und PIG3) induzieren. Der Zellzyklusarrest in G1 oder G2 ermöglicht es einer geschädigten Zelle, den aufgetretenen Schaden zu beheben. Bei irreparablen Schädigungen besitzt die Zelle die Möglichkeit, den programmierten Zelltod auszulösen oder dauerhaft in einen seneszenten Arrest zu gehen. Es ist noch nicht geklärt, wodurch die eine oder die andere Antwort ausgelöst wird, da sogar verschiedene Zelltypen eines Organismus nicht mit derselben Reaktion auf p53 Aktivierung antworten (el-Deiry et al. 1992; Cox and Lane 1995; el-Deiry 1998; Vogelstein et al. 2000).

Durch die Expression von p21^{CIP1} erhält p53 eine übergeordnete Regulatorfunktion im Zellzyklus (el-Deiry et al. 1993; Harper et al. 1993; Agarwal et al. 1995; Brugarolas et al. 1995; Waldman et al. 1996; Bates et al. 1998b). p21^{CIP1} inhibiert die Aktivität von Zyklin E oder A-cdk2 Komplexen und unterbindet dadurch den Übergang der G1 in die S Phase. Außerdem blockiert p21^{CIP1} die Initiation der DNA Replikation durch Bindung des Replikationsfaktors PCNA, der für eine erfolgreiche Elongation der DNA benötigt wird. Die Funktionen von PCNA in der DNA Reparatur bleiben dabei unbeeinflusst (Li et al. 1994; Shivji et al. 1994; Waga et al. 1994). Die Einleitung des p53-vermittelten G1 Arrests erfordert einige Stunden, da zunächst neu synthetisiertes p21^{CIP1} akkumulieren muss, und sorgt für eine lang andauernde, manchmal sogar permanente Eliminierung geschädigter Zellen aus dem Zellzyklus (Carr 2000; Kastan and Bartek 2004).

I.3. Negative Regulation des Übergangs der G1 in die S Phase

I.3.1. CDK-Inhibitoren

Die Regulation der CDK-Aktivität durch das Binden von kleinen inhibitorischen Proteinen, den CDK-Inhibitoren, ist ein ubiquitärer Mechanismus (Sherr and Roberts 1999). Die Expression von CDK-Inhibitoren wird als Antwort auf verschiedene zelluläre Prozesse, wie Differenzierungs- oder Stress-Signale, ausgelöst (Sherr and Weber 2000; Malumbres and Barbacid 2001). Es gibt 2 Familien von CDK-Inhibitoren: die Cip/Kip Familie der CDK-Inhibitoren, die durch die Proteine p21^{CIP1}, p27^{KIP1} und p57^{KIP2} gebildet wird, und die INK4 Familie, die sich aus p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} und p19^{INK4D} zusammensetzt.

Die Cip/Kip Proteine binden mit ihrem N-Terminus an Zyklin E- und Zyklin A-cdk2 Komplexe und inhibieren diese dadurch in ihrer Aktivität. Proteine aus der INK4 Familie binden ausschließlich an cdk4 und cdk6 und inhibieren dadurch den Aufbau aktiver Zyklin D-cdk4/6 Komplexe (Guan et al. 1994; Polyak et al. 1994; Chen et al. 1995; Hall et al. 1995; Nakanishi et al. 1995; Chen et al. 1996; Guan et al. 1996; Lin et al. 1996; Russo et al. 1996a). Durch die Expression der CDK-Inhibitoren wird die Zyklin-cdk Aktivität in der G1 Phase unterbunden.

Die wichtigste Funktion der Zyklin-cdk Komplexe in G1 ist die Phosphorylierung von pRb/p105, da dadurch E2F Transkriptionsfaktoren freigegeben werden, deren

Aktivität für den Übergang in die S Phase notwendig ist (Nevins 2001; Trimarchi and Lees 2002). Zyklin D-cdk4/6 Komplexe initiieren dabei die Phosphorylierung von pRb/p105 in der frühen G1 Phase und erlauben damit eine eingeschränkte Aktivität der E2F Transkriptionsfaktoren. Die Phosphorylierung von pRb/p105 durch Zyklin E-cdk2 Komplexe in der späten G1 Phase löst die Bindung zwischen E2F und pRb/p105 vollständig auf, und der Eintritt in die S Phase wird ermöglicht (Harbour and Dean 2000).

Zyklin D-cdk4/6 Komplexe besitzen zusätzlich eine nichtkatalytische Funktion in der Regulation der G1 Phase, sie sequestrieren Cip/Kip Proteine. Durch diese Sequestrierung wird die Aktivität von Zyklin E-cdk2 und Zyklin A-cdk2 gefördert, da weniger Cip/Kip Proteine an Zyklin E oder A-cdk2 Komplexe binden können (Abbildung 6) (Blain et al. 1997; Cheng et al. 1998). In normalen, proliferierenden Zellen wird p27^{KIP1} durch Zyklin D-cdk4/6 komplexiert und dadurch die Proliferation unterstützt (Toyoshima and Hunter 1994). Durch die Sequestrierung wird die inhibitorische Aktivität von p27^{KIP1} unter ein bestimmtes Niveau gesenkt, so dass Zyklin E-cdk2 Komplexe weniger inhibiert sind. Zyklin E-cdk2 kann dann seinen Inhibitor p27^{KIP1} phosphorylieren, markiert ihn dadurch für die Ubiquitin-vermittelte proteasomale Degradierung und unterstützt damit die eigene Aktivität (Sheaff et al. 1997; Vlach et al. 1997). Wenn mitogene Stimuli wegfallen, wird die Zyklin D Synthese eingestellt, die Zyklin D-cdk4/6 Komplexe lösen sich auf und gebundene Cip/Kip Proteine werden frei. Diese blockieren dann Zyklin E-cdk2 und führen so zu einem G1 Phase Arrest (Abbildung 6) (Toyoshima and Hunter 1994; Zhang et al. 1994).

Die Bindung der Cip/Kip Proteine an Zyklin D-cdk4/6 Komplexe dient nicht allein der Sequestrierung dieser CDK-Inhibitoren. Durch Interaktion von Zyklin D und cdk4/6 mit Cip/Kip Proteinen wird die Bildung des aktiven Zyklin D-cdk4/6 Komplexes erleichtert, der Komplex stabilisiert und die Ausschleusung von Zyklin D aus dem Zellkern inhibiert (Abbildung 6) (LaBaer et al. 1997; Cheng et al. 1999; Alt et al. 2002).

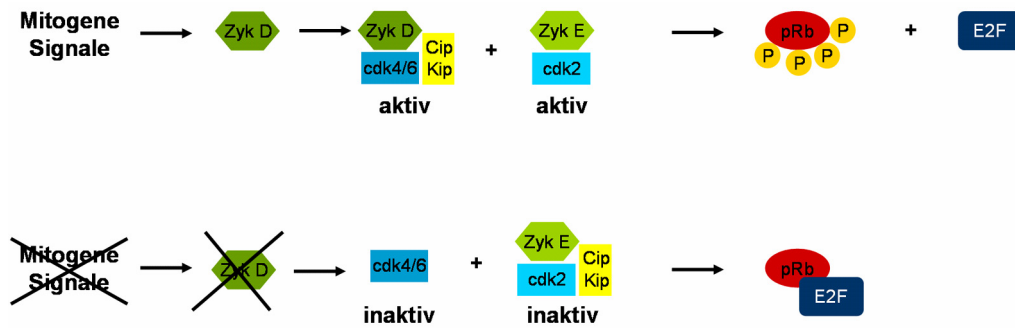


Abbildung 6: Interaktionen von Cip/Kip Proteinen mit Zyklin-cdk Komplexen in G1.

Mitogene Signale führen zur Zyklin D Synthese. Zyklin D bildet dann mit Unterstützung von Cip/Kip Proteinen einen stabilen, aktiven Komplex mit cdk4/6. Gleichzeitig werden Cip/Kip Proteine durch die Sequestrierung über Zyklin D-cdk4/6 von den Zyklin E-cdk2 Komplexen fern gehalten, die dadurch ihre Aktivität bewahren. Zyklin D-cdk4/6 und Zyklin E-cdk2 Aktivität führt zur Phosphorylierung von pRb/p105 und Freigabe von E2F Transkriptionsfaktoren. Fallen die mitogenen Stimuli weg, wird kein Zyklin D synthetisiert und in der Folge keine Zyklin D-Cip/Kip-cdk4/6 Komplexe gebildet. Cip/Kip, welches vorher durch Zyklin D-cdk4/6 Komplexe gebunden war, wird jetzt frei und blockiert die Zyklin E-cdk2 Komplexe. Die hypophosphorylierte Form von pRb/p105, welche E2F Transkriptionsfaktoren gebunden hält, führt zu einem G1 Arrest.

Die Familie der INK4 Proteine bindet direkt an cdk4 beziehungsweise cdk6 und konkurriert in ihrer Bindung mit den Cip/Kip Proteinen und Zyklin D (Parry et al. 1995). Der Komplex aus einem INK4 Protein und cdk4/6 ist stabil und katalytisch inaktiv. Aus diesem Komplex kann die Zyklin-abhängige Kinase durch Zyklin D nicht mehr gelöst werden, die Ausbildung funktioneller Zyklin D-cdk4/6 Komplexe ist somit unterbunden (Hall et al. 1995; Parry et al. 1995).

Zunehmende Mengen von INK4 verändern die Verteilung von cdk4/6 zugunsten von INK4-cdk4/6 Komplexen und verdrängen dadurch die sequestrierten Cip/Kip Proteine aus dem Zyklin D-cdk4/6 Komplex. Die freigesetzten Cip/Kip Proteine interagieren dann mit Zyklin E-cdk2 und führen so zu einem G1 Arrest (Abbildung 7) (Reynisdottir et al. 1995; McConnell et al. 1999). INK4 Proteine können einen Zellzyklusarrest nur in Anwesenheit eines intakten pRb/p105 Protein induzieren (Guan et al. 1994; Lukas et al. 1995).

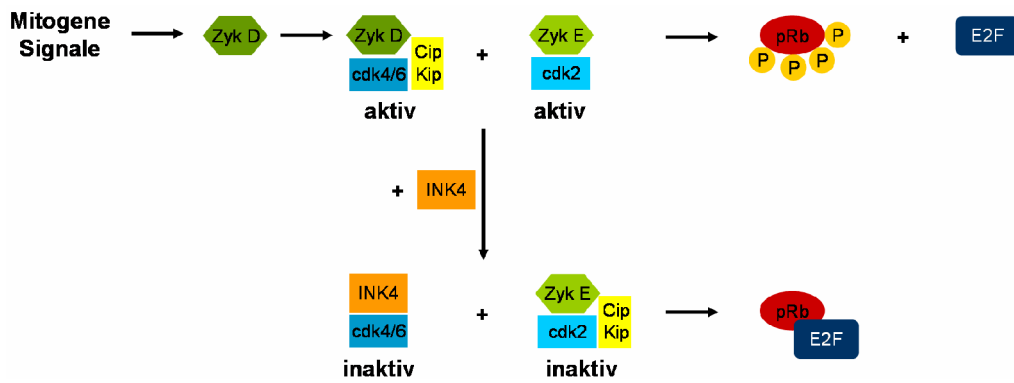


Abbildung 7: Interaktionen von INK4 Proteinen mit Zyklin-cdk Komplexen in G1. Durch die Expression von INK4 Faktoren kommt es zu einer Verlagerung der Cip/Kip Proteine. INK4 Proteine binden cdk4/6 und drängen dadurch Zyklus D und Cip/Kip Proteine aus dem Komplex. Die dadurch freigegebenen Cip/Kip Proteine binden an Zyklus E-cdk2 Komplexe und inhibieren deren Aktivität. Durch die fehlende Phosphorylierung von pRb/p105 kommt es dann zu einem G1 Zellzyklusarrest.

I.3.2. Negative Regulation der CDK-Aktivität durch Phosphorylierung

Neben der Inhibierung der Zyklin-cdk Komplexe durch die Proteine der Cip/Kip und der INK4 Familie ist der Phosphorylierungsstatus der Zyklin-abhängigen Kinasen entscheidend für die Kinase-Aktivität der Zyklin-cdk Komplexe. Die Kinase-Aktivität wird durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung bestimmter Aminosäuren der katalytischen Untereinheit geregelt.

Um katalytisch aktiv sein zu können, müssen die Zyklin-abhängigen Kinasen zunächst an einem bestimmten Threonin-Rest in ihrem *T loop* (cdk4: Thr172, cdk6: Thr177, cdk2: Thr160) phosphoryliert werden. Die aktivierende Phosphorylierung erfolgt durch die Serin/Threonin Kinase CAK (*cdk activating kinase*), die sich aus den Untereinheiten Zyklus H und cdk7 zusammensetzt (Nigg 1996; Russo et al. 1996b).

Die inhibitorische Phosphorylierung der Zyklin-abhängigen Kinasen erfolgt durch die dualspezifische Kinase Wee1/Myt1. Dabei werden die in der ATP-bindenden Region benachbarten Aminosäuren Threonin 14 und Tyrosin 15 phosphoryliert, wodurch die Aktivierung des Zyklin-cdk Komplexes verhindert wird (Nurse 1997). Dualspezifische Phosphatasen aus der Cdc25 Familie wirken der Phosphorylierung durch die Wee1/Myt1 Kinase entgegen und kontrollieren dadurch den Zeitpunkt der CDK-Aktivierung (Morgan 1997; Pines 1999; Ekholm and Reed 2000). Am G1/S-Übergang erfolgt die Aktivierung von Zyklus E-cdk2 durch die dualspezifische

Phosphatase Cdc25A, welche die inhibitorischen Phosphatreste an Thr14 und Tyr15 von cdk2 entfernt (Abbildung 8) (Blomberg and Hoffmann 1999; Eastman 2004). Nach Schädigung der DNA durch ionisierende Strahlung, UV Licht oder Inhibierung der DNA Replikation erfolgt die ATM-abhängige Aktivierung von Chk2 beziehungsweise die ATR-abhängige Aktivierung von Chk1 (Bartek and Lukas 2001; Zhou et al. 2002). Die aktiven Chk2- beziehungsweise Chk1-Kinasen phosphorylieren in der späten G1 Phase die Phosphatase Cdc25A, welche dadurch inaktiviert und dem Ubiquitin-vermittelten Abbau zugeführt wird (Abbildung 8) (Mailand et al. 2000). Werden Zyklin E-cdk2 Komplexe durch die Inaktivierung der Cdc25A Phosphatase nicht aktiviert, ist der Übergang der G1 in die S Phase geblockt. Diese Schadensreaktion erfolgt innerhalb von wenigen Minuten und kann für einige Stunden aufrechterhalten werden (Rotman and Shiloh 1999; Mailand et al. 2000; Zhou and Elledge 2000). Sie ergänzt damit die langsamere Schadensantwort durch p53-vermittelte Aktivierung von p21^{CIP1}.

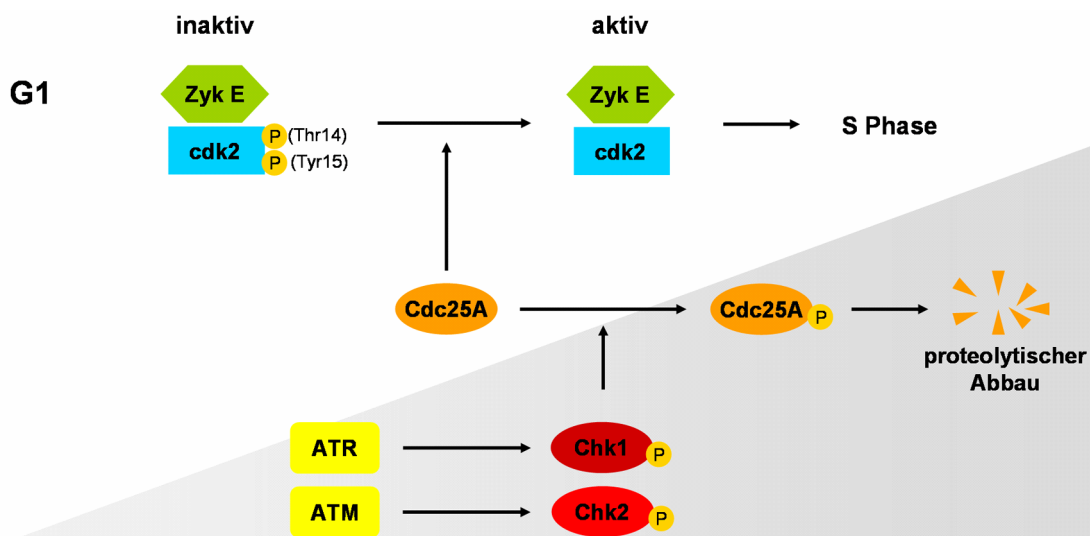


Abbildung 8: Aktivierung von Zyklin E-cdk2 Komplexen durch die dualspezifische Phosphatase Cdc25A und Inhibierung durch DNA Schäden. Phosphatasen aus der Cdc25 Familie werden benötigt, um Phosphatreste von der cdk Untereinheit der Zyklin E-cdk2 Komplexe zu entfernen. Dies aktiviert die Komplexe und führt zu einem Fortschreiten im Zellzyklus. Bei DNA Schaden (grau unterlegter Bereich) wird die Aktivität der Cdc25 Proteine durch Chk-vermittelte Phosphorylierung inhibiert, so dass die cdk-Untereinheiten nicht mehr dephosphoryliert werden können und folglich die Zyklin-cdk Komplexe nicht aktiviert werden. Dies verursacht einen Zellzyklusarrest in der späten G1 Phase.

I.4. Onkogenese durch Deregulation der G1 Phase

Tumorzellen besitzen Defekte in regulatorischen Systemen, die für eine normale Zellproliferation und genetische Stabilität sorgen. Im Laufe der Tumorgenese werden diese Zellen unabhängig von externen Wachstumssignalen und unsensibel für antimitogene Signale. Zusätzlich wird häufig das apoptotische Programm inaktiviert (Hanahan and Weinberg 2000). Die Deregulation der G1 Phase im Zellzyklus spielt eine entscheidende Rolle für die Entstehung von Tumoren. In dieser Phase werden externe Signale in den Zellzyklus integriert, die darüber entscheiden, ob die Zelle einen neuen Teilungszyklus durchläuft, in die Ruhephase eintritt oder terminal differenziert.

Defekte in der Kontrolle der G1 Phase sind in vielen verschiedenen Tumoren zu finden. In den meisten humanen Tumoren ist der p16^{INK4A}-Zyklus D-cdk4/6-pRb/p105 Signalweg von einer Deregulation betroffen (Abbildung 9) (Sellers and Kaelin 1997; Hahn and Weinberg 2002). Dabei weist in der Regel nur eines der Proteine aus diesem Signalwegs eine veränderte Expression auf. Die modifizierte Expression resultiert entweder aus chromosomalen Veränderungen (Amplifikationen, Translokationen und Deletionen) oder aus epigenetischem *Silencing* (Methylierung von Promotoren).

In humanen Tumoren ist besonders häufig die Überexpression von Zyklinen (vor allem Zyklus D1 und E1) oder Zyklus-abhängigen Kinasen (vor allem cdk4, selten cdk2) wie auch ein Verlust des CDK-Inhibitors p16^{INK4A} und eine erniedrigte Expression von p27^{KIP1} zu beobachten (Malumbres and Barbacid 2001).

Der Verlust des zentralen Proteins des p16^{INK4A}-pRb Signalwegs, des Tumorsuppressors pRb/p105, ist ursächlich für die Entstehung der Retinoblastome verantwortlich (Knudson 1971; Knudson et al. 1973), tritt aber auch in anderen Tumoren auf. Eine Inaktivierung des Retinoblastom-Proteins pRb/p105 wird besonders häufig in Lungenkarzinomen beobachtet. Zusätzlich können Retinoblastom-Proteine durch virale Onkoproteine inaktiviert werden. Das Protein E7 des humanen Papillomvirus (HPV) hebt die Funktionen von pRb/p105 auf und ist dadurch maßgeblich an der Entstehung von Zervixkarzinomen beteiligt (Heck et al. 1992).

Der Inaktivierung des p53-Signalwegs kommt in der Tumorentstehung eine übergeordnete Bedeutung zu. p53 gilt als „Wächter des Genoms“ und sorgt nach DNA-Schaden für einen Zellzyklus-Arrest oder Induktion der Apoptose (Lane 1992).

Dadurch wird die genomische Stabilität der Zelle bewahrt. Die p53-vermittelte Schadensantwort ist in den meisten, wenn nicht sogar in allen, humanen Tumoren

inaktiviert (Levine 1997). Dabei ist in über 50 % der Fälle das Tumorsuppressorgen *p53* selbst mutiert. Die Inaktivierung dieses Signalwegs erleichtert chromosomale Veränderungen, ohne die eine Akkumulation von synergistischen Mutationen in Tumorzellen nicht möglich wäre.

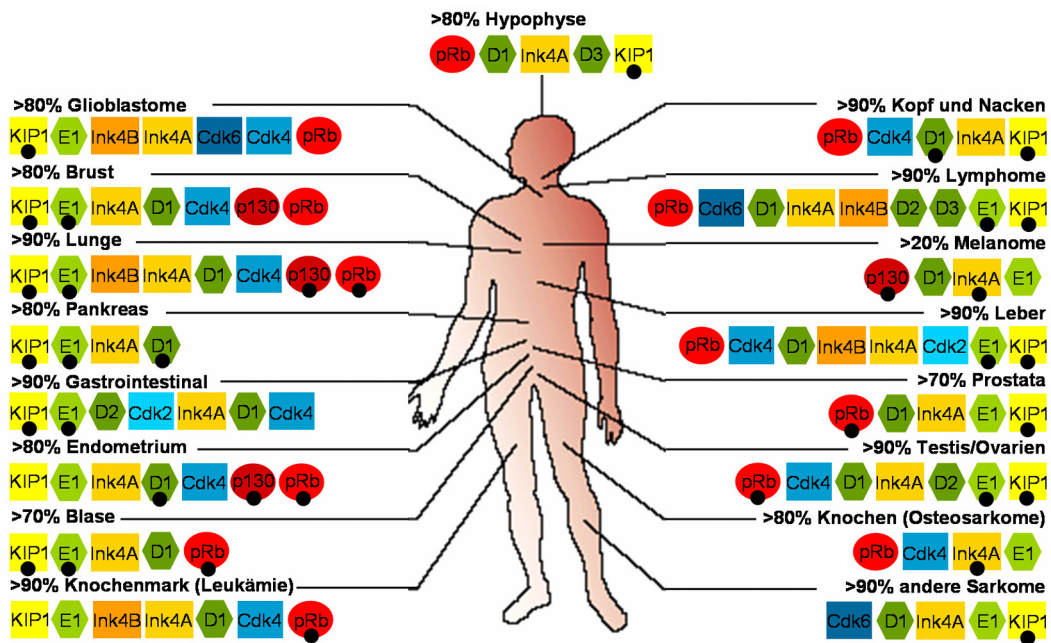


Abbildung 9: Mutationen der G1/S regulatorischen Proteine in humanen Tumoren. Die Prozentzahlen geben den Anteil der Tumore an, der eine Mutation in einem der aufgelisteten, regulatorischen Proteine besitzt. Die Veränderungen, die für die Tumorprognose relevant sind, sind mit einem schwarzen Punkt gekennzeichnet. Häufige Veränderungen sind Überexpression von Zyklinen (vor allem D1 und E1) und Zyclin-abhängigen Kinasen (vor allem *cdk4* und *cdk6*), sowie der Verlust von CDK-Inhibitoren (vor allem *INK4A*, *INK4B* und *KIP1*) und Retinoblastom-Proteinen (Malumbres and Barbacid 2001).

II. PROBLEMSTELLUNG

Die Inaktivierung von p53 ist ein entscheidender Schritt in der Immortalisierung und Transformation von Zellen und trägt wesentlich zu der Entstehung von Tumoren bei. Die so geschädigte Zelle ist nicht mehr in der Lage, mit Apoptose oder Zellzyklusarrest auf onkogene Stress-Signale wie DNA Schaden oder hyperproliferative Stimuli zu reagieren und verliert dadurch die Kontrolle über ein intaktes Genom.

Die Inaktivierung von p53 in Tumoren erfolgt häufig durch *missense* Punktmutationen, aber auch durch die Deletion von *ARF*. Die Expression von ARF wird durch die Überexpression von Ras, c-Myc, E1A und anderen Onkoproteinen induziert (Serrano et al. 1997; Bates et al. 1998a; de Stanchina et al. 1998; Zindy et al. 1998; Dimri et al. 2000). ARF bindet und inaktiviert die Funktionen von Mdm2, dem negativen Regulator von p53, wodurch p53 stabilisiert wird und einen Wachstumsarrest oder Apoptose induzieren kann. Der Verlust von ARF verhindert die Stabilisierung von p53 als Antwort auf onkogenen Stress. Da ARF wie auch p16^{INK4A} über einen alternativen Leserahmen durch den *INK4A* Locus kodiert werden, geht die Deletion von *ARF* häufig mit einer Deletion von p16^{INK4A} einher. Solch eine Deletion inaktiviert gleichzeitig zwei essentielle Signalwege der negativen Zellzykluskontrolle: den p16^{INK4A}-pRb Signalweg und den ARF-p53 Signalweg. Mutationen von Proteinen dieser beiden Signalwege sind in Tumoren so häufig, dass sie fast immer Teil der Entstehungsgeschichte von Krebszellen sind. In Tumorzellen kann die Reaktivierung dieser Signalwege durch Rekonstitution der inaktivierten Proteine einen Ansatz für die Unterdrückung des Tumorwachstums darstellen.

Ziel dieser Arbeit war es, über die Wiederherstellung von Wildtyp p53 Funktionen die Kontrolle über den Zellzyklus in p16^{INK4A} und *ARF* deletierten Tumorzellen wiederzuerlangen. Da die p16^{INK4A}-pRb und ARF-p53 Signalwege miteinander verknüpft sind, sollte analysiert werden, ob die p53 Funktionen bei Abwesenheit von p16^{INK4A} allein ausreichen, um dieses Ziel zu erreichen.

Zur Untersuchung der Reaktivierung von p53 Funktionen in Tumorzellen eignet sich die temperatursensitive Mutante p53^{Val135}, welche bei 39 °C Mutanten-Konformation und bei 30 °C Wildtyp-Konformation besitzt (Michalovitz et al. 1990; Milner and

Medcalf 1990). Diese temperatursensitive Mutante von p53 wurde schon in verschiedenen Zelllinien erfolgreich zur Aufklärung von p53 Funktionen benutzt (Martinez et al. 1991; Ramqvist et al. 1993; Wang et al. 1993; Malcomson et al. 1995; Stewart et al. 1995; Knippschild et al. 1996; Castro et al. 2004). Mit Hilfe eines Expressionsvektors kann die Mutante stabil in die Zellen transfiziert werden, und ein Temperaturwechsel reicht aus, um Wildtyp p53 Funktionen zu aktivieren beziehungsweise zu inaktivieren.

Als zelluläres System für die Analyse der durch p53 aktivierten Signalwege diente die C6 Rattenglioblastom-Zelllinie. Diese Zelllinie ist durch eine Deletion des *INK4A* Locus charakterisiert, die *p16^{INK4A}* und *ARF* gleichermaßen betrifft. Zusätzlich wird in den C6 Zellen kein endogenes p53 exprimiert. Nach stabiler Transfektion der C6 Zelllinie mit der temperatursensitiven Mutante p53^{Val135} wurde der Subklon C6D10-5 gewonnen, der eine Kernlokalisierung der Mutanten- wie auch der Wildtyp-Form von p53^{Val135} zeigt (Roser et al. 1991; Klotzsche et al. 1998). Ziel war es, detailliert zu analysieren, welche Signalwege durch p53 genutzt werden. Aus der Analyse sollten Aussagen über die generelle Relevanz dieser Signalwege für *INK4A* negative Tumorzellen gewonnen werden.

III. MATERIAL

III.1. Zelllinien

III.1.1. Eukaryotische Zelllinien

C6D10: Subklon der Rattengliom-Zelllinie C6. Die Zellen exprimieren keine zytoplasmatischen Intermediärfilamente und stellen einen Zustand der fortgeschrittenen Differenzierung dar (Roser et al. 1991).

C6D10-5: $tsp53^{Val135}$ exprimierende Zelllinie, die nach stabiler Transfektion von C6D10 Zellen mit dem Expressionsvektor pLTRp53cG9 (Eliyahu et al. 1985) etabliert wurde (Klotzsche et al. 1998).

III.1.2. Prokaryotische Zelllinien

E. coli DH5 α (Woodcock et al. 1989)

XL1-Blue (Stratagene); das $lacI^qZ\Delta M15$ Gen auf dem F' Episom ermöglicht Blau-Weiß Selektion

III.2. Plasmide

Ad5 E1A12S

pBluescript SK+

pCMV-CyclinA

pIRES2-AcGFP1

pIRES2-CyclinA-AcGFP1

pmaxGFP

T. Dobner, Universität Regensburg

Stratagene, California, USA

L. Hengst, Universität Innsbruck

Clontech, Frankreich

pIRES2-AcGFP1 mit einem cDNA Insert für die Expression von humanem Zyklin A

AMAXA, Köln

III.3. siRNA Sequenzen

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
p53 siRNA (Maus)	AAGACTCCAGTGGGAACCTTC
Rb2 siRNA (Ratte)	AAGACTAGCTCCTTATCACTT
scr siRNA (human, Maus, Ratte)	AAGCATCTAAGAGCTCGCGTC

III.4. Oligonukleotide

Experiment/ Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
<i>ChIP</i>	
Zyklin A Promotor, Ratte	CGCAGCAGAGGCTCAAGACTC (<i>forward</i>) CACAGCCAAATGCAGGGTCTC (<i>reverse</i>)
<i>RT-PCR</i>	
Zyklin A, Ratte	CGCAGCAGAGGCTCAAGACTC (<i>forward</i>) CACAGCCAAATGCAGGGTCTC (<i>reverse</i>)
β -Aktin, Ratte	AGCTATGAGCTGCCTGAC (<i>forward</i>) AGAGCCACCAATCCACAC (<i>reverse</i>)
<i>Klonierung</i>	
Zyklin A, human	CTCGAGGAATTCATGTTGGGCAACTCTGCG (<i>forward</i>) GGATCCGTCGACTTACAGATTTAGTGTCTCTGGTGG (<i>reverse</i>)
<i>Sequenzierung</i>	
pIRES2-CyclinA-AcGFP1	CGGTGGGAGGTCTATATAAG (<i>forward</i>) GAAGAAGCCAGCTGAATCTC (<i>forward</i>) CGTGGACTGGTTAGTTGAAG (<i>forward</i>) ACACCGGCCTTATTCCAAGC (<i>reverse</i>)
<i>siRNA Oligonukleotid- Templates</i>	
p53 siRNA	AAGACTCCAGTGGGAACCTTCCCTGTCTC (<i>antisense</i>) AAGAAGGTCCCACTGGAGTCCCTGTCTC (<i>sense</i>)
Rb2 siRNA	AAGACTAGCTCCTTATCACTTCCCTGTCTC (<i>antisense</i>) AAAAGTGATAAGGAGCTAGTCCCTGTCTC (<i>sense</i>)
scr siRNA	AAGCATCTAAGAGCTCGCGTCCCTGTCTC (<i>antisense</i>) AAGACGCGAGCTCTTAGATGCCCTGTCTC (<i>sense</i>)

III.5. Normalseren

Esel-Normalserum: polyklonales Präimmunserum (Dianova, Hamburg)

III.6. Antikörper

III.6.1. Primäre Antikörper

- PAb248: Maus anti p53 IgG2b; monoklonal, Hybridoma (Yewdell et al., 1986)
- CY-A1: Maus anti Zyklin A IgG; monoklonal (#C4710, Sigma, München)
- H-432: Kaninchen anti Zyklin A IgG, polyklonal, affinitätsgereinigt (#sc-751, Santa Cruz Biotechnology, USA)
- M-20: Kaninchen anti Zyklin E IgG, polyklonal, affinitätsgereinigt (#sc-481, Santa Cruz Biotechnology, USA)
- F-5: Maus anti p21^{CIP1} IgG2b, monoklonal (#sc-6246, Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Clone 57: Maus anti p27^{KIP1} IgG1, monoklonal (#610242, BD Transduction Labs, USA)
- mAb245: Maus anti pRb/p105 IgG1, monoklonal (#SA-188, Biomol, Hamburg)
- Clone 10: Maus anti pRb2/p130 IgG2a, monoklonal (#610262, BD Transduction Labs, USA)
- C-18: Kaninchen anti p107 IgG, polyklonal, affinitätsgereinigt (#sc-318, Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Ab-1: Maus anti β -Tubulin IgG1 κ , monoklonal (#CPO7, Oncogene Research, USA)
- I-19: Ziege anti Aktin IgG, polyklonal, affinitätsgereinigt (#sc-1616, Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Asp175: Kaninchen anti cleaved Caspase 3 IgG, polyklonal, affinitätsgereinigt (#9661, Cell Signaling, USA)
- B-2: Maus anti GFP IgG2a, monoklonal (#sc-9996, Santa Cruz Biotechnology, USA)
- Bu20a: Maus anti BrdU IgG1 κ , monoklonal (#Mo744, DAKO, Dänemark)
- 13 S-5: Kaninchen anti Adenovirus-2 E1A IgG, polyklonal, affinitätsgereinigt (Santa Cruz Biotechnology, USA)

III.6.2. Sekundäre, enzymgekoppelte Antikörper

Esel anti Maus IgG (H+L), konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (Biomol, Hamburg)

Esel anti Kaninchen IgG (H+L), konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (Biomol, Hamburg)

Esel anti Ziege IgG (H+L), konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (Biomol, Hamburg)

III.6.3. Sekundäre Fluorochrom-gekoppelte Antikörper

Esel anti Maus IgG (H+L), konjugiert mit Al 555 (Molecular Probes, Niederlande)

Esel anti Kaninchen IgG (H+L), konjugiert mit Al 488 (Molecular Probes, Niederlande)

III.7. Fluoreszenzfarbstoff für die DNA Färbung

DAPI (4,6 Diamidino-2-phenylidol) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

Propidiumiodid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

III.8. Molekulargewichtstandards

Proteinstandard: Molecular Weight Standard Mixture, recombinant
(#M-0671, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
Das Molekulargewicht der rekombinanten Proteine beträgt 15, 25, 35, 50, 75, 100, 150 kDa

DNA-Standard: GeneRuler 1kb DNA Ladder
(#SM0311, MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
Die DNA-Fragmente haben folgende Größe: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 Basenpaare

III.9. Enzyme

M-MLV Reverse Transkriptase	Invitrogen, Großbritannien
Pfu Turbo Hotstart DNA Polymerase	Stratagene, California, USA
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Schwalbach
RNase A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Calf Intestine Phosphatase	New England Biolabs, Schwalbach
T4 DNA Ligase, Ready-To-Go	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
T4 Polynukleotidkinase	New England Biolabs, Schwalbach
Taq DNA Polymerase	Eppendorf, Hamburg
Trypsin 2,5% (1:250)	Biochrom, Berlin

III.10. Chemikalien und andere Materialien

Die handelsüblichen Chemikalien wurden von den Firmen Roche (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Lifetechnologies (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Darüber hinaus wurden folgende Chemikalien eingesetzt:

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-Propanol	Merck, Darmstadt
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	National Diagnostics, Atlanta, USA
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	National Diagnostics, Atlanta, USA
4-Cumarsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Amidoschwarz 10B	Merck, Darmstadt
Ampicillin	USB, Cleveland, USA
APS	Merck, Darmstadt
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	New England Biolabs, Frankfurt a.M.

DEPC	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylformamid	Serva, Heidelberg
DMEM Pulver	Gibco/BRL Life Technologies, Eggenstein
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
dNTPs	MBI Fermentas, Heidelberg
DTT	Serva, Heidelberg
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure (100 %)	Merck, Darmstadt
Ethanol (p.a.)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim
FCS	PAA, Pasching, Österreich
Geneticin-Sulfat (G418)	Gibco/BRL Life Technologies, Eggenstein
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin	Serva, Heidelberg
HEPES	Serva, Heidelberg
IPTG	Biomol, Hamburg
Kanamycin	Serva, Heidelberg
Leupeptin	Biomol, Hamburg
Luminol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magermilchpulver	Neuform, Lüneburg
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natrium-Desoxycholat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nonidet P40 (NP-40)	Fluka, Neu-Ulm
Pefablock SC	Biomol, Hamburg
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Biomol, Hamburg
Polyvinylalkohol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein-G-Sepharose	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Salmon Sperm DNA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS	Serva, Heidelberg
Steriles Wasser	DeltaSelect, Pfullingen
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Trasyol	Bayer, Leverkusen
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trizma Base (Tris Base)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tween 20	Fluka, Neu-Ulm
Wasserstoffperoxid	Fluka, Neu-Ulm
X-Gal	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Xylencyanol FF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

III.11. Puffer und Lösungen

2x SDS-Lysispuffer

20 % Glycerol
4 % SDS
100 mM Tris/HCl pH 6,8

6x SDS-Probenpuffer

60 % Glycerol
12 % SDS
300 mM Tris/HCl pH 6,8
600 mM DTT
0,6 % Bromphenolblau

50x TAE

2 M Tris Base
0,5 M Essigsäure
0,05 M EDTA

Ampicillin-Stammlösung

60 mg Ampicillin in 1 ml Wasser
Aliquots bei -20 °C lagern

Bottom Gel Stammlösung 4x

1,5 M Tris/HCl pH 8,8
0,4 % SDS
Lagerung bei 4 °C

6x DNA-Probenpuffer

30 % Glycerol in Wasser
0,1 % Bromphenolblau
0,1 % Xylencyanol FF

10x PBS

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Na₂HPO₄
1,8 mM KH₂PO₄
pH 7,4 (HCl)

Amidoschwarz-Lösung

50 % Isopropanol
10 % Essigsäure
0,1 % Amidoschwarz
40 % Wasser

Blockpuffer

5 % Magermilchpulver in TBST
Lagerung bei 4 °C

ChIP Puffer 1

1 % SDS
10 mM EDTA
50 mM Tris/HCl pH 8,1

ChIP Puffer 2

0,01 % SDS
1,1 % Triton X-100
1,2 mM EDTA
16,7 mM Tris/HCl pH 8,1
16,7 mM NaCl
1:1000 Leupeptin Stammlsg.
1:100 Pepstatin A Stammlsg.
1:100 Pefablock Stammlsg.
1:100 Trasylol

ChIP Puffer 4

0,1 % SDS
1 % Triton X-100
2 mM EDTA
20 mM Tris/HCl pH 8,1
500 mM NaCl

ChIP Puffer 6 (TE-Puffer)

10 mM Tris/HCl pH 8,0
1 mM EDTA

Cumarsäure-Stammlösung

90 mM 4-Cumarsäure in DMSO
Lagerung in Aliquots bei -20°C

DMEM

133,8 g DMEM Pulver
37 g NaHCO₃
in 10l Zellkulturwasser
pH 7,1 mit HCl
steril filtrieren, bei 4 °C lagern

ECL Reagenz 2

15 µl H₂O₂
1 ml 1 M Tris/HCl pH 8,5
9 ml Wasser

ChIP Puffer 3

0,1 % SDS
1 % Triton X-100
2 mM EDTA
20 mM Tris/HCl pH 8,1
150 mM NaCl

ChIP Puffer 5

0,25 M LiCl
1 % NP-40
1 % Natrium Desoxycholat
1 mM EDTA
10 mM Tris/HCl pH 8,1

ChIP Puffer 7

1 % SDS
0,1 M NaHCO₃

DEPC-Wasser

0,1 % DEPC in Wasser
über Nacht rühren, dann
autoklavieren

ECL Reagenz 1

100 µl Luminol-Stammlösung
44 µl Cumarsäure-Stammlösung
1 ml 1 M Tris/HCl pH 8,5
9 ml Wasser

Einbettungsmedium

12 g Polyvinylalkohol
84 ml Wasser
6 ml Tris/HCl pH 8,5
30 % Glycerol

Einfrriermedium

10 % DMSO
50 % FCS
40 % DMEM

IPTG Stammlösung

10 mM IPTG in Wasser
lagern in Aliquots bei -20 °C

LB-Agarplatten

1,5 % Bacto-Agar in LB-Medium

Leupeptin Stammlösung 1000x

10 mg Leupeptin in 1 ml Wasser
Lagerung in Aliquots bei -20 °C

Mini-Prep Lösung I

50 mM Glucose
25 mM Tris/HCl pH 8,0
10 mM EDTA

Mini-Prep Lösung III

60 ml 5 M KAcetat
11,5 ml Eisessig
28,5 ml Wasser

PBS/EDTA

0,1 % (w/v) EDTA in PBS

Pepstatin A Stammlösung 100x

1 mg Pepstatin A in 1 ml Ethanol
Lagerung in Aliquots bei -20 °C

Ethidiumbromid Stammlösung

10 mg Ethidiumbromid in 1 ml
Wasser

Kanamycin-Stammlösung

10 mg Kanamycin in 1 ml Wasser
Aliquots bei -20 °C lagern

LB-Medium

10 g NaCl
5 g Bacto-Hefeextrakt
10 g Bacto-Trypton
pH 7,0

Luminol-Stammlösung

250 mM 3-Aminophthalhydrazid
in DMSO
Lagerung in Aliquots bei -20 °C

Mini-Prep Lösung II

200 mM NaOH
1 % SDS

Natriumazid-Stammlösung 100x

10 % (w/v) Natriumazid in Wasser

Pefablock Stammlösung 100x

10 mM Pefablock in 50 % Glyzerol
Lagerung in Aliquots bei -20 °C

Propidiumiodid-Färbelösung

1:15 Propidiumiodid Stammlösung
1:30 RNase A, DNase frei
in 1x PBS

Propidiumiodid-Stammlösung

0,5 mg Propidiumiodid
in 1 ml 380 mM NaCitrat pH 7,0
Lagerung bei 4 °C im Dunkeln

RNase A, Dnase-frei

10 mg Rnase A in 1 ml 10 mM
NaAcetat pH 5,2
15 min auf 100 °C erhitzen
+ 0,1 Volumen 1 M Tris/HCl
pH 7,4
Aliquots bei -20 °C lagern

SDS-Laufpuffer

25 mM Tris Base
200 mM Glycin pH 8,3
0,1 % SDS

SDS-Sammelgel

4 ml Wasser
0,67 ml 30 %
Acrylamid/Bisacrylamid
0,5 ml Upper Gel Stammlösung
40 µl 10 % APS
4 µl TEMED

SDS-Trenngel 8 %

4,73 ml Wasser
2,67 ml 30 %
Acrylamid/Bisacrylamid
2,5 ml Bottom Gel Stammlösung
100 µl 10 % APS
6 µl TEMED

SDS-Trenngel 10 %

4,1 ml Wasser
3,3 ml 30 %
Acrylamid/Bisacrylamid
2,5 ml Bottom Gel Stammlösung
100 µl 10 % APS
4 µl TEMED

SDS-Trenngel 13 %

3,1 ml Wasser
4,33 ml 30 %
Acrylamid/Bisacrylamid
2,5 ml Bottom Gel Stammlösung
100 µl 10 APS
4 µl TEMED

SOC Medium

20 g Bacto-Trypton
5 g Bacto-Hefeextrakt
0,5 g NaCl
2,4 g MgCl₂ (anhydr.)
0,186 g KCl
pH 7,0
+ 20 ml 1 M Glukose-Lösung
(steril) pro 1000 ml

Stripping Buffer

2 % SDS
62,5 mM Tris/HCl pH 6,8
100 mM 2-Mercaptoethanol
(2-Mercaptoethanol frisch
zugeben)

TBST

20 mM Tris/HCl pH 7,6
150 mM NaCl
0,05 % Tween 20

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl pH 8,0
1 mM EDTA

TfB-I

100 mM RbCl
50 mM MnCl₂
10 mM CaCl₂
30 mM Kacetat
15 % (w/v) Glycerol
pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure

TfB-II

10 mM MOPS
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂
15 % (w/v) Glycerol
pH 7,0 mit 1 N NaOH

Transferpuffer

20 mM Tris/Essigsäure pH 8,3
0,1 % SDS
20 % 2-Propanol

Trypsin/EDTA

400 ml Trypsin 2,5%
10 ml EDTA 0,5 M
1 l PBS 10x
ad 10 l Wasser
steril filtrieren, bei -20 °C lagern

Upper Gel Stammlösung 8x

1 M Tris/HCl pH 6,8
0,8 % SDS
Lagerung bei 4 °C

X-Gal Färbelösung

1 ml X-Gal Stammlösung
20 ml X-Gal Puffer

X-Gal Stammlösung

20 mg X-Gal in 1 ml
Dimethylformamid

X-Gal Puffer

40 mM Zitronensäure pH 6,0
40 mM Natriumphosphat
5 mM Kaliumferrocyanat
5 mM Kaliumferricyanat
150 mM NaCl
2 mM MgCl₂
(frisch ansetzen)

III.12. Verbrauchsmaterialien

Bakterienschalen

Deckgläser Ø 12 mm

Filterpapier Whatman 3 MM

Gewebekulturschalen

Nunc, Wiesbaden

Marienfeld. Lauda-Königshofen

Schleicher und Schüll, Dassel

Nunc, Wiesbaden

Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Membranfilter (0,2 µm)	Sartorius, Göttingen
Nitrozellulosemembran Hybond-C Super	Amersham Biosciences, Großbritannien
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm „M“	American National Can, Greenwich
Reaktionsgefäße (1,5 und 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Röntgenfilm Super RX	Fuji, Düsseldorf

III.13. Geräte

Agarosegeldokumentation	BioDoc Analyze, Biometra, Göttingen
Agarosegelkammer	Horizon 11-14, Gibco/BRL Life Technologies, Eggenstein
Analysenwaagen	H54AR; PM460, Mettler Toledo, Gießen
Brutschrank	T5042E; BB16, Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer	Coulter Epics, Beckman Coulter, Krefeld
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 35, Zeiss, Jena
	DMRA, Leica, Bensheim
Heizblock	Dri-Block DB 2A, Techne Inc., Burlington, USA
Horizontalschüttler	Heidolph, Schwabach
Inkubationsschüttler	Multitron, Infors HT, Basel, Schweiz
Lichtmikroskop	Phase Contrast ULWCD 0,30, Olympus, Hamburg
Minigel-Elektrophorese-Apparatur	Hoefer Mighty Small II, Hoefer, San Francisco, USA
Milli-Q-Wasser	Milli-Q Reagent Water System, Millipore, Eschborn
Nukleofector	Nucleofector I, Amaxa, Köln
PCR-Gerät	PTC-200, MJ Research, Massachusetts, USA
pH-Meter	PHM 82, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Photometer	BioSpec-1601 E, Shimadzu, Duisburg

Rollentisch	RollerMixer SRT1, Stuart Scientific, Watford, UK
Schüttler	Certomat BS-T, B. Braun Biotech, Melsungen
Spannungsquelle	Power Pac 300, BioRad, München
Sterilwerkbank	Lamin Air HA2448GS, Heraeus, Hanau
Tankblotapparatur	Mini Trans-Blot Cell, BioRad, München
Thermomixer	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät	Sonifier B-12, Branson, Danbury, USA
Wasserbad	GFL, Haake, Karlsruhe
Zentrifugen	Biofuge pico, Heraeus, Hanau Sorvall RC 5C Plus, Kendro, Hanau 5810R, Eppendorf, Hamburg 5415D, Eppendorf, Hamburg

IV. METHODEN

IV.1. Arbeiten mit prokaryotischen Zellen

IV.1.1. LB-Medium und Agarplatten

Frisch hergestelltes LB-Medium wurde 20 Minuten bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Vor Gebrauch des Mediums wurden gegebenenfalls Selektionsantibiotika zugegeben. Dabei wurde mit einer Konzentration von 60 µg/ml Ampicillin, beziehungsweise 50 µg/ml Kanamycin gearbeitet.

Für die Herstellung von Agarplatten wurde zu frisch hergestelltem LB-Medium die entsprechende Menge Agar gegeben und dieser Ansatz bei 121 °C für 20 Minuten autoklaviert, so dass der Agar sich lösen konnte. Nach dem Autoklavieren wurde der Ansatz auf ca. 40 °C abgekühlt und erst dann die Selektionsantibiotika in Konzentrationen analog zum LB-Medium zugegeben. Dann wurden ca. 15 ml des Ansatzes in eine Bakterienkulturschale mit 10 cm Durchmesser gegossen und bei Raumtemperatur zum Gelieren stehen gelassen. Die fertigen LB-Agarplatten wurden bei 4 °C kopfüber gelagert.

IV.1.2. Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Der Bakterienstamm *E. coli* DH5α wurde zunächst auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie gepickt und in 5 ml LB-Medium übergeimpft. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37 °C auf einem horizontalen Schüttler mit 180 Umdrehungen pro Minute kultiviert. 1 ml der Übernacht-Kultur wurde auf 100 ml LB-Medium übergeimpft und bei 37 °C auf einem Schüttler mit 180 Umdrehungen pro Minute kultiviert, bis die optische Dichte gemessen bei 595 nm ungefähr 0,6 betrug. Die Bakterienzellen wurden dann sofort mit 3000 Umdrehungen pro Minute (SS34-Rotor, Sorvall) für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 30 ml Tfb-I Lösung resuspendiert und 30-60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut mit 3000 Umdrehungen pro Minute (SS34-Rotor, Sorvall) für 10 Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig in 5 ml Tfb-II resuspendiert und 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Von dieser Suspension wurden 200 µl Aliquots in

vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße gefüllt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aliquots der kompetenten Zellen wurden dann bei -80 °C gelagert.

IV.1.3. Transformation von *E. coli* DH5α mit Plasmiden

Zur Transformation von *E. coli* DH5α wurde ein Aliquot der bei -80 °C gelagerten kompetenten DH5α auf Eis aufgetaut. Pro Transformation wurden 50 µl der Bakterien mit 100 ng der Plasmid-DNA für 45 Minuten auf Eis inkubiert, so dass die Plasmid-DNA sich an die Bakterien anlagern konnte. Dann folgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C, wodurch das Eindringen der Plasmid-DNA in die Zellen erleichtert wurde. Anschließend wurden die Bakterien weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde dann in 500 µl SOC-Medium aufgenommen und für 30 Minuten bei 37 °C kultiviert, damit die transformierten Bakterien die Antibiotikaresistenz vor dem Ausplattieren auf Antibiotika haltige LB-Agarplatten ausprägen konnten. 1/10 beziehungsweise 9/10 der Kultur wurden dann auf 2 Agarplatten, die das entsprechende Selektionsantibiotikum enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert, so dass am folgenden Tag Kolonien zur Gewinnung der Plasmid-DNA gepickt werden konnten.

IV.1.4. Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen

Minipräparation

Für die Minipräparation wurden mehrere Klone von den am Tag zuvor transformierten DH5α mit sterilen Pipettenspitzen gepickt und in 2,5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler mit 180 Umdrehungen pro Minute in Glasröhrchen inkubiert. 1,5 ml dieser Kultur wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und in einer Tischzentrifuge mit 6000 Umdrehungen pro Minute bei Raumtemperatur für 5 Minuten abzentrifugiert. Die restliche Bakterienkultur wurde bei 4 °C gelagert, um damit gegebenenfalls LB-Medium für eine Maxipräparation animpfen zu können. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 100 µl Mini-Prep Lösung I durch Vortexen resuspendiert. Dann wurden 200 µl Mini-Prep Lösung II zupipettiert, durch 2-3 maliges Kippen vorsichtig gemischt und 3 Minuten, in keinem Fall länger als 5 Minuten, bei Raumtemperatur inkubiert. Zu dem Ansatz wurden 150 µl Mini-

Prep Lösung III gegeben, durch Schütteln vermischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde in einer Eppendorf Zentrifuge 5810R, Rotor F-45-30-11 bei 14000 Umdrehungen pro Minute und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben, die zuvor mit 1 ml Ethanol absolut befüllt worden waren. Die DNA wurde unter Schütteln gefällt und der Ansatz zur vollständigen Fällung 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die gefällte DNA mit 14000 Umdrehungen pro Minute (Rotor F-45-30-11, Eppendorf Zentrifuge 5810R) für 15 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet einmal in 500 µl 70 % Ethanol (-20 °C) gewaschen. Dann wurde nochmals abzentrifugiert (14000 Umdrehungen pro Minute, 10 Minuten, 4 °C), der Überstand verworfen, das Pellet getrocknet und in 100 µl Wasser gelöst.

Maxipräparation

Für eine Maxipräparation von Plasmid-DNA wurde eine Kolonie der am Vortag transformierten DH5α mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum für 6 Stunden bei 37 °C und 180 Umdrehungen pro Minute kultiviert. 200 µl dieser Vorkultur wurden zum Animpfen einer 200 ml Kultur in LB-Medium mit Selektionsantibiotikum verwendet und diese über Nacht bei 37 °C und 180 Umdrehungen pro Minute kultiviert. Alternativ wurden 200 µl der verbliebenen Kultur für die Minipräparation zum Animpfen der Hauptkultur verwendet. Dann wurden die Bakterien mit 5000 Umdrehungen pro Minute (GSA-Rotor, Sorvall) für 10 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert und die Plasmid-DNA mit Hilfe des NUCLEOBOND AX500 Kits (Macherey-Nagel) gemäß den Angaben des Herstellers präpariert. Abschließend wurde die DNA in 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 200 µl Wasser gelöst. Die Konzentration und Reinheit der gewonnenen Plasmid-DNA wurden photometrisch bestimmt, zusätzlich wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die DNA-Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$62,9 \times OD_{260} - 36,0 \times OD_{280} = [DNA] \mu\text{g} / \text{ml}$$

Die Reinheit der DNA wurde aus dem Verhältnis OD_{260}/OD_{280} , das 1,8 bis 2,0 betragen sollte, beurteilt.

IV.1.5. Glycerolkultur transformierter Bakterien

Zur Langzeitlagerung transformierter Bakterien wurden Glycerolkulturen angelegt, um für die nächste Plasmid-DNA-Präparation den Schritt der Transformation kompetenter Bakterien umgehen zu können. Dazu wurden 750 µl der Bakterienkultur mit 250 µl 60 % sterilem Glycerol gemischt und dann bei -80 °C gelagert.

IV.2. Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

IV.2.1. Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Bei allen verwendeten eukaryotischen Zelllinien handelt es sich um adhärent wachsende Kulturen. C6D10 und C6D10-5 Zellen wurden in DMEM mit 5 % FCS bei 39 °C beziehungsweise bei 30 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert.

Die Zellen wurden alle 3-4 Tage bei einer Konfluenz von ungefähr 80 % passagiert. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 2 ml 37 °C warmer Trypsin/EDTA Lösung gewaschen und anschließend so lange mit 1 ml 37 °C warmer Trypsin/EDTA Lösung bei 37 °C inkubiert, bis sich die Zellen gerade von der Kulturschale lösten. Dann wurden sie in 5 ml 37 °C warmem DMEM mit 5 % FCS aufgenommen und in vorbereiteten 10 cm Kulturschalen mit 10 ml DMEM mit 5 % FCS 1:5 bis 1:20 verdünnt.

C6D10-5 Zellen wurden in regelmäßigen Abständen in Kulturmedium mit 400 µg/ml Geneticin (G418) kultiviert, um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten.

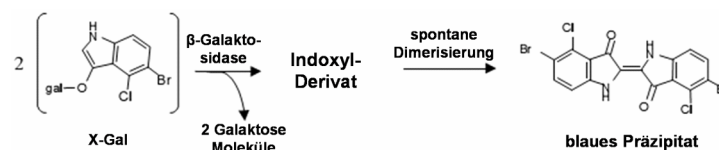
IV.2.2. Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Zum Einfrieren von adhärent wachsenden Zellen wurden diese zunächst mit 2 ml vorgewärmter Trypsin/EDTA Lösung gewaschen und dann mit 0,5 ml Trypsin/EDTA Lösung bei 37 °C so lange inkubiert, bis sich die Zellen gerade von der Kulturplatte lösten. Dann wurden die abgelösten Zellen in 1 ml Einfriermedium suspendiert und in eisgekühlte Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden dann in eine Styroporbox überführt und über Nacht bei -80 °C eingefroren. Für eine Langzeitlagerung wurden die Kryoröhrchen dann in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen möglichst schnell in einem $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmen Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in einer mit 20 ml vorgewärmten DMEM/5 % FCS vorbereiteten Kulturschale ausplattiert. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt, um tote Zellen und DMSO Rückstände des Einfriermediums zu entfernen.

IV.2.3. β -Galaktosidase Test

Senescente Zellen exprimieren die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase, die histochemisch bei pH 6,0 nachweisbar ist (Dimri et al. 1995). Die β -Galaktosidase-Aktivität kann durch das Spalten von farblosem X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid) durch β -Galaktosidase detektiert werden, wobei Galaktose und ein Indoxylderivat entsteht, welches nach spontaner Dimerisierung als blauer Farbstoff präzipitiert.



Für den β -Galaktosidase Test wurden die Zellen so kultiviert, dass die Kulturen zu 50-60 % konfluent waren. Dann wurden sie zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen und in den Kulturschalen mit 2 % Paraformaldehyd in PBS pH 7,4 für 5 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal gründlich mit PBS gewaschen. Die X-Gal-Färbelösung wurde unmittelbar vor dem Gebrauch aus X-Gal Stammlösung und X-Gal Puffer, die jeweils auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ vorgewärmt waren, hergestellt. Pro 10 cm Kulturschale wurden 5 ml der Färbelösung verwendet und die Zellen damit 6 bis 18 Stunden bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, bis die Färbung deutlich zu sehen war. Vor der mikroskopischen Analyse wurden die Zellen noch zweimal mit PBS gewaschen.

IV.2.4. Immunfluoreszenzmarkierung

Für die Immunfluoreszenzmarkierung wurden die adhärenenten Zellen auf Deckgläschen mit 12 mm Durchmesser kultiviert. Vor dem Fixieren wurden die Zellen

zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen zur Fixierung der Zellen in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltes Aceton überführt, wo sie mindestens 1 Stunde lagerten, bevor die Immunfluoreszenzmarkierung durchgeführt wurde.

Vor der Immunfluoreszenzmarkierung wurden die Zellen 10 Minuten in PBS bei Raumtemperatur gewaschen und rehydriert. Die folgenden Inkubationsschritte wurden in einer feuchten, abgedunkelten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt. Je Deckgläschen wurden in jedem Schritt $100\text{ }\mu\text{l}$ Lösung aufgetragen, die Antikörper wurden in raumwarmem PBS verdünnt. Für Doppelmarkierungen wurden die verschiedenen primären beziehungsweise sekundären Antikörper gemischt und gleichzeitig inkubiert (Ausnahme: Markierung von BrdU, siehe unten).

Um einer unspezifischen Bindung der sekundären Antikörper vorzubeugen, wurden die Zellen vor der Markierung für 10 Minuten mit einer PBS-Verdünnung von normalem Serum aus der gleichen Spezies wie die des später verwendeten sekundären Antikörpers vorinkubiert. Danach wurden die Zellen kurz in PBS gewaschen und anschließend für 25 Minuten mit der PBS-Verdünnung des primären Antikörpers inkubiert. Als nächstes wurden die Proben 15 Minuten in PBS gewaschen und dann mit dem sekundären Antikörper für 20 Minuten inkubiert. Abschließend wurden die Zellen nochmals 15 Minuten in PBS gewaschen. Gegebenenfalls wurde für die letzten 5 Minuten des letzten Waschschrilles dem PBS DAPI zugesetzt (Konzentration $0,1\text{ }\mu\text{g/ml}$), um die DNA in den Zellkernen anzufärben. Dann wurden die Deckgläschen in Einbettungsmedium auf einem Objektträger fixiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

IV.2.5. BrdU-Einbau

Zur Bestimmung der S Phase-Aktivität wurden Zellen auf Deckgläschen kultiviert und dem Kulturmedium, wenn nicht anders angegeben, für 30 Minuten $30\text{ }\mu\text{g/ml}$ BrdU zugefügt. Anschließend wurden die Zellen in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ Aceton fixiert. Für eine einfache Färbung von BrdU wurde die DNA für 10 Minuten in 2 N HCl in PBS bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert, wodurch das inkorporierte BrdU für den Antikörper zugänglich wird. Anschließend wurden die Proben für 15 Minuten in PBS neutralisiert und die Immunfluoreszenzmarkierung wie oben beschrieben durchgeführt.

Bei einer Doppelmarkierung von BrdU wurde zuerst das zu analysierende Protein markiert. Anschließend wurden die gebundenen Antikörper durch Inkubation mit

2 % Paraformaldehyd in PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Daran anschließend wurde die DNA der Probe denaturiert und die Immunfluoreszenzmarkierung von BrdU durchgeführt.

IV.2.6. TUNEL Test

Der TUNEL Test (*TdT-mediated dUTP nick end labeling*) detektiert DNA Fragmentierung in einer Fluoreszenzmarkierung (Facchinetti et al. 1991; Gavrieli et al. 1992; Piqueras et al. 1996). Das Enzym Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) katalysiert dabei den Einbau von Fluorescein-dUTP an den freien 3' OH-Enden fragmentierter DNA. Die Fluorescein-markierte DNA kann dann mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie oder durchflusszytometrischer Analyse detektiert werden.

Der TUNEL Test wurde mit dem ApoAlert DNA Fragmentation Assay Kit von Clontech durchgeführt. Dazu wurden die zu analysierenden Zellen auf Deckgläschen kultiviert und zum entsprechenden Zeitpunkt in -20 °C Aceton fixiert. Nach dem Fixieren wurden die Deckgläschen für 10 Minuten in PBS gewaschen und mit je 100 µl Equilibrierungspuffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Je Deckgläschen wurden 45 µl Equilibrierungspuffer, 5 µl Nukleotidgemisch und 1 µl TdT Enzym gemischt und die Deckgläschen damit für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inkubation mit 200 µl 2x SSC Puffer je Deckgläschen für 15 Minuten bei Raumtemperatur beendet. Abschließend wurden die Proben 3x für 5 Minuten in PBS gewaschen und zur mikroskopischen Analyse mit Einbettungsmedium auf Objektträgern fixiert.

IV.2.7. Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie ermöglicht die Diskriminierung von Zellen unterschiedlichen DNA-Gehalts und damit eine Aussage über die Zellzyklusverteilung und den Ploidiegrad von Zellen innerhalb einer Population. Durch Einlagerung des Fluorochroms Propidiumiodid in die DNA und durchflusszytometrische Analyse wird der DNA Gehalt erfasst. Die aufgezeichneten Histogramme zeigen eine Population G₀/G₁-Zellen mit einheitlichem, geringem DNA-Gehalt (G₀/G₁-Peak) sowie eine Population mit dem doppelten DNA-Gehalt (G₂-Peak). Zellen in der S-

Phase weisen einen intermediären DNA-Gehalt auf und bilden eine Population zwischen den Peaks. Zellen höheren Ploidiegrades erscheinen in Bereichen jenseits des G₂-Peaks. Apoptotische Zellen degradieren die genomische DNA mit einer spezifischen Endonuklease. Die dabei entstehenden Fragmente können leicht aus den Zellen extrahiert werden, so dass apoptotische Zellen als eine Population mit einem DNA-Gehalt kleiner als G₀/G₁-Zellen erscheinen (sub-G₁ Population). Für die durchflusszytometrische Analyse wurden Kulturen verwendet, die zu 50-80 % konfluent waren (1-2x 10⁶ Zellen pro Probe). Die Zellen wurden zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen, mit 1 ml Trypsin/EDTA Lösung abgelöst, in 10 ml eiskaltem PBS/EDTA aufgenommen und in 15 ml Reaktionsgefäßen mit 310x g für 6 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abgesaugt und das Zellpellet vorsichtig mechanisch gebrochen. Die Zellen wurden behutsam in 0,5 ml eiskaltem PBS/EDTA resuspendiert und durch Zutropfen von 5 ml 80 %igem, -20 °C kaltem Ethanol unter Vortexen fixiert. Nachdem die Proben 20-30 Minuten auf Eis standen, wurden sie bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert. Zur quantitativen DNA Färbung wurden die fixierten Zellen zunächst für 5 Minuten bei Raumtemperatur erwärmt und dann mit 310x g bei 16 °C für 6 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen zur Rehydrierung für 5 Minuten in PBS/EDTA bei Raumtemperatur inkubiert. Dann folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 310x g bei 16 °C für 6 Minuten. Das Zellpellet wurde in 1 ml Propidiumiodid-Färbelösung resuspendiert und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Proben wurden über Nacht im Dunkeln bei Raumtemperatur abgekühlt und am nächsten Tag der durchflusszytometrischen Analyse unterworfen. Je Probe wurden für die durchflusszytometrische Analyse 10000 Zellen im Coulter Epics (Beckman) gemessen und mit den Programmen WinMDI und Cylchred ausgewertet.

IV.2.8. Bestrahlung von Zellen mit ultraviolettem Licht

Die zu bestrahlenden Zellen wurden in Kulturschalen kultiviert. Vor der Bestrahlung wurden die Zellen zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen. Der Puffer wurde vor der Bestrahlung möglichst vollständig abgesaugt, die Zellen mit 100 J/m² bestrahlt und anschließend mit frischem Kulturmedium versetzt. Die Zellen wurden dann unter normalen Bedingungen bis zum Zeitpunkt der Probennahme weiter kultiviert.

IV.2.9. Transfektion von Expressionsplasmiden

Zur transienten Transfektion seneszenten C6D10-5 Zellen mit einem Expressionsplasmid wurde das System der Nukleoporation von AMAXA verwendet, da aufgrund des Wachstumsarrestes eine Lipofektion nicht möglich war. Mit Hilfe der Nucleofector-Technologie wird die DNA direkt in den Zellkern eingebracht, wodurch auch Zellen mit geringer Teilungsaktivität und schwer transfizierbare Zelllinien einer effizienten Transfektion zugänglich sind. Für die Nukleofektion von C6D10-5 Zellen mit Plasmid-DNA wurde die Nucleofector Solution V von AMAXA eingesetzt.

Zur Transfektion wurden die Zellen einmal mit 2 ml vorgewärmter Trypsin/EDTA Lösung gewaschen, in 1 ml Trypsin/EDTA abgelöst und in 5 ml Kulturmedium resuspendiert. Pro Transfektion wurden je 1×10^6 Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden mit 200x g bei Raumtemperatur für 10 Minuten abzentrifugiert, der Überstand möglichst vollständig abgesaugt und das Zellpellet in 100 µl der raumwarmen Nucleofektor-Lösung aus dem Kit resuspendiert. 2 µg der Plasmid-DNA wurden zugesetzt, diese durch Pipettieren kurz mit der Zellsuspension vermischt und die Suspension in eine Einmal-Küvette überführt. Die Zellen wurden dann mit dem Programm U09 beziehungsweise U30 nukleoporiert und unmittelbar danach in 500 µl Kulturmedium aufgenommen. Zur weiteren Analyse wurde die Zellsuspension wieder in Kulturschalen mit Medium aufgenommen und bis zur Probenentnahme bei 30 °C weiter kultiviert.

IV.2.10. Transfektion von siRNA

Transfektion mit AMAXA

Für die transiente Transfektion seneszenten C6D10-5 Zellen mit siRNA wurde ebenfalls das Nukleoporationssystem von AMAXA verwendet. Für die Nukleofektion von C6D10-5 Zellen mit siRNA wurde das Kit V von AMAXA eingesetzt.

Für die Transfektion wurden Zellpellets in Analogie zum Protokoll für die Transfektion von Expressionsplasmiden gewonnen und ebenfalls in 100 µl der raumwarmen Nucleofektor-Lösung aus dem Kit resuspendiert. Es wurden 1,4 µg siRNA zugesetzt, diese durch Pipettieren kurz mit der Zellsuspension vermischt und die Suspension in eine Einmal-Küvette aus dem Kit überführt. Die Zellen wurden dann mit dem Programm U09 nukleoporiert und unmittelbar danach in 500 µl Kultur-

medium aufgenommen. Zur weiteren Analyse wurde die Zellsuspension wieder in Kulturschalen mit Medium aufgenommen und bis zur Probenentnahme bei 30 °C weiter kultiviert.

Zum Test der Transfektionseffizienz für siRNA mit AMAXA in seneszenten Zellen wurde das siRNA Test Kit verwendet. Die Transfektion wurde unter den oben geschilderten Bedingungen durchgeführt mit dem Unterschied, dass gleichzeitig 1,5 µg siRNA und 2 µg eines GFP Expressionsplasmids zu der Zellsuspension gegeben wurden.

Transfektion mit Oligofectamine

Für eine Transfektion von siRNA mit Oligofectamine in 6-wells wurden am Vortag der Transfektion 1×10^5 C6D10-5 Zellen pro well ausplattiert, so dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 30-50 % aufwiesen. Für jedes well wurden 100 pmol der siRNA in 185 µl DMEM ohne FCS verdünnt. Parallel dazu wurden 3 µl Oligofectamine mit DMEM ohne FCS auf ein Gesamtvolumen von 15 µl verdünnt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das verdünnte Oligofectamine zu der siRNA Lösung gegeben, vorsichtig gemischt und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurden die zu transfizierenden Zellen einmal mit DMEM ohne FCS gewaschen und anschließend mit 800 µl DMEM ohne FCS versetzt. Nach vorsichtigem Mischen der Transfektionskomplexe wurden diese zu den Zellen pipettiert und durch vorsichtiges Bewegen der Kulturplatte mit dem DMEM gemischt. Die Zellen wurden dann für 4 Stunden bei 39 °C inkubiert, anschließend mit 500 µl DMEM mit der dreifachen Menge FCS (hier 15 %) versetzt und für den entsprechenden Zeitraum bis zur Probenentnahme bei 30 °C weiterkultiviert.

IV.3. Proteinanalytische Methoden

IV.3.1. Zellyse

Zur Herstellung von Gesamtzellysaten wurden subkonfluente Zellkulturen von Medium befreit, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und dann auf Eis abgeschabt. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 300x g für 10 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand

abgesaugt und die Pellets entweder bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder direkt verwendet.

Je nach Pelletgröße wurden die Zellen in $50\text{-}200\text{ }\mu\text{l}$ $2\times$ SDS-Lysispuffer suspendiert und die DNA durch Ultraschall geschert. Durch das anionische Detergenz SDS im Lysispuffer denaturieren die Proteine. Die Lysate wurden durch Zentrifugation in einer Eppendorfzentrifuge (5415D) mit 13000 Umdrehungen pro Minute bei Raumtemperatur für 10 Minuten geklärt.

IV.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem Bichinoninsäure (BCA) Protein Assay durchgeführt. Die Methode beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} durch Proteine im alkalischen Milieu. Das reduzierte Kupfer bildet mit der Bichinoninsäure einen violetten Komplex, der sein Absorptionsmaximum bei 562 nm hat.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden $2,5\text{ }\mu\text{l}$ des Gesamtzelllysats in 1 ml BCA-Arbeitslösung verdünnt. Die Arbeitslösung setzte sich aus 2% Lösung A (4% CuSO_4 , PIERCE, Rockford, USA) in Lösung B (BCA und Natriumtartrat in basischem Carbonatpuffer, PIERCE, Rockford, USA) zusammen, die unmittelbar vor Gebrauch gemischt wurden. Die Proben wurden dann für 30 Minuten im $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ warmen Wasserbad inkubiert und anschließend die Absorption bei 562 nm im Photometer gemessen. Als Referenz diente eine BSA Verdünnungsreihe von $25\text{ }\mu\text{g/ml}$ bis 2 mg/ml . Die Gesamtzelllysate wurden mit $2\times$ SDS-Lysispuffer auf gleiche Proteinkonzentrationen angeglichen, mit der entsprechenden Menge $6\times$ SDS-Probenpuffer versetzt und zur vollständigen Denaturierung der Proteine für 5 Minuten auf $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt.

IV.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der analytischen Trennung von Proteingemischen und erlaubt eine Abschätzung des Molekulargewichts der Proteine. Die denaturierten Proteine interagieren mit dem anionischen Detergenz SDS annäherungsweise proportional zu ihrem Molekulargewicht und unabhängig von ihrer Sequenz und migrieren daher mit einer Geschwindigkeit proportional zu

ihrem Molekulargewicht. Die SDS-PAGE wird in einem diskontinuierlichen Puffersystem durchgeführt, um eine möglichst große Auftrennung der Proteine zu erreichen.

10-25 µl der Gesamtzellysate wurden neben 5 µl des Proteinstandards aufgetragen und in einem diskontinuierlichen SDS-PAGE Gel aufgetrennt. Dabei richtete sich die Acrylamid-Konzentration des Trenngels nach der Größe der zu analysierenden Proteine und betrug zwischen 8 und 13 %. Die Gelelektrophorese wurde bei konstanter Stromstärke von 12 mA pro Gel zum Durchlaufen des Sammelgels und von 20 mA zum Auftrennen der Probe im Trenngel durchgeführt. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Bromphenol-Lauffront gerade aus dem Gel migriert war.

IV.3.4. Western Blot

Proteine, die durch SDS-PAGE aufgetrennt wurden, können elektrophoretisch auf eine Membran transferiert werden (*blotting*) und sind dann für eine Immundetektion zugänglich.

Nach der SDS-PAGE wurden die im Gel aufgetrennten Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Dazu wurden das Gel und die Membran zwischen je 3 Lagen in Transferpuffer getränktem Whatman 3 MM Papier eingespannt. Der Transfer erfolgte bei konstanten 60 V für 70 Minuten in einer mit Transferpuffer gefüllten Nassblot-Apparatur.

Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran in einer Lösung von Amidoschwarz in Wasser angefärbt, um so den Erfolg des Proteintransfers zu kontrollieren und die Banden des Proteinstandards zu detektieren und nachzuzeichnen. Um die Membran zu entfärben, wurde diese für 3x 15 Minuten mit 5 % Magermilch in TBST bei Raumtemperatur auf einem Schwenktisch inkubiert.

IV.3.5. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membran

Für den immunologischen Nachweis der Proteine auf der Nitrozellulose-Membran wurde diese zunächst eine halbe Stunde auf einem Schwenktisch bei Raumtemperatur in Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

Die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper, der in Blockpuffer verdünnt wurde und dem zur Erhöhung der Haltbarkeit 0,1 % Natriumazid beige-mengt war, erfolgte über Nacht bei 4 °C unter langsamem Schwenken. Danach wurde der Blot gründlich mit TBST gewaschen (3x 15 Minuten) und für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einer Verdünnung des sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörpers in Blockpuffer unter langsamem Schwenken inkubiert. Abschließend wurde der Blot wieder 3x 15 Minuten mit TBST gewaschen.

IV.3.6. ECL Reaktion

Die Detektion der Antikörperkomplexe erfolgte durch eine enzymatische Reaktion der Peroxidase, bei der Chemolumineszenz erzeugt wird.

Dazu wurden 10 ml der ECL Lösung 1 mit 10 ml der ECL Lösung 2 gemischt, auf die Membran gegeben, 1 Minute inkubiert und die Membran dann in eine Filmkassette überführt. Die feuchte Membran wurde mit einer Folie abgedeckt und je nach Intensität der Chemolumineszenz 1 bis 10 Minuten einem Röntgenfilm exponiert.

IV.3.7. Ablösen von Antikörperkomplexen von der Nitrozellulose-Membran

Die Membran kann ohne weiteres zur Detektion anderer Proteine genutzt werden, sofern sich die Signale der verschiedenen Antikörper nicht durch gleiche Laufhöhe der Proteine stören. Bei anzunehmender Überlagerung des Signals können die bereits gebundenen Antikörperkomplexe durch Denaturierung mit β -Mercaptoethanol entfernt werden.

Dazu wurde die Membran für 30-60 Minuten bei 60 °C in Stripping Buffer inkubiert und dabei ab und zu bewegt. Anschließend wurde die Membran so lange unter Schwenken bei Raumtemperatur mit TBST gewaschen, bis kein β -Mercaptoethanol mehr zu riechen war. Dann wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran durch Inkubation mit Blockpuffer abgesättigt und der Blot erneut mit primärem und sekundärem Antikörper inkubiert.

IV.4. Nukleinsäure-analytische Methoden

IV.4.1. Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)

Zelllyse

Die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) stellt eine Methode dar, mit deren Hilfe Protein-DNA-Interaktionen im Chromatin-Kontext lebender Zellen analysiert werden können (Orlando et al. 1997). Zur Analyse von Protein-DNA-Wechselwirkungen wurde die DNA von 2×10^6 Zellen einer 10 cm Kulturschale mit 1 % Formaldehyd in DMEM bei Raumtemperatur quervernetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 125 mM Glycin für 5 Minuten bei Raumtemperatur unterbrochen. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS unter Zusatz von Proteinase-inhibitoren wurden die Zellen abgeschabt und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen sedimentiert (1400x g, 5 Minuten, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1x Volumen ChIP Puffer 1 lysiert und 6x 5 Minuten auf Eis sonifiziert (4 MHz). Durch Zentrifugation mit 20000x g bei 4 °C für 25 Minuten wurden die Lysate geklärt und anschließend in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß überführt.

Präzipitation der DNA-Proteinkomplexe

Das gewonnene Lysat wurde 1:10 mit ChIP Puffer 2 verdünnt und für 45 Minuten bei 4 °C auf einem Rolltisch mit 80 µl ssPGS (mit Lachssperma DNA präabsorbierte Protein G Sepharose) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation mit 300x g bei 4 °C für 1 Minute sedimentiert und der Überstand in zwei gleichgroße Teile aufgeteilt. Einem Aliquot wurden 2 µg des entsprechenden Antikörpers hinzugefügt und über Nacht bei 4 °C auf dem Rolltisch inkubiert. Die Inkubation des zweiten Aliquots ohne Antikörper diente als Negativkontrolle. Am nächsten Tag erfolgte die Präzipitation der Immunkomplexe durch Zugabe von 60 µl ssPGS und Inkubation für 1 Stunde bei 4 °C auf dem Rolltisch. Die Sepharose-Kügelchen wurden kurz abzentrifugiert (1 Minute, 300x g, 4 °C) und der Überstand verworfen. Die präzipitierten Protein-DNA-Komplexe wurden dann sequentiell je einmal mit 1 ml ChIP Puffer 3, 1 ml ChIP Puffer 4, 1 ml ChIP Puffer 5 und zweimal mit 1 ml ChIP Puffer 6 gewaschen (je 5 Minuten Inkubation bei 4 °C auf dem Rolltisch). Zwischen den Waschschrritten wurde die ssPGS durch Zentrifugation mit 300x g für 1 Minute bei 4 °C sedimentiert und der Waschpuffer verworfen.

Elution der Immunkomplexe und Freisetzung der DNA

Die Elution der Protein-DNA-Komplexe erfolgte durch Zugabe von 250 µl ChIP Puffer 7 und Inkubation der ssPGS für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Rolltisch. Das Eluat wurde abgenommen, der Elutionsschritt wiederholt und die Eluate vereinigt.

Durch Zugabe von 5 M NaCl und Inkubation der Proben für 4 Stunden im Thermomixer bei 65 °C und 1000 Umdrehungen pro Minute wurden die kovalenten Bindungen zwischen Proteinen und DNA aufgehoben. Anschließend wurden 10 µl 500 mM EDTA, 20 µl 1 M Tris/HCl pH 6,5 und 2 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben und der Ansatz für 1 Stunde bei 45 °C im Thermomixer geschüttelt.

IV.4.2. Phenol/Chloroform Extraktion und DNA-Präparation

Die Phenol/Chloroform Extraktion ist eine Methode zur Reinigung von Nukleinsäuren und dient in erster Linie der Trennung von Proteinen und Nukleinsäuren. Die DNA Lösung wurde mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, gut gemischt und die Phasentrennung durch Zentrifugation mit 13000 Umdrehungen pro Minute für 4 Minuten bei Raumtemperatur (Tischzentrifuge) beschleunigt. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Extraktionsschritt wiederholt. Die wässrige Phase wurde wieder in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 1 µl Glycogen (20 µg/µl) zugegeben und die DNA durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol absolut über Nacht bei -70 °C gefällt. Am nächsten Tag wurde die gefällte DNA durch Zentrifugation mit 14000x g bei 4 °C für 30 Minuten sedimentiert und anschließend das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol (-20 °C) gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und dann in 30 µl TE-Puffer gelöst.

Der Nachweis bestimmter DNA-Fragmente erfolgte über PCR mit Hilfe sequenzspezifischer Primer. Zur Kontrolle wurde jeweils eine PCR unter den gleichen Bedingungen mit genomischer DNA, mit der Negativ-Kontrolle für den Antikörper und ohne DNA durchgeführt.

IV.4.3. Agarose Gelelektrophorese

In einem elektrischen Feld wandert DNA, die bei einem neutralen pH negativ geladen ist, zur Anode. Dieses Verhalten macht man sich in der Agarose-Gelelektrophorese zunutze und kann so DNA-Fragmente analytisch und präparativ auftrennen. Die DNA-Fragmente wandern im Agarosegel umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichts.

Agarosegele wurden hergestellt, indem die Agarose in 1x TAE Puffer gelöst wurde, bis eine klare, transparente Lösung erhalten wurde. Die Agaroselösung wurde auf 50 °C abgekühlt, 1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben und dann in eine Gelform gegossen. Nach dem vollständigen Gelieren der Agarose wurden die DNA Proben mit 6x DNA Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Zusätzlich wurden 5 µl des DNA-Standards aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in TAE Puffer bei konstanter Spannung von 80 V durchgeführt. Die Banden wurden nach Beendigung der Elektrophorese durch UV-Illumination sichtbar gemacht.

IV.4.4. Restriktionsspaltung von Nukleinsäuren

Die spezifische Spaltung von DNA erfolgt mit Restriktionsendonukleasen. Sie dient u. a. der analytischen Charakterisierung unbekannter Sequenzen, der Kontrolle von Klonierungen, der Gewinnung von DNA Fragmenten für eine Klonierung oder der Linearisierung von zirkulärer DNA. In der Regel kann 1 Einheit Restriktionsenzym die Spaltung von 1 µg DNA in 1 Stunde katalysieren. Die Glyzerolkonzentration im Ansatz darf höchstens 5 % betragen, da Restriktionsenzyme die DNA sonst unspezifisch verdauen.

In der Klonierung wurde der Restriktionsverdau zum Linearisieren der Plasmid-DNA und zum Ausschneiden des DNA Fragments aus einem Klonierungsvektor genutzt.

Der Restriktionsverdau erfolgte in einem Volumen von 20-50 µl in dem für das Restriktionsenzym optimalen Puffer und bei einer für das Enzym optimalen Temperatur. Die erhaltene DNA wurde gereinigt, und der Erfolg der Spaltung gelelektrophoretisch kontrolliert.

IV.4.5. DNA Extraktion aus Agarosegelen

Nach Verdau des Plasmids mit geeigneten Restriktionsenzymen wurden die DNA-Fragmente über ein Agarosegel aufgereinigt (QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden). Die Banden wurden unter UV-Illumination detektiert, und das Agarosestück mit der entsprechenden Bande mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und anschließend gewogen. Zum Aufschmelzen der Agarose und Binden der DNA an eine Matrix wurden je 100 mg Gel 300 µl Puffer QX1, und 30 µl Glasmilch für 2-10 µg DNA zugegeben. Dann wurde der Ansatz unter regelmäßigem Vortexen 10 Minuten bei 50 °C inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit 500 µl QX1 Puffer und zweimaligem Waschen mit 500 µl PE Puffer wurde die Glasmilch für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, bis das Pellet weiß wurde. Zur Elution der DNA wurde das Pellet in Wasser resuspendiert und für 5 Minuten bei 50 °C inkubiert. Dann wurde die Glasmilch sedimentiert und die DNA Lösung in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

IV.4.6. 5' Dephosphorylierung von DNA Fragmenten

Die Calf Intestine Phosphatase (CIP) ist eine Phosphohydrolase, die die 5'-Phosphatgruppe von RNA und DNA abspaltet. Bei der Klonierung von DNA-Fragmenten in einen linearisierten Vektor ist die Dephosphorylierung der Plasmid-DNA notwendig, um eine Rezirkularisierung der Vektor-DNA zu vermeiden und dadurch einen effizienteren Einbau von DNA-Fragmenten zu erhalten.

Zur Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten mit überhängenden Enden nach präparativem Restriktionsverdau (10 µg Plasmid DNA) wurden nach Abschluss des Verdaus diesem Ansatz 10 Einheiten CIP beigemischt und für weitere 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Da die CIP nicht hitzeinaktiviert werden kann, erfolgte eine Aufreinigung der DNA über ein Agarosegel und anschließende Extraktion der DNA.

IV.4.7. 5' Phosphorylierung von PCR-Fragmenten zur Klonierung

Für eine Ligation von Vektor und Insert wird in der Regel der linearisierte Vektor dephosphoryliert. Damit eine Ligation möglich ist, müssen daher die zu klonierenden Fragmente am 5' Ende phosphoryliert sein. DNA-Fragmente, die

durch eine PCR gewonnen wurden, besitzen keine Phosphatreste am 5' Ende. Zur Phosphorylierung der 5' Termini wurden 20 µl des PCR-Produkts mit 10 Einheiten der T4 Polynukleotidkinase in 1x T4 Ligase Puffer für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend mit dem Nucleospin Extract Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt.

IV.4.8. DNA-Ligation

Für eine schnelle Ligation des dephosphorylierten, linearisierten Vektors mit dem phosphorylierten PCR-Produkt wurde die Ready-To-Go T4 DNA Ligase (Amersham Biosciences) verwendet. Der Vektor wurde in einem molaren Verhältnis von 1:3 zum Insert eingesetzt. Die Menge des Inserts, die für 100 ng Vektor benötigt wurde, berechnete sich aus folgender Formel:

$$\frac{bp(Insert) \times ng(Vektor)}{bp(Vektor)} \times \frac{3}{1} = ng(Insert)$$

Die entsprechenden DNA Mengen wurden mit Wasser auf ein Endvolumen von 20 µl ergänzt. Dieser Ligationsansatz wurde zu einem Reaktionsgefäß pipettiert, welches die Ready-To-Go T4 DNA Ligase enthielt, und zunächst für 10 Minuten auf Eis und anschließend für 2 Stunden bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl einer Suspension von kompetenten Bakterien mit 4 µl dieses Ligationsansatzes transformiert.

IV.4.9. Blau-Weiß Selektion

Einige Klonierungsvektoren wie zum Beispiel pBluescript können nach Transformation kompetenter XL1-Blue Bakterien mit dem Ligationsansatz für eine Blau-Weiß Selektion genutzt werden, vorausgesetzt das Substrat X-Gal befindet sich im LB-Agar. In diesen Plasmiden liegt die *multiple cloning site* (MCS) in einem DNA Abschnitt, der für das Enzym β-Galaktosidase kodiert. Wurde das DNA-Fragment in der Ligation erfolgreich in den Vektor eingebaut, so ist das Leseraster für die β-Galaktosidase zerstört. Bakterien, die einen Vektor mit Insert aufgenommen haben, bilden daher weiße Kolonien und solche, die einen Vektor ohne Insert aufgenommen haben und das Enzym β-Galaktosidase exprimieren können, blaue

Kolonien. Dabei wird X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid) von der β -Galaktosidase in Galaktose und ein blaues Indoxylderivat überführt. Als Induktor für die Reaktion wird IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid) eingesetzt, das die Expression des lac-Operons induziert.

LB-Agarplatten wurden für eine Blau-Weiß Selektion 30 bis 60 Minuten vor dem Ausstreichen der transformierten XL-Blue Bakterien mit einer Lösung eingestrichen, die das Substrat X-Gal enthielt. Dafür wurden in einem sterilen Reaktionsgefäß je Agarplatte 100 μ l SOC-Medium vorgelegt. Dann wurden zunächst 100 μ l X-Gal Stammlösung zugegeben, gut gemischt, und dann 100 μ l IPTG Stammlösung zugegeben. Diese Mischung wurde auf der Agarplatte ausgestrichen und diffundierte dann in den Agarboden.

IV.4.10. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Standard PCR

Die PCR ist eine schnelle und sensitive Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Segmente (Saiki et al. 1988). Die Verwendung einer thermostabilen Polymerase ermöglicht die zyklische Denaturierung von DNA und die anschließende Verlängerung von Oligonukleotiden, die als Primer fungieren.

Die PCR Standardreaktion wurde in einem Volumen von 50 μ l und folgender Zusammensetzung durchgeführt: PCR-Puffer (1x), dNTP-Mix (je 0,25 mM), Taq-Polymerase (0,02 U/ μ l), Vorwärts-Primer (0,5 μ M), Rückwärts-Primer (0,5 μ M). Als Ausgangs-DNA wurden 2 μ l einer Reversen Transkriptions-Reaktion oder 10 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Das Zyklusprogramm (35 Zyklen) wurde ausgehend von folgenden Starteinstellungen für die Reaktionen optimiert: Initiale Denaturierung (3 Minuten, 96 °C), Denaturierung (30 Sekunden, 96 °C), Annealing (30 Sekunden, $T_m - 5$ K), Elongation (1 Minute pro 1 kb, 72 °C), finale Elongation (10 Minuten, 72 °C). Die Schmelztemperatur der Primer (T_m), die zur Berechnung der Annealing Temperatur benötigt wurde, ergab sich aus folgender Gleichung:

$$T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (T + A)$$

PCR zur Gewinnung von Klonierungsfragmenten

PCR-Produkte, die zur Klonierung vorgesehen waren, wurden mit der Pfu Turbo Hotstart DNA Polymerase (0,05 U/ μ l) amplifiziert. Die Pfu DNA Polymerase besitzt neben der DNA Polymerase-Aktivität auch eine 3'-5' Exonuklease-Funktion, durch deren Korrekturlese-Funktion die Fehlerrate der Pfu DNA Polymerase im Vergleich zur Taq DNA Polymerase deutlich vermindert ist. So sind im Durchschnitt berechnet auf 1 kb Fragmente 16 % der Fragmente bei Synthese mit der Taq DNA Polymerase mutiert, durch Synthese mit der Pfu DNA Polymerase nur 2,6 % der Fragmente. Innerhalb des PCR-Fragments, welches zur Klonierung verwendet werden soll, dürfen keine Mutationen auftreten, da dies sonst zu Mutationen in dem zu exprimierenden Protein führen kann.

IV.4.11. Sequenzierung

Die Didesoxy-Sequenzierung (Sanger et al. 1977) basiert auf dem statistischen Kettenabbruch einer Polymerase-Reaktion durch Zusatz von Didesoxynukleotiden (ddNTPs) zu den Desoxynukleotiden (dNTPs). Eine Variante der Methode stellt das *cycle sequencing* (Sears et al. 1992) dar. Die *cycle sequencing* Reaktion wurde mit dem ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Biosystems) durchgeführt. In diesem System dienen Dichlorrhodamin-gekoppelte ddNTPs als Reaktionsterminatoren. Der Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 20 μ l folgende Komponenten: 400 ng Plasmid-DNA, 10 pmol Primer, 3 μ l BigDye (Kit). Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen (25 Zyklen): Initiale Denaturierung (1 Minute, 96 °C), Denaturierung (15 Sekunden, 96 °C), Annealing (15 Sekunden, 50 °C), Elongation (4 Minuten, 60 °C). Anschließend wurden 70 μ l Wasser und 10 μ l 3 M KAc, pH 5,1 zugegeben, die DNA durch Zusatz von 300 μ l absolutem Ethanol gefällt, abzentrifugiert (14000 Umdrehungen pro Minute, 30 Minuten, 4 °C), gegebenenfalls mit 70 % Ethanol gewaschen und dann getrocknet. Die Analyse erfolgte durch den Sequenzierservice (Institut für Zellbiochemie und klinische Neurologie, Hamburg) in einem ABI-Sequenator 377.

IV.4.12. RNA Präparation

Die Isolation von sauberer, intakter RNA ist eine grundlegende Voraussetzung für die Analyse der Genexpression. Die Schwierigkeit der RNA Präparation besteht in erster Linie darin, dass Ribonukleasen sehr stabile Enzyme sind, die keine Ko-Faktoren benötigen. Der erste Schritt der Präparation besteht daher in einer Zellyse unter Bedingungen, die zur weitgehenden Denaturierung der RNasen führen. Die RNA wird dann durch eine saure Phenolextraktion von anderen zellulären Makromolekülen abgetrennt. Guanidinthiocyanat ist eine der effektivsten Protein-denaturierenden Substanzen. Die *single-step* Methode zur RNA Präparation basiert auf der Eigenschaft von RNA, bei pH 4,0 in einer wässrigen Phase mit 4 M Guanidinthiocyanat zu verbleiben. Unter diesen sauren Bedingungen reichern sich nur die DNA Fragmente, die kleiner als 10 kb sind, und Proteine in der organischen Phenol/Chloroform-Phase an (Chomczynski and Sacchi 1987). Daher ist eine Fragmentierung der DNA im Zuge der Zellyse notwendig (Homogenisation). Die RNA kann nach der Extraktion aus der wässrigen Phase mit Isopropanol gefällt werden.

Die RNA-Präparation erfolgte mit Hilfe der peqGOLD RNAPure Lösung (peqlab). Die Zellen wurden direkt in der Zellkulturschale durch Zugabe von 1 ml peqGOLD RNAPure pro 3,5 cm Kulturschale lysiert. Das Lysat wurde durch zehnmaliges Aufziehen in eine 2 ml Spritze versehen mit einer 21 G Nadel homogenisiert. Die Proben wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Je eingesetztem Milliliter peqGOLD RNAPure wurden 200 µl Chloroform zugegeben, 15 Sekunden kräftig geschüttelt und anschließend 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zentrifugation bei 12000x g und Raumtemperatur für 5 Minuten, wodurch die Phasentrennung beschleunigt wurde, wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde durch Zugabe von 500 µl Isopropanol pro eingesetzten Milliliter peqGOLD RNAPure und durch Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Nach Zentrifugation (12000x g, 10 Minuten, 4 °C) wurde das RNA-Pellet zweimal mit 1 ml eiskaltem 75 % Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl DEPC-Wasser gelöst. Die wässrigen RNA-Lösungen wurden bei -70 °C gelagert.

IV.4.13. RT-PCR

Die Reverse Transkription ist das enzymatische Umschreiben von RNA in DNA, die sogenannte cDNA (*copy DNA*). Die Reaktion erfolgt mit retroviralen Polymerasen, die ein DNA-Oligonukleotid (Primer) in 5'-3'-Richtung komplementär zur RNA verlängern.

Zur cDNA-Synthese wurden RNA (1-2 µg) und Primer (Random Hexamers, 50 ng, Invitrogen) zunächst denaturiert (5 Minuten, 65 °C) und dann schnell auf 4 °C abgekühlt. Die Reaktion fand dann in 20 µl unter folgenden Bedingungen statt: First Standard Puffer (1x, Invitrogen), DTT (10 mM), dNTP-Mix (je 0,5 mM), Reverse Transkriptase (M-MLV, 200 U). Nach Inkubation für 52 Minuten bei 37 °C wurde das Enzym für 15 Minuten bei 70 °C inaktiviert. 2 µl dieses Reaktionsansatzes wurden für eine PCR eingesetzt.

IV.4.14. Herstellen von siRNA

Doppelsträngige RNA (dsRNA) kann ein gezieltes Gen-*Silencing* einleiten. Dabei werden kleine dsRNAs, die siRNAs (*small interfering RNAs*) genannt werden, in einen Multi-Enzymkomplex mit Nukleaseaktivität (RISC = *RNA-induced silencing complex*) integriert. Der *antisense*-Strang der siRNA dirigiert den Multi-Enzymkomplex zur komplementären mRNA, welche dann durch die im RISC eingeschlossene Nuklease zielgerichtet degradiert wird. In Mammalia-Zellen dürfen die siRNAs eine Länge von ca. 30 Basenpaaren nicht überschreiten, da durch längere dsRNAs eine starke, antivirale Antwort in der Zelle ausgelöst wird. Durch die antivirale Antwort werden mRNAs unspezifisch degradiert, wodurch es schwierig wird, zwischen unspezifischer und spezifischer Antwort zu unterscheiden. Das Design der siRNAs erfolgt nach bestimmten Algorithmen.

Die in dieser Arbeit verwendeten siRNAs wurden nach folgenden Regeln konstruiert: Die siRNA Duplexe setzten sich aus einem *sense*- und einem *antisense*-Strang mit einer Länge von jeweils 21 Nukleotiden zusammen, wobei am 3' Ende 2 Nukleotide (2 Thymin-Reste) überhingen. Am 5' und 3' Ende befindliche, nicht translatierte Regionen der mRNA (UTRs) wurden als Zielregion der siRNAs ausgeschlossen, da man davon ausgeht, dass in diesen Bereichen häufig andere Proteine binden und dadurch die mRNA vor der Degradierung durch RISC schützen können. Bei der Auswahl der Zielsequenz für die siRNA innerhalb der mRNA wurde darauf geachtet,

dass diese Sequenz der Formel AA (N19) folgte und einen GC-Gehalt von ungefähr 50 % hatte. Außerdem wurden Folgen von mehr als 3 Cytosin- oder Guanin-Resten ausgeschlossen. Die so gewonnene Zielsequenz wurde auf Spezifität innerhalb des Zielorganismus geprüft, indem eine BLAST-Suche in der NCBI Datenbank für exprimierte Sequenzen (*EST library*) durchgeführt wurde. Dadurch wurde abgesichert, dass spezifisch nur die als Ziel ausgewählte mRNA degradiert wurde. Die siRNAs wurden mit Hilfe des Silencer siRNA Construction Kit von Ambion hergestellt. Dazu wurden jeweils ein *sense* und ein *antisense* DNA-Template von 29 Nukleotiden Länge eingesetzt. Diese Oligonukleotide setzten sich vom 5' Ende her zunächst aus 21 Nukleotiden zusammen, die sich aus der spezifischen Zielsequenz der mRNA ergaben, gefolgt von 8 Nukleotiden, die für das Binden des T7 Promotor Primers notwendig waren. Nach dem Binden des T7 Promotor Primers wurden in einer Reaktion mit dem Klenow Fragment der DNA Polymerase I die 3'-Termini entlang der einzelsträngigen 5'-DNA-Überhänge aufgefüllt. Der T7 Promotor wurde zur Transkription von RNA mit Hilfe der T7 RNA Polymerase vom jeweiligen *Template* benötigt. Nach Transkription der *sense* und *antisense* RNA wurden die beiden Ansätze vereinigt, so dass sie sich zu doppelsträngiger RNA zusammen lagern konnten. Dieser Ansatz wurde dann mit DNase zum Abbau der DNA-*Templates* und mit einzelstrangspezifischer RNase zum Abspalten der 5' *leader* Sequenz verdaut. Der Ansatz wurde über Säulen mit einem Glasfaser-Filter aufgereinigt und die aufgereinigte siRNA mit Wasser eluiert.

V. ERGEBNISSE

V.1. Die Expression von Wildtyp p53^{Val135} führt zu zellulärer Seneszenz

V.1.1. Durch die Expression der p53^{Val135} Wildtyp-Form wird ein stabiler G1 Arrest induziert

Auf die Expression von ektope oder Stabilisierung von endogenem Wildtyp p53 reagieren Mammalia-Zellen entweder mit Apoptose oder mit einem Wachstumsarrest (Levine 1997). Ziel der Arbeit war es zu bestimmen, welche Signalwege durch ektope Expression von Wildtyp p53 in Rattengliomzellen, die eine Deletion im *INK4A* Locus besitzen, aktiviert werden. Dafür wurde der Subklon C6D10-5 verwendet, der die temperatursensitive Mutante p53^{Val135} exprimiert, welche sowohl in Mutanten- wie auch in Wildtyp-Konformation vorliegen kann.

C6D10-5 Zellen wurden zunächst bei 39 °C kultiviert. Bei dieser Temperatur liegt p53^{Val135} in Mutanten-Konformation vor. Durch anschließende Kultivierung der Zellen bei 30 °C wurde der Übergang der Mutanten- in die Wildtyp-Konformation von p53^{Val135} induziert werden. Mikroskopische Beobachtungen der Zellen zeigten, dass die Zellen auf die Anwesenheit von Wildtyp p53 nicht mit Apoptose antworteten, sondern durch andauernde Expression der Wildtyp-Form von p53 im Wachstum arretierten. Um genauer definieren zu können, ob der Arrest mit der Akkumulation der Zellen in einer bestimmten Zellzyklusphase einhergeht, wurden die Zellen einer durchflusszytometrischen Analyse unterworfen, wobei der DNA Gehalt der Zellen durch Propidiumiodid-Einlagerung in die DNA erfasst wurde.

Bereits 7 Tage nach Übergang von mutiertem p53 in die Wildtyp-Form war eine deutliche Verschiebung im Zellzyklusprofil dieser Kulturen zu erkennen (Abbildung 10). Nach vierwöchiger Expression von Wildtyp p53 zeigten die meisten Zellen einen G1 Phase-spezifischen DNA Gehalt. Parallel dazu erniedrigte sich die Zahl der Zellen in der G2 Phase deutlich, und nur noch eine verschwindend geringe Anzahl von Zellen zeigte einen S Phase-spezifischen DNA-Gehalt (Abbildung 10). Die Analyse zeigte eindeutig, dass C6D10-5 Zellen durch die Anwesenheit von Wildtyp p53 in der Proliferation stagnierten und in der G1 Phase des Zellzyklus arretierten.

Gleichzeitig bestätigte die durchflusszytometrische Analyse die mikroskopische Beobachtung, dass unter diesen Bedingungen keine Apoptose induziert wurde, da bei andauernder Expression von Wildtyp p53 keine sub-G1 Population im Zellzyklusprofil sichtbar wurde.

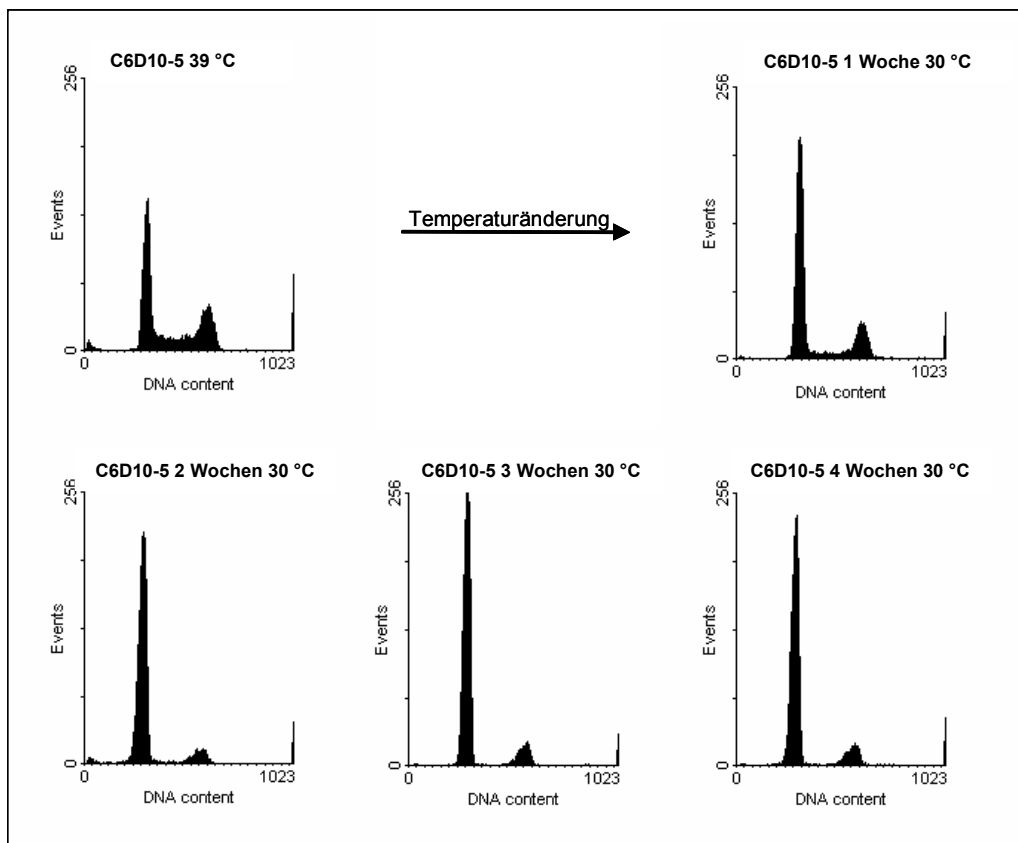


Abbildung 10: Analyse der Verschiebung des Zellzyklusprofils von C6D10-5 Zellen durch die Expression der Wildtyp-Form von p53^{Val135}. C6D10-5 Zellen wurden bei 39 °C und für 7, 14, 21 beziehungsweise 28 Tage bei 30 °C kultiviert. p53^{Val135} liegt bei 39 °C in der Mutanten-Form und bei 30 °C in der Wildtyp-Form vor. Die Zellen wurden zu diesen Zeitpunkten durch Trypsin abgelöst, in Ethanol fixiert, die DNA mit dem Fluorochrom Propidiumiodid angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Pro Ansatz wurden 10000 Zellen gezählt und unter Ausschluss von Dubletten und Zelltrümmern ausgewertet.

Zur genaueren Quantifizierung der Zellzyklusphasen innerhalb einer Zellpopulation von arretierten C6D10-5 Zellen wurden die Zellzyklusprofile mit dem Programm Cylchred ausgewertet, so dass Angaben zur prozentualen Verteilung der Zellpopulation auf die verschiedenen Zellzyklusphasen gemacht werden konnten. Um eventuelle Schwankungen innerhalb des Experiments ausschließen zu können, wurden

Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen aus drei getrennt von einander durchgeführten Experimenten errechnet. In dem Säulendiagramm in Abbildung 11 lässt sich deutlich die starke Zunahme der Zellen in G1 Phase von ca. 43 % innerhalb einer Zellpopulation mit mutiertem p53^{Val135} auf 86 % für Zellen, die 4 Wochen Wildtyp p53 exprimierten, erkennen. Gleichzeitig fiel der Anteil der Zellen, die einen S Phase-typischen DNA Gehalt zeigten, von 33 % auf 2 %, der Anteil der Zellen in der G2 Phase sank von 23 % auf 12 %.

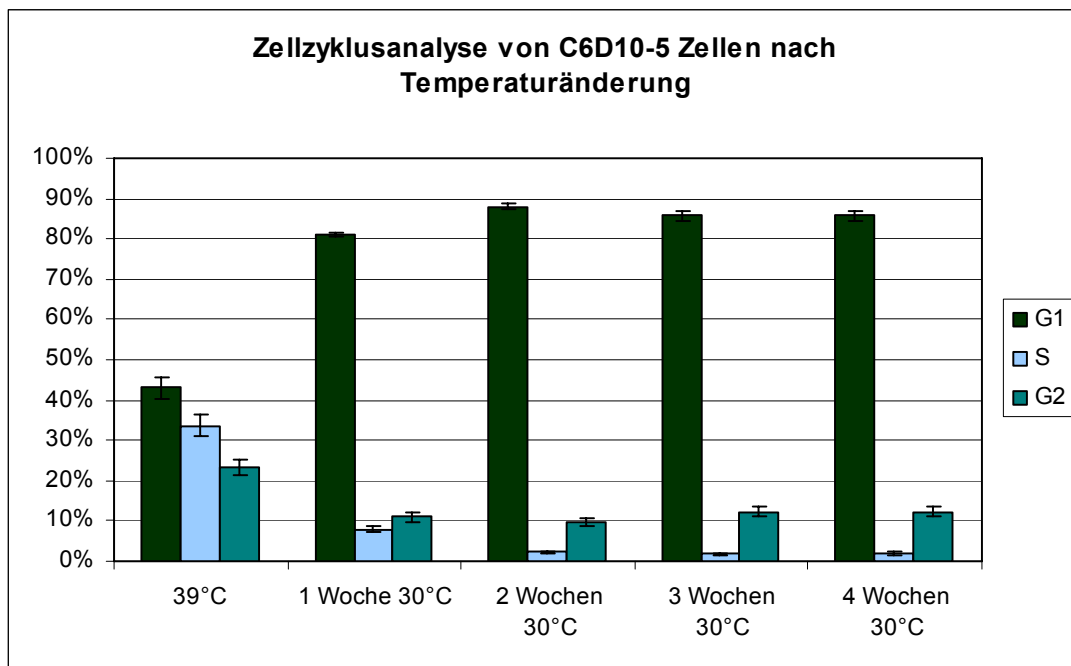


Abbildung 11: Analyse der prozentualen Verteilung von C6D10-5 Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen vor und nach Expression von Wildtyp p53. In drei voneinander unabhängigen Ansätzen wurden die Zellen entweder bei 39 °C oder für die angegebenen Zeitwerte bei 30 °C kultiviert, anschließend abtrypsiniert und in Ethanol fixiert. Nach Färben der DNA mit Propidiumiodid wurden die Zellen einer durchflusszytometrischen Messung unterworfen, wobei je Probe 10000 Zellen unter Ausschluss von Dubletten und Zelltrümmern erfasst wurden. Die Rohdaten vom Epics XL (Beckman Coulter) wurden mit der Software WinMDI 2.8 in single parameter Histogramme umgewandelt und quantitativ mit dem Programm Cylchred ausgewertet. Die so erhaltenen Werte der drei voneinander unabhängigen Experimente wurden gemittelt und die Standardabweichung berechnet. Die gemittelten Werte sind mit ihrer Standardabweichung in dem Säulendiagramm dargestellt.

V.1.2. Der G1 Arrest ist unabhängig von der Änderung der Kulturbedingungen

Um sicherzugehen, dass die mit p53^{Val135} stabil transfizierten C6D10 Zellen nicht aufgrund der auf 30 °C erniedrigten Temperatur, die für den Wechsel der Mutanten in die Wildtyp-Form von p53^{Val135} notwendig ist, in der G1 Phase arretierten, wurde zum Vergleich die Ausgangszelllinie C6D10 analog zu den C6D10-5 Zellen bei 39 °C und bei 30 °C kultiviert und anschließend einer durchflusszytometrischen Analyse unterworfen. Dabei wurde deutlich, dass C6D10-5 Zellen spezifisch durch die Expression von Wildtyp p53 in einen G1 Phasen-Arrest übergehen, da C6D10 Zellen allein durch die veränderten Kulturbedingungen keine Verschiebung im Zellzyklusprofil aufzeigten (Abbildung 12).

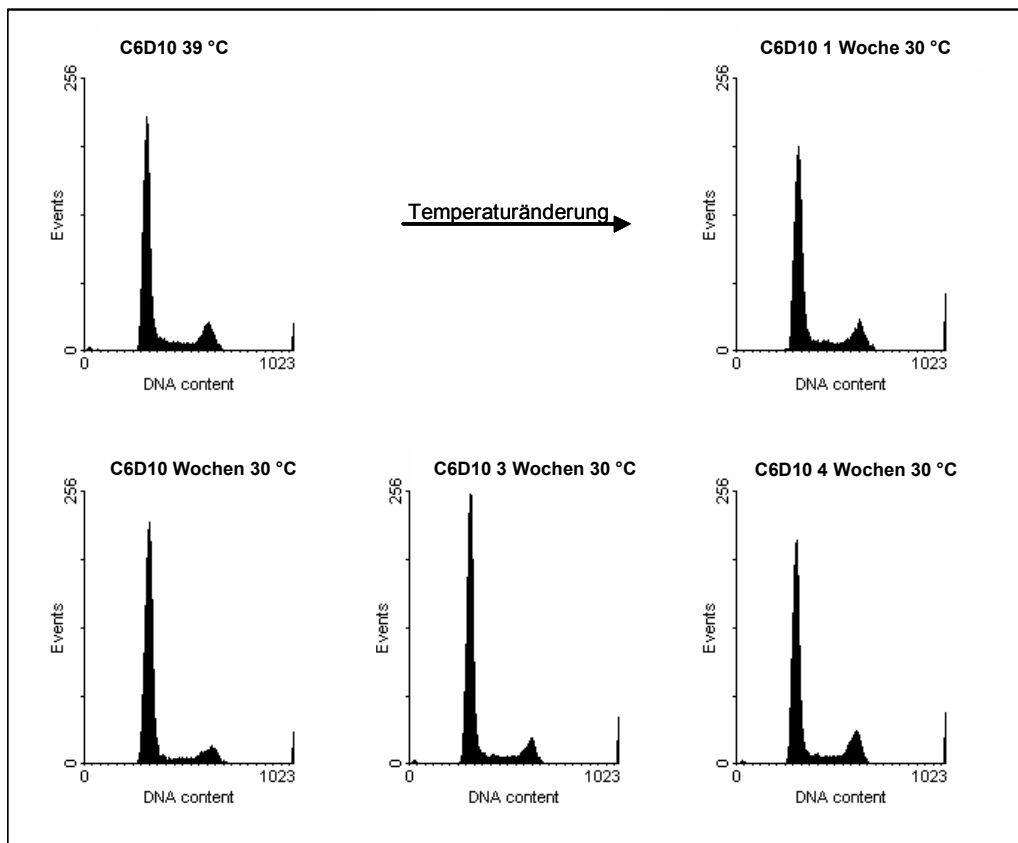


Abbildung 12: Analyse des Zellzyklusprofils von C6D10 Zellen, die bei 39 °C beziehungsweise bei 30 °C kultiviert wurden. C6D10 Zellen wurden analog zu den C6D10-5 Zellen bei 39 °C und 30 °C kultiviert, abtrypsiniert, in Ethanol fixiert und nach Anfärben der DNA mit PI einer durchflusszytometrischen Analyse unterworfen. Pro Probe wurden 10000 Zellen unter Ausschluss von Dubletten und Zelltrümmern erfasst.

Ebenso wurden für die C6D10 Zellen zu jedem Zeitpunkt drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente ausgewertet. Dabei wurden aus den drei erhaltenen Werten der Mittelwert und die entsprechende Standardabweichung errechnet. Im Vergleich zur Darstellung der prozentualen Anteile der Zellzyklusphasen von C6D10-5, die Wildtyp p53 exprimieren (Abbildung 11), ist ersichtlich, dass allein durch die Temperaturänderung keine deutlichen Schwankungen in der Verteilung der Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen auftreten. Die Zellen zeigen sowohl bei 39 °C wie auch bei 30 °C ein annähernd identisches Zellzyklusprofil (Abbildung 13).

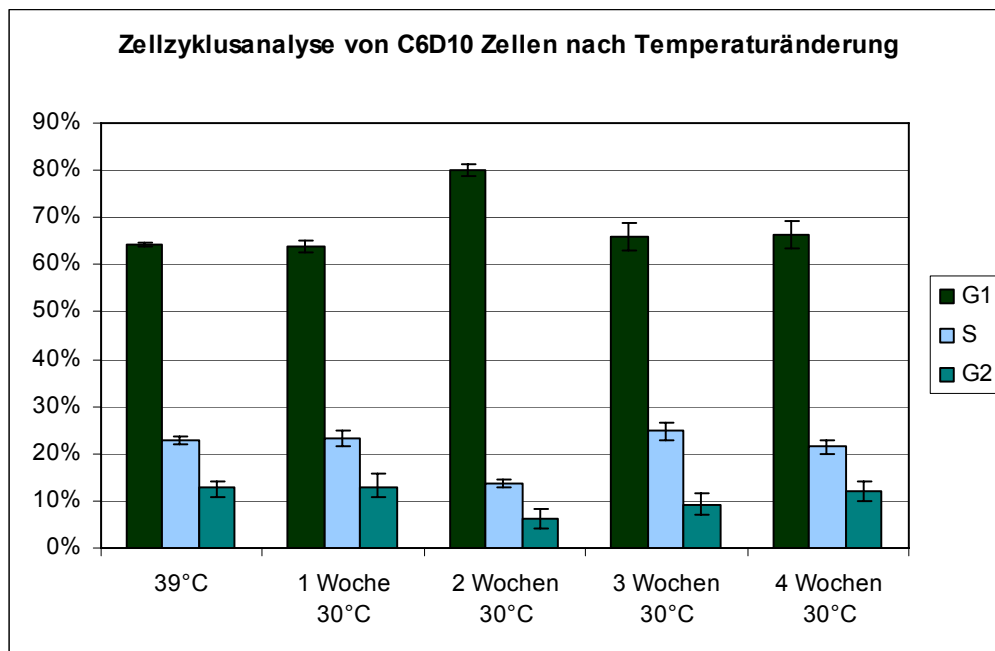


Abbildung 13: Analyse der prozentualen Verteilung von C6D10 Zellen, die bei 39 °C beziehungsweise bei 30 °C kultiviert wurden, auf die verschiedenen Zellzyklusphasen. In drei voneinander unabhängigen Ansätzen wurden C6D10 Zellen entweder bei 39 °C oder für die angegebenen Zeitwerte bei 30 °C kultiviert, anschließend abtrypsiniert und in Ethanol fixiert. Nach Färben der DNA mit Propidiumiodid wurden die Zellen einer durchflusszytometrischen Messung unterworfen, wobei je Probe 10000 Zellen unter Ausschluss von Dubletten und Zelltrümmern erfasst wurden. Die Auswertung der Rohdaten aus den drei unabhängigen Experimenten erfolgte analog zur Auswertung der Daten in Abbildung 11.

Die Daten belegen, dass die Induktion eines Wachstumsarrestes in C6D10-5 Zellen eindeutig in Abhängigkeit der Expression von Wildtyp p53 erfolgt. Dass C6D10 Zellen bei 39 °C im Vergleich zu C6D10-5 Zellen grundsätzlich weniger S Phase-

Aktivität aufweisen, kann durch einen Wachstumsvorteil der Zellen, die mutiertes p53 exprimieren, erklärt werden.

V.1.3. Der Arrest ist durch die Repression von Zyklin A und die Akkumulation von Zyklin E gekennzeichnet

Für das Durchlaufen des Zellzyklus ist es notwendig, dass Zykline, mit den entsprechenden Zyklin-abhängigen Kinasen (cdk) einen funktionellen Komplex bilden. Innerhalb dieses Komplexes stellt die konstant exprimierte Zyklin-abhängige Kinase die katalytische Untereinheit dar, während das Zyklin Zellzyklus-spezifisch exprimiert wird und damit die katalytische Untereinheit bildet. Die Substrate der Zyklin-cdk Komplexe werden durch Phosphorylierung entweder aktiviert oder deaktiviert (Johnson and Walker 1999).

Die meisten Zelllinien, in denen p53 Expression zu einem andauernden Wachstumsarrest führt, akkumulieren zu einem Zeitpunkt in G₁, zu dem weder Zyklin E noch Zyklin A exprimiert werden. Dieser Punkt wird auch als G₁ Restriktionspunkt bezeichnet (Pardee 1989). Die Expression der Zykline E und A leitet den Übergang der G₁ in die S Phase ein, da die Phosphorylierung von Zielproteinen durch Zyklin E bzw. Zyklin A-cdk₂ Komplexe zur Expression S Phase-spezifischer Gene führt.

Um den Arrestpunkt im Zellzyklus der C6D10-5 Zellen genauer definieren zu können, wurde die Expression Zellzyklus-regulatorischer Proteine von arretierten C6D10-5 Zellen qualitativ und quantitativ untersucht. Durch diese Analyse wurde eine genauere Aussage über den exakten Arrestpunkt der Zellen im Übergang von G₁ zu S möglich. Zunächst wurde das Expressionsmuster der Zykline E und A in den arretierten Zellen bestimmt. Zur Proteinexpressionsanalyse wurden C6D10-5 Zellen bei 39 °C beziehungsweise für 1, 2, 3 oder 4 Wochen bei 30 °C kultiviert, das Gesamtzelllysat dieser Kulturen in einem SDS-PAGE Gel aufgetrennt und die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Zyklin E wurde immunologisch durch Inkubation der Membran mit dem Antikörper M-20 nachgewiesen. Nach Ablösen der Zyklin E Antikörperkomplexe war die immunologische Detektion von Zyklin A mit dem Antikörper H-432 möglich. p53 Proteinmengen wurden durch Inkubation der Membran mit dem Antikörper PAb248 detektiert. Zum Nachweis für das Beladen des Gels mit gleichen Gesamtproteinmengen wurde das Protein β -Tubulin detektiert.

Die Proteinmengen von p53^{Val135} sanken sehr stark, sobald die Mutanten-Form durch Temperaturwechsel in die Wildtyp-Form überführt wurde (Abbildung 14). Die Wildtyp p53 Mengen der bei 30 °C kultivierten Zellen sind bei der gewählten Expositionszeit des Röntgenfilms nicht zu detektieren. Bei längerer Exposition des Films gegenüber dem Chemolumineszenzsignal kann Wildtyp p53 jedoch detektiert werden (hier nicht dargestellt). Die starke Abnahme der p53 Proteinmengen ist durch eine veränderte Halbwertszeit von p53 zu erklären. p53^{Val135} besitzt in seiner Mutanten-Form eine Halbwertszeit von 6 Stunden, in der Wildtyp-Form nur noch eine von ca. 20 Minuten (Oren et al. 1981; Reich et al. 1983).

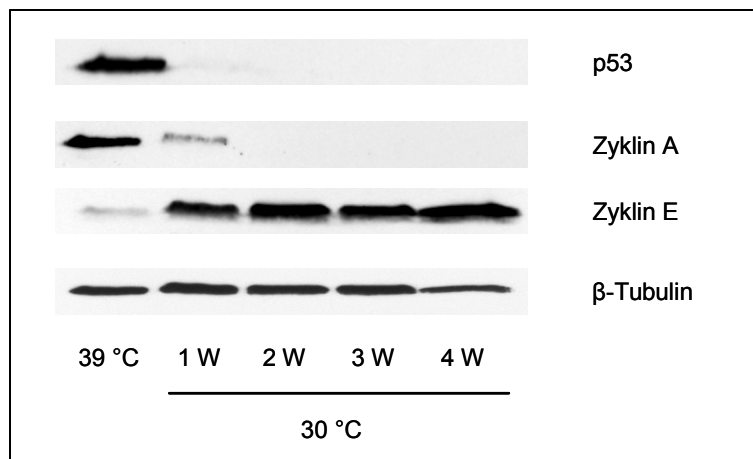


Abbildung 14: Analyse der Proteinexpression von p53^{Val135}, Zyklin A und Zyklin E nach Überführen der Mutanten-Form von p53^{Val135} in die Wildtyp-Form. C6D10-5 Zellen wurden bei 39 °C (Spalte 1) und bei für 1, 2, 3 beziehungsweise 4 Wochen bei 30 °C (Spalten 2-5) kultiviert und anschließend pelletiert, lysiert und die Proteine über ein 13 % SDS-PAGE Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran wurde diese durch Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern auf Anwesenheit von p53, Zyklin A und Zyklin E und durch Exposition von Röntgenfilmen gegen die Chemolumineszenzsignale nach ECL Reaktion überprüft.

Mit der Überführung von p53^{Val135} in die Wildtyp-Form ging eine Akkumulation von Zyklin E einher, die sich bereits 7 Tage nach Expression von Wildtyp p53 manifestierte. Nach 14 Tagen hatten die Zyklin E Mengen einen Plateau-Wert erreicht (Abbildung 14). Parallel zur Akkumulation von Zyklin E sanken die Zyklin A Mengen rasch, bis nach 14 Tagen auch bei sehr langer Exposition des Röntgenfilms kein Zyklin A mehr detektiert werden konnte (Abbildung 14). Die β-Tubulin Mengen

blieben in den arretierten Zellen relativ konstant und zeigten, dass gleiche Gesamtproteinmengen von jedem Lysat aufgetragen wurden.

Die Veränderungen im Expressionsmuster von Zyklin E und Zyklin A bestätigen die durch durchflusszytometrische Analyse gewonnenen Daten. Auch dort ist zu erkennen, dass sich die prozentualen Anteile der Zellzyklusphasen mit der Anwesenheit von Wildtyp p53 zunächst sehr stark veränderten (1 Woche 30 °C) und bereits nach 2 Wochen Wildtyp p53 Expression auf dem endgültigen Niveau angekommen waren. Durch die Proteinexpressionsanalyse der Zykline E und A, die ihre Funktionen in der Regulation des Übergangs der G1 in die S Phase haben, konnte der Arrestpunkt der C6D10-5 Zellen in der G1 Phase des Zellzyklus noch genauer definiert werden. Die Daten zeigten, dass C6D10-5 Zellen im Gegensatz zu den meisten Zellen nicht am G1 Restriktionspunkt arretierten (Pardee 1989), sondern diesen überliefen und zu einem Zeitpunkt im Zellzyklus akkumulierten, zu dem bereits Zyklin E exprimiert wurde.

Die Ergebnisse, die durch die Proteinexpressionsanalyse von Gesamtzelllysaten mit Hilfe der Western Blot-Technik erhalten wurden, konnten durch eine Immunfluoreszenzmarkierung von Zyklin A und Zyklin E in arretierten C6D10-5 Zellen bestätigt werden. Nach Fixieren in -20 °C Aceton wurden die Zellen mit dem monoklonalen Antikörper CY-A1 gegen Zyklin A und dem polyklonalen Antikörper M-20 gegen Zyklin E für die Immunfluoreszenzmikroskopie markiert und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Auch auf Einzelzellniveau war zu sehen, dass über 99 % der Zellen negativ für die Immunfärbung von Zyklin A waren und deutlich Zyklin E exprimierten (Abbildung 15).

Dieses Ergebnis machte deutlich, dass die Zellpopulation einheitlich auf die Anwesenheit von Wildtyp p53 reagierte und das Zyklin Expressionsmuster demnach nicht nur für eine Subpopulation Gültigkeit hatte. Die gesamte Zellpopulation arretierte zwischen Zyklin E- und Zyklin A-vermittelten Schritten innerhalb des Zellzyklus.

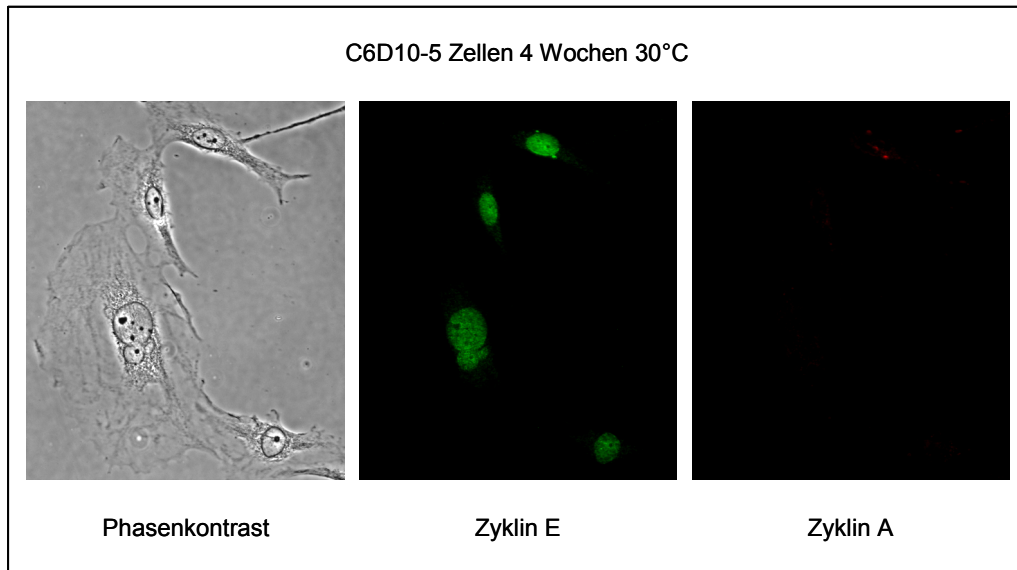


Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Proteinexpression von Zyklin A und Zyklin E in arretierten C6D10-5 Zellen. Nach Fixierung der Zellen in $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ Aceton und Markierung der Proteine Zyklin A und Zyklin E mit den entsprechenden primären und sekundären Antikörpern wurden die Proben in Einbettungsmedium auf Objektträgern fixiert und mit dem Fluoreszenzmikroskop (DMRA, Leica) analysiert. Die Abbildung zeigt exemplarisch einen Ausschnitt einer Kultur von arretierten C6D10-5 Zellen.

V.1.4. Im Arrest akkumulieren die CDK-Inhibitoren $p21^{\text{CIP1}}$ und $p27^{\text{KIP1}}$

Die Kinase-Aktivität der Zyklin-cdk Komplexe, die für das Durchlaufen des Zellzyklus notwendig ist und zur Phosphorylierung der Substrate führt, kann durch CDK-Inhibitoren blockiert werden. Dabei binden die CDK-Inhibitoren nicht willkürlich an jeden Zyklin-cdk Komplex, sondern haben eine Spezifität für bestimmte Zyklin-cdk Komplexe.

Die CDK-Inhibitoren bestehen aus zwei Familien, der Cip/Kip Familie, zu der unter anderem die Proteine $p21^{\text{CIP1}}$ und $p27^{\text{KIP1}}$ gehören, und der INK4 Familie, deren wichtigstes Mitglied das Protein $p16^{\text{INK4A}}$ ist. $p16^{\text{INK4A}}$ bindet nur an die Zyklin-abhängigen Kinasen $cdk4$ und $cdk6$, wohingegen $p21^{\text{CIP1}}$ und $p27^{\text{KIP1}}$ an Zyklin D-, E- und A-abhängige Kinasen binden können, sie aber mit unterschiedlicher Effizienz in ihrer Aktivität blockieren. Durch Bindung von $p21^{\text{CIP1}}$ und $p27^{\text{KIP1}}$ an Zyklin E-cdk2 und Zyklin A-cdk2 Komplexe werden diese in ihrer Aktivität blockiert. Gleichzeitig werden Cip/Kip Proteine aber von Zyklin D-cdk4/6 Komplexen sequestriert und unterstützen die Bildung und damit die Aktivität dieser Komplexe. Bei Anwesenheit von $p16^{\text{INK4A}}$ werden $p21^{\text{CIP1}}$ und $p27^{\text{KIP1}}$ aus ihrer Bindung mit Zyklin D-cdk4/6

gedrängt und stehen für eine effektive Blockierung von Zyklin-cdk2-Komplexen zur Verfügung (Sherr and Roberts 1999).

Um zu sehen, inwiefern CDK-Inhibitoren an dem p53-induzierten Zellzyklusarrest in C6D10-5 Zellen beteiligt waren, wurde eine Western Blot-Analyse der C6D10-5 Zellysate auf die Expression von p21^{CIP1} und p27^{KIP1} durchgeführt. p16^{INK4A} wird in der Rattengliom-Zelllinie C6 aufgrund einer Deletion im *INK4A* Lokus nicht exprimiert und wurde daher nicht analysiert. Zur Detektion von p21^{CIP1} wurde der Antikörper F-5 eingesetzt, für die Detektion von p27^{KIP1} wurde der Antikörper Clone 57 verwendet.

Bereits 1 Woche nachdem die Kultivierung der C6D10-5 Zellen auf 30 °C umgestellt wurde, ist eine deutlich höhere p21^{CIP1} Konzentration zu erkennen als in der 39 °C Kontrolle (Abbildung 16). Dieser Anstieg ist durch eine direkte Transaktivierung von *p21* durch Wildtyp p53 zu erklären und ist charakteristisch für einen p53-induzierten Arrest (el-Deiry et al. 1993). Auch p27^{KIP1} akkumulierte deutlich, wobei die Proteinmengen etwas langsamer als die von p21^{CIP1} anstiegen. *p27* ist im Gegensatz zu *p21* kein Zielgen von p53, und wird in seiner Menge über posttranslationale Modifikationen geregelt. Die Halbwertszeit von p27^{KIP1} verlängert sich, wenn eine Phosphorylierung des Proteins ausbleibt (Sheaff et al. 1997).

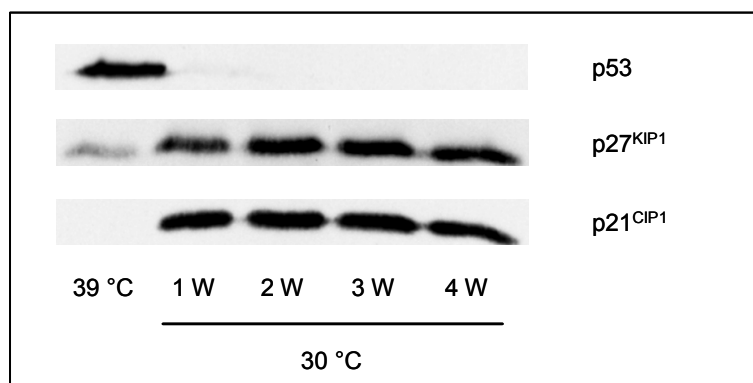


Abbildung 16: Analyse der Proteinexpression der CDK-Inhibitoren p21^{CIP1} und p27^{KIP1} nach Aktivierung von Wildtyp p53. Für die Analyse wurde dieselbe Membran wie in Abbildung 14 verwendet. Die Anwesenheit von p21^{CIP1} und p27^{KIP1} wurde durch Inkubation der Nitrozellulose-Membran mit den entsprechenden Antikörpern und Exposition des Chemolumineszenzsignals gegen einen Röntgenfilm detektiert.

V.1.5. Die Aktivierung des Arrests führt zu qualitativen und quantitativen Veränderungen in der Expression der Retinoblastom-Proteine

Durch Zyklin-cdk Aktivität in der G₁ Phase des Zellzyklus wird das Retinoblastom-Protein pRb/p105 sukzessive phosphoryliert. Die hypophosphorylierte Form von pRb/p105 reprimiert durch Sequestrierung von E2F Transkriptionsfaktoren die Expression von Genen wie zum Beispiel DNA Polymerase α , Thymidinkinase und PCNA, die in der S Phase benötigt werden (Wu et al. 2001). Durch die starke Phosphorylierung von pRb/p105 während der G₁ Phase wird die Interaktion mit den E2F Transkriptionsfaktoren aufgehoben, welche dann die Promotoren S Phasen-spezifischer Gene aktivieren und so zu einem Fortschreiten des Zellzyklus führen (Harbour and Dean 2000).

Nach Aktivierung von Wildtyp p53 arretierten die C6D10-5 Zellen kurz nach dem Restriktionspunkt im G₁/S Übergang. Durch die Akkumulation der CDK-Inhibitoren p21^{CIP1} und p27^{KIP1} während des Arrests wurden Zyklin-cdk Komplexe in ihrer Aktivität eingeschränkt. Daher stellte sich die Frage, inwieweit pRb/p105 unter diesen Bedingungen phosphoryliert wurde und damit an dem Arrest beteiligt war. Die Akkumulation der hypophosphorylierten Form von pRb/p105 ist für einen G₁ Arrest charakteristisch.

Zur Analyse des Phosphorylierungsgrades von pRb/p105 im p53-induzierten Arrest wurden Gesamtzelllysate der arretierten C6D10-5 in einem 8 % SDS-PAGE Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Diese wurde auf eine phosphorylierungsbedingte Änderung der Migration von pRb/p105 durch Inkubation mit dem Antikörper mAb245 analysiert. pRb/p105 war in proliferierenden C6D10-5 Zellen in großen Mengen in der hyperphosphorylierten Form vorhanden. In Proben einwöchig arretierter Zellen war eine Verschiebung der hyper- zur hypophosphorylierten Form von pRb/p105, aber gleichzeitig auch eine sehr prägnante Abnahme der Gesamtproteinmengen von pRb/p105 zu erkennen. 2 Wochen nach Induktion des Wachstumsarrests waren die pRb/p105 Mengen auf ein nicht mehr zu detektierendes Niveau gesunken (Abbildung 17).

Da bei der Abwesenheit eines Retinoblastom-Proteins häufig ein zweites Protein aus der Retinoblastom-Familie dieses in seinen Funktionen ersetzen kann, wurden die Proteinmengen von p107 mit dem Antikörper C-18 detektiert. Auch die Mengen des Retinoblastom-Proteins p107 nahmen innerhalb der ersten Woche nach Arrest-

induktion drastisch ab und waren 2 Wochen nach Arrestinduktion nicht mehr zu detektieren (Abbildung 17). Da weder pRb/p105 noch p107 in den arretierten Zellen exprimiert wurde, wurde die Membran auf Anwesenheit des dritten Retinoblastom-Proteins (Rb2/p130) in den arretierten C6D10-5 Zellen untersucht. Es war zu beobachten, dass sich dieses Protein, welches in proliferierenden Zellen in nur sehr geringen Mengen in der hyperphosphorylierten Form vorhanden war, im Arrest sehr deutlich in der hypophosphorylierten Form anreicherte (Abbildung 17) und somit das einzig exprimierte Retinoblastom-Protein im p53-induzierten Wachstumsarrest von C6D10-5 Zellen war.

Rb2/p130 ist das Retinoblastom-Protein, welches typischerweise in ruhenden und differenzierten Zellen in großen Mengen, in proliferierenden Zellen aber nur in sehr geringen Mengen vorliegt (Classon and Harlow 2002). Wie auch p27^{KIP1} werden Rb2/p130 Mengen posttranslational geregelt. Dieses Protein wird durch Zyklin E-cdk2 Komplexe phosphoryliert, dadurch für einen Ubiquitin-vermittelten Abbau markiert und anschließend proteasomal degradiert (Tedesco et al. 2002). Die Anreicherung der hypophosphorylierten Form von Rb2/p130 spricht für eine Inhibierung der Zyklin E-cdk2 Aktivität während des Zellzyklusarrests.

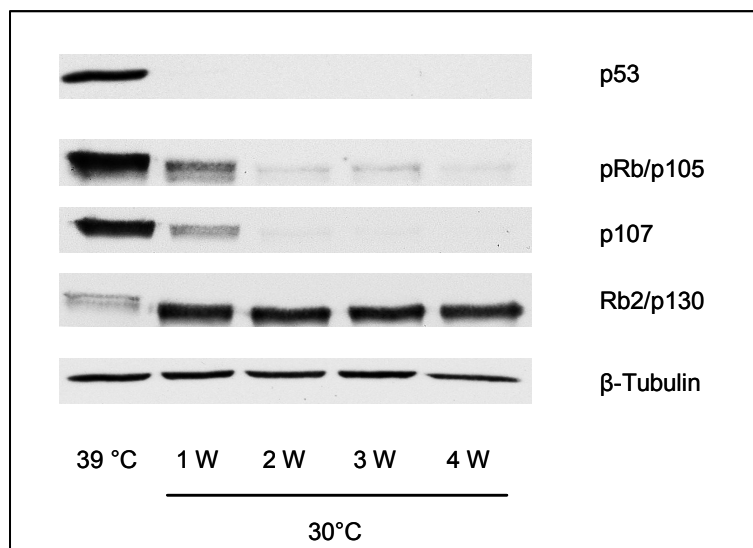


Abbildung 17: Analyse der Expression der drei Retinoblastom-Proteine pRb/p105, p107, Rb2/p130. Für die Analyse wurden die Lysate, die für den Blot in Abbildung 14 und 16 auf ein 13 % SDS-PAGE Gel aufgetragen wurden, über ein 8 % SDS-PAGE Gel aufgetrennt. Die hyperphosphorylierte Form der Retinoblastom-Proteine migriert im SDS-PAGE Gel etwas langsamer als die hypophosphorylierte Form (Verschiebung der Banden).

V.1.6. Die arretierten Zellen zeigen Merkmale der Seneszenz

Bei durchlichtmikroskopischen Beobachtungen der C6D10-5 Zellen nach der Induktion eines p53-abhängigen Wachstumsarrests fiel auf, dass die Zellen nicht nur in der Proliferation stagnierten, sondern während des Arrests ihren Phänotyp veränderten. Im Laufe der 4 Wochen nach Beginn der Expression von Wildtyp p53 konnte festgestellt werden, dass sich immer mehr flache, stark ausgebreitete Zellen in der Kultur ansammeln, die eine Tendenz zur Mehrkernigkeit zeigten. Diese arretierten Zellen waren metabolisch aktiv, da sie die Nährstoffe aus dem Kulturmedium verbrauchten. Trotz der Zugabe von Nährstoffen waren diese Zellen nicht in der Lage, in den Zellzyklus zu gehen, konnten aber über einen Zeitraum von bis zu 3 Monaten in Kultur gehalten werden, ohne dass sie starben. Dieser Phänotyp von Zellen wurde häufig in Zusammenhang mit zellulärer Seneszenz beobachtet und unterscheidet sich von dem Phänotyp ruhender Zellen, die durch Zugabe von Nährstoffen stimuliert werden können, wieder zu proliferieren (Ben-Porath and Weinberg 2004).

Ein Test auf die Expression der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase wurde durchgeführt, um mit einem molekularen Marker nachweisen zu können, ob der andauernde, p53-induzierte Wachstumsarrest von C6D10-5 Zellen zu zellulärer Seneszenz führte (Dimri et al. 1995). Das Aktivitätsmaximum der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase liegt bei pH 6,0, wohingegen sich das Optimum der lysosomalen β -Galaktosidase bei pH 4,0-4,5 befindet. Somit kann zwischen den Aktivitäten der verschiedenen β -Galaktosidasen differenziert werden, wenn der Test bei dem pH-Wert für das jeweilige Aktivitätsmaximum durchgeführt wird. β -Galaktosidase-Aktivität kann dadurch sichtbar gemacht werden, dass dieses Enzym das Substrat X-Gal zu Galaktose und einem blauen Farbstoff umsetzt. Wenn dieser Versuch bei pH 6,0 durchgeführt wird, erscheinen seneszenten Zellen in der Durchlichtmikroskopie blau. Im Fall der wachstumsarretierten C6D10-5 Zellen wurden diese nach einwöchiger Expression von Wildtyp p53 mit 2 % Paraformaldehyd fixiert und für ca. 16 Stunden bei 37 °C und pH 6,0 mit X-Gal-Färbelösung inkubiert. Eine blaue Färbung, die mit dem seneszenten Phänotyp der Zelle einherging, war in vielen Zellen zu detektieren. Abbildung 18 zeigt stellvertretend eine dieser seneszenten Zellen.

Eine Quantifizierung der SA- β -Gal-positiven C6D10-5 Zellen 1 bis 7 Tage nach Aktivierung von Wildtyp p53 zeigte, dass bereits nach einwöchigem Wachstums-

arrest ca. 50 % der Zellen die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase exprimierten (Abbildung 19).



Abbildung 18: Test auf Expression von Seneszenz-assoziiierter β -Galaktosidase in arretierten C6D10-5 Zellen. Während des p53-induzierten Wachstumsarrest verändern C6D10-5 Zellen ihre Morphologie und exprimierten den Seneszenzmarker SA- β -Galaktosidase, dessen Anwesenheit durch seine enzymatische Aktivität bei der Umsetzung von X-Gal zu Galaktose und einem blauen Farbstoff bei pH 6,0 nachgewiesen wurde.

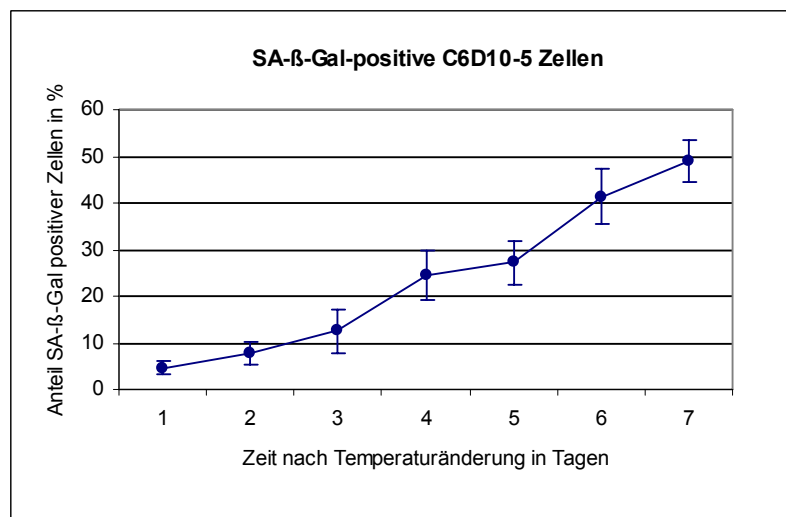


Abbildung 19: Auszählung der SA- β -Gal-positiven Zellen nach Aktivierung von Wildtyp p53 für 1 bis 7 Tage. Je Zeitwert wurden 10 Felder mit jeweils 300-400 Zellen ausgezählt und der prozentuale Anteil SA- β -Gal-positiver Zellen bestimmt. Aus den Werten der 10 Zählungen pro Zeitwert wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet um auszuschließen, dass sich in einem Feld ausnahmsweise überdurchschnittlich viele seneszente Zellen befanden.

V.2. Die Inaktivierung von Wildtyp p53 in arretierten C6D10-5 Zellen führt zu S Phase-Aktivität, nicht aber zur Proliferation der Zellen

V.2.1 Die p53 Wildtyp-Form ist essentiell, um den G1/S Arrest aufrecht zu erhalten

Die Daten zeigen, dass C6D10-5 Zellen in Anwesenheit von Wildtyp p53 Merkmale zellulärer Seneszenz entwickeln und für lange Zeit in Kultur gehalten werden können, ohne aus dem G1/S Arrest zu entkommen. Es stellt sich die Frage, inwieweit p53-spezifische Funktionen nicht nur für die Induktion, sondern auch für die Aufrechterhaltung des Arrests gefordert sind. Aus der Literatur ist die Hypothese bekannt, dass arretierte Zellen, die p53 aber nur wenig oder kein p16^{INK4A} exprimieren, nach Inaktivierung von p53 weiter proliferieren können (Beausejour et al. 2003). Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde p53^{Val135} in seneszenten C6D10-5 Zellen durch einen Temperaturwechsel auf 39 °C aus der aktiven Wildtyp-Form in die inaktive Mutanten-Form überführt. Damit ein möglichst großer Anteil von Zellen (90 %) innerhalb der Population Merkmale der Seneszenz ausprägen konnte, wurden die Kulturen für 4 Wochen bei 30 °C im Arrest gehalten.

Nach Inaktivierung der Wildtyp p53 Funktionen durch den Temperaturwechsel auf 39 °C wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Temperaturänderung Gesamtzelllysate für proteinchemische Analysen gewonnen. Diese wurden elektrophoretisch in einem SDS-PAGE Gel aufgetrennt und durch das Western Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Anschließend wurden die Veränderungen des Expressionsmusters Zellzyklus-regulatorischer Proteine nach der Inaktivierung von p53 analysiert.

Die Membran wurde mit dem monoklonalen Antikörper PAb248, der sowohl die Mutanten- als auch die Wildtyp-Form von p53 erfasst, inkubiert. p53 Proteinmengen akkumulierten bereits 16 Stunden nach dem Überführen der aktiven Wildtyp- in die inaktive Mutanten-Form durch deren längere Halbwertszeit. Schließlich erreichte die p53-Mengen einen Wert, der dem in proliferierenden Zellen (39 °C) entsprach (Abbildung 20).

Die Inkubation der Nitrozellulose-Membran mit dem Antikörper H-432 gegen Zyklin A und dem Antikörper M-20 gegen Zyklin E zeigte, dass mit der Inaktivie-

zung von Wildtyp p53 ein erneuter Anstieg der Zyklin A Proteinmengen einher ging. Parallel zu der Akkumulation der Mutanten-Form von p53 konnte ein Abfall von Zyklin E detektiert werden (Abbildung 20). 72 Stunden nach Inaktivierung von p53 hatten sich die Proteinmengen von Zyklin A und Zyklin E den Mengen in normal proliferierenden Zellen wieder angenähert. Der Nachweis von β -Tubulin Mengen stellte sicher, dass diese Schwankungen nicht auf generelle Änderungen in den Gesamtproteinmengen zurückzuführen waren. Die Veränderungen im Zyklin A und Zyklin E Expressionsmuster nach Inaktivierung von Wildtyp p53 weisen auf einen möglichen Wiedereintritt der Zellen in den Zellzyklus hin.

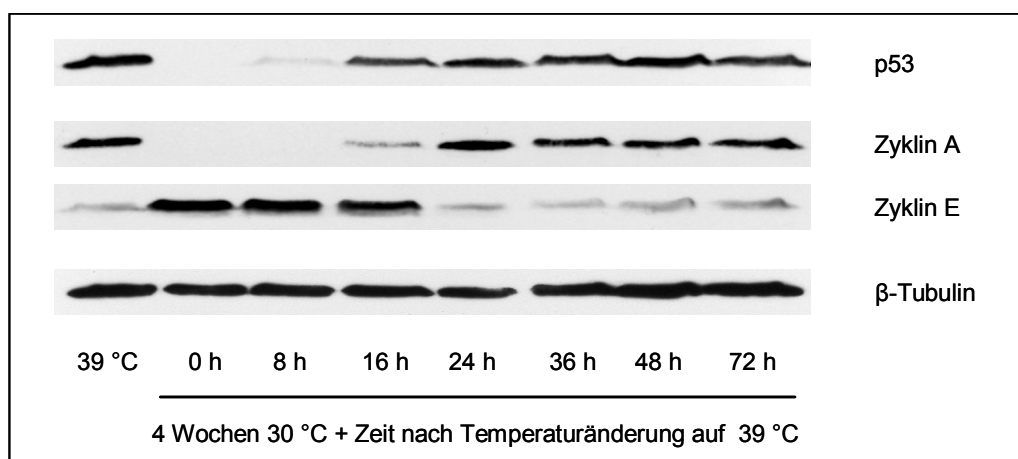


Abbildung 20: Proteinmengen von p53, Zyklin E und Zyklin A nach Inaktivierung von Wildtyp p53 C6D10-5 Zellen, die 4 Wochen arretiert waren. C6D10-5 Zellen wurden zunächst für 4 Wochen bei 30 °C und anschließend für bestimmte Zeitspannen bei 39 °C kultiviert. Aus den Kulturen wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten Gesamtzelllysate angefertigt, diese über SDS-PAGE in einem 13 % Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Nach Inkubation mit den entsprechenden Antikörpern wurde ein Röntgenfilm gegen das Chemolumineszenzsignal exponiert.

CDK-Inhibitoren blockieren die Aktivität von Zyklin-cdk Komplexen und können dadurch die Zellen im Zellzyklus arretieren. Die seneszenten, im Arrest befindlichen C6D10-5 Zellen zeigten hohe Proteinmengen der Inhibitoren $p27^{KIP1}$ und $p21^{CIP1}$. $p21$ wird direkt durch Wildtyp p53 transaktiviert und ist essentiell für einen p53-vermittelten G₁ Arrest.

Um erkennen zu können, inwieweit eine Blockierung der Zyklin-cdk Aktivität durch CDK-Inhibitoren auch nach Inaktivierung der Wildtyp-Form von p53 möglich ist,

wurde die Membran im Weiteren auf das Expressionsmuster der CDK-Inhibitoren $p21^{CIP1}$ und $p27^{KIP1}$ untersucht. Parallel zur Inaktivierung der Wildtyp-Form von $p53^{Val135}$ in seneszenten C6D10-5 Zellen kam es zu einer deutlichen Abnahme der Proteinmenge von $p21^{CIP1}$. Mit einer Verzögerung von einigen Stunden sank auch die Menge des CDK-Inhibitors $p27^{KIP1}$ und erreichte nach 72 Stunden das Niveau proliferierender Zellen (Abbildung 21). Eine Inhibierung der Zyklin-cdk Aktivität durch CDK-Inhibitoren war somit nicht mehr möglich.

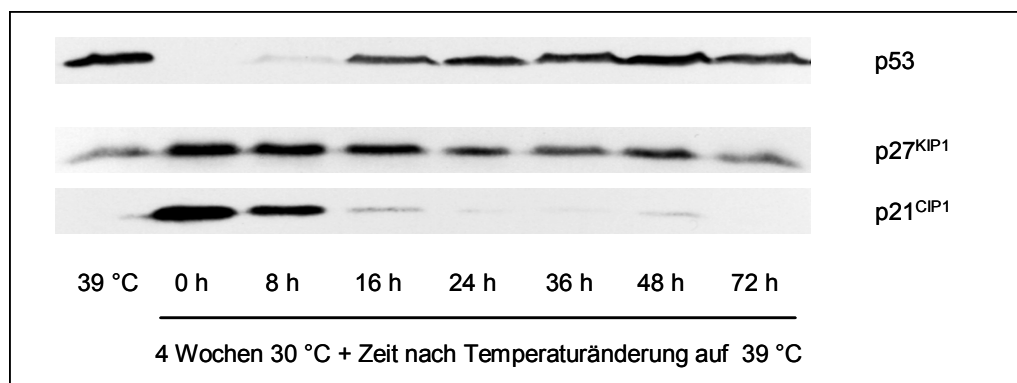


Abbildung 21: Proteinmengen von $p21^{CIP1}$ und $p27^{KIP1}$ nach Inaktivierung von Wildtyp $p53$ in C6D10-5 Zellen, die für 4 Wochen arretiert waren. Für die Detektion von $p21^{CIP1}$ und $p27^{KIP1}$ wurde derselbe Blot wie in Abbildung 20 verwendet. Die Western Blot-Membran wurde mit dem Antikörper F-5 gegen $p21^{CIP1}$ und dem Antikörper Clone57 gegen $p27^{KIP1}$ inkubiert und das Chemolumineszenzsignal anschließend gegen einen Röntgenfilm exponiert.

Die Wiederherstellung der Zyklin-cdk Komplexe durch die Expression der entsprechenden Zykline und die Repression der CDK-Inhibitoren gaben einen Anhalt dafür, dass sich der Zellzyklusarrest in den seneszenten Zellen durch Inaktivierung der Wildtyp-Form von $p53^{Val135}$ aufheben lässt und die Zellen in die S-Phase eintreten können. Ein Eintritt in die S-Phase ist aber nur durch Zyklin-cdk-vermittelte Phosphorylierung von Retinoblastom-Proteinen möglich, da durch die Phosphorylierung deren Interaktion mit E2F Transkriptionsfaktoren aufgehoben wird. Durch E2F Transkriptionsfaktoren werden S Phase-spezifische Gene transaktiviert, ohne deren Expression die Zelle nicht in die S Phase eintreten kann. In den seneszenten C6D10-5 Zellen ist Rb2/p130 als einziges Retinoblastom-Protein vorhanden. Der Western Blot von Gesamtzelllysaten seneszenten C6D10-5 Zellen nach Inaktivierung von Wildtyp $p53$ Funktionen zeigte, dass zunächst die Mobilität

der im Arrest deutlich erhöhten Proteinmengen von Rb2/p130 geringer wurde, was auf eine starke Phosphorylierung dieses Proteins hinweist. Anschließend nahm die Gesamtmenge an Rb2/p130 ab und erreichte nach ca. 24 Stunden das Niveau proliferierender Zellen (Abbildung 22). Parallel zur Inaktivierung von p53 und zur Reduktion von Rb2/p130 waren die beiden anderen Retinoblastom-Proteine pRb/p105 und p107 wieder detektierbar und akkumulierten in der hyperphosphorylierten Form (Abbildung 22). β -Tubulin wurde als Kontrolle für ein gleichmäßiges Beladen des Gels mit Gesamtzelllysaten verwendet.

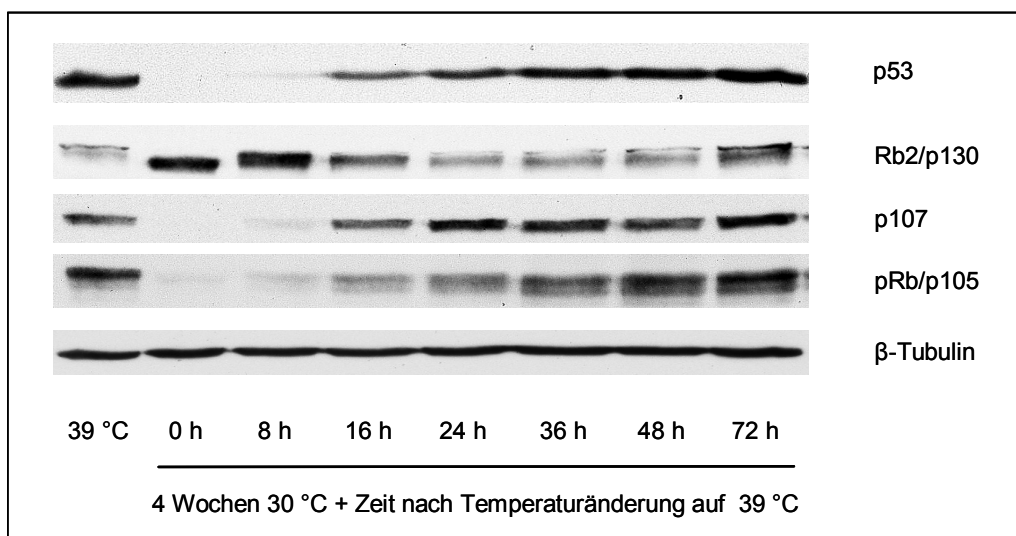


Abbildung 22: Analyse der Proteinmengen und der Phosphorylierung von Rb2/p130, p107 und pRb/p105 nach Inaktivierung von Wildtyp p53 in 4 Wochen arretierten C6D10-5 Zellen. Die Gesamtzelllysate, die für den in Abbildung 20 und 21 gezeigten Western Blot verwendet wurden, wurden zum Nachweis der Retinoblastom-Proteine über ein 8 % SDS-PAGE Gel aufgetrennt, anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und dann mit den Antikörpern Clone 10 gegen Rb2/p130, C-18 gegen p107 und mAb245 gegen pRb/p105 inkubiert.

Die Analyse der Zellzyklus-regulatorischen Proteine zeigt, dass die Aufrechterhaltung des seneszenten Arrests, der in C6D10-5 Zellen durch Wildtyp p53 induziert wird, abhängig von p53 Funktionen ist. Die Inaktivierung von Wildtyp p53 in seneszenten C6D10-5 Zellen führte dazu, daß die Zellen ein Proteinexpressionsmuster zeigten, das dem von proliferierenden Zellen entsprach.

V.2.2. Nach Inaktivierung von Wildtyp p53 zeigen C6D10-5 Zellen S Phase-Aktivität

Das Expressionsmuster der Zellzyklus-regulatorischen Proteine, das sich nach Inaktivierung von Wildtyp p53 einstellte, entsprach dem von Zellen, die bei 39 °C kultiviert werden. Es bestand daher die Möglichkeit, dass die seneszenten Zellen nach Inaktivierung der Wildtyp p53 Funktionen aus dem G1 Arrest in die S Phase übertreten können. Ein Nachweis von S Phase-Aktivität ist der Einbau des Thymidinanalogs Bromodesoxyuridin (BrdU) in die replizierte DNA, dessen Einbau sich immunhistochemisch analysieren lässt.

Die seneszenten C6D10-5 Zellen wurden zum Zeitpunkt der p53-Inaktivierung für einen Zeitraum von 32 Stunden mit BrdU inkubiert, da sich innerhalb dieses Zeitraums das Expressionsmuster Zellzyklus-regulatorischer Proteine dem von proliferierenden Zellen angenähert hatte. Dadurch konnte analysiert werden, wie groß der Anteil seneszenter C6D10-5 Zellen ist, der nach Inaktivierung von Wildtyp p53 in der Lage ist, in die S Phase einzutreten. Um die residuale S Phase-Aktivität 4 Wochen arretierter C6D10-5 Zellen bestimmen zu können, wurden diese Zellen bei 30 °C ebenfalls für 32 Stunden mit BrdU inkubiert. Anschließend wurden die auf Deckgläschen kultivierten Zellen bei -20 °C in Aceton fixiert und der BrdU-Einbau über Immunfluoreszenzmarkierung mit dem Antikörper Bu20a gegen BrdU detektiert.

In arretierten Kulturen, die bei 30 °C über einen Zeitraum von 32 Stunden mit BrdU inkubiert wurden, wiesen ca. 10 % der Zellen einen Einbau von BrdU auf. Im Gegensatz dazu zeigten 92 % der seneszenten Zellen, in denen p53 inaktiviert worden war, S Phase-Aktivität. Abbildung 23 zeigt die Kultur nach Inaktivierung von p53 und Inkubation mit BrdU für einen Zeitraum von 32 Stunden. Die Färbung der DNA mit dem interkalierenden Farbstoff DAPI ließ gleichzeitig starke Anomalien in der Morphologie der Zellkerne und Probleme bei der Zytokinese erkennen.

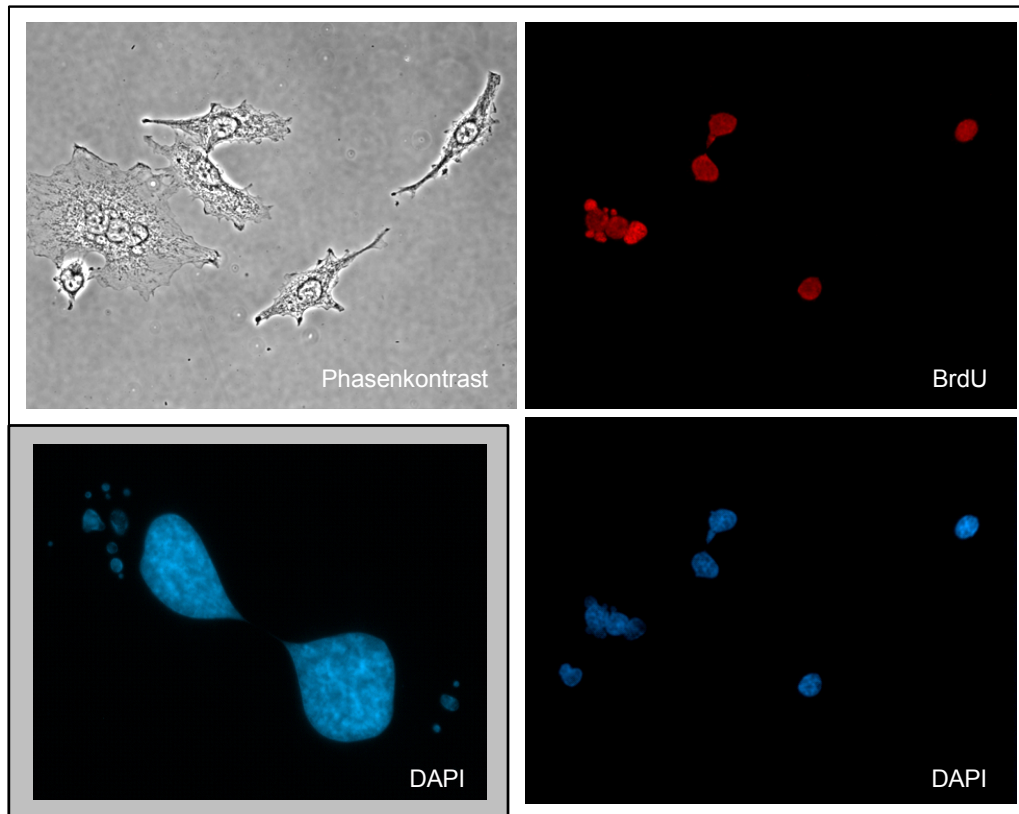


Abbildung 23: S Phase-Aktivität von C6D10-5 Zellen nach Inaktivierung von Wildtyp p53 nach vierwöchigem Arrest. C6D10-5 Zellen wurden für 4 Wochen bei 30 °C kultiviert, dann wurde p53 durch Temperaturänderung auf 39 °C inaktiviert und gleichzeitig für 32 h mit BrdU inkubiert. Der Einbau von BrdU wurde durch Immunfluoreszenzmarkierung nachgewiesen, die Zellkerne durch Einlagerung von DAPI angefärbt. Anschließend wurden die Proben mit Einbettungsmedium auf Objektträgern fixiert und mit einem Fluoreszenzmikroskop (DMRA, Leica) analysiert. Die Abbildung unten links ist eine vergrößerte Darstellung von Zellkernen zweier Tochterzellen.

Um Temperatureffekte ausschließen zu können, wurden in einem zweiten Ansatz die Proteinmengen von Wildtyp p53 durch RNA Interferenz (RNAi) spezifisch reduziert und so die Inaktivierung von p53 bei gleich bleibenden Kulturbedingungen durchgeführt.

Dafür musste zunächst geklärt werden, ob arretierte C6D10-5 Zellen mit siRNA transfizierbar sind und ob die transfizierte siRNA in den seneszenten Zellen aktiv werden kann. Als Kontrolle wurde je eine Probe von C6D10-5 Zellen, die durch Aktivierung von Wildtyp p53 für 1 Woche beziehungsweise 4 Wochen arretiert worden waren, mit dem GFP exprimierenden Vektor pmaxGFP und *scrambled*

siRNA (scr siRNA) transfiziert. Je eine weitere Probe wurde mit pmaxGFP und GFP siRNA transfiziert, so dass im Vergleich der Proben das Ausmaß der Reduktion des GFP Signals durch spezifische GFP siRNA zu analysieren war. Die arretierten Zellen wurden unter Verwendung des Kit V und Programm U09 mit dem Nukleofektor von AMAXA transfiziert.

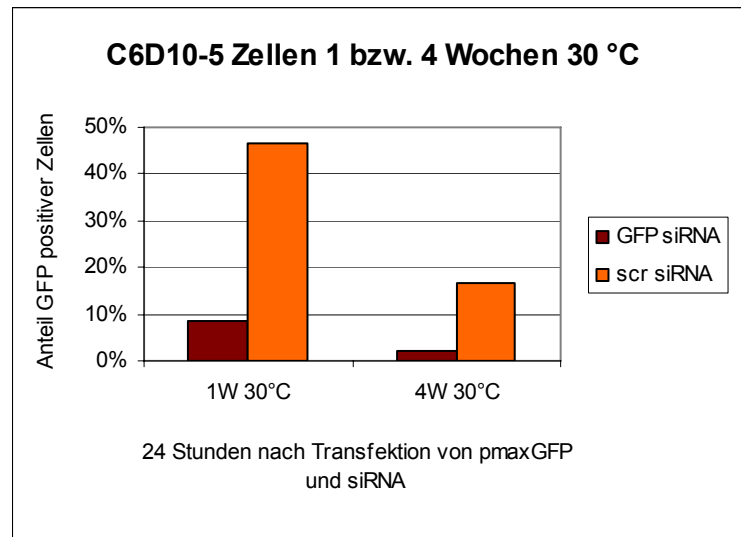


Abbildung 24: Transfektionseffizienz von siRNA in 1 Woche beziehungsweise 4 Wochen arretierten C6D10-5 Zellen. C6D10-5 Zellen, die durch Aktivierung von Wildtyp p53 für 1 beziehungsweise 4 Wochen arretiert waren, wurden je einmal mit dem GFP Expressionsvektor und scr siRNA und je einmal mit dem GFP Expressionsvektor und GFP siRNA unter Zuhilfenahme des Nukleofektor-Systems von AMAXA transfiziert. Zur Transfektion wurden 2 µg DNA und 1,4 µg siRNA, 1×10^6 Zellen, 100 µl Nucleofector Solution V und Programm U09 verwendet. Die Zellen wurden nach Transfektion bei 30 °C kultiviert. 24 h nach Transfektion wurden die GFP-positiven Zellen durch fluoreszenzmikroskopische Auswertung von insgesamt 800 Zellen je Probe bestimmt.

In Zellen, die 1 Woche beziehungsweise 4 Wochen durch Wildtyp p53 arretiert wurden, konnte durch die spezifische GFP siRNA im Vergleich zur unspezifischen scr siRNA eine deutliche Reduktion des GFP Signals beobachtet werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass arretierte C6D10-5 Zellen mit siRNA transfizierbar sind und diese in den Zellen auch aktiv ist (Abbildung 24).

Durch Transfektion der arretierten C6D10-5 Zellen mit p53 siRNA beziehungsweise scr siRNA mit Hilfe des Nukleoporationssystems von AMAXA konnte gezeigt

werden, dass die Zahl der Zellen mit S Phase-Aktivität nach Reduktion von Wildtyp p53 bei 30 °C zunahm (Abbildung 25). 48 Stunden beziehungsweise 72 Stunden nach siRNA Transfektion wurden die Kulturen für eine halbe Stunde mit BrdU in inkubiert und anschließend in -20 °C Aceton fixiert. Der Einbau von BrdU wurde über eine Immunfluoreszenzmarkierung mit dem Antikörper Bu20a nachgewiesen. Pro Zeitwert wurden ungefähr je 2000 Zellen auf BrdU-Einbau untersucht. In scr siRNA transfizierten Zellen zeigten ca. 4 % der Zellen einen Einbau von BrdU in die DNA. Transfektion von p53 siRNA führte zu einer Steigerung des Anteils der BrdU-positiven Zellen auf etwas mehr als das Doppelte.

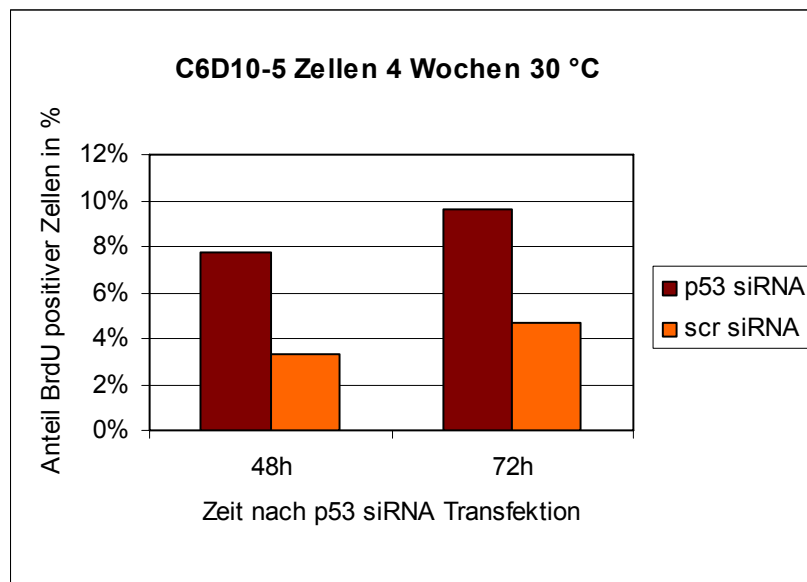


Abbildung 25: Nachweis von S Phase-Aktivität durch BrdU-Einbau in arretierten C6D10-5 Zellen nach Reduktion von p53. 1×10^6 C6D10-5 Zellen, die 4 Wochen durch p53 Aktivierung arretiert wurden, wurden mit $1,4 \mu\text{g}$ p53 beziehungsweise scr siRNA mit Hilfe des AMAXA Nukleofektor transfiziert und danach für den angegebenen Zeitraum bei 30 °C auf Deckgläschen weiter kultiviert. Eine halbe Stunde vor dem Fixieren der Zellen wurde dem Kulturmedium BrdU zugegeben. Anschließend erfolgte eine Immunfluoreszenzmarkierung des eingebauten BrdU. Pro Zeitwert wurden 2000 Zellen fluoreszenzmikroskopisch auf die Anwesenheit von BrdU untersucht.

Dieses Ergebnis zeigt, dass das Eintreten arretierter Zellen in die S Phase die Inaktivierung von p53 voraussetzt und nicht eine Auswirkung der Temperaturänderung von 30 °C auf 39 °C ist.

V.2.3. Inaktivierung von p53 führt nicht zu Proliferation, sondern zu Apoptose

Aus den vorangegangenen Analysen der Expression Zellzyklus-regulatorischer Proteine konnte entnommen werden, dass durch andauernde Expression von Wildtyp p53 in C6D10-5 Zellen ein seneszenten Arrest induziert werden kann, der abhängig von den Funktionen der p53 Wildtyp-Form ist. Nach der Inaktivierung von p53 Funktionen in arretierten C6D10-5 Zellen bildete sich das Proteinexpressionsmuster seneszenten Zellen zu dem Expressionsmuster proliferierender Zellen zurück, und die Zellen konnten in die S Phase eintreten. Um die Verschiebung der Zellzyklusphasen nach Inaktivierung von Wildtyp p53 verfolgen zu können, wurden Proben arretierter C6D10-5 Zellen zu bestimmten Zeitpunkten nach Temperaturänderung gewonnen und anschließend einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen.

Die Verteilung der Zellpopulation über die verschiedenen Phasen des Zellzyklus ergab, dass die Zellen nach Inaktivierung von p53 nicht synchron aus dem Arrest in die S Phase eintraten: zu allen Zeitpunkten nach Inaktivierung von Wildtyp p53 befanden sich mindestens 50 % der Zellen in der G1 Phase (Abbildung 26). Die Analyse des BrdU-Einbaus während eines Zeitraums von 32 Stunden nach Inaktivierung von p53 ergab aber, dass über 90 % der Zellpopulation innerhalb dieser Zeitspanne in die S Phase eingetreten waren beziehungsweise diese durchlaufen hatten (siehe Punkt V.2.2.). Das bedeutet, dass nach vierwöchigem, seneszenten Arrest praktisch alle Zellen in der Lage waren, den G1/S Block zu überwinden. Ein Maximum in der S Phase der seneszenten Kulturen war mit über 20 % bei 16 bis 20 Stunden nach Temperaturwechsel zu beobachten. Im Anschluß wurde nach 24 Stunden ein maximaler Wert der Zellen in G2 Phase erreicht (34%). Im Vergleich zu proliferierenden Zellen zeigte die so behandelte Kultur auch 72 Stunden nach Aufhebung der Wildtyp p53 Funktionen ein stark verändertes Zellzyklusprofil. Mit 60% statt 47% war die G1 Phase überrepräsentiert, während die S Phase mit 17% statt 31% unterrepräsentiert war. Der Anteil der G2 Phase Zellen hatte sich dem Ausgangswert wieder angenähert (Abbildung 26). Obwohl das Expressionsmuster der Zellzyklus-regulatorischen Proteine 72 Stunden nach Inaktivierung von Wildtyp p53 wieder dem Expressionsmuster in normal proliferierenden Zellen entsprach, spricht das Zellzyklusprofil für deutliche Veränderungen dieser Zellen während des seneszenten Arrests.

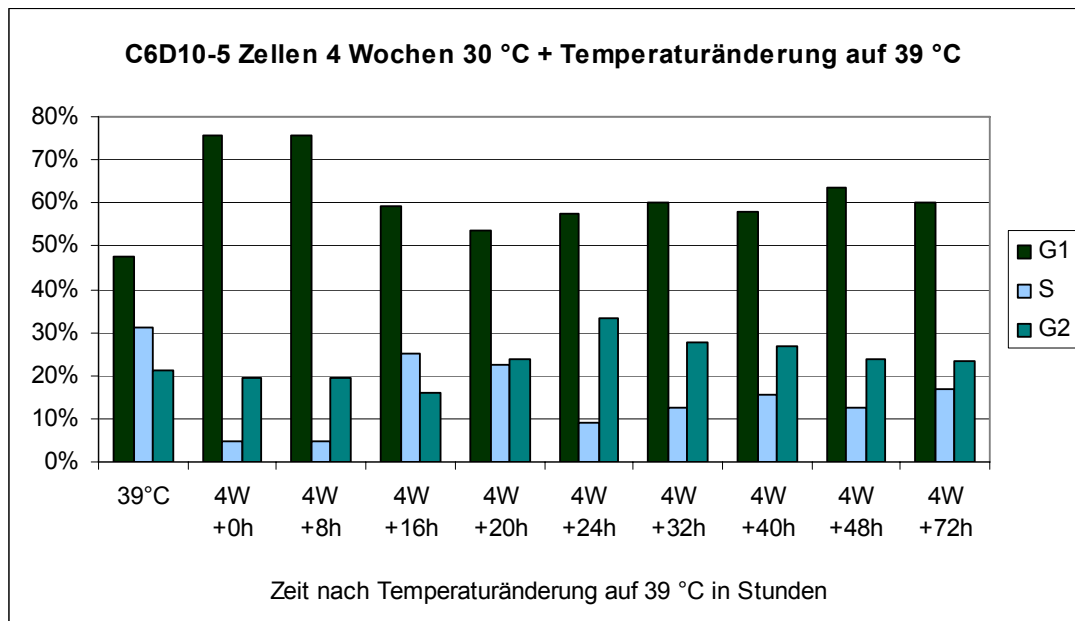


Abbildung 26: Prozentuale Verteilung von C6D10-5 Zellen auf die verschiedenen Zellzyklusphasen nach der Inaktivierung von p53. C6D10-5 Zellen wurden zunächst für 4 Wochen bei 30 °C kultiviert und anschließend für den angegebenen Zeitraum bei 39 °C weiter kultiviert. Dann wurden die Zellen in Ethanol fixiert und nach Anfärben der DNA mit PI einer durchflusszytometrischen Analyse unterworfen. Pro Probe wurden 10000 Zellen unter Ausschluss von Dubletten und Zelltrümmern erfasst. Die Rohdaten wurden mit der Software WinMDI 2.8 in single parameter Histogramme umgewandelt und quantitativ mit dem Programm Cylchred ausgewertet.

Aus der durchflusszytometrischen Analyse wurde deutlich, dass die Fähigkeit der Zellen, wieder in die S Phase eintreten zu können, nicht unbedingt mit einer Wiederaufnahme der Proliferation gleichzusetzen ist (Abbildung 27). Das Zellzyklusprofil macht deutlich, dass mit dem Wiedereintreten in den Zellzyklus ein großer Teil der Zellen einen sub-G1 DNA-Gehalt aufzeigte, der für das Auftreten apoptotischer Ereignisse typisch ist. Durch DNA Fragmentierung zeigen sich apoptotische Zellen im Zellzyklusprofil als eine Population mit einem geringeren DNA-Gehalt als Go/G1-Zellen, da bei der Fixierung der Zellen kleine DNA Fragmente verloren gehen. Die Zahl der apoptotischen Zellen nahm mit der Dauer der Kultivierung nach p53 Inaktivierung zu (Abbildung 27).

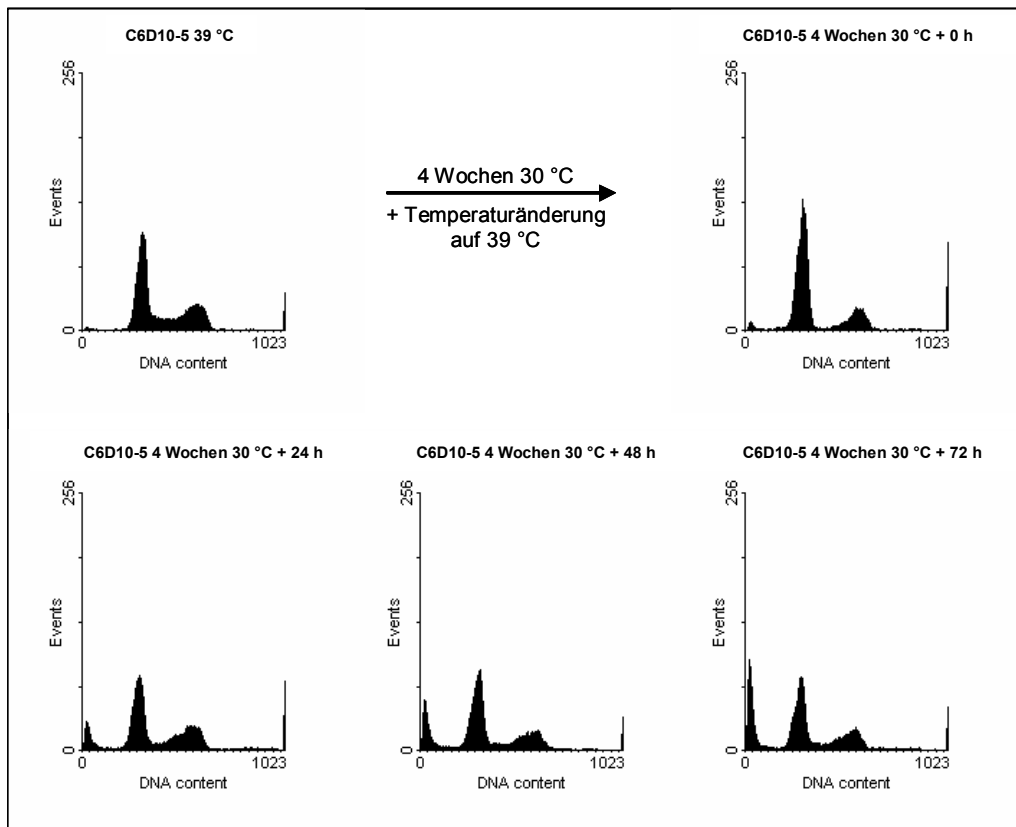


Abbildung 27: Zellyklusprofile von C6D10-5 Zellen nach der Inaktivierung von Wildtyp p53 nach vierwöchigem Arrest. Dargestellt sind ausgewählte Zeitpunkte von C6D10-5 Zellen, die zunächst für 4 Wochen bei 30 °C kultiviert wurden und anschließend für den angegebenen Zeitraum bei 39 °C weiter kultiviert wurden (gleiche Proben wie in Abbildung 26). Die Rohdaten wurden mit der Software WinMDI 2.8 in single parameter Histogramme umgewandelt. Deutlich zu erkennen ist die sub-G1 Fraktion der apoptotischen Zellen.

Das Auftreten von apoptotischen Ereignissen innerhalb einer Zellpopulation kann neben der durchflusszytometrischen Analyse auch durch das Auftreten der aktiven, gespaltenen Form der Caspase 3 nachgewiesen werden. Die Caspase 3 ist eine Effektor-Caspase, die aufgrund vorangegangener apoptotischer Signale durch die Initiator-Caspasen 8 und 9 in eine p12 und eine p17 Untereinheit gespalten und dadurch aktiviert wird (Fernandes-Alnemri et al. 1994; Nicholson et al. 1995). Durch Aktivierung der Caspase 3 werden viele Schlüsselproteine gespalten, weitere Caspasen aktiviert und DNA fragmentiert. Das Auftreten der aktiven Form von Caspase 3 kann durch einen Antikörper nachgewiesen werden, der die größere Untereinheit der gespaltenen Caspase 3 erkennt. Diese weist eine Größe von 17 kDa und/oder 19 kDa in der SDS-PAGE auf.

Zusätzlich zu den Proben für die durchflusszytometrische Analyse wurden Gesamtzelllysate von arretierten, seneszenten Kulturen angefertigt, die für einen bestimmten Zeitraum nach Inaktivierung von Wildtyp p53 weiter kultiviert wurden. Um eine positive Kontrolle für apoptotische Prozesse zu erhalten, wurden C6D10-5 Zellen, die mutiertes p53^{Val135} exprimieren, mit ultraviolettem Licht (100 J/m²) bestrahlt und 16 beziehungsweise 24 Stunden nach UV-Bestrahlung Proben genommen. Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE und anschließenden Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran wurde die aktive, gespaltene Form der Caspase 3 mit dem spezifischen Antikörper Asp175 nachgewiesen. Als Kontrolle für das Beladen des Gels mit gleichen Gesamtproteinmengen wurde das Protein β -Tubulin mit dem Antikörper Ab-1 detektiert.

Abbildung 28 zeigt, dass nach UV-Bestrahlung die aktive, gespaltene Form der Caspase 3 zu detektieren war. In arretierten, seneszenten C6D10-5 Zellen war bereits eine geringe Menge der aktiven Caspase 3 zu beobachten. Nach Inaktivierung von Wildtyp p53 in den seneszenten Kulturen folgte dann eine prägnante Akkumulation der aktiven Caspase 3, die sich zeitlich und in ihrer Intensität mit dem Auftreten der sub-G1 Fraktion in der durchflusszytometrischen Messung deckt.

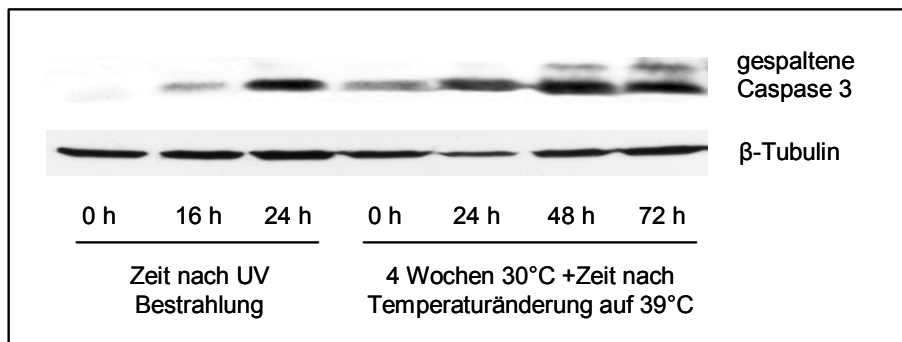


Abbildung 28: Auftreten von gespaltener Caspase 3 als ein Nachweis für apoptotische Ereignisse, die durch Inaktivierung von Wildtyp p53 in arretierten C6D10-5 Zellen hervorgerufen wird. Dargestellt ist der immunologische Nachweis von gespaltener Caspase 3 zu bestimmten Zeitpunkten nach Inaktivierung von Wildtyp p53 in arretierten C6D10-5 Zellen. Dafür wurden Gesamtzelllysate der Kulturen angefertigt, die Proteine über ein 13 % SDS-PAGE Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern wurde die Anwesenheit von gespaltener Caspase 3 und β -Tubulin nachgewiesen. Zur Kontrolle wurden gleichzeitig Gesamtzelllysate von UV-bestrahlten, apoptotischen C6D10-5 Zellen angefertigt und auf demselben Gel aufgetragen.

Das Auftreten von Apoptose nach Inaktivierung von Wildtyp p53 in seneszenten Kulturen bedeutet, dass diese zwar aus dem G1 Arrest in die S Phase eintreten, aber nicht mehr proliferieren können. Das Auftreten von apoptotischen Ereignissen in UV-bestrahlten C6D10-5 Zellen und in seneszenten C6D10-5 Zellen nach Inaktivierung von p53 ist ein von Wildtyp p53 Funktionen unabhängiges Ereignis. In beiden Fällen trat die Apoptose zu einem Zeitpunkt auf, zu dem die Zellen mutiertes p53^{Val135} exprimierten.

V.2.4. Seneszenzente C6D10-5 Zellen akkumulieren DNA Schäden, die eine mögliche Ursache für die Induktion der Apoptose darstellen

Während des durch p53 induzierten Arrests akkumulierten in der DNA von seneszenten C6D10-5 Zellen freie 3'OH-Gruppen, die möglicherweise beim Wiedereintreten in den Zellzyklus als DNA Schäden erkannt werden und somit eine Erklärung für das Auftreten apoptotischer Ereignisse nach Inaktivierung von Wildtyp p53 und folgendem Eintritt in die S Phase darstellen (Abbildung 29).

Detektiert wurde diese Akkumulation von DNA-Schäden im p53-induzierten Arrest durch den TUNEL Test. In diesem Nachweis werden freie 3' OH-Gruppen sichtbar gemacht, indem das Enzym terminale Desoxynukleotidyltransferase Fluorescein-gekoppeltes dUTP an die 3' OH-Gruppen der DNA bindet, welches dann durch Fluoreszenzmikroskopie visualisiert werden kann.

In Abbildung 29 ist der signifikante Unterschied zwischen einer Kultur von C6D10-5 Zellen bei 39 °C und einer Kultur der gleichen Zellen nach vierwöchigem Arrest durch Wildtyp p53 zu erkennen. Nach dem TUNEL Assay in normal proliferierenden C6D10-5 Zellen zeigte lediglich ein verschwindend geringer Anteil von Zellen ein Signal von eingebautem Fluorescein-dUTP, während in der durch p53 arretierten Kultur praktisch in allen Zellen Fluoreszenzsignale von eingebautem Fluorescein-dUTP zu erkennen waren.

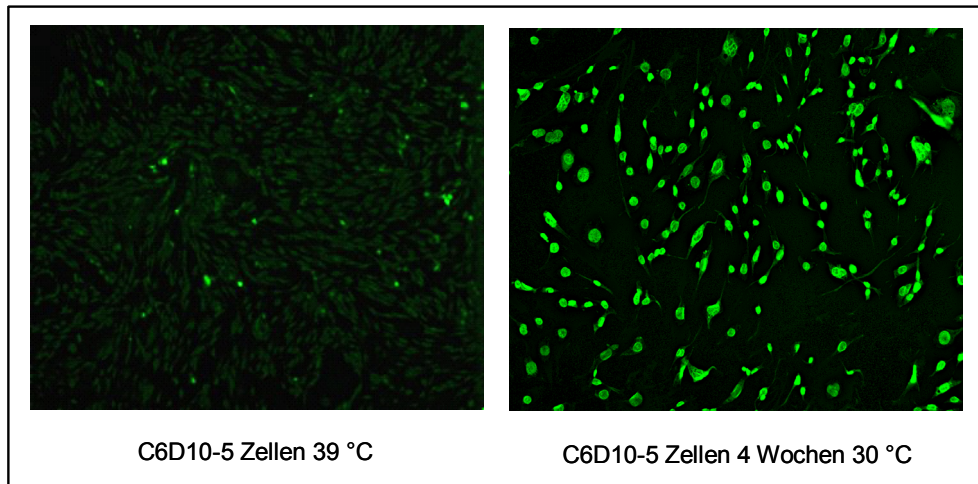


Abbildung 29: Akkumulation von freien 3' OH-Gruppen während des p53-vermittelten G1 Arrest von C6D10-5 Zellen. Mit Hilfe des ApoAlert Kits (Clontech) wurde ein TUNEL Assay in C6D10-5 Zellen, die bei 39 °C beziehungsweise für 4 Wochen bei 30 °C kultiviert wurden, durchgeführt. Dazu wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert, in -20 °C Aceton fixiert und dann nach Anweisung des Herstellers mit dem Enzym terminale Desoxynukleotidyltransferase und Fluorescein-gekoppeltem dUTP inkubiert. Nach dem Fixieren der Proben mit Einbettungsmedium auf Objektträgern wurden diese fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

V.3. Die Wildtypform von p53^{Val135} kooperiert mit Rb2/p130 in der Aufrechterhaltung des seneszenten Wachstumsarrests

V.3.1. Die Inaktivierung der Retinoblastom-Proteine in arretierten Zellen durch E1A-12S führt zu vermehrter S Phase-Aktivität

Bestimmte virale Onkoproteine haben die Eigenschaft, negative Regulatoren des Zellzyklus zu binden, um einem Zellzyklusarrest durch die virale Infektion vorzubeugen und so die DNA-Replikationsmaschinerie für ihre Zwecke nutzen zu können. Die Proteine E6 und E7 des humanen Papillomavirus (HPV) binden p53 beziehungsweise Retinoblastom-Proteine, das große T-Antigen des Simian Virus (SV40) hat die Fähigkeit p53 und Retinoblastom-Proteine gleichzeitig binden zu können. Dabei werden die Funktionen dieser Proteine inhibiert. Das adenovirale E1A Protein bindet die hypophosphorylierte, aktive Form der Retinoblastom-Proteine, geht jedoch keine Bindung mit p53 ein (Levine 1997). Durch die Interaktion mit den Retinoblastom-Proteinen werden E2F Transkriptionsfaktoren frei gesetzt, die normalerweise erst nach Phosphorylierung der Retinoblastom-Proteine durch Zyklin-cdk Komplexe freigegeben werden. Diese Eigenschaft von adenoviralem E1A kann genutzt werden, um Retinoblastom-Proteine durch Expression ektooper E1A-Proteine zu inaktivieren und dadurch ihre Funktionen zu analysieren.

Das Adenovirus-5 E1A-Gen kodiert für verschiedene E1A (early region 1A) Proteine, die durch alternatives Spleißen der hnRNA entstehen. Hauptsächlich werden die zwei Proteine E1A-13S und E1A-12S (benannt nach den Sedimentationskoeffizienten ihrer mRNAs) exprimiert, wobei E1A-12S nur zwei der für die E1A Proteine typischen konservierten Regionen enthält (CR1 und CR2), während das Protein E1A-13S alle drei konservierten Regionen besitzt (CR1, CR2 und CR3). Die konservierte Region 3 (CR3) bindet vor allem eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, die nicht durch die anderen konservierten Regionen gebunden werden, und besitzt ein Zinkfinger Motiv. Weitere zelluläre Proteine interagieren mit den zwei anderen konservierten Regionen (CR1 und CR2), unter anderem auch die Familie der Retinoblastom-Proteine (Abbildung 30) (Brockmann and Esche 1995; Yoshida et al. 1995; Frisch and Mymryk 2002).

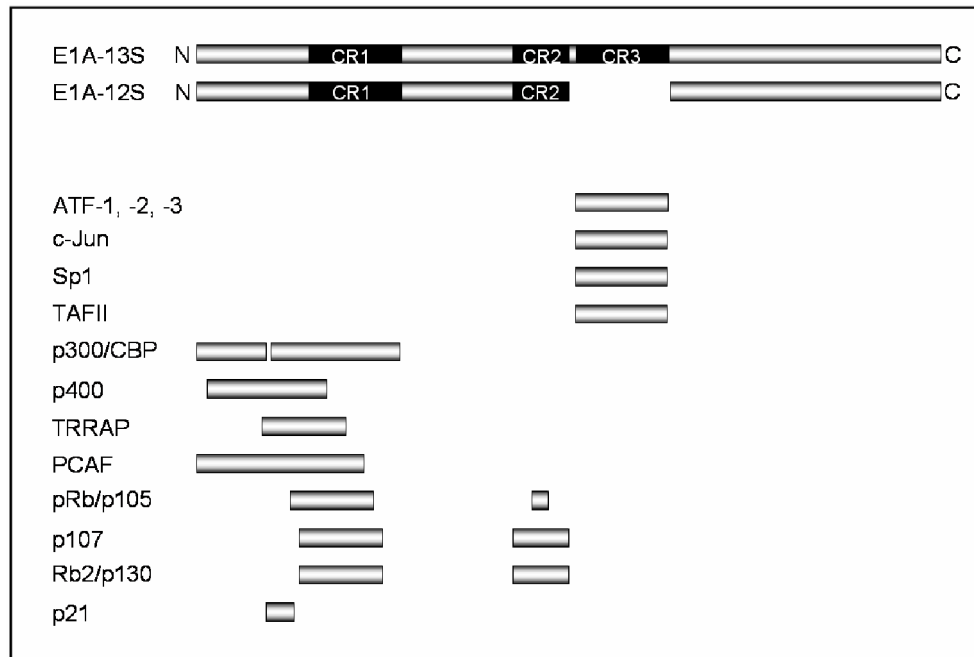


Abbildung 30: Darstellung der zwei Adenovirus E1A Proteine E1A-13S und E1A-12S und der konservierten E1A Regionen CR1, CR2 und CR3. Dargestellt sind die Bindungsstellen zellulärer Proteine innerhalb der E1A Proteine (modifiziert nach Frisch and Mymryk 2002).

Die Retinoblastom-Proteine betreffend können E1A Proteine in seneszenten C6D10-5 Zellen nur mit Rb2/p130 als Zielprotein interagieren, da die zwei anderen Retinoblastom-Proteine pRb/p105 und p107 während des Arrests auf nicht mehr zu detektierende Proteinmengen reduziert wurden (Abbildung 17).

Zur Analyse der Funktionen von Rb2/p130 in der Aufrechterhaltung der Seneszenz sollten seneszente C6D10-5 Zellen mit einem E1A-Expressionsvektor transfiziert werden. Um unspezifische Effekte durch Interaktion der konservierten Region 3 (CR3) mit Transkriptionsfaktoren auszuschließen zu können (siehe Abbildung 30), wurde im Folgenden ein Expressionsvektor für das Protein E1A-12S verwendet, welches die konservierte Region 3 nicht besitzt. Dabei stellte sich zunächst die Frage, in welchem Ausmaß seneszente C6D10-5 Zellen mit Expressionsplasmiden transfizierbar sind.

Zunächst wurde durch Transfektion eines GFP-exprimierenden Plasmids die Transfektionseffizienz der arretierten C6D10-5 Zellen bestimmt. Da aufgrund des Wachstumsarrestes eine Lipofektion nicht möglich war, wurden die arretierten

C6D10-5 Zellen mit Hilfe der Nukleofektor-Technologie von AMAXA transfiziert, wodurch die Plasmid-DNA direkt in den Zellkern gebracht wird und so auch Zellen mit geringer Teilungsaktivität transfiziert werden können.

Für Zellen, die durch vierwöchige Aktivierung von Wildtyp p53 arretiert waren, ergab sich 24 Stunden nach Transfektion (Programm U09 und Kit V) eine Transfektionseffizienz von 12,7 %. Seneszenten C6D10-5 Zellen können also mit einem Expressionsplasmid transfiziert werden und synthetisieren auch das entsprechende Protein.

Zur Bestimmung der Rb2/p130 Funktionen in der Aufrechterhaltung des seneszenten Wachstumsarrests wurde eine Kultur von C6D10-5 Zellen 1 Woche nach Induktion eines p53-abhängigen Wachstumsarrest durch Nukleoporation mit dem Expressionsvektor Ad-5 E1A-12S transfiziert und diese Zellen anschließend auf Deckgläschen bei 30 °C bis zu 48 Stunden nach Transfektion weiter kultiviert. Eine halbe Stunde vor Fixierung der Proben wurde dem Kulturmedium BrdU zugegeben, so dass ein Eintritt in die S Phase durch Inaktivierung von Rb2/p130 am Einbau von BrdU in die DNA erkannt werden konnte. Zur Analyse des BrdU-Einbaus wurden die Proben mit einem BrdU-spezifischen, monoklonalen Antikörper (Bu20a) und einem polyklonalen Antikörper gegen E1A (13 S-5) markiert und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei wurde innerhalb der E1A-12S-positiven und innerhalb der E1A-12S-negativen Population die Anzahl der BrdU-positiven Zellen bestimmt.

Die Daten zeigen, dass durch ektope Expression von E1A-12S in arretierten C6D10-5 Zellen vermehrte S Phase-Aktivität beobachtet werden kann (Abbildung 31) und unterstützen die Hypothese, dass Rb2/p130 im p53-induzierten seneszenten Arrest den Eintritt dieser Zellen in die S Phase unterdrückt.

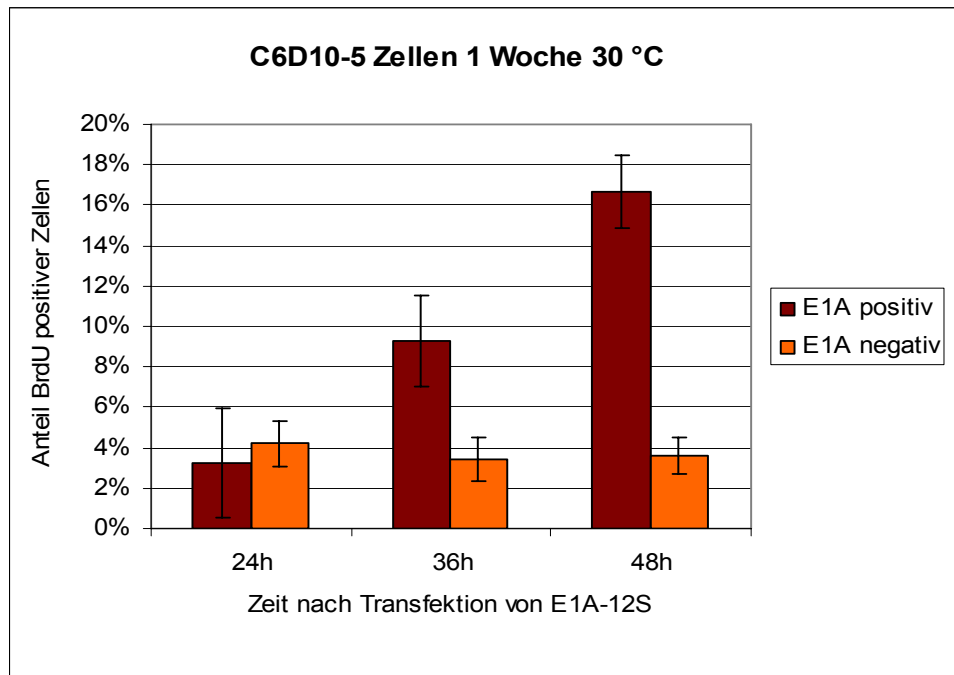


Abbildung 31: Expression von E1A-12S in C6D10-5 Zellen während des p53-vermittelten Wachstumsarrests mit Analyse der S Phase-Aktivität der Zellen. C6D10-5 Zellen, die durch Aktivierung von Wildtyp p53 für 1 Woche arretiert waren, wurden mit einem E1A-12S Expressionsvektor (T. Dobner, Regensburg) mit Hilfe des Nukleofektor-Systems von AMAXA transfiziert. Zur Transfektion wurden 2 µg DNA, 1×10^6 Zellen, 100 µl Nucleofector Solution V und Programm U09 verwendet. Die Zellen wurden nach Transfektion auf Deckgläschen weiterhin bei 30 °C kultiviert und Proben nach 24 h, 36 h und 48 h genommen. Vor der Probenentnahme wurde dem Kulturmedium für eine halbe Stunde BrdU zugegeben, die Zellen anschließend in -20 °C Aceton fixiert und E1A-12S Expression sowie BrdU-Einbau mit den entsprechenden Antikörpern in einer Immunfluoreszenzmarkierung nachgewiesen. Um mögliche Schwankungen auszuschließen, wurden drei unabhängige Experimente ausgewertet (pro Experiment wurden 1200 Zellen gezählt) und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet

V.3.2. Die Reduzierung von Rb2/p130 durch spezifische siRNA reicht aus, um den Wachstumsarrest aufzuheben

Neben der Inaktivierung von Rb2/p130 kann die Interaktion von E1A-12S mit weiteren Proteinen eine mögliche Ursache für den Wiedereintritt der seneszenten Zellen in die S Phase darstellen (siehe Abbildung 30). So kann E1A-12S beispielsweise auch mit p21^{CIP1} interagieren. Um sicherzugehen, dass die Inaktivierung von Rb2/p130 für den Wiedereintritt der seneszenten C6D10-5 Zellen in die S Phase ausreichend ist, sollten Rb2/p130 Proteinmengen gezielt durch Rb2/p130-spezifische siRNA reduziert werden.

Um eine möglichst effiziente siRNA gegen Rb2/p130 zur Verfügung zu haben, wurden zunächst 3 verschiedene siRNAs gegen Rb2/p130 getestet. C6D10-5 Zellen wurden dazu bei 39 °C mit dem Transfektionsagens Oligofectamine und siRNA transfiziert, 4 Stunden nach Transfektion bei 39 °C und anschließend für 3 Tage bei 30 °C kultiviert. Aus den Proben wurden Gesamtzelllysate zur Analyse der Rb2/p130 Proteinmengen zur Auftrennung über SDS-PAGE und Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran durch Western Blot angefertigt. Die Analyse der Rb2/p130 Proteinmengen mit dem Antikörper Clone 10 zeigte, dass die siRNA Rb2/p130-3 zu einer deutlichen Reduktion der Rb2/p130 Mengen führte (Abbildung 32). Der Nachweis von β -Tubulin stellte sicher, dass die Änderung der Rb2/p130 Mengen nicht auf generelle Änderungen in den Gesamtproteinmengen zurückzuführen waren.

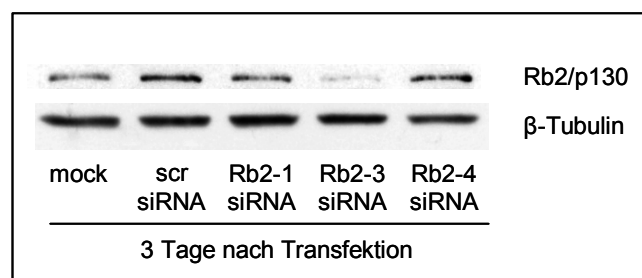


Abbildung 32: Transfektion verschiedener siRNAs gegen Rb2/p130 und Analyse ihrer Effizienz in der Reduktion der Rb2/p130 Proteinmengen. Nach Transfektion proliferierender C6D10-5 Kulturen mit Rb2 beziehungsweise scr siRNA mittels Oligofectamine wurde die Kultivierungstemperatur 4 h nach Transfektion auf 30 °C geändert, um p53-vermittelt einen Anstieg der bei 39 °C sehr geringen Mengen von Rb2/p130 zu erhalten. 3 Tage nach Induktion der Wildtyp p53 Funktionen wurden Proben der verschiedenen Transfektionen gewonnen und Lysate für eine Auftrennung durch SDS-PAGE präpariert. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran wurde Rb2/p130 mit dem Antikörper Clone 10 nachgewiesen.

Analog zu der Transfektion des E1A-12S Expressionsvektors wurden C6D10-5 Zellen, die für 1 Woche arretiert waren, mit dieser siRNA gegen Rb2/p130 transfiziert. Parallel dazu wurde als Kontrolle die unspezifische scr siRNA transfiziert. Die Analyse der S Phase-Aktivität der seneszenten Zellen nach Transfektion von Rb2/p130 siRNA und Reduktion der Rb2/p130 Proteinmengen

erfolgte durch immunhistochemische Detektion des BrdU-Einbaus und alternativ der Expression von Zyklin A.

Dazu wurden 48 Stunden nach siRNA Transfektion Proben genommen, wobei die Proben eine halbe Stunde vor dem Fixieren mit BrdU inkubiert wurden. Für die Immunfluoreszenzmarkierung wurde je eine Probe mit dem BrdU-spezifischen, monoklonalen Antikörper Bu20a beziehungsweise mit dem monoklonalen Antikörper CY-A1 gegen Zyklin A inkubiert. Die Proben wurden anschließend einer fluoreszenzmikroskopischen Analyse unterzogen. Je Probe wurden 3000 Zellen ausgewertet und der Anteil BrdU- beziehungsweise Zyklin A-positiven Zellen bestimmt. Mittelwert und Standardabweichung berechneten sich auf Basis dreier, unabhängig voneinander durchgeführten Experimente (Abbildung 33).

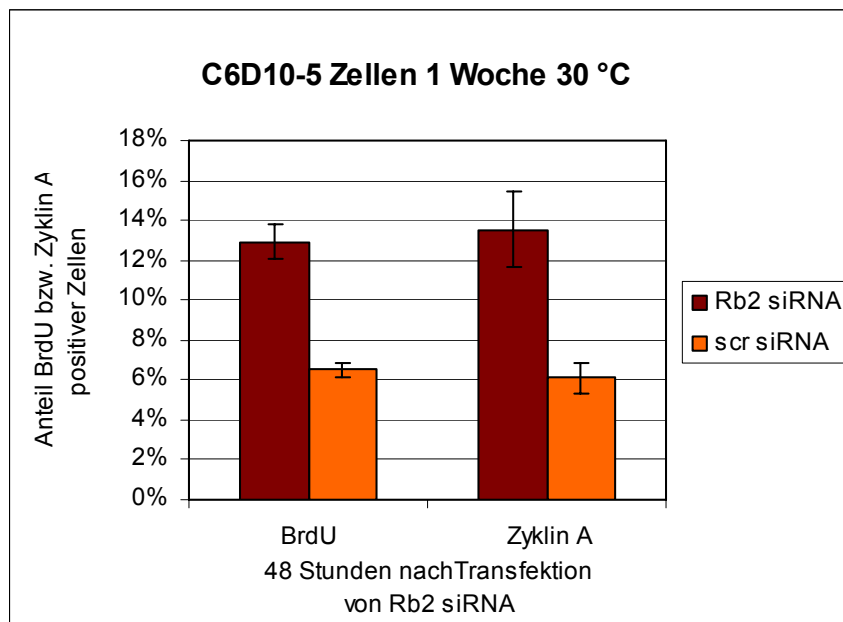


Abbildung 33: Transfektion von C6D10-5 Zellen mit Rb2/p130 bzw. scr siRNA nach einwöchigem Arrest. C6D10-5 Zellen, die durch Aktivierung von Wildtyp p53 für 1 Woche arretiert wurden, wurden mit Rb2/p130 siRNA unter Zuhilfenahme des Nukleofektor-Systems von AMAXA transfiziert. Zur Transfektion wurden 1,4 µg siRNA, 1×10^6 Zellen, 100 µl Nucleofector Solution V und Programm U09 verwendet. Die Zellen wurden nach Transfektion für 48 h bei 30 °C kultiviert, dann in -20 °C Aceton fixiert und anschließend Zyklin A beziehungsweise BrdU mit den entsprechenden Antikörpern für die Fluoreszenzmikroskopie markiert.

Das Ergebnis macht deutlich, dass Rb2/p130 siRNA in der Lage ist, die Anzahl der Zellen, die S Phase-Aktivität zeigen, signifikant zu erhöhen. Analog zu diesem

Experiment wurden in einem weiteren Versuch statt 1 Woche arretierte Zellen 4 Wochen arretierte Zellen für die Transfektion mit Rb2/p130 beziehungsweise scr siRNA eingesetzt. Es wurden ebenfalls drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt und je Probe ca. 3000 Zellen analysiert. Auch in C6D10-5 Zellen, die durch Aktivierung von Wildtyp p53 4 Wochen arretiert waren und zu über 90 % Merkmale zellulärer Seneszenz zeigten, konnte der Anteil der S Phase aktiven Zellen signifikant erhöht werden (Abbildung 34).

Diese Daten machen deutlich, dass die Anwesenheit von Rb2/p130 für die Aufrechterhaltung des p53-induzierten Wachstumsarrest benötigt wird. Wird die Expression von Rb2/p130 in den arretierten C6D10-5 Zellen unterdrückt, so sind diese in der Lage, Zyklin A zu synthetisieren und die Replikation der DNA zu starten.

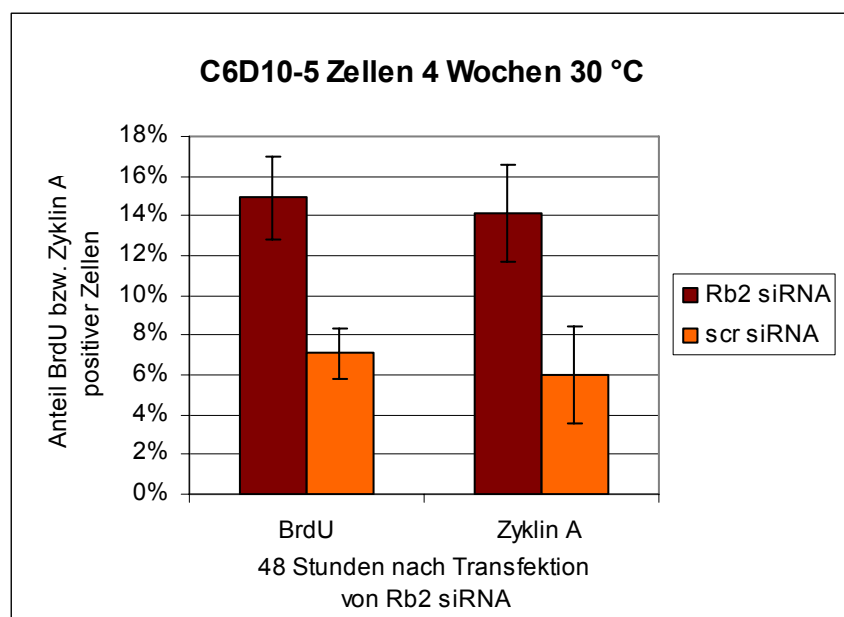


Abbildung 34: Transfektion von C6D10-5 Zellen mit Rb2/p130 bzw. scr siRNA nach vierwöchigem Arrest. C6D10-5 Zellen, die durch Aktivierung von Wildtyp p53 für 4 Wochen arretiert waren, wurden mit Rb2/p130 siRNA unter Zuhilfenahme des Nukleofektor-Systems von AMAXA transfiziert. Zur Transfektion wurden 1,4 µg siRNA, 1×10^6 Zellen, 100 µl Nucleofector Solution V und Programm U09 verwendet. Die Zellen wurden nach Transfektion für 48 h bei 30 °C kultiviert, dann in -20 °C Aceton fixiert und anschließend Zyklin A beziehungsweise BrdU mit den entsprechenden Antikörpern für die Fluoreszenzmikroskopie markiert.

V.3.3. Die Repression des *Zyklin A* Promoters durch Rb2/p130 ist essentiell für die Aufrechterhaltung des Arrests

Rb2/p130 ist das einzige in arretierten C6D10-5 Zellen vorhandene Retinoblastom-Protein und ist für die Aufrechterhaltung des G1 Arrests der Zellen notwendig. Die Wachstums-suppressive Aktivität von Rb2/p130 beruht auf der Komplexbildung mit E2F-4 (Vairo et al. 1995). Diese Komplexe können die Funktion bestimmter Promotoren blockieren. Aus Studien von ruhenden Zellen ist bekannt, dass Rb2/p130-E2F-4 Komplexe neben einer Vielzahl von weiteren Promotoren auch an den *Zyklin A* Promotor binden und dadurch die Transkription von *Zyklin A* inhibieren (Takahashi et al. 2000). In einer weiteren Arbeit wurde Rb2/p130 nicht nur in ruhenden, sondern auch in seneszenten Zellen in Bindung an den *Zyklin A* Promotor gefunden (Narita et al. 2003). Es sollte untersucht werden, ob auch in den seneszenten C6D10-5 Zellen eine Bindung von Rb2/p130 an den *Zyklin A* Promotor vorlag.

Dazu wurde eine Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) von Kulturen angefertigt, die über einen Zeitraum von 4 Wochen durch p53 arretiert waren und Merkmale zellulärer Seneszenz zeigten. Als Kontrolle wurden proliferierende C6D10-5 Zellen, die die mutierte Form von p53^{Val135} exprimierten, eingesetzt (Abbildung 35).

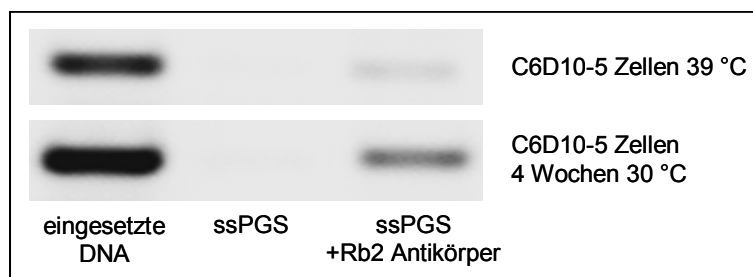


Abbildung 35: Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) von proliferierenden beziehungsweise seneszenten C6D10-5 Zellen. C6D10-5 Zellen wurden entweder bei 39 °C oder für 4 Wochen bei 30 °C kultiviert. Nach Quervernetzung von Proteinen und DNA wurden Zellkernlysate hergestellt, die dann mit dem Rb2/p130 Antikörper Clone 10 oder für die Negativkontrolle ohne Antikörper inkubiert wurden. Die Immunkomplexe wurden durch Bindung an ssPGS präzipitiert und die so gewonnene DNA einer PCR (35 Zyklen) mit Primern gegen den *Zyklin A* Promotor unterzogen. Das PCR-Produkt wurde über Gelelektrophorese in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und durch Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA unter UV-Bestrahlung detektiert. (diese Daten sind in Zusammenarbeit mit Amir Kopic entstanden)

Die ChIP-Analyse zeigte, dass Rb2/p130-spezifisch in seneszenten C6D10-5 Kulturen an den *Zyklin A* Promotor gebunden ist. In Kulturen proliferierender C6D10-5 Zellen war praktisch keine Bindung von Rb2/p130 an den *Zyklin A* Promotor zu beobachten (Abbildung 35).

In Korrelation dazu ließ sich in der Western Blot-Analyse der Gesamtzelllysate seneszenten Kulturen mit der Zunahme von Rb2/p130 eine Reduktion der Zyklin A Proteinmengen feststellen (siehe Abbildungen 14 und 17). Bei Aufhebung des Arrests durch die Inaktivierung von p53 konnte gleichzeitig mit der Phosphorylierung und dem Abbau von Rb2/p130 erneut Zyklin A detektiert werden (siehe Abbildungen 20 und 22). Um sicherzustellen, dass die Reduktion der Zyklin A Proteinmengen auf transkriptioneller Ebene durch die Blockierung des Promotors und nicht durch eine Destabilisierung des Proteins im Laufe des Arrests erfolgte, wurde eine RT-PCR der Zyklin A mRNA durchgeführt. Analog zum ChIP-Experiment wurden Kulturen 4 Wochen arretierter C6D10-5 Zellen mit denen von proliferierenden C6D10-5 Zellen verglichen. Die RT-PCR (Abbildung 36) zeigt eindeutig, dass die Reduktion der Zyklin A Proteinmengen in arretierten C6D10-5 Zellen auf einen transkriptionellen Block des *Zyklin A* Promotors zurückzuführen ist. In normal proliferierenden C6D10-5 war der *Zyklin A* Promotor aktiv und Zyklin A mRNA konnte nachgewiesen werden (Abbildung 36).

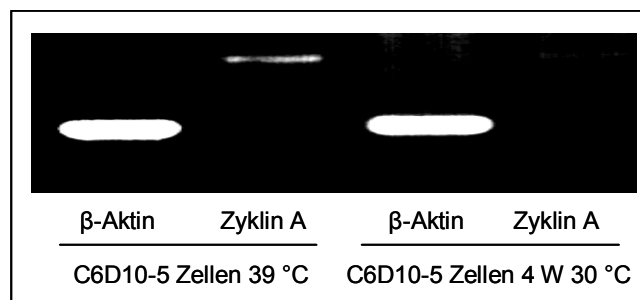


Abbildung 36: RT-PCR von proliferierenden beziehungsweise seneszenten C6D10-5 Zellen. C6D10-5 Zellen wurden entweder bei 39 °C oder für 4 Wochen bei 30 °C kultiviert. Die Zellen wurden anschließend pelletiert. Aus dem Pellet wurde die RNA mit Hilfe der peqGOLD RNAPure Lösung präpariert. Die RNA wurde dann einer RT-PCR unterzogen und die so gewonnene DNA einer PCR mit Primern gegen Zyklin A beziehungsweise β-Aktin cDNA unterzogen. Die PCR-Produkte wurden über Gelelektrophorese in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und durch Interkalation von Ethidiumbromid in die DNA unter UV-Bestrahlung detektiert.

V.3.4. Die Expression von ektoem Zyklin A ist ausreichend für die Aufhebung des seneszenten Wachstumsarrests

Rb2/p130 kann nicht nur an den Promotor von *Zyklin A* binden und ihn dadurch blockieren, sondern interagiert mit einer Vielzahl weiterer Promotoren. So wurde in ruhenden Zellen eine Bindung an die Promotoren von *E2F-1*, *Cdc6*, *p107* und *B-myb* nachgewiesen (Takahashi et al. 2000). Der Eintritt in die S Phase bei Inaktivierung von Rb2/p130 kann somit theoretisch auch auf der Aktivierung von Promotoren anderer Zellzyklus-regulatorischer Proteine beruhen. Um zu bestätigen, dass die Aktivierung des *Zyklin A* Promotors und die damit einhergehende Expression des Proteins seneszente C6D10-5 Zellen in die S Phase treibt, wurde in seneszenten Zellen ein ektoem Zyklin A exprimiert.

Zur Differenzierung der Expression von ektoem Zyklin A gegenüber der möglichen Expression von endogenem Zyklin A wurde ein Expressionsvektor kloniert, der über ein *internal ribosome entry site* (IRES) Element gleichzeitig Zyklin A und GFP exprimieren kann (pIRES2-Cyclin A-AcGFP1). Es entsteht in Folge der Transkription eine einzige bizistronische mRNA, von der bei der Translation zwei einzelne Proteine abgeschrieben werden. In Folge einer Transfektion von Zellen mit dem Expressionsvektor pIRES2-Cyclin A-AcGFP1 unterscheiden sich Zellen, die ektoem Zyklin A exprimieren von Zellen mit endogenem Zyklin A durch die gleichzeitige Expression von GFP.

Der Vorteil eines Expressionsvektors mit IRES-Element besteht darin, dass nicht ein Fusionsprodukt aus Zyklin A und GFP exprimiert wird, welches eine Linkerregion benötigt, um die Funktion von Zyklin A nicht einzuschränken. Solch ein Fusionsprotein könnte sich in anderen subzellulären Kompartimenten als das endogene Protein anreichern und damit andere Funktionen ausüben oder auch inaktiv sein.

Für die Klonierung des pIRES2-Cyclin A-AcGFP1 Vektors wurde die cDNA von Zyklin A über eine PCR aus einem Vektor gewonnen, der humanes Zyklin A als Fusionsprotein mit GFP exprimiert (pCMVCycA, L.Hengst, Innsbruck). Dabei wurden die Primer so entworfen, dass sie zusätzlich zu der cDNA am 5' und am 3' Ende der cDNA Schnittstellen für Restriktionsenzyme entstehen lassen (5': XhoI und EcoRI, 3': SalI und BamHI). Dieses PCR-Produkt mit glatten Enden wurde dann in einen mit SmaI linearisierten pBluescript Klonierungsvektor ligiert, der

durch den Restriktionsverdau ebenfalls glatte Enden besaß. Durch Blau-Weiß-Selektion wurden Klone ausgewählt, die das PCR-Produkt erfolgreich eingebaut hatten. Aus dem Klonierungsvektor wurde die cDNA über die durch die PCR eingefügten Restriktionsschnittstellen EcoRI und SalI ausgeschnitten und in die *multiple cloning site* (MCS) des pIRES2-AcGFP1 Vektors, der ebenfalls mit EcoRI und SalI geschnitten und dadurch linearisiert wurde, inkloniert (Abbildung 37). Die DNA des gewonnen Expressionsvektors wurde durch Sequenzierung auf Fehlerfreiheit untersucht.

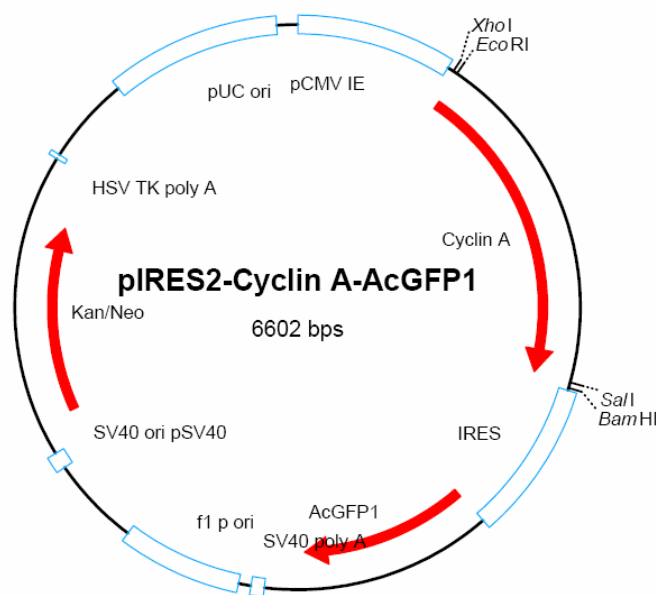


Abbildung 37: Vektorkarte des klonierten pIRES2-Cyclin a-AcGFP1 Expressionsvektors. Das PCR-Fragment der cDNA von Zyklin A wurde über die Schnittstellen EcoR I und Sal I in die multiple cloning site (MCS) des Ausgangsvektors pIRES2-AcGFP1 (Clontech) kloniert.

Dieser Expressionsvektor wurde mit Hilfe des Nukleofektor-Systems (siehe Punkt V.3.1.) in seneszente C6D10-5 Zellen transfiziert. Um sicherzugehen, dass nicht der Expressionsvektor alleine zu einer Expression von Zyklin A in den Zellen führt, wurden der Vektor pIRES2-AcGFP1 und der Vektor pIRES2-Cyclin A-AcGFP1 in zwei getrennten Experimenten transfiziert.

Durch Immunfluoreszenzmarkierung mit einem polyklonalen Antikörper gegen Zyklin A (H-432) und einem monoklonalen Antikörper gegen GFP (B-2) wurde

nachgewiesen, dass Zellen, die mit dem pIRES2-AcGFP1 Vektor transfiziert wurden, nur GFP exprimierten (Abbildung 38). Zellen, die mit dem pIRES2-Cyclin A-AcGFP1-Vektor transfiziert wurden, zeigten hingegen eine Ko-Expression von Zyklin A und GFP (Abbildung 39).

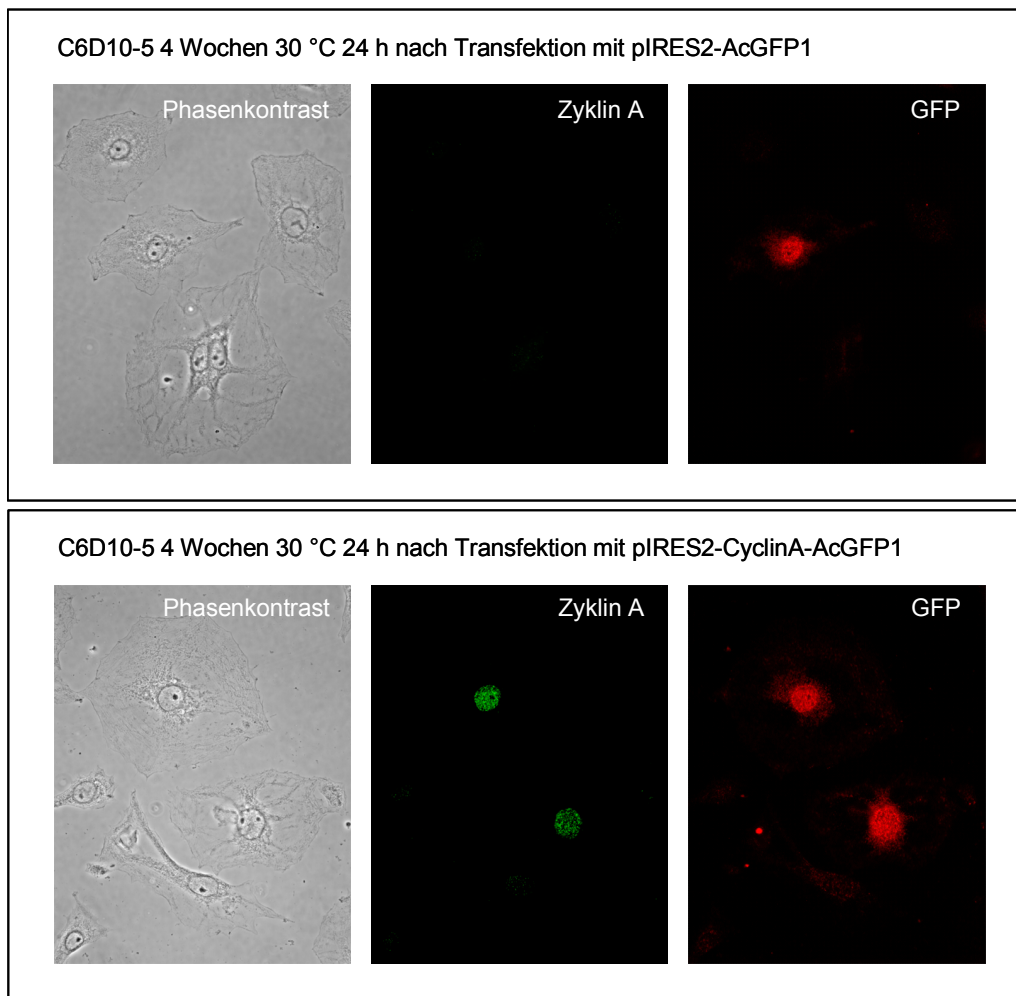


Abbildung 38 und 39: Seneszente C6D10-5 Zellen nach Transfektion mit pIRES2-Cyclin A beziehungsweise pIRES2-Cyclin A-AcGFP1 und Detektion von Zyklin A und GFP Expression. C6D10-5 Zellen, die durch vierwöchige Expression von p53 wachstumsarretiert waren, wurden mit Hilfe des Nucleofekorsystems von AMAXA transfiziert. Dazu wurden 2 µg DNA, 1×10^6 Zellen, 100 µl Nucleofektor Solution V und das Programm U30 benutzt. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen in -20 °C Aceton fixiert und die Expression von Zyklin A und GFP durch Immunfluoreszenzmarkierung mit den entsprechenden Antikörpern detektiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch den Expressionsvektor pIRES2-Cyclin A-AcGFP1 spezifisch Zyklin A exprimiert werden kann und nicht die Transfektion als solche zu einer unspezifischen Expression von endogenem Zyklin A führt.

Daraufhin wurde untersucht, inwieweit die Expression von ektope Zyklin A in seneszenten C6D10-5 Zellen ausreicht, um S Phase-Aktivität zu induzieren. Zur Analyse der S Phase-Aktivität 24 Stunden nach Transfektion wurden die Proben vor der Fixierung für eine halbe Stunde mit BrdU inkubiert. Anschließend wurde eine Immunfluoreszenzmarkierung mit dem polyklonalen Antikörper H-432 gegen Zyklin A und dem monoklonalen Antikörper Bu20a gegen BrdU durchgeführt und die Zellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Diese Analyse zeigte, dass Zellen, die positiv für Zyklin A waren, gleichzeitig auch ein Signal für BrdU-Einbau zeigten (Abbildung 40).

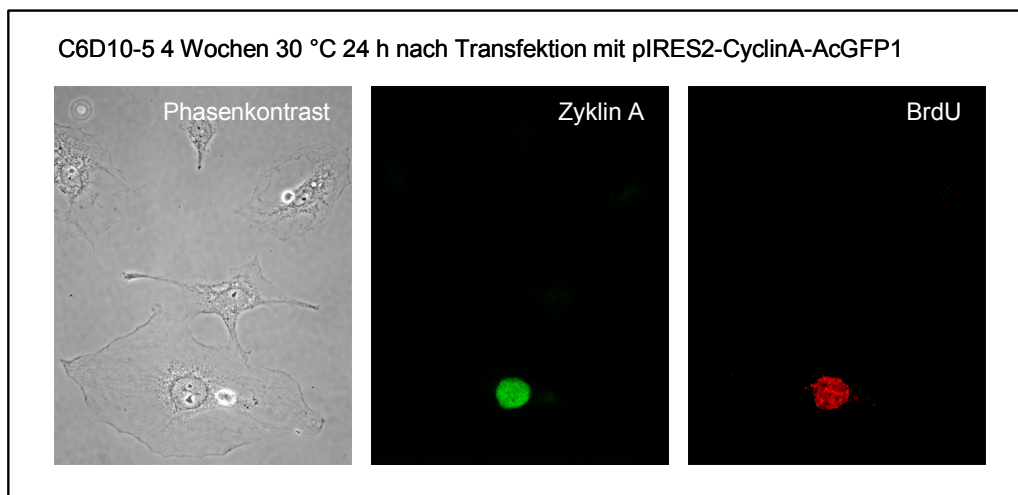


Abbildung 40: Seneszente C6D10-5 Zellen nach Transfektion mit pIRES2-Cyclin A-AcGFP1 und anschließender Detektion von Zyklin A Expression und BrdU-Einbau. C6D10-5 Zellen, die durch vierwöchige Expression von p53 Wachstums-arretiert waren, wurden mit Hilfe des Nukleofekorsystems von AMAXA analog zu den Zellen in Abbildung 38 transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen in -20 °C Aceton fixiert und die Expression von Zyklin A und BrdU durch Immunfluoreszenzmarkierung mit den entsprechenden Antikörpern detektiert.

Die Expression von ektope Zyklin A reicht also aus, um in wachstumsarretierten C6D10-5 Zellen S Phase-Aktivität zu induzieren. Weitere Faktoren sind nicht notwendig, um in den Zellen die Synthese von DNA einzuleiten. Die transkriptionelle

Repression des *Zyklin A* Promotors durch Rb2/p130 und daraus folgend die Reduktion der Zyklin A Proteinmengen ist offensichtlich der limitierende Faktor, durch dessen Fehlen die Zellen am Übergang der G1 Phase zur S Phase arretiert wurden.

VI. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Wiederherstellung der p53 Funktionen in C6D10-5 Rattenglioblastom-Zellen zu einem stabilen, seneszenten Wachstumsarrest führt, und betont damit die zentrale Funktion von p53 in der Induktion zellulärer Seneszenz.

Zelluläre Seneszenz bedeutet einen terminalen Wachstumsarrest, in dem die Zellen irreversibel in der G1 Phase des Zellzyklus arretiert sind. Der Begriff Seneszenz wurde 1961 durch Hayflick geprägt und bezog sich ursprünglich auf die Tatsache, dass normale humane Zellen nur eine begrenzte Anzahl von Verdopplungen durchlaufen können (replikative Seneszenz) (Hayflick and Moorhead 1961; Hayflick 1965). Am Ende ihrer proliferativen Phase verändern die Zellen dabei ihre Morphologie: das Gesamtvolumen der Zellen vergrößert sich, sie verlieren ihre ursprüngliche Form und flachen stark ab. Diese Veränderungen gehen einher mit Änderungen der Kernstruktur, der Genexpression und des Metabolismus der Zellen. Seneszenten Zellen reagieren nicht mehr auf mitogene Stimuli, sind aber noch lange Zeit nach Arrestinduktion lebensfähig (Campisi 2000; Sitte et al. 2000; Narita et al. 2003). Sie zeigen als charakteristisches Merkmal die Expression der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (Dimri et al. 1995). Ursprünglich wurde die Seneszenz auf die Verkürzung der Telomere zurückgeführt, die als ein Schadenssignal erkannt wird (Harley et al. 1990). Im Laufe der Zeit wurde dann beobachtet, dass auch andere Stress-Signale, vor allem solche mit onkogenen Qualitäten, Seneszenz in kultivierten Zellen induzieren können (Serrano et al. 1995; Serrano et al. 1997; de Stanchina et al. 1998; Lin et al. 1998; Robles and Adami 1998; Lowe 1999; Wei et al. 1999). Mittlerweile gibt es Hinweise dafür, dass zelluläre Seneszenz nicht nur in Zellkulturen, sondern auch *in vivo* auftritt, und zwar in prämaligen Stadien der Tumorentwicklung (Schmitt et al. 2002; Satyanarayana et al. 2003; Braig et al. 2005; Chen et al. 2005). Zelluläre Seneszenz ist daher, wie die Apoptose, ein genereller Sicherungsmechanismus, der frühe Schritte der Tumorprogression unterbindet.

Eine zentrale und bisher nicht geklärte Frage ist, über welche Signalwege zelluläre Seneszenz ausgelöst wird. Zelluläre Seneszenz kann durch die Tumorsuppressoren ARF, p53, p16^{INK4A} und pRb/p105 induziert werden. p16^{INK4A} und ARF, die über einen alternativen Leserahmen durch den *INK4A* Locus kodiert werden (Quelle et

al. 1995), modulieren die Aktivität von p53 und pRb/p105 (Abbildung 41). Mäuse, die Mutationen in den Genen für ARF, p53, p16^{INK4A} oder pRb/p105 tragen, neigen stark zur Ausbildung von Tumoren. Verglichen mit p16^{INK4A}/ARF null Mäusen oder reinen ARF null Mäusen ist in p16^{INK4A} null Mäusen eine geringere Häufigkeit von spontanen Tumoren zu beobachten (Serrano et al. 1996; Kamijo et al. 1997). Embryonale Fibroblasten (MEFs) aus ARF null Mäusen können im Gegensatz zu p16^{INK4A} null MEFs nicht mehr in Seneszenz übergehen (Krimpenfort et al. 2001; Sharpless et al. 2001). Zelllinien, die spontan aus normalen MEFs entstehen, indem sie die zelluläre Seneszenz und Apoptose umgehen, weisen entweder eine Deletion von ARF oder eine Mutation von p53 auf (Kamijo et al. 1997). Diese Daten zeigen, dass die Funktion des Tumorsuppressors p53 für die Aktivierung zellulärer Seneszenz von höchster Wichtigkeit ist, wobei noch nicht geklärt ist, über welche Signalwege p53 Seneszenz induzieren kann. Da eine effektive Induktion zellulärer Seneszenz durch p53 nur in Anwesenheit eines funktionellen Retinoblastom-Proteins möglich ist (Haupt et al. 1995; Dannenberg et al. 2000; Sage et al. 2000; Psyrrri et al. 2004), ist ein Zusammenspiel der ARF-p53 und INK4A-pRb Signalwege für die Induktion zellulärer Seneszenz notwendig (Abbildung 41).

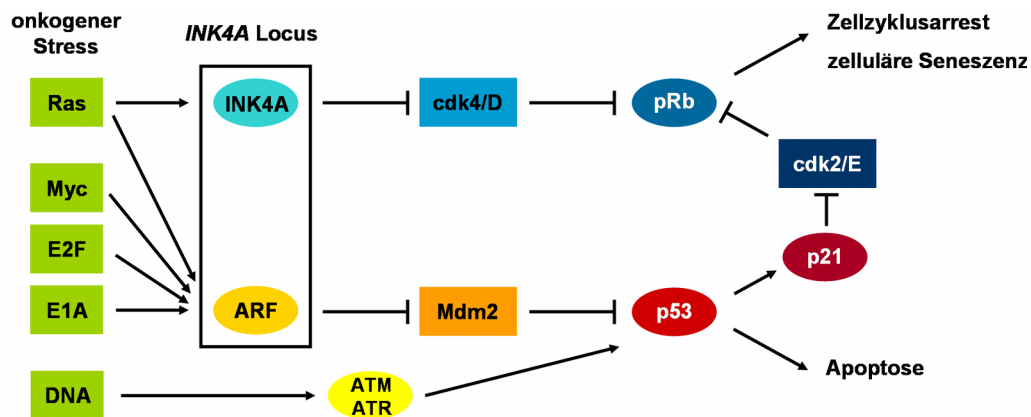


Abbildung 41: Kooperation von pRb und p53 in der Induktion zellulärer Seneszenz. Die Signalwege werden durch die Produkte des *INK4A* Locus kontrolliert, der in der Gegenwart von onkogenem Stress aktiviert wird. Außerdem wird p53 durch DNA Schäden stabilisiert. Das Ergebnis ist ein transienter Zellzyklusarrest, zelluläre Seneszenz oder Apoptose.

VI.1. Schlüsselfunktion von p21^{CIP1} in der Induktion zellulärer Seneszenz

Der zentrale Mediator des p53-induzierten Zellzyklusarrests ist der CDK-Inhibitor p21^{CIP1} (Sherr and Roberts 1999; Chang et al. 2000). Entsprechend wurde auch in der hier vorliegenden Arbeit eine starke Zunahme der p21^{CIP1} Proteinmengen nach Aktivierung der Wildtyp p53 Funktionen in C6D10-5 Zellen beobachtet.

Der CDK-Inhibitor p21^{CIP1} übt seine Funktion in der negativen Regulation des Zellzyklus über die Inaktivierung von Zyklin E-cdk2 und Zyklin A-cdk2 Komplexen aus (siehe Abbildung 6, Einleitung). Ein Substrat der Zyklin E-cdk2 Komplexe ist der CDK-Inhibitor p27^{KIP1} (Muller et al. 1997; Sheaff et al. 1997; Vlach et al. 1997; Nguyen et al. 1999), welcher nach Aktivierung von Wildtyp p53 Funktionen in den C6D10-5 Zellen deutlich akkumuliert. Die Proteinmenge von p27^{KIP1} wird post-translational durch Zyklin E-cdk2-vermittelte Phosphorylierung geregelt (Hengst and Reed 1996). Durch die spezifische Phosphorylierung an Thr187 wird der Ubiquitin-vermittelte proteasomale Abbau von p27^{KIP1} eingeleitet (Sheaff et al. 1997; Vlach et al. 1997; Montagnoli et al. 1999; Nguyen et al. 1999).

Nach der Aktivierung von Wildtyp p53 in den C6D10-5 Zellen blockieren die ansteigenden p21^{CIP1} Proteinmengen die Zyklin E-cdk2 Kinase-Aktivität und schalten dadurch diesen Degradationsweg von p27^{KIP1} aus. Folglich akkumuliert der CDK-Inhibitor p27^{KIP1} in den arretierten C6D10-5 Zellen. Da zunächst p21^{CIP1} akkumulieren muss, um die Degradierung von p27^{KIP1} aufzuhalten, erklärt sich damit der im Vergleich zu p21^{CIP1} verzögerte Anstieg von p27^{KIP1}.

p21^{CIP1} und p27^{KIP1} interagieren beide nicht nur mit Zyklin E bzw. Zyklin A-cdk2 Komplexen, sondern werden auch von Zyklin D-cdk4/6 Komplexen gebunden. Diese Bindung wirkt sich nicht inhibitorisch auf den Kinase-Komplex aus, sondern stellt eine Sequestrierung von p21^{CIP1} bzw. p27^{KIP1} dar, so dass Komplexe von Zyklin E und Zyklin A mit cdk2 eventuell nicht mehr vollständig inhibiert werden können (Sherr and Roberts 1999). In dieser Situation nimmt p16^{INK4A} eine Schlüsselrolle ein. Durch die Aktivierung von p16^{INK4A} werden p21^{CIP1} und p27^{KIP1} aus ihrer Bindung mit Zyklin D-cdk4/6 verdrängt und inhibiert dann effektiv die Zyklin E-cdk2 und Zyklin A-cdk2 Komplexe (siehe Abbildung 7, Einleitung). Gleichzeitig wird die

Kinase-Aktivität der Zyklin D-cdk4/6 Komplexe durch Bindung von p16^{INK4A} effizient blockiert.

Da C6D10-5 Zellen eine Deletion von p16^{INK4A} aufweisen, erhält der durch Wildtyp p53 transaktivierte CDK-Inhibitor p21^{CIP1} die zentrale Rolle in der Induktion des seneszenten Wachstumsarrests. Die p21^{CIP1}-vermittelte Akkumulation von p27^{KIP1} und die Blockierung der Zyklin E-cdk2 Komplexe durch die Cip/Kip Proteine führt dazu, dass Substrate dieser Komplexe nicht mehr phosphoryliert werden.

In den arretierten C6D10-5 Zellen müssen aufgrund der Abwesenheit von p16^{INK4A} sehr große Mengen p21^{CIP1} und p27^{KIP1} vorliegen, um trotz Sequestrierung der Cip/Kip Proteine an Zyklin D-cdk4/6 Komplexe die Kinase-Aktivität der Zyklin E-cdk2 Komplexe inhibieren zu können. Dass die Blockierung der Zyklin E-cdk2 Funktionen trotz Abwesenheit von p16^{INK4A} erfolgreich ist, ist an der unvollständigen Phosphorylierung der Retinoblastom-Proteine zu erkennen. In ihrer aktiven, hypophosphorylierten Form interagieren die Retinoblastom-Proteine mit E2F Transkriptionsfaktoren, unterbinden dadurch deren Aktivität und sind damit maßgeblich an der Induktion und Aufrechterhaltung des Arrests beteiligt.

VI.2. Die Familie der Retinoblastom-Proteine

Die Familie der Retinoblastom-Proteine besteht aus den drei Proteinen pRb/p105, p107 und Rb2/p130. Diese drei Proteine können in ihren Funktionen überlappen, jedes einzelne hat aber auch nicht redundante Funktionen. Die Gene der Retinoblastom-Proteine liegen auf verschiedenen Chromosomen und werden über unterschiedliche Promotoren zu bestimmten Zeitpunkten aktiviert (Lee et al. 1987; Mayol et al. 1993; Yeung et al. 1993; Hurford et al. 1997; Classon et al. 2000).

Die Retinoblastom-Proteine werden aufgrund einer konservierten Region, der *Pocket* Region, auch als *Pocket*-Proteine bezeichnet. Diese Region befindet sich zentral zwischen dem N- und dem C-Terminus und besteht aus der A-Domäne, einem Zwischenstück (*Spacer*) und der B-Domäne. Die *Pocket* Region wird für die Interaktion der Retinoblastom-Proteine mit diversen Proteinen benötigt. p107 und Rb2/p130 sind sich in ihrer Sequenz relativ ähnlich und teilen Homologien über die gesamte Proteinelänge, wohingegen ihre Homologie mit pRb/p105 auf die A/B-

Domänen beschränkt ist (Abbildung 42) (Lee et al. 1987; Hong et al. 1989; Mayol et al. 1993; Yeung et al. 1993; Baldi et al. 1996; Ichimura et al. 2000).

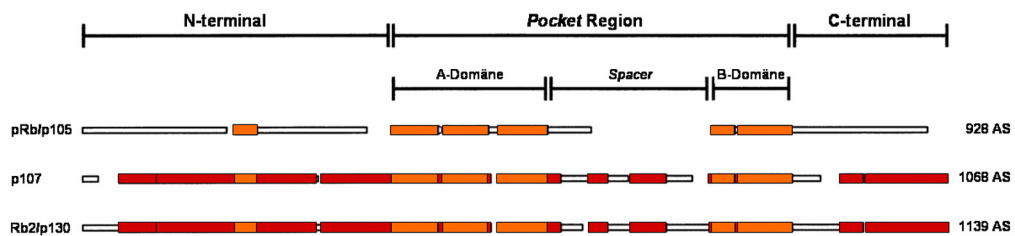


Abbildung 42: Strukturelle Homologien zwischen den Retinoblastom-Proteinen pRb/p105, p107, und pRb2/p130. Die orangenen Bereiche stellen Regionen mit hoher Homologie dar und sind im Wesentlichen auf die A- und B- Domänen beschränkt. Rote Bereiche stellen homologe Regionen dar, die nur zwischen p107 und Rb2/p130 vorhanden sind, weiße Bereiche sind nicht homologe Regionen (Paggi and Giordano 2001).

Innerhalb des C-Terminus und in der *Pocket Region* befinden sich die Bindungsstellen für die E2F Transkriptionsfaktoren (Hong et al. 1989; Huang et al. 1992). p107 und Rb2/p130 binden aufgrund ihrer Homologien bevorzugt andere E2F Transkriptionsfaktoren als pRb/p105 (Dyson 1998; Nevins 2001; Trimarchi and Lees 2002). Die starken Transkriptionsaktivatoren E2F-1, E2F-2 und E2F-3a, die das Fortschreiten des Zellzyklus fördern, werden ausschließlich von pRb/p105 gebunden. Die Expression dieser E2F Proteine unterliegt periodischen Schwankungen innerhalb des Zellzyklus. Die reprimierenden E2F Transkriptionsfaktoren E2F-4 und E2F-5, die konstitutiv exprimiert werden und über subzelluläre Lokalisation in ihrer Aktivität geregelt werden, bilden meistens einen Komplex mit p107 oder Rb2/p130. Die reprimierenden E2F Transkriptionsfaktoren werden überwiegend für den Zellzyklusarrest und Differenzierung benötigt (Cobrinik 2005; Dimova and Dyson 2005).

Die Interaktion der Retinoblastom-Proteine mit den E2F Transkriptionsfaktoren wird über die Phosphorylierung der drei Retinoblastom-Proteine durch Zyklin-abhängige Kinasen geregelt (Hurford et al. 1997; Classon et al. 2000) und ist entscheidend für die Regulation des Zellzyklus durch die Retinoblastom-Proteine.

VI.3. Veränderte Expression der Retinoblastom-Proteine im seneszenten Arrest

In bisherigen Arbeiten sind im Zusammenhang mit einem seneszenten Wachstumsarrest meistens die Funktionen des Retinoblastom-Proteins pRb/p105 untersucht worden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen besagen, dass ein funktionelles pRb/p105 für einen Arrest in der G1 Phase unbedingt notwendig ist (Haupt et al. 1995; Dannenberg et al. 2000; Sage et al. 2000; Psyrrri et al. 2004). Im Vergleich dazu ist wenig über die Aufgaben von p107 und Rb2/p130 im Zellzyklus-Arrest bekannt. Das Retinoblastom-Protein Rb2/p130 wurde bisher hauptsächlich in Verbindung mit der Aufrechterhaltung des ruhenden Zustands (G₀) von Zellen gebracht, p107 scheint Aufgaben in der S und G₂ Phase zu haben (Kiess et al. 1995).

Umso interessanter ist das Expressionsmuster der Retinoblastom-Proteine in seneszenten C6D10-5 Zellen. Die Expression des für einen Arrest als essentiell postulierten pRb/p105 wird vollständig unterdrückt. Gleichzeitig akkumuliert Rb2/p130 in der p53-vermittelten Seneszenz von C6D10-5 Zellen stark in der hypophosphorylierten Form. Da auch p107 in den arretierten C6D10-5 Zellen auf nicht mehr detektierbare Mengen reduziert wird, ist Rb2/p130 das einzige im Arrest exprimierte Retinoblastom-Protein.

Normalerweise werden die Funktionen von pRb/p105 nicht über die Proteinmenge, sondern hauptsächlich über den Phosphorylierungsstatus des Proteins bestimmt (Buchkovich et al. 1989; Mihara et al. 1989). pRb/p105 zeigt in ruhenden Zellen eine moderate Expression, die beim Durchlaufen des Zellzyklus annähernd konstant bleibt (Abbildung 43). Der Phosphorylierungsstatus von pRb/p105 ändert sich im Laufe des Zellzyklus jedoch drastisch. pRb/p105 liegt in ruhenden Zellen in seiner hypophosphorylierten Form vor, in der es durch Bindung von E2F Transkriptionsfaktoren als Zellzyklusinhibitor aktiv ist (Chen et al. 1989). In der G₁ Phase wird pRb/p105 sequenziell durch verschiedene Zyklin-abhängige Kinasen hyperphosphoryliert und dadurch inaktiviert (Buchkovich et al. 1989; Chen et al. 1989; Mihara et al. 1989). Zyklin D-cdk4/6 Komplexe sind für die Phosphorylierung von pRb/p105 in der frühen G₁ Phase verantwortlich, wohingegen Zyklin E-cdk2 Komplexe das Protein in der mittleren bis späten G₁ Phase phosphorylieren. Die Phosphorylierung von pRb/p105 wird in der S Phase durch Zyklin A-cdk2 Komplexe fortgesetzt (DeCaprio et al. 1992; Hinds et al. 1992; Dowdy et al. 1993; Lundberg and Weinberg

1998), bis pRb/p105 in der M Phase durch die Proteinphosphatase 1 dephosphoryliert wird (Durfee et al. 1993; Ludlow et al. 1993).

Als Folge der Inhibierung von Zyklin E-cdk2 Komplexen durch p21^{CIP1} und p27^{KIP1} ist in arretierten C6D10-5 Zellen zunächst weniger stark phosphoryliertes pRb/p105 vorhanden, dessen Expression jedoch kurz nach Arrestinduktion auf nicht mehr zu detektierende Mengen reduziert wird. Die Repression der pRb/p105 Expression während eines Wachstumsarrests ist absolut untypisch.

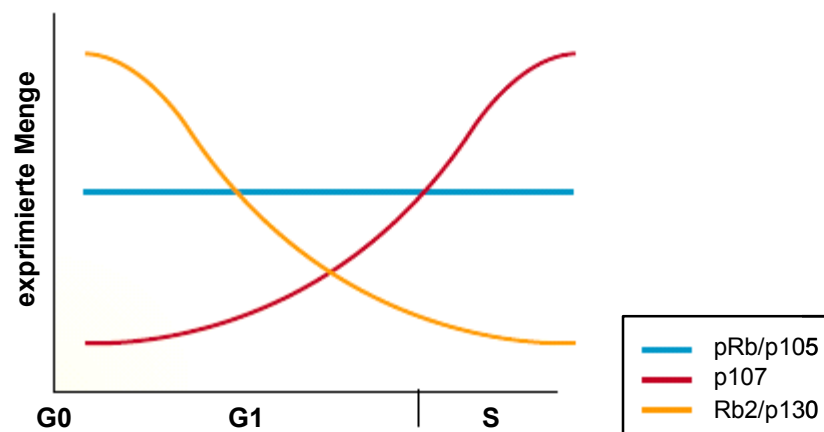


Abbildung 43: Die Retinoblastom-Proteine werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Zellzyklus exprimiert. pRb/p105 wird während des gesamten Zellzyklus in konstanter Weise exprimiert (blaue Linie), während Rb2/p130 in ruhenden Zellen stark und in zyklisierenden Zellen kaum exprimiert wird (gelbe Linie). p107 Proteinmengen zeigen ein Maximum in der S Phase und sind in ruhenden Zellen praktisch nicht vertreten (rote Linie) (Classon and Harlow 2002).

Im Gegensatz zu pRb/p105 ändern sich die Proteinmengen von p107 beim Durchlaufen des Zellzyklus sehr stark (Abbildung 43) und werden dabei auf transkriptioneller Ebene geregelt (Smith et al. 1998). In ruhenden Zellen sind nur geringe Mengen p107 vorhanden, die stark ansteigen, wenn die Zellen in den Zellzyklus eintreten (Kiess et al. 1995). p107 wird in der mittleren bis späten G1 Phase durch Zyklin E-cdk2 und in der S Phase durch Zyklin A-cdk2 Komplexe phosphoryliert (Beijersbergen et al. 1995; Xiao et al. 1996). Die Abnahme der Proteinmengen von p107 in arretierten C6D10-5 Zellen kann eventuell durch die relativ spät im Zellzyklus einsetzende transkriptionelle Aktivierung dieses Proteins erklärt werden (siehe Abbildung 43). Die C6D10-5 Zellen müssten dann zu einem Zeitpunkt

arretieren, an dem dieses Protein unter normalen Zellzyklusbedingungen noch nicht exprimiert wird.

Rb2/p130 Proteinmengen verhalten sich umgekehrt proportional zu den p107 Mengen und werden auf posttranslationaler Ebene geregelt (Smith et al. 1998). Das Protein liegt in ruhenden Zellen in großen Mengen vor (Kiess et al. 1995; Smith et al. 1996) und ist bereits in G₀ durch die Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3) an Stellen phosphoryliert, die einzigartig für Rb2/p130 sind (Canhoto et al. 2000; Litovchick et al. 2004). Diese Phosphorylierung führt zu einer erhöhten Proteinstabilität, beeinflusst aber nicht die Interaktion von Rb2/p130 mit E2F Transkriptionsfaktoren. Wie auch pRb/p105 wird es in der frühen G₁ Phase durch Zyklin D-cdk4/6 Komplexe und im G₁/S Übergang durch Zyklin E-cdk2 beziehungsweise Zyklin A-cdk2 Komplexe phosphoryliert. Mit dem Eintreten der Zellen in die S Phase sinken die Rb2/p130 Proteinmengen rapide (Baldi et al. 1995; Mayol et al. 1995; Claudio et al. 1996; Dong et al. 1998) (Abbildung 43). Hyperphosphoryliertes Rb2/p130 assoziiert mit der SCF(Skp2) Ubiquitin-Ligase, wird ubiquitiniert und anschließend proteasomal degradiert. Diese Degradierung findet am Übergang der späten G₁ Phase in die S Phase statt (Tedesco et al. 2002). Folglich ist Rb2/p130 in proliferierenden Zellen nur in sehr geringen Mengen vorhanden, und die Kontrolle über den Zellzyklus wird den Retinoblastom-Proteinen pRb/p105 und p107 überlassen. Da in den arretierten C6D10-5 Zellen die Zyklin E-cdk2 Kinase Aktivität durch p21^{CIP1} und p27^{KIP1} blockiert ist, wird Rb2/p130 nicht mehr vollständig phosphoryliert. Die hypophosphorylierte Form von Rb2/p130 kann nicht mehr degradiert werden und akkumuliert dadurch in den seneszenten C6D10-5 Zellen. Rb2/p130 erhält als einziges Retinoblastom-Protein, welches in arretierten C6D10-5 Zellen exprimiert wird, eine zentrale Funktion in der Aufrechterhaltung des seneszenten Wachstumsarrests.

Obwohl die Expression von Rb2/p130 als charakteristisch für die G₀ Phase gilt und seine Funktionen meistens im Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung des G₀ Status von ruhenden oder differenzierten Zellen beschrieben wurden, gibt es Hinweise auf eine wesentliche Funktion von Rb2/p130 in der Kontrolle des G₁/S Übergangs. Die Überexpression von Rb2/p130 in verschiedenen Zelllinien (Saos-2, C33A, T98G) konnte diese in der G₁ Phase des Zellzyklus arretieren, wohingegen in zwei dieser Zelllinien die Überexpression von pRb/p105 keine Auswirkung auf das Zellwachstum hatte (Hinds et al. 1992; Zhu et al. 1993; Claudio et al. 1994; Lacy and Whyte 1997).

Akkumulierendes, hypophosphoryliertes Rb2/p130 bindet im Komplex mit E2F-4 an E2F-abhängige Promotoren, und ist in der Lage, weitere Chromatin-verändernde Proteine zu rekrutieren, wodurch eine effiziente Inhibierung verschiedener Promotoren erreicht wird (Smith et al. 1996; Ferreira et al. 1998; Stiegler et al. 1998; Iavarone and Massague 1999; Bouzahzah et al. 2000; Takahashi et al. 2000; Rayman et al. 2002; Macaluso et al. 2003; Liu et al. 2005). Die Bildung von Rb2/p130-E2F-4 Repressor-Komplexen am Promotor des Transkriptionsfaktors *E2F-1* (Takahashi et al. 2000) ist wahrscheinlich ein essentieller Schritt in der Aufrechterhaltung des Arrests von C6D10-5 Zellen. Die negative Regulation dieses Promotors wurde ebenfalls als entscheidend für die Aufrechterhaltung des Zustands ruhender Zellen beschrieben (Smith et al. 1996). Durch die transkriptionelle Blockierung der E2F-1 Expression können Rb2/p130-E2F-4 Komplexe die Expression verschiedener, E2F 1-abhängiger Gene reprimieren, die für das Durchlaufen des Zellzyklus benötigt werden (Hsiao et al. 1994; Johnson et al. 1994; Neuman et al. 1994; Smith et al. 1996; Takahashi et al. 2000; Araki et al. 2003). Es existieren Daten, die für eine E2F-1-abhängige Regulation des *pRb/p105* und des *p107* Promotors sprechen (Shan et al. 1994; Takahashi et al. 2000), so dass mit der Bindung von Rb2/p130-E2F-4 Komplexen an den *E2F-1* Promotor auch die Reduktion der pRb/p105 und p107 Proteinmengen im seneszenten Arrest der C6D10-5 Zellen erklärt werden kann. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass p53 selbst über eine p53 Bindungsstelle den *pRb/p105* Promotor blockiert, und damit direkt zur Reduktion dieses Retinoblastom-Proteins beiträgt (Shiio et al. 1992; Osifchin et al. 1994).

VI.4. Deregulierte Expression von Zyklin E durch Abwesenheit von pRb/p105

Der p53-vermittelte Arrest von C6D10-5 Zellen ist durch die Expression von Rb2/p130 und die Repression von p107 und pRb/p105 charakterisiert. Parallel dazu akkumulieren die seneszenten C6D10-5 Zellen Zyklin E, wohingegen die Expression von Zyklin A im Arrest unterdrückt wird. Der Arrestpunkt in der späten G1 Phase ist somit durch den Übergang von Zyklin E zu Zyklin A-vermittelten Schritten exakt definiert. Die Expression der beiden Zykline E und A wird durch die Interaktion von Retinoblastom-Proteinen mit E2F Transkriptionsfaktoren reguliert.

Für die negative Regulation der Zyklin E Expression wird das Retinoblastom-Protein pRb/p105 benötigt. Über E2F-1, -2 oder -3 Transkriptionsfaktoren, die an E2F Bindungsstellen mit dem *Zyklin E* Promotor interagieren, bindet hypophosphoryliertes pRb/p105 an diesen Promotor und inhibiert die Transkriptionsfaktoren in ihrer Aktivität. Durch pRb/p105 werden dann HDAC, die Histon-Methyltransferase Suv39H1 und HP1 an den *Zyklin E* Promotor rekrutiert und sorgen im Komplex für eine stabile Repression der Zyklin E Expression. Wahrscheinlich ist auch der hBRM/BRG1 Nucleosom *Remodeling* Komplex zusammen mit pRb/p105 und HDAC an der Repression des *Zyklin E* Promotors beteiligt (Abbildung 44) (Harbour et al. 1999; Zhang et al. 2000). pRb/p105 ist aufgrund seiner spezifischen Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren E2F-1/-2/-3 für die Bildung des Repressor-Komplexes absolut notwendig und kann in dieser Funktion durch keines der beiden anderen Retinoblastom-Proteine ersetzt werden (Cobrinik 2005). In Zellen, die aufgrund einer homozygoten Mutation kein pRb/p105 exprimieren, sind die Zyklin E Proteinmengen dereguliert und erreichen bereits in der frühen G1 Phase ein Maximum (Herrera et al. 1996; Lee et al. 2002).

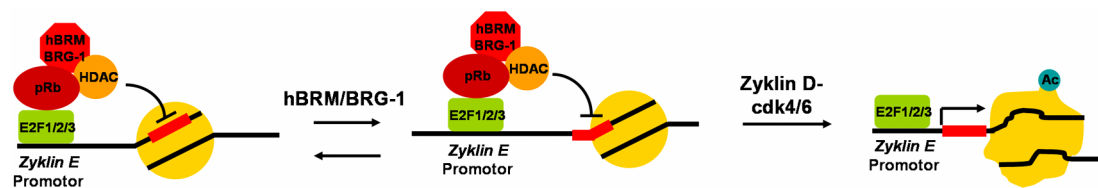


Abbildung 44: Die Regulation des *Zyklin E* Promotors durch pRb/p105. pRb/p105 bindet mit Hilfe von E2F-1/2/3 an den *Zyklin E* Promotor und rekrutiert dann die Chromatinstrukturverändernden Proteine HDAC und hBRM/BRG1. Außerdem können auch die Histon-Methyltransferase Suv39H1 und HP1 an den Komplex gebunden werden (hier nicht dargestellt). Durch den Repressor-Komplex befindet sich das *Zyklin E* Gen (rote Box) in einem Chromatinbereich, der der Transkriptionsmaschinerie nicht zugänglich ist. Durch die Funktionen der Nucleosom *Remodeling* Komplexe hBRM/BRG1 und der Inaktivierung des pRb/p105-HDAC Komplex durch Zyklin D-cdk4/6-vermittelte Phosphorylierung wird die Chromatinstruktur soweit verändert, dass die Transkription des *Zyklin E* Gens möglich wird.

Die Repression des *Zyklin E* Promotors ist in seneszenten C6D10-5 Zellen aufgehoben, da das Retinoblastom-Protein pRb/p105 auf ein nicht mehr zu detektierendes Niveau reduziert wird. Dadurch akkumuliert Zyklin E in den betreffenden Zellen. Die Anwesenheit von großen Mengen Zyklin E weist darauf hin, dass die

Zellen den G1 Restriktionspunkt (Pardee 1989) bereits überschritten haben und erst am Übergang der G1 in die S Phase arretieren.

VI.5. Induktion zellulärer Seneszenz durch Rb2/p130-vermittelte Repression des *Zyklin A* Promotors

Aufgrund der unterdrückten Expression von pRb/p105 ist die negative Regulation des G1/S Übergangs durch pRb/p105 in seneszenten C6D10-5 Zellen ausgeschlossen. Im seneszenten Arrest der C6D10-5 Zellen erreicht indes die Expression von Rb2/p130 ein Maximum. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass dieses Retinoblastom-Protein eine zentrale Funktion im seneszenten Arrest besitzt.

Der kritische Punkt in der Aufrechterhaltung des seneszenten Arrests von C6D10-5 Zellen ist die Repression der *Zyklin A* Expression durch Rb2/p130. Die Inaktivierung von Rb2/p130 durch das adenovirale Protein E1A-12S beziehungsweise die Reduktion von Rb2/p130 Proteinmengen durch Rb2 siRNA induziert die Expression von endogenem *Zyklin A* und führt zu S Phase-Aktivität in den arretierten Zellen. Die negative Regulation der *Zyklin A* Expression erfolgt auf transkriptioneller Ebene durch direkte Bindung von Rb2/p130 an den *Zyklin A* Promotor. Folglich ist Rb2/p130 der zentrale Faktor, der den Übergang der Zellen aus der G1 in die S Phase durch spezifische Inhibierung der *Zyklin A* Expression blockiert. Dieser Zusammenhang wird durch die Tatsache unterstützt, dass die Expression von ektope *Zyklin A* in seneszenten C6D10-5 Zellen ausreicht, um S Phase-Aktivität zu induzieren.

Die Regulation des *Zyklin A* Promotors durch Rb2/p130 ist wahrscheinlich ein genereller Mechanismus in der Induktion zellulärer Seneszenz, da eine Bindung von Rb2/p130 an den *Zyklin A* Promotor bereits in anderen Systemen beobachtet wurde (Stiegler et al. 1998; Takahashi et al. 2000; Narita et al. 2003). Jedoch wurde sie in keinen kausalen Zusammenhang mit der Induktion und Aufrechterhaltung eines seneszenten Wachstumsarrests gebracht. Bisher wurde die Repression des *Zyklin A* Promotors auf die Funktionen von pRb/p105 zurückgeführt. Durch die Bindung von pRb/p105 an den *Zyklin A* Promotor kann ein Repressor-Komplex mit Histon-Methyltransferasen gebildet werden, der dafür sorgt, dass H3K9 methyliert wird und anschließend HP1 bindet (Narita et al. 2003). Die pRb/p105-abhängige

Inhibierung des *Zyklin A* Promotors ist außerdem abhängig von der Rekrutierung der hBRM/BRG1 Nukleosom *Remodeling* Komplexe, wohingegen die Aktivität von HDAC für die Repression des *Zyklin A* Promotors entbehrlich zu sein scheint (Strobeck et al. 2000; Zhang et al. 2000; Coisy et al. 2004). Die Bindung der Nukleosom *Remodeling* Komplexe verändert die Chromatinstruktur des *Zyklin A* Promotors nachhaltig (Dunaief et al. 1994; Philips et al. 1998; Strobeck et al. 2000; Zhang et al. 2000; Dahiya et al. 2001; Siddiqui et al. 2003; Coisy et al. 2004) und ist wahrscheinlich grundlegend für die Induktion zellulärer Seneszenz. Die Expression von ektopem hBRM oder BRG1 in Zelllinien, die diese Proteine endogen nicht exprimieren, reicht aus, um einen Zellzyklusarrest zu induzieren, in welchem die arretierten Zellen Merkmale zellulärer Seneszenz zeigen (Dunaief et al. 1994; Strober et al. 1996; Zhang et al. 2000). Durch die Expression eines adenoviralen E1A-Konstrukts, welches die Retinoblastom-Proteine inaktiviert, wird dieser Phänotyp aufgehoben (Dunaief et al. 1994; Strober et al. 1996).

Neben pRb/p105 ist auch Rb2/p130 in der Lage, an den *Zyklin A* Promoter zu binden. Rb2/p130 kann Repressor-Komplexe bilden, die den durch pRb/p105 initiierten Komplexen ähnlich sind. Rb2/p130 rekrutiert im Komplex mit E2F-4 ebenfalls Histon-Methyltransferasen wie Suv39H1 (Ghosh and Harter 2003; Macaluso et al. 2003; Nicolas et al. 2003; Liu et al. 2005) und auch Nukleosom *Remodeling* Komplexe wie hBRM/BRG1 (Strober et al. 1996), die für eine effiziente Repression des *Zyklin A* Promotors notwendig sind. Daher können auch Rb2/p130-vermittelte Repressor-Komplexe für die nachhaltige Veränderung der Chromatinstruktur und die dauerhaften Blockierung des *Zyklin A* Promotors in der Seneszenz verantwortlich sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen im Gegensatz zu Schlussfolgerungen anderer Autoren, die eine ausschließlich von pRb/p105-abhängige Regulation des *Zyklin A* Promotors in der zellulären Seneszenz postulieren (Narita et al. 2003). Ihrer Beobachtung nach tritt die Bindung von pRb/p105 an den *Zyklin A* Promotor spezifisch in seneszenten und nicht in ruhenden IMR90 Zellen auf, wohingegen die Bindung von Rb2/p130 in ruhenden wie in seneszenten IMR90 Zellen gleich stark ist. Allerdings ist im Vergleich zu pRb/p105 eine sehr viel größere Menge Rb2/p130 an den *Zyklin A* Promotor gebunden. Durch die Transfektion eines E1A-Expressionsvektors wird in den seneszenten IMR90 Zellen die Expression von Zyklin A und der Einbau von BrdU in die DNA ermöglicht. Dieser Ansatz differenziert jedoch

nicht zwischen den Funktionen von pRb/p105 und Rb2/p130, da beide Proteine mit dem *Zyklin A* Promotor interagieren und durch E1A gebunden und inaktiviert werden. Eine siRNA gegen pRb/p105 konnte die Re-Expression von Zyklin A nur sehr schwach induzieren, wohingegen eine siRNA gegen p16^{INK4A}, in diesem Fall der Induktor der zellulären Seneszenz, die Re-Expression von Zyklin A deutlich unterstützte (Narita et al. 2003). Dies spricht für eine Beteiligung weiterer Faktoren an der Repression des *Zyklin A* Promotors. Ob eine Inaktivierung von Rb2/p130 durch spezifische siRNA einen Effekt auf die Zyklin A Expression hat, wurde nicht untersucht.

Die Daten der Arbeit von Narita et al., 2003 lassen die Interpretation zu, dass Rb2/p130 und nicht pRb/p105 die zentrale Rolle in der Induktion zellulärer Seneszenz einnimmt. Da eine Bindung von Rb2/p130 an den *Zyklin A* Promotor in ruhenden wie in seneszenten IMR90 Zellen vorhanden ist, kann sie allein nicht den Unterschied vom transienten zum permanenten Wachstumsarrest ausmachen. Jedoch können sekundäre Ereignisse, die nicht von dem Mengenunterschied des gebundenen Retinoblastom-Proteins abhängig sind, für die Irreversibilität verantwortlich sein. So kann zum Beispiel die Art der rekrutierten Histon-Methyltransferase und damit verbunden der Methylierungsgrad der Histone für die Reversibilität des Arrests entscheidend sein.

Aus den vorhandenen Daten lässt sich ableiten, dass Rb2/p130 im seneszenten Arrest eine Schlüsselrolle übernimmt. Die starken Repressorfunktionen im Komplex mit dem E2F-4 Transkriptionsfaktor und Chromatin *Remodeling* Proteinen prädestinieren Rb2/p130 für diese Aufgabe.

VI.6. Irreversibilität des Arrests durch p53-unabhängige Apoptose

Die Expression von Wildtyp p53 in C6D10-5 Glioblastom-Zellen arretiert diese im G1/S Übergang und induziert zelluläre Seneszenz. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Reaktivierung des Seneszenzprogramms ein Ansatz sein kann, die Proliferation von Krebszellen zu blockieren und damit die Remission eines Tumors einzuleiten. Besonders für die Therapie Apoptose-resistenter Tumore ist die Induktion zellulärer Seneszenz von großer Bedeutung. Allerdings werden die Tumorzellen in der zellulären Seneszenz im Gegensatz zur Apoptose nicht endgültig eliminiert. Daher muss sichergestellt werden, dass die Zellen den seneszenten Arrest nicht

spontan verlassen und erneut proliferieren können. Aus diesem Grund ist es wichtig, die Faktoren zu bestimmen, die den seneszenten Arrests irreversibel machen. Daten anderer Autoren zeigen, dass p16^{INK4A}, nicht aber p53 einen irreversiblen, seneszenten Arrest induzieren kann. Die Inaktivierung von p53 in seneszenten Zellen führte zur erneuten Proliferation der Zellen (Beausejour et al. 2003). Die hier vorliegende Arbeit zeigt, dass auch nach Inaktivierung des Arrestinduktors p53 keine erneute Proliferation der Zellen möglich ist. Die seneszenten Zellen können nach p53 Inaktivierung zwar in die S Phase eintreten, eine Proliferation wird aber durch Apoptose verhindert.

Welche Faktoren dabei im Einzelnen zur Apoptose führen, ist noch nicht bekannt. Möglicherweise werden die in der DNA in sehr großer Zahl auftretenden freien 3' OH Enden, die während des Arrests akkumulieren, beim Wiedereintritt in den Zellzyklus als DNA Schäden erkannt. Da die seneszenten C6D10-5 Zellen an einem Punkt arretieren, an dem sie die initiale Phase der DNA-Replikation bereits erreicht haben, ist die Akkumulation von freien 3' OH Enden eventuell auf Modifikationen an den Replikations-Startpunkten zurückzuführen. In dem Arrest am Übergang der G1 in die S Phase ist eine Aktivität der DNA-Polymerase α -Primase möglich. Diese synthetisiert RNA-DNA Primer an den Replikations-Startpunkten, deren freie 3' OH Enden möglicherweise den positiven TUNEL Test erklären können. Die DNA-Polymerase α -Primase kann erst durch Zyklin A-cdk2 Aktivität wieder inaktiviert werden (Voitenleitner et al. 1997; Dehde et al. 2001). Um diese These zu bestätigen, muss mit spezifischen Antikörpern gegen die hypophosphorylierte, aktive Form der DNA-Polymerase α -Primase (Dehde et al. 2001) überprüft werden, ob eine Bindung an die Replikations-Startpunkte in seneszenten Zellen vorliegt.

Außerdem ist zu beobachten, dass C6D10-5 Zellen, die für längere Zeit arretiert wurden, beim Übergang in die Proliferation deutliche Probleme bei der Zytokinese zeigen. Es treten Zellen mit extranukleären DNA-enthaltenden Vesikeln, Verlust von DNA Partikeln und asymmetrischer Kernteilung auf. Solche Zellen, die schwerwiegende Störungen in ihrem Chromosomensatz aufweisen, sind wahrscheinlich nicht mehr in der Lage, weiter zu proliferieren und gehen durch eine mitotische Katastrophe zugrunde. In Analogie zu den hier vorliegenden Ergebnissen wurde an humanen Fibrosarkom-Zellen, die aus einem p21^{CIP1}-induzierten seneszenten Arrest entlassen wurden, ebenfalls zunächst ein Eintritt in die S Phase beobachtet. Im weiteren Verlauf zeigten die Zellen aber ein verlangsamtes Wachstum, eine abnorme

Mitose, Endoreduplikation und Zelltod. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der durch p21^{CIP1} inhibierten Expression verschiedener Proteine, die für die Kontrolle und Durchführung der Mitose benötigt werden. Nach Inaktivierung von p21^{CIP1} werden diese Proteine asynchron neu synthetisiert und sind daher in der Mitose nicht ausreichend vorhanden (Chang et al. 2000). Eventuell sind auch E2F Faktoren, die in Abwesenheit von pRb/p105 dereguliert sind, für die Expression und Akkumulation von Proteinen, die zu einer fehlerhaften Mitose führen können, verantwortlich (Almasan et al. 1995; Hernando et al. 2004).

Die apoptotischen Ereignisse in den seneszenten Zellen nach Inaktivierung des Arrest-induzierenden Faktors p53 stellen einen essentiellen Sicherungsmechanismus dar, der für einen therapeutischen Ansatz von großer Relevanz ist. Ohne diesen Schutz könnten die arretierten Tumorzellen auch nach langem Arrest erneut proliferieren.

VI.7. Kooperation von p53 und Rb2/p130 zur Kontrolle des G1/S Übergangs bei defektem p16^{INK4A}-pRb/p105 Signalweg

In dieser Arbeit wurden Signalwege aufgeklärt, die von p53 in der Induktion zellulärer Seneszenz genutzt werden. Dabei erweist sich die Kooperation von p53 mit Rb2/p130 für die Induktion zellulärer Seneszenz von grundlegender Bedeutung. Nur durch die Rb2/p130-vermittelte Repression des *Zyklin A* Promotors können die Zellen dauerhaft im Zustand zellulärer Seneszenz arretieren.

Dieser durch Rb2/p130-vermittelte Zellzyklusarrest in der späten G1 Phase kann von genereller Bedeutung für *INK4A* negative Tumorzellen sein. p16^{INK4A}-positive Zellen können bereits in der frühen G1 Phase arretieren, da p16^{INK4A} die Zyklin D-cdk4/6 Aktivität unterdrückt. Durch die Inhibierung der Zyklin D-cdk4/6 Kinase-Aktivität werden Zielproteine nicht mehr phosphoryliert. Unter anderem kann durch die fehlende Kinase-Aktivität kein Zyklin E exprimiert werden, da die partielle Phosphorylierung von pRb/p105 durch Zyklin D-cdk4/6, die für die Aktivierung des *Zyklin E* Promotors notwendig ist, nicht mehr erfolgt. Durch die daraus folgende Abwesenheit von Zyklin E-cdk2 Komplexen haben die CDK-Inhibitoren p21^{CIP1} und p27^{KIP1} in diesem Arrest keine Bedeutung. p16^{INK4A}-positive Zellen zeigen somit im

G1 Arrest ein anderes Proteinexpressionsmuster und einen anderen Phosphorylierungsstatus Zellzyklus-regulatorischer Proteine als p16^{INK4A} negative Zellen.

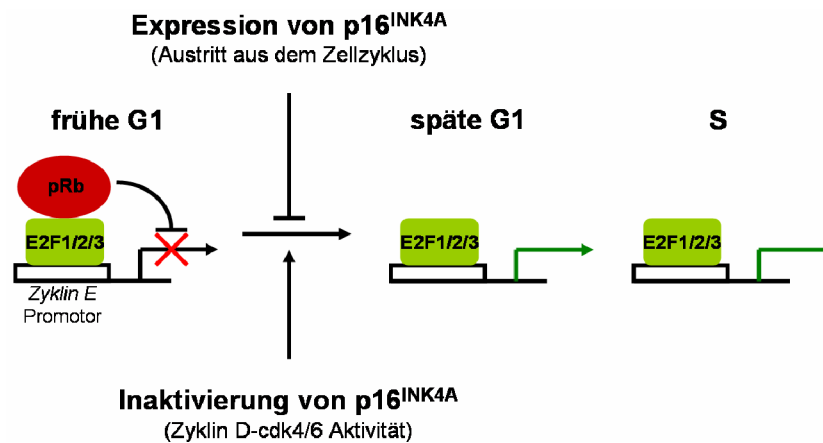


Abbildung 45: Zellzyklus-Arrest durch die Funktionen von pRb/p105. In der frühen G1 Phase bildet pRb/p105 Repressor-Komplexe mit E2F-1/2/3 Transkriptionsfaktoren am *Zyklin E* Promotor und unterdrückt dessen Transkription. Ein Fortschreiten in den G1/S Übergang ist unmöglich. Nach Inaktivierung von p16^{INK4A} werden Zyklin D-cdk4/6 Komplexe reaktiviert und die Transkription von *Zyklin E* ermöglicht. Der Zellzyklusblock ist aufgehoben.

In p16^{INK4A} negativen Zellen hingegen kann die Zyklin D-cdk4/6 Aktivität nach onkogenem Stress nicht unterbunden werden. Die durch Stress-Signale aktivierten Cip/Kip CDK-Inhibitoren sind nicht in der Lage, die Zyklin D-cdk4/6 Kinase-Aktivität zu blockieren, wodurch pRb/p105 partiell phosphoryliert werden kann. Durch die Phosphorylierung von pRb/p105 wird die Transkription bestimmter Gene ermöglicht, zu denen auch *Zyklin E* gehört. Die Kinase-Aktivität sich bildender Zyklin E-cdk2 Komplexe wird durch die CDK-Inhibitoren p21^{CIP1} und p27^{KIP1} effizient blockiert. Dies hat unter anderem zur Folge, dass Rb2/p130 aufgrund fehlender Phosphorylierung nicht mehr degradiert wird und in seiner hypophosphorylierten Form am Übergang der G1 in die S Phase akkumuliert. Rb2/p130 kann nun an verschiedenen Promotoren Repressor-Komplexe bilden, die einen Übergang der G1 in die S Phase verhindern. Dabei ist die Repression des *Zyklin A* Promotors durch Rb2/p130 für die Aufrechterhaltung des G1/S Arrests von *INK4A* negativen Zellen von essentieller Bedeutung.

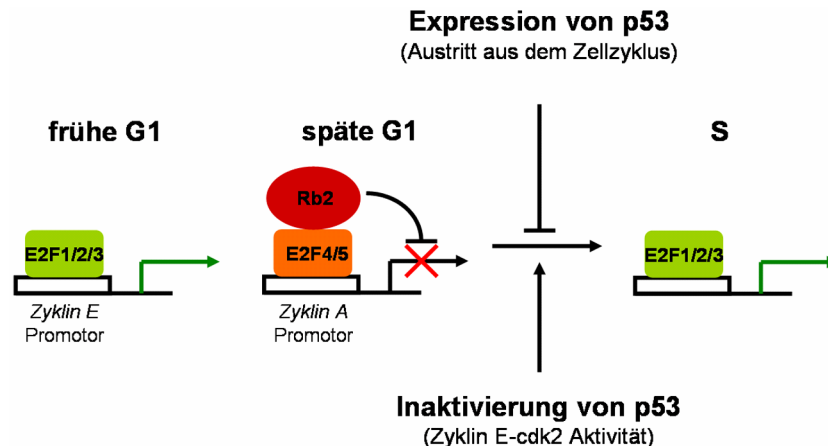


Abbildung 46: Zellzyklus-Arrest durch die Funktionen von Rb2/p130. In der späten G1 Phase, wenn Zyklin E bereits exprimiert wird und im Komplex mit cdk2 aktiv ist, sorgen die p53-induzierte Expression von p21^{CIP1} und die Akkumulation von p27^{KIP1} für eine Inhibition der Zyklin E-cdk2 Aktivität. Rb2/p130 akkumuliert, bildet Repressor-Komplexe mit E2F-4 beziehungsweise E2F-5 Transkriptionsfaktoren am *Zyklin A* Promotor und unterdrückt die Transkription von Zyklin A. Nach Inaktivierung von p53 wird Zyklin E-cdk2 wieder aktiv, phosphoryliert Rb2/p130 und löst die Komplexe aus Rb2/p130 und E2F-4 beziehungsweise -5 auf. Anschließend binden Aktivator-E2Fs an die Zellzyklus-regulierten Promotoren und aktivieren die Transkription.

Der durch Rb2/p130 induzierte Arrest stellt somit einen Sicherungsmechanismus für alle Zellen dar, die nach onkogenen Signalen eine unvollständige Inhibition von Zyklin D-cdk4/6 Aktivität und/oder einen Verlust der Expression des Retinoblastom-Proteins pRb/p105 aufweisen. So geschädigte Zellen können nicht am G1 Restriktionspunkt arretieren. Die Repressorfunktion von Rb2/p130 am *Zyklin A* Promotor schützt diese Zellen vor dem Eintreten in die S Phase. Ein Verlust der Expression von Rb2/p130 schaltet diesen Sicherungsmechanismus aus und kann die Progression eines Tumors begünstigen.

In prämaligen Tumorstadien wurde eine starke Expression von Rb2/p130 beobachtet, wohingegen eine geringe Proteinexpression von Rb2/p130 mit einer hohen Malignität der Tumore korreliert (Baldi et al. 1997; Susini et al. 2001; Li et al. 2004). Daten, die durch Tumormodelle der Maus sowie in humanen Melanomen gewonnen wurden, geben eine starke Evidenz dafür, dass zelluläre Seneszenz spezifisch in prämaligen Stadien der Tumorentwicklung auftritt (Braig et al. 2005; Chen et al. 2005). Diese Korrelation spricht für eine Beteiligung von Rb2/p130 in der Induktion zellulärer Seneszenz *in vivo*.

Man könnte vermuten, dass die geringen Mengen von Rb2/p130, die in stark proliferierenden Tumoren beobachtet wurden, lediglich eine Folge von Zyklin-cdk Aktivität in proliferierenden Zellen und der damit verbundenen Destabilisierung von Rb2/p130 sind (Tedesco et al. 2002). Es gibt aber Hinweise darauf, dass Rb2/p130 Mengen in Tumoren nicht durch die Destabilisierung des Proteins, sondern durch eine Repression der Transkription reduziert werden (Milde-Langosch et al. 2001; D'Andrilli et al. 2004). In Retinoblastomen und in Lungenkarzinomen wurde ein epigenetisches *Silencing* des *Rb2/p130* Promotors durch Promotor-Methylierung beobachtet. Methylierungen und/oder Mutationen im *Rb2/p130* Gen können die Funktionen von Rb2/p130 in der negativen Regulation des Zellzyklus beeinträchtigen und dadurch zur molekularen Pathogenese der Tumore beitragen (Helin et al. 1997; La Sala et al. 2003; Macaluso et al. 2003; Cinti et al. 2005; Tosi et al. 2005). Das bedeutet, dass geringe Rb2/p130 Mengen nicht als eine Folge der starken Proliferation von Tumorzellen zu sehen sind, sondern eine Ursache für Tumorentstehung beziehungsweise Tumorprogression darstellen.

Die Aufklärung des p53-Rb2/p130 Signalwegs ist für therapeutische Ansätze von großer Bedeutung. Viele Tumore, die Wildtyp p53 exprimieren, sind Apoptose-resistent und reagieren auf Chemotherapeutika und γ -Bestrahlung mit einem Wachstumsarrest und zellulärer Seneszenz (Chang et al. 1999; Han et al. 2002; Jones et al. 2005; Zupanska et al. 2005; Jackson and Pereira-Smith 2006). Um Tumore mit Wildtyp p53 erfolgreich behandeln zu können, ist der Status von Rb2/p130 entscheidend, da erst durch Funktionen von Rb2/p130 ein dauerhafter Arrest möglich wird. In Apoptose-resistenten Tumoren kann somit durch die Kooperation von p53 mit Rb2/p130 ein stabiler, seneszenten Arrest induziert werden, der das Tumorwachstum unterdrückt und damit eine Alternative zur Apoptose darstellt.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, P.D. 2001. Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. *Biochim Biophys Acta* **1471**(3): M123-133.
- Agarwal, M.L., Agarwal, A., Taylor, W.R., and Stark, G.R. 1995. p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(18): 8493-8497.
- Aktas, H., Cai, H., and Cooper, G.M. 1997. Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol Cell Biol* **17**(7): 3850-3857.
- Almasan, A., Yin, Y., Kelly, R.E., Lee, E.Y., Bradley, A., Li, W., Bertino, J.R., and Wahl, G.M. 1995. Deficiency of retinoblastoma protein leads to inappropriate S-phase entry, activation of E2F-responsive genes, and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(12): 5436-5440.
- Alt, J.R., Cleveland, J.L., Hannink, M., and Diehl, J.A. 2000. Phosphorylation-dependent regulation of cyclin D1 nuclear export and cyclin D1-dependent cellular transformation. *Genes Dev* **14**(24): 3102-3114.
- Alt, J.R., Gladden, A.B., and Diehl, J.A. 2002. p21(Cip1) Promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export. *J Biol Chem* **277**(10): 8517-8523.
- Araki, K., Nakajima, Y., Eto, K., and Ikeda, M.A. 2003. Distinct recruitment of E2F family members to specific E2F-binding sites mediates activation and repression of the E2F1 promoter. *Oncogene* **22**(48): 7632-7641.
- Baldi, A., Boccia, V., Claudio, P.P., De Luca, A., and Giordano, A. 1996. Genomic structure of the human retinoblastoma-related Rb2/p130 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(10): 4629-4632.
- Baldi, A., De Luca, A., Claudio, P.P., Baldi, F., Giordano, G.G., Tommasino, M., Paggi, M.G., and Giordano, A. 1995. The RB2/p130 gene product is a nuclear protein whose phosphorylation is cell cycle regulated. *J Cell Biochem* **59**(3): 402-408.
- Baldi, A., Esposito, V., De Luca, A., Fu, Y., Meoli, I., Giordano, G.G., Caputi, M., Baldi, F., and Giordano, A. 1997. Differential expression of Rb2/p130 and p107 in normal human tissues and in primary lung cancer. *Clin Cancer Res* **3**(10): 1691-1697.
- Bartek, J. and Lukas, J. 2001. Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett* **490**(3): 117-122.
- Bashir, T., Horlein, R., Rommelaere, J., and Willwand, K. 2000. Cyclin A activates the DNA polymerase delta -dependent elongation machinery in vitro: A parvovirus DNA replication model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10): 5522-5527.

- Bates, S., Phillips, A.C., Clark, P.A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R.L., and Vousden, K.H. 1998a. p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* **395**(6698): 124-125.
- Bates, S., Ryan, K.M., Phillips, A.C., and Vousden, K.H. 1998b. Cell cycle arrest and DNA endoreduplication following p21Waf1/Cip1 expression. *Oncogene* **17**(13): 1691-1703.
- Beausejour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P., and Campisi, J. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo J* **22**(16): 4212-4222.
- Beijersbergen, R.L., Carlee, L., Kerkhoven, R.M., and Bernards, R. 1995. Regulation of the retinoblastoma protein-related p107 by G1 cyclin complexes. *Genes Dev* **9**(11): 1340-1353.
- Bell, S.P. and Dutta, A. 2002. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* **71**: 333-374.
- Ben-Porath, I. and Weinberg, R.A. 2004. When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest* **113**(1): 8-13.
- Blain, S.W., Montalvo, E., and Massague, J. 1997. Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27Kip1 with cyclin A-Cdk2 and cyclin D2-Cdk4. *J Biol Chem* **272**(41): 25863-25872.
- Blomberg, I. and Hoffmann, I. 1999. Ectopic expression of Cdc25A accelerates the G(1)/S transition and leads to premature activation of cyclin E- and cyclin A-dependent kinases. *Mol Cell Biol* **19**(9): 6183-6194.
- Bouzahzah, B., Fu, M., Iavarone, A., Factor, V.M., Thorgeirsson, S.S., and Pestell, R.G. 2000. Transforming growth factor-beta1 recruits histone deacetylase 1 to a p130 repressor complex in transgenic mice in vivo. *Cancer Res* **60**(16): 4531-4537.
- Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A.H., Schlegelberger, B., Stein, H., Dorken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C.A. 2005. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **436**(7051): 660-665.
- Brockmann, D. and Esche, H. 1995. Regulation of viral and cellular gene expression by E1A proteins encoded by the oncogenic adenovirus type 12. *Curr Top Microbiol Immunol* **199** (Pt 3): 81-112.
- Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J.I., Beach, D., Jacks, T., and Hannon, G.J. 1995. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* **377**(6549): 552-557.
- Buchkovich, K., Duffy, L.A., and Harlow, E. 1989. The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell* **58**(6): 1097-1105.
- Bullock, A.N. and Fersht, A.R. 2001. Rescuing the function of mutant p53. *Nat Rev Cancer* **1**(1): 68-76.

- Campisi, J. 2000. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo* **14**(1): 183-188.
- Canhoto, A.J., Chestukhin, A., Litovchick, L., and DeCaprio, J.A. 2000. Phosphorylation of the retinoblastoma-related protein p130 in growth-arrested cells. *Oncogene* **19**(44): 5116-5122.
- Carr, A.M. 2000. Cell cycle. Piecing together the p53 puzzle. *Science* **287**(5459): 1765-1766.
- Castro, M.E., del Valle Guijarro, M., Moneo, V., and Carnero, A. 2004. Cellular senescence induced by p53-ras cooperation is independent of p21waf1 in murine embryo fibroblasts. *J Cell Biochem* **92**(3): 514-524.
- Chang, B.D., Broude, E.V., Fang, J., Kalinichenko, T.V., Abdryashitov, R., Poole, J.C., and Roninson, I.B. 2000. p21Waf1/Cip1/Sdi1-induced growth arrest is associated with depletion of mitosis-control proteins and leads to abnormal mitosis and endoreduplication in recovering cells. *Oncogene* **19**(17): 2165-2170.
- Chang, B.D., Xuan, Y., Broude, E.V., Zhu, H., Schott, B., Fang, J., and Roninson, I.B. 1999. Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene* **18**(34): 4808-4818.
- Chen, J., Jackson, P.K., Kirschner, M.W., and Dutta, A. 1995. Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature* **374**(6520): 386-388.
- Chen, J., Saha, P., Kornbluth, S., Dynlacht, B.D., and Dutta, A. 1996. Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21CIP1. *Mol Cell Biol* **16**(9): 4673-4682.
- Chen, P.L., Scully, P., Shew, J.Y., Wang, J.Y., and Lee, W.H. 1989. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* **58**(6): 1193-1198.
- Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P.P. 2005. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **436**(7051): 725-730.
- Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J.A., Fero, M., Roussel, M.F., Roberts, J.M., and Sherr, C.J. 1999. The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *Embo J* **18**(6): 1571-1583.
- Cheng, M., Sxsl, V., Sherr, C.J., and Roussel, M.F. 1998. Assembly of cyclin D-dependent kinase and titration of p27Kip1 regulated by mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(3): 1091-1096.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**(1): 156-159.

- Cinti, C., Macaluso, M., and Giordano, A. 2005. Tumor-specific exon 1 mutations could be the 'hit event' predisposing Rb2/p130 gene to epigenetic silencing in lung cancer. *Oncogene* **24**(38): 5821-5826.
- Classon, M. and Harlow, E. 2002. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer* **2**(12): 910-917.
- Classon, M., Salama, S., Gorka, C., Mulloy, R., Braun, P., and Harlow, E. 2000. Combinatorial roles for pRB, p107, and p130 in E2F-mediated cell cycle control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(20): 10820-10825.
- Claudio, P.P., De Luca, A., Howard, C.M., Baldi, A., Firpo, E.J., Koff, A., Paggi, M.G., and Giordano, A. 1996. Functional analysis of pRb2/p130 interaction with cyclins. *Cancer Res* **56**(9): 2003-2008.
- Claudio, P.P., Howard, C.M., Baldi, A., De Luca, A., Fu, Y., Condorelli, G., Sun, Y., Colburn, N., Calabretta, B., and Giordano, A. 1994. p130/pRb2 has growth suppressive properties similar to yet distinctive from those of retinoblastoma family members pRb and p107. *Cancer Res* **54**(21): 5556-5560.
- Clurman, B.E., Sheaff, R.J., Thress, K., Groudine, M., and Roberts, J.M. 1996. Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by cdk2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev* **10**(16): 1979-1990.
- Cobrinik, D. 2005. Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene* **24**(17): 2796-2809.
- Coisy, M., Roure, V., Ribot, M., Philips, A., Muchardt, C., Blanchard, J.M., and Dantoni, J.C. 2004. Cyclin A repression in quiescent cells is associated with chromatin remodeling of its promoter and requires Brahma/SNF2alpha. *Mol Cell* **15**(1): 43-56.
- Coleman, T.R., Carpenter, P.B., and Dunphy, W.G. 1996. The Xenopus Cdc6 protein is essential for the initiation of a single round of DNA replication in cell-free extracts. *Cell* **87**(1): 53-63.
- Collas, P. 1999. Sequential PKC- and Cdc2-mediated phosphorylation events elicit zebrafish nuclear envelope disassembly. *J Cell Sci* **112** (Pt 6): 977-987.
- Cox, L.S. and Lane, D.P. 1995. Tumour suppressors, kinases and clamps: how p53 regulates the cell cycle in response to DNA damage. *Bioessays* **17**(6): 501-508.
- D'Andrilli, G., Masciullo, V., Bagella, L., Tonini, T., Minimo, C., Zannoni, G.F., Giuntoli, R.L., 2nd, Carlson, J.A., Jr., Soprano, D.R., Soprano, K.J., Scambia, G., and Giordano, A. 2004. Frequent loss of pRb2/p130 in human ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* **10**(9): 3098-3103.
- Dahiya, A., Wong, S., Gonzalo, S., Gavin, M., and Dean, D.C. 2001. Linking the Rb and polycomb pathways. *Mol Cell* **8**(3): 557-569.
- Dannenbergh, J.H., van Rossum, A., Schuijff, L., and te Riele, H. 2000. Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing

- immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions. *Genes Dev* **14**(23): 3051-3064.
- de Stanchina, E., McCurrach, M.E., Zindy, F., Shieh, S.Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A.V., Prives, C., Roussel, M.F., Sherr, C.J., and Lowe, S.W. 1998. E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* **12**(15): 2434-2442.
- DeCaprio, J.A., Furukawa, Y., Ajchenbaum, F., Griffin, J.D., and Livingston, D.M. 1992. The retinoblastoma-susceptibility gene product becomes phosphorylated in multiple stages during cell cycle entry and progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(5): 1795-1798.
- Dehde, S., Rohaly, G., Schub, O., Nasheuer, H.P., Bohn, W., Chemnitz, J., Deppert, W., and Dornreiter, I. 2001. Two immunologically distinct human DNA polymerase alpha-primase subpopulations are involved in cellular DNA replication. *Mol Cell Biol* **21**(7): 2581-2593.
- Dhar, S.K., Yoshida, K., Machida, Y., Khaira, P., Chaudhuri, B., Wohlschlegel, J.A., Leffak, M., Yates, J., and Dutta, A. 2001. Replication from oriP of Epstein-Barr virus requires human ORC and is inhibited by geminin. *Cell* **106**(3): 287-296.
- Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. 1998. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* **12**(22): 3499-3511.
- Dimova, D.K. and Dyson, N.J. 2005. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* **24**(17): 2810-2826.
- Dimri, G.P., Itahana, K., Acosta, M., and Campisi, J. 2000. Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. *Mol Cell Biol* **20**(1): 273-285.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., and et al. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(20): 9363-9367.
- Dong, F., Cress, W.D., Jr., Agrawal, D., and Pledger, W.J. 1998. The role of cyclin D3-dependent kinase in the phosphorylation of p130 in mouse BALB/c 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem* **273**(11): 6190-6195.
- Dowdy, S.F., Hinds, P.W., Louie, K., Reed, S.I., Arnold, A., and Weinberg, R.A. 1993. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell* **73**(3): 499-511.
- Dunaief, J.L., Strober, B.E., Guha, S., Khavari, P.A., Alin, K., Luban, J., Begemann, M., Crabtree, G.R., and Goff, S.P. 1994. The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell* **79**(1): 119-130.

- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.L., Yeh, S.H., Yang, Y., Kilburn, A.E., Lee, W.H., and Elledge, S.J. 1993. The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* **7**(4): 555-569.
- Dyson, N. 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev* **12**(15): 2245-2262.
- Eastman, A. 2004. Cell cycle checkpoints and their impact on anticancer therapeutic strategies. *J Cell Biochem* **91**(2): 223-231.
- Ekholm, S.V. and Reed, S.I. 2000. Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* **12**(6): 676-684.
- el-Deiry, W.S. 1998. Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* **8**(5): 345-357.
- el-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. 1992. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* **1**(1): 45-49.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**(4): 817-825.
- Eliyahu, D., Michalovitz, D., and Oren, M. 1985. Overproduction of p53 antigen makes established cells highly tumorigenic. *Nature* **316**(6024): 158-160.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. 1983. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**(2): 389-396.
- Ezhevsky, S.A., Ho, A., Becker-Hapak, M., Davis, P.K., and Dowdy, S.F. 2001. Differential regulation of retinoblastoma tumor suppressor protein by G(1) cyclin-dependent kinase complexes in vivo. *Mol Cell Biol* **21**(14): 4773-4784.
- Facchinetti, A., Tessarollo, L., Mazzocchi, M., Kingston, R., Collavo, D., and Biasi, G. 1991. An improved method for the detection of DNA fragmentation. *J Immunol Methods* **136**(1): 125-131.
- Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., and Alnemri, E.S. 1994. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem* **269**(49): 30761-30764.
- Ferreira, R., Magnaghi-Jaulin, L., Robin, P., Harel-Bellan, A., and Trouche, D. 1998. The three members of the pocket proteins family share the ability to repress E2F activity through recruitment of a histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**(18): 10493-10498.
- Frisch, S.M. and Mymryk, J.S. 2002. Adenovirus-5 E1A: paradox and paradigm. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(6): 441-452.
- Gautier, J., Minshull, J., Lohka, M., Glotzer, M., Hunt, T., and Maller, J.L. 1990. Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* **60**(3): 487-494.

- Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S.A. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* **119**(3): 493-501.
- Ghosh, M.K. and Harter, M.L. 2003. A viral mechanism for remodeling chromatin structure in Go cells. *Mol Cell* **12**(1): 255-260.
- Giaccia, A.J. and Kastan, M.B. 1998. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* **12**(19): 2973-2983.
- Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S.E., Scheffner, M., and Del Sal, G. 1999. Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo J* **18**(22): 6462-6471.
- Gu, W. and Roeder, R.G. 1997. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**(4): 595-606.
- Guan, K.L., Jenkins, C.W., Li, Y., Nichols, M.A., Wu, X., O'Keefe, C.L., Matera, A.G., and Xiong, Y. 1994. Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function. *Genes Dev* **8**(24): 2939-2952.
- Guan, K.L., Jenkins, C.W., Li, Y., O'Keefe, C.L., Noh, S., Wu, X., Zariwala, M., Matera, A.G., and Xiong, Y. 1996. Isolation and characterization of p19INK4d, a p16-related inhibitor specific to CDK6 and CDK4. *Mol Biol Cell* **7**(1): 57-70.
- Hahn, W.C. and Weinberg, R.A. 2002. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* **2**(5): 331-341.
- Hall, M., Bates, S., and Peters, G. 1995. Evidence for different modes of action of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15 and p16 bind to kinases, p21 and p27 bind to cyclins. *Oncogene* **11**(8): 1581-1588.
- Han, Z., Wei, W., Dunaway, S., Darnowski, J.W., Calabresi, P., Sedivy, J., Hendrickson, E.A., Balan, K.V., Pantazis, P., and Wyche, J.H. 2002. Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin. *J Biol Chem* **277**(19): 17154-17160.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1): 57-70.
- Harbour, J.W. and Dean, D.C. 2000. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* **14**(19): 2393-2409.
- Harbour, J.W., Luo, R.X., Dei Santi, A., Postigo, A.A., and Dean, D.C. 1999. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* **98**(6): 859-869.
- Harley, C.B., Futcher, A.B., and Greider, C.W. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**(6274): 458-460.

- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**(4): 805-816.
- Haupt, Y., Rowan, S., and Oren, M. 1995. p53-mediated apoptosis in HeLa cells can be overcome by excess pRB. *Oncogene* **10**(8): 1563-1571.
- Hayflick, L. 1965. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* **37**: 614-636.
- Hayflick, L. and Moorhead, P.S. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**: 585-621.
- Heck, D.V., Yee, C.L., Howley, P.M., and Munger, K. 1992. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(10): 4442-4446.
- Helin, K., Holm, K., Niebuhr, A., Eiberg, H., Tommerup, N., Hougaard, S., Poulsen, H.S., Spang-Thomsen, M., and Norgaard, P. 1997. Loss of the retinoblastoma protein-related p130 protein in small cell lung carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(13): 6933-6938.
- Hengst, L. and Reed, S.I. 1996. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* **271**(5257): 1861-1864.
- Hernando, E., Nahle, Z., Juan, G., Diaz-Rodriguez, E., Alaminos, M., Hemann, M., Michel, L., Mittal, V., Gerald, W., Benezra, R., Lowe, S.W., and Cordon-Cardo, C. 2004. Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature* **430**(7001): 797-802.
- Herrera, R.E., Sah, V.P., Williams, B.O., Makela, T.P., Weinberg, R.A., and Jacks, T. 1996. Altered cell cycle kinetics, gene expression, and G1 restriction point regulation in Rb-deficient fibroblasts. *Mol Cell Biol* **16**(5): 2402-2407.
- Hinchcliffe, E.H. and Sluder, G. 2002. Two for two: Cdk2 and its role in centrosome doubling. *Oncogene* **21**(40): 6154-6160.
- Hinds, P.W., Mittnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Reed, S.I., and Weinberg, R.A. 1992. Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell* **70**(6): 993-1006.
- Honda, R. and Yasuda, H. 1999. Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *Embo J* **18**(1): 22-27.
- Hong, F.D., Huang, H.J., To, H., Young, L.J., Oro, A., Bookstein, R., Lee, E.Y., and Lee, W.H. 1989. Structure of the human retinoblastoma gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(14): 5502-5506.
- Hsiao, K.M., McMahon, S.L., and Farnham, P.J. 1994. Multiple DNA elements are required for the growth regulation of the mouse E2F1 promoter. *Genes Dev* **8**(13): 1526-1537.

- Huang, S., Shin, E., Sheppard, K.A., Chokroverty, L., Shan, B., Qian, Y.W., Lee, E.Y., and Yee, A.S. 1992. The retinoblastoma protein region required for interaction with the E2F transcription factor includes the T/E1A binding and carboxy-terminal sequences. *DNA Cell Biol* **11**(7): 539-548.
- Hurford, R.K., Jr., Cobrinik, D., Lee, M.H., and Dyson, N. 1997. pRB and p107/p130 are required for the regulated expression of different sets of E2F responsive genes. *Genes Dev* **11**(11): 1447-1463.
- Iavarone, A. and Massague, J. 1999. E2F and histone deacetylase mediate transforming growth factor beta repression of cdc25A during keratinocyte cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* **19**(1): 916-922.
- Ichimura, K., Hanafusa, H., Takimoto, H., Ohgama, Y., Akagi, T., and Shimizu, K. 2000. Structure of the human retinoblastoma-related p107 gene and its intragenic deletion in a B-cell lymphoma cell line. *Gene* **251**(1): 37-43.
- Jackson, J.G. and Pereira-Smith, O.M. 2006. Primary and compensatory roles for RB family members at cell cycle gene promoters that are deacetylated and downregulated in doxorubicin-induced senescence of breast cancer cells. *Mol Cell Biol* **26**(7): 2501-2510.
- Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K., and Reimann, J.D. 2000. The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* **10**(10): 429-439.
- Jayaraman, L. and Prives, C. 1999. Covalent and noncovalent modifiers of the p53 protein. *Cell Mol Life Sci* **55**(1): 76-87.
- Jiang, W., Wells, N.J., and Hunter, T. 1999. Multistep regulation of DNA replication by Cdk phosphorylation of HsCdc6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(11): 6193-6198.
- Johnson, D.G., Ohtani, K., and Nevins, J.R. 1994. Autoregulatory control of E2F1 expression in response to positive and negative regulators of cell cycle progression. *Genes Dev* **8**(13): 1514-1525.
- Johnson, D.G. and Walker, C.L. 1999. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 295-312.
- Jones, K.R., Elmore, L.W., Jackson-Cook, C., Demasters, G., Povirk, L.F., Holt, S.E., and Gewirtz, D.A. 2005. p53-Dependent accelerated senescence induced by ionizing radiation in breast tumour cells. *Int J Radiat Biol* **81**(6): 445-458.
- Juven-Gershon, T. and Oren, M. 1999. Mdm2: the ups and downs. *Mol Med* **5**(2): 71-83.
- Kamijo, T., Weber, J.D., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. 1998. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(14): 8292-8297.
- Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M.F., Quelle, D.E., Downing, J.R., Ashmun, R.A., Grosveld, G., and Sherr, C.J. 1997. Tumor suppression at the mouse INK4a

- locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* **91**(5): 649-659.
- Kastan, M.B. and Bartek, J. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**(7015): 316-323.
- Kelly, T.J. and Brown, G.W. 2000. Regulation of chromosome replication. *Annu Rev Biochem* **69**: 829-880.
- Kiess, M., Gill, R.M., and Hamel, P.A. 1995. Expression and activity of the retinoblastoma protein (pRB)-family proteins, p107 and p130, during L6 myoblast differentiation. *Cell Growth Differ* **6**(10): 1287-1298.
- 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**(26): 3423-3434.
- Knippschild, U., Oren, M., and Deppert, W. 1996. Abrogation of wild-type p53 mediated growth-inhibition by nuclear exclusion. *Oncogene* **12**(8): 1755-1765.
- Knudson, A.G., Jr. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**(4): 820-823.
- Knudson, A.G., Jr., Strong, L.C., and Anderson, D.E. 1973. Heredity and cancer in man. *Prog Med Genet* **9**: 113-158.
- Koepp, D.M., Schaefer, L.K., Ye, X., Keyomarsi, K., Chu, C., Harper, J.W., and Elledge, S.J. 2001. Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science* **294**(5540): 173-177.
- Kreitz, S., Ritzi, M., Baack, M., and Knippers, R. 2001. The human origin recognition complex protein 1 dissociates from chromatin during S phase in HeLa cells. *J Biol Chem* **276**(9): 6337-6342.
- Krimpenfort, P., Quon, K.C., Mooi, W.J., Loonstra, A., and Berns, A. 2001. Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* **413**(6851): 83-86.
- La Sala, D., Macaluso, M., Trimarchi, C., Giordano, A., and Cinti, C. 2003. Triggering of p73-dependent apoptosis in osteosarcoma is under the control of E2Fs-pRb2/p130 complexes. *Oncogene* **22**(23): 3518-3529.
- LaBaer, J., Garrett, M.D., Stevenson, L.F., Slingerland, J.M., Sandhu, C., Chou, H.S., Fattaey, A., and Harlow, E. 1997. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* **11**(7): 847-862.
- Lacy, S. and Whyte, P. 1997. Identification of a p130 domain mediating interactions with cyclin A/cdk 2 and cyclin E/cdk 2 complexes. *Oncogene* **14**(20): 2395-2406.
- Lane, D.P. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**(6381): 15-16.

- Lee, E.Y., Cam, H., Ziebold, U., Rayman, J.B., Lees, J.A., and Dynlacht, B.D. 2002. E2F4 loss suppresses tumorigenesis in Rb mutant mice. *Cancer Cell* **2**(6): 463-472.
- Lee, W.H., Bookstein, R., Hong, F., Young, L.J., Shew, J.Y., and Lee, E.Y. 1987. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science* **235**(4794): 1394-1399.
- Levine, A.J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**(3): 323-331.
- Li, Q., Sakurai, Y., Ryu, T., Azuma, K., Yoshimura, K., Yamanouchi, Y., Ikehara, S., and Kawamoto, K. 2004. Expression of Rb2/p130 protein correlates with the degree of malignancy in gliomas. *Brain Tumor Pathol* **21**(3): 121-125.
- 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**(6497): 534-537.
- Lin, A.W., Barradas, M., Stone, J.C., van Aelst, L., Serrano, M., and Lowe, S.W. 1998. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* **12**(19): 3008-3019.
- Lin, J., Reichner, C., Wu, X., and Levine, A.J. 1996. Analysis of wild-type and mutant p21WAF-1 gene activities. *Mol Cell Biol* **16**(4): 1786-1793.
- Litovchick, L., Chestukhin, A., and DeCaprio, J.A. 2004. Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates RBL2/p130 during quiescence. *Mol Cell Biol* **24**(20): 8970-8980.
- Liu, D.X., Nath, N., Chellappan, S.P., and Greene, L.A. 2005. Regulation of neuron survival and death by p130 and associated chromatin modifiers. *Genes Dev* **19**(6): 719-732.
- Lowe, S.W. 1999. Activation of p53 by oncogenes. *Endocr Relat Cancer* **6**(1): 45-48.
- Ludlow, J.W., Glendening, C.L., Livingston, D.M., and DeCarprio, J.A. 1993. Specific enzymatic dephosphorylation of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* **13**(1): 367-372.
- Lukas, J., Parry, D., Aagaard, L., Mann, D.J., Bartkova, J., Strauss, M., Peters, G., and Bartek, J. 1995. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature* **375**(6531): 503-506.
- Lundberg, A.S. and Weinberg, R.A. 1998. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* **18**(2): 753-761.
- Macaluso, M., Cinti, C., Russo, G., Russo, A., and Giordano, A. 2003. pRb2/p130-E2F4/5-HDAC1-SUV39H1-p300 and pRb2/p130-E2F4/5-HDAC1-SUV39H1-DNMT1 multimolecular complexes mediate the transcription of estrogen receptor-alpha in breast cancer. *Oncogene* **22**(23): 3511-3517.

- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R.G., Welcker, M., Bartek, J., and Lukas, J. 2000. Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* **288**(5470): 1425-1429.
- Maiorano, D., Lemaitre, J.M., and Mechali, M. 2000a. Stepwise regulated chromatin assembly of MCM2-7 proteins. *J Biol Chem* **275**(12): 8426-8431.
- Maiorano, D., Moreau, J., and Mechali, M. 2000b. XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*. *Nature* **404**(6778): 622-625.
- Malcomson, R.D., Oren, M., Wyllie, A.H., and Harrison, D.J. 1995. p53-independent death and p53-induced protection against apoptosis in fibroblasts treated with chemotherapeutic drugs. *Br J Cancer* **72**(4): 952-957.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. 2001. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* **1**(3): 222-231.
- Malumbres, M. and Pellicer, A. 1998. RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci* **3**: d887-912.
- Marshall, C. 1999. How do small GTPase signal transduction pathways regulate cell cycle entry? *Curr Opin Cell Biol* **11**(6): 732-736.
- Martinez, J., Georgoff, I., Martinez, J., and Levine, A.J. 1991. Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature-sensitive p53 protein. *Genes Dev* **5**(2): 151-159.
- Masui, Y. and Markert, C.L. 1971. Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* **177**(2): 129-145.
- Mayol, X., Garriga, J., and Grana, X. 1995. Cell cycle-dependent phosphorylation of the retinoblastoma-related protein p130. *Oncogene* **11**(4): 801-808.
- Mayol, X., Grana, X., Baldi, A., Sang, N., Hu, Q., and Giordano, A. 1993. Cloning of a new member of the retinoblastoma gene family (pRb2) which binds to the E1A transforming domain. *Oncogene* **8**(9): 2561-2566.
- McConnell, B.B., Gregory, F.J., Stott, F.J., Hara, E., and Peters, G. 1999. Induced expression of p16(INK4a) inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassembly of cyclin-CDK-inhibitor complexes. *Mol Cell Biol* **19**(3): 1981-1989.
- Meraldi, P., Lukas, J., Fry, A.M., Bartek, J., and Nigg, E.A. 1999. Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A. *Nat Cell Biol* **1**(2): 88-93.
- 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**(4): 671-680.
- Mihara, K., Cao, X.R., Yen, A., Chandler, S., Driscoll, B., Murphree, A.L., T'Ang, A., and Fung, Y.K. 1989. Cell cycle-dependent regulation of phosphorylation of the human retinoblastoma gene product. *Science* **246**(4935): 1300-1303.

- Milde-Langosch, K., Goemann, C., Methner, C., Rieck, G., Bamberger, A.M., and Loning, T. 2001. Expression of Rb2/p130 in breast and endometrial cancer: correlations with hormone receptor status. *Br J Cancer* **85**(4): 546-551.
- Milner, J. and Medcalf, E.A. 1990. Temperature-dependent switching between "wild-type" and "mutant" forms of p53-Val135. *J Mol Biol* **216**(3): 481-484.
- 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**(7): 1237-1245.
- Montagnoli, A., Fiore, F., Eytan, E., Carrano, A.C., Draetta, G.F., Hershko, A., and Pagano, M. 1999. Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation. *Genes Dev* **13**(9): 1181-1189.
- Morgan, D.O. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 261-291.
- Morris, E.J. and Dyson, N.J. 2001. Retinoblastoma protein partners. *Adv Cancer Res* **82**: 1-54.
- Muller, D., Bouchard, C., Rudolph, B., Steiner, P., Stuckmann, I., Saffrich, R., Ansorge, W., Huttner, W., and Eilers, M. 1997. Cdk2-dependent phosphorylation of p27 facilitates its Myc-induced release from cyclin E/cdk2 complexes. *Oncogene* **15**(21): 2561-2576.
- Murray, A.W. 2004. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* **116**(2): 221-234.
- Nakanishi, M., Robetorye, R.S., Adami, G.R., Pereira-Smith, O.M., and Smith, J.R. 1995. Identification of the active region of the DNA synthesis inhibitory gene p21Sdi1/CIP1/WAF1. *Embo J* **14**(3): 555-563.
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**(6): 703-716.
- Nasmyth, K. 1999. Separating sister chromatids. *Trends Biochem Sci* **24**(3): 98-104.
- Natale, D.A., Li, C.J., Sun, W.H., and DePamphilis, M.L. 2000. Selective instability of Orc1 protein accounts for the absence of functional origin recognition complexes during the M-G(1) transition in mammals. *Embo J* **19**(11): 2728-2738.
- Neuman, E., Flemington, E.K., Sellers, W.R., and Kaelin, W.G., Jr. 1994. Transcription of the E2F-1 gene is rendered cell cycle dependent by E2F DNA-binding sites within its promoter. *Mol Cell Biol* **14**(10): 6607-6615.
- Nevins, J.R. 2001. The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet* **10**(7): 699-703.

- Nguyen, H., Gitig, D.M., and Koff, A. 1999. Cell-free degradation of p27(kip1), a G1 cyclin-dependent kinase inhibitor, is dependent on CDK2 activity and the proteasome. *Mol Cell Biol* **19**(2): 1190-1201.
- Nicholson, D.W., Ali, A., Thornberry, N.A., Vaillancourt, J.P., Ding, C.K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P.R., Labelle, M., Lazebnik, Y.A., and et al. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**(6535): 37-43.
- Nicolas, E., Roumillac, C., and Trouche, D. 2003. Balance between acetylation and methylation of histone H3 lysine 9 on the E2F-responsive dihydrofolate reductase promoter. *Mol Cell Biol* **23**(5): 1614-1622.
- Nigg, E.A. 1995. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* **17**(6): 471-480.
- . 1996. Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Curr Opin Cell Biol* **8**(3): 312-317.
- Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T., and Nurse, P. 2000. The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature* **404**(6778): 625-628.
- Nurse, P. 1997. Checkpoint pathways come of age. *Cell* **91**(7): 865-867.
- Olivier, M., Eeles, R., Hollstein, M., Khan, M.A., Harris, C.C., and Hainaut, P. 2002. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* **19**(6): 607-614.
- Oren, M., Maltzman, W., and Levine, A.J. 1981. Post-translational regulation of the 54K cellular tumor antigen in normal and transformed cells. *Mol Cell Biol* **1**(2): 101-110.
- Orlando, V., Strutt, H., and Paro, R. 1997. Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods* **11**(2): 205-214.
- Osifchin, N.E., Jiang, D., Ohtani-Fujita, N., Fujita, T., Carroza, M., Kim, S.J., Sakai, T., and Robbins, P.D. 1994. Identification of a p53 binding site in the human retinoblastoma susceptibility gene promoter. *J Biol Chem* **269**(9): 6383-6389.
- Paggi, M.G. and Giordano, A. 2001. Who is the boss in the retinoblastoma family? The point of view of Rb2/p130, the little brother. *Cancer Res* **61**(12): 4651-4654.
- Pardee, A.B. 1989. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* **246**(4930): 603-608.
- Parry, D., Bates, S., Mann, D.J., and Peters, G. 1995. Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product. *Embo J* **14**(3): 503-511.

- Peter, M., Nakagawa, J., Doree, M., Labbe, J.C., and Nigg, E.A. 1990. In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* **61**(4): 591-602.
- Peters, J.M. 2002. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell* **9**(5): 931-943.
- Petersen, B.O., Lukas, J., Sorensen, C.S., Bartek, J., and Helin, K. 1999. Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *Embo J* **18**(2): 396-410.
- Petersen, B.O., Wagener, C., Marinoni, F., Kramer, E.R., Melixetian, M., Lazzarini Denchi, E., Gieffers, C., Matteucci, C., Peters, J.M., and Helin, K. 2000. Cell cycle- and cell growth-regulated proteolysis of mammalian CDC6 is dependent on APC-CDH1. *Genes Dev* **14**(18): 2330-2343.
- Philips, A., Huet, X., Plet, A., Le Cam, L., Vie, A., and Blanchard, J.M. 1998. The retinoblastoma protein is essential for cyclin A repression in quiescent cells. *Oncogene* **16**(11): 1373-1381.
- Pines, J. 1999. Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat Cell Biol* **1**(3): E73-79.
- Pines, J. and Hunter, T. 1990. Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature* **346**(6286): 760-763.
- Piqueras, B., Autran, B., Debre, P., and Gorochov, G. 1996. Detection of apoptosis at the single-cell level by direct incorporation of fluorescein-dUTP in DNA strand breaks. *Biotechniques* **20**(4): 634-640.
- Polyak, K., Lee, M.H., Erdjument-Bromage, H., Koff, A., Roberts, J.M., Tempst, P., and Massague, J. 1994. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* **78**(1): 59-66.
- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.W., Cordon-Cardo, C., and DePinho, R.A. 1998. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* **92**(6): 713-723.
- Prives, C. and Hall, P.A. 1999. The p53 pathway. *J Pathol* **187**(1): 112-126.
- Psyrris, A., DeFilippis, R.A., Edwards, A.P., Yates, K.E., Manuelidis, L., and DiMaio, D. 2004. Role of the retinoblastoma pathway in senescence triggered by repression of the human papillomavirus E7 protein in cervical carcinoma cells. *Cancer Res* **64**(9): 3079-3086.
- Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A., and Sherr, C.J. 1995. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* **83**(6): 993-1000.
- Ramqvist, T., Magnusson, K.P., Wang, Y., Szekely, L., Klein, G., and Wiman, K.G. 1993. Wild-type p53 induces apoptosis in a Burkitt lymphoma (BL) line that carries mutant p53. *Oncogene* **8**(6): 1495-1500.

- Rayman, J.B., Takahashi, Y., Indjeian, V.B., Dannenberg, J.H., Catchpole, S., Watson, R.J., te Riele, H., and Dynlacht, B.D. 2002. E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev* **16**(8): 933-947.
- Reich, N.C., Oren, M., and Levine, A.J. 1983. Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen, p53. *Mol Cell Biol* **3**(12): 2143-2150.
- Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, A., and Massague, J. 1995. Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev* **9**(15): 1831-1845.
- Robles, S.J. and Adami, G.R. 1998. Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* **16**(9): 1113-1123.
- Rodriguez, M.S., Desterro, J.M., Lain, S., Midgley, C.A., Lane, D.P., and Hay, R.T. 1999. SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *Embo J* **18**(22): 6455-6461.
- 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**(2): 200-206.
- Rotman, G. and Shiloh, Y. 1999. ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress. *Oncogene* **18**(45): 6135-6144.
- Rudner, A.D. and Murray, A.W. 2000. Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *J Cell Biol* **149**(7): 1377-1390.
- Russo, A.A., Jeffrey, P.D., Patten, A.K., Massague, J., and Pavletich, N.P. 1996a. Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* **382**(6589): 325-331.
- Russo, A.A., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. 1996b. Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol* **3**(8): 696-700.
- Sage, J., Mulligan, G.J., Attardi, L.D., Miller, A., Chen, S., Williams, B., Theodorou, E., and Jacks, T. 2000. Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization. *Genes Dev* **14**(23): 3037-3050.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**(4839): 487-491.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-5467.
- Satyanarayana, A., Wiemann, S.U., Buer, J., Lauber, J., Dittmar, K.E., Wustefeld, T., Blasco, M.A., Manns, M.P., and Rudolph, K.L. 2003. Telomere shortening

- impairs organ regeneration by inhibiting cell cycle re-entry of a subpopulation of cells. *Embo J* **22**(15): 4003-4013.
- Schmitt, C.A., Fridman, J.S., Yang, M., Lee, S., Baranov, E., Hoffman, R.M., and Lowe, S.W. 2002. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* **109**(3): 335-346.
- Sears, L.E., Moran, L.S., Kissinger, C., Creasey, T., Perry-O'Keefe, H., Roskey, M., Sutherland, E., and Slatko, B.E. 1992. Circumvent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase. *Biotechniques* **13**(4): 626-633.
- Sellers, W.R. and Kaelin, W.G., Jr. 1997. Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* **15**(11): 3301-3312.
- Serrano, M., Gomez-Lahoz, E., DePinho, R.A., Beach, D., and Bar-Sagi, D. 1995. Inhibition of ras-induced proliferation and cellular transformation by p16INK4. *Science* **267**(5195): 249-252.
- Serrano, M., Lee, H., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D., and DePinho, R.A. 1996. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* **85**(1): 27-37.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**(5): 593-602.
- Shan, B., Chang, C.Y., Jones, D., and Lee, W.H. 1994. The transcription factor E2F-1 mediates the autoregulation of RB gene expression. *Mol Cell Biol* **14**(1): 299-309.
- Sharpless, N.E., Bardeesy, N., Lee, K.H., Carrasco, D., Castrillon, D.H., Aguirre, A.J., Wu, E.A., Horner, J.W., and DePinho, R.A. 2001. Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* **413**(6851): 86-91.
- Shaw, P., Freeman, J., Bovey, R., and Iggo, R. 1996. Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene* **12**(4): 921-930.
- Sheaff, R.J., Groudine, M., Gordon, M., Roberts, J.M., and Clurman, B.E. 1997. Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev* **11**(11): 1464-1478.
- Sherr, C.J. 1993. Mammalian G1 cyclins. *Cell* **73**(6): 1059-1065.
- Sherr, C.J. and McCormick, F. 2002. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* **2**(2): 103-112.
- Sherr, C.J. and Roberts, J.M. 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13**(12): 1501-1512.
- Sherr, C.J. and Weber, J.D. 2000. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* **10**(1): 94-99.

- Shiio, Y., Yamamoto, T., and Yamaguchi, N. 1992. Negative regulation of Rb expression by the p53 gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(12): 5206-5210.
- Shivji, M.K., Grey, S.J., Strausfeld, U.P., Wood, R.D., and Blow, J.J. 1994. Cip1 inhibits DNA replication but not PCNA-dependent nucleotide excision-repair. *Curr Biol* **4**(12): 1062-1068.
- Siddiqui, H., Solomon, D.A., Gunawardena, R.W., Wang, Y., and Knudsen, E.S. 2003. Histone deacetylation of RB-responsive promoters: requisite for specific gene repression but dispensable for cell cycle inhibition. *Mol Cell Biol* **23**(21): 7719-7731.
- Simbulan-Rosenthal, C.M., Rosenthal, D.S., Luo, R., and Smulson, M.E. 1999. Poly(ADP-ribosyl)ation of p53 during apoptosis in human osteosarcoma cells. *Cancer Res* **59**(9): 2190-2194.
- Sitte, N., Merker, K., Von Zglinicki, T., Grune, T., and Davies, K.J. 2000. Protein oxidation and degradation during cellular senescence of human BJ fibroblasts: part I--effects of proliferative senescence. *Faseb J* **14**(15): 2495-2502.
- Smith, E.J., Leone, G., DeGregori, J., Jakoi, L., and Nevins, J.R. 1996. The accumulation of an E2F-p130 transcriptional repressor distinguishes a G0 cell state from a G1 cell state. *Mol Cell Biol* **16**(12): 6965-6976.
- Smith, E.J., Leone, G., and Nevins, J.R. 1998. Distinct mechanisms control the accumulation of the Rb-related p107 and p130 proteins during cell growth. *Cell Growth Differ* **9**(4): 297-303.
- Smith, L.D. and Ecker, R.E. 1971. The interaction of steroids with Rana pipiens Oocytes in the induction of maturation. *Dev Biol* **25**(2): 232-247.
- 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**(1): 109-115.
- Stiegler, P., De Luca, A., Bagella, L., and Giordano, A. 1998. The COOH-terminal region of pRb2/p130 binds to histone deacetylase 1 (HDAC1), enhancing transcriptional repression of the E2F-dependent cyclin A promoter. *Cancer Res* **58**(22): 5049-5052.
- Strobeck, M.W., Knudsen, K.E., Fribourg, A.F., DeCristofaro, M.F., Weissman, B.E., Imbalzano, A.N., and Knudsen, E.S. 2000. BRG-1 is required for RB-mediated cell cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(14): 7748-7753.
- Strober, B.E., Dunaief, J.L., Guha, and Goff, S.P. 1996. Functional interactions between the hBRM/hBRG1 transcriptional activators and the pRB family of proteins. *Mol Cell Biol* **16**(4): 1576-1583.
- Susini, T., Massi, D., Paglierani, M., Masciullo, V., Scambia, G., Giordano, A., Amunni, G., Massi, G., and Taddei, G.L. 2001. Expression of the retinoblastoma-related gene Rb2/p130 is downregulated in atypical endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. *Hum Pathol* **32**(4): 360-367.

- Takahashi, Y., Rayman, J.B., and Dynlacht, B.D. 2000. Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev* **14**(7): 804-816.
- Tatsumi, Y., Tsurimoto, T., Shirahige, K., Yoshikawa, H., and Obuse, C. 2000. Association of human origin recognition complex 1 with chromatin DNA and nuclease-resistant nuclear structures. *J Biol Chem* **275**(8): 5904-5910.
- Tedesco, D., Lukas, J., and Reed, S.I. 2002. The pRb-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCF(Skp2). *Genes Dev* **16**(22): 2946-2957.
- Tosi, G.M., Trimarchi, C., Macaluso, M., La Sala, D., Ciccodicola, A., Lazzi, S., Massaro-Giordano, M., Caporossi, A., Giordano, A., and Cinti, C. 2005. Genetic and epigenetic alterations of RB2/p130 tumor suppressor gene in human sporadic retinoblastoma: implications for pathogenesis and therapeutic approach. *Oncogene* **24**(38): 5827-5836.
- Toyoshima, H. and Hunter, T. 1994. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* **78**(1): 67-74.
- Trimarchi, J.M. and Lees, J.A. 2002. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(1): 11-20.
- Uhlmann, F. 2001. Chromosome cohesion and segregation in mitosis and meiosis. *Curr Opin Cell Biol* **13**(6): 754-761.
- Vairo, G., Livingston, D.M., and Ginsberg, D. 1995. Functional interaction between E2F-4 and p130: evidence for distinct mechanisms underlying growth suppression by different retinoblastoma protein family members. *Genes Dev* **9**(7): 869-881.
- van den Heuvel, S. and Harlow, E. 1993. Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* **262**(5142): 2050-2054.
- Vaziri, H., West, M.D., Allsopp, R.C., Davison, T.S., Wu, Y.S., Arrowsmith, C.H., Poirier, G.G., and Benchimol, S. 1997. ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *Embo J* **16**(19): 6018-6033.
- Vlach, J., Hennecke, S., and Amati, B. 1997. Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Embo J* **16**(17): 5334-5344.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. 2000. Surfing the p53 network. *Nature* **408**(6810): 307-310.
- Voitenleitner, C., Fanning, E., and Nasheuer, H.P. 1997. Phosphorylation of DNA polymerase alpha-primase by cyclin A-dependent kinases regulates initiation of DNA replication in vitro. *Oncogene* **14**(13): 1611-1615.

- Wadgaonkar, R. and Collins, T. 1999. Murine double minute (MDM2) blocks p53-coactivator interaction, a new mechanism for inhibition of p53-dependent gene expression. *J Biol Chem* **274**(20): 13760-13767.
- 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**(6481): 574-578.
- Waldman, T., Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. 1996. Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature* **381**(6584): 713-716.
- Walter, J. and Newport, J. 2000. Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha. *Mol Cell* **5**(4): 617-627.
- Wang, Y., Ramqvist, T., Szekely, L., Axelson, H., Klein, G., and Wiman, K.G. 1993. Reconstitution of wild-type p53 expression triggers apoptosis in a p53-negative v-myc retrovirus-induced T-cell lymphoma line. *Cell Growth Differ* **4**(6): 467-473.
- Ward, G.E. and Kirschner, M.W. 1990. Identification of cell cycle-regulated phosphorylation sites on nuclear lamin C. *Cell* **61**(4): 561-577.
- Wei, S., Wei, S., and Sedivy, J.M. 1999. Expression of catalytically active telomerase does not prevent premature senescence caused by overexpression of oncogenic Ha-Ras in normal human fibroblasts. *Cancer Res* **59**(7): 1539-1543.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., and Graham, M.W. 1989. Quantitative evaluation of Escherichia coli host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**(9): 3469-3478.
- Wu, L., Timmers, C., Maiti, B., Saavedra, H.I., Sang, L., Chong, G.T., Nuckolls, F., Giangrande, P., Wright, F.A., Field, S.J., Greenberg, M.E., Orkin, S., Nevins, J.R., Robinson, M.L., and Leone, G. 2001. The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* **414**(6862): 457-462.
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D., and Levine, A.J. 1993. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* **7**(7A): 1126-1132.
- Xiao, Z.X., Ginsberg, D., Ewen, M., and Livingston, D.M. 1996. Regulation of the retinoblastoma protein-related protein p107 by G1 cyclin-associated kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(10): 4633-4637.
- Yeung, R.S., Bell, D.W., Testa, J.R., Mayol, X., Baldi, A., Grana, X., Klinga-Levan, K., Knudson, A.G., and Giordano, A. 1993. The retinoblastoma-related gene, RB2, maps to human chromosome 16q12 and rat chromosome 19. *Oncogene* **8**(12): 3465-3468.
- Yoshida, K., Higashino, F., and Fujinaga, K. 1995. Transcriptional regulation of the adenovirus E1A gene. *Curr Top Microbiol Immunol* **199** (Pt 3): 113-130.

- Zachariae, W. and Nasmyth, K. 1999. Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev* **13**(16): 2039-2058.
- Zhang, H., Hannon, G.J., and Beach, D. 1994. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev* **8**(15): 1750-1758.
- Zhang, H.S., Gavin, M., Dahiya, A., Postigo, A.A., Ma, D., Luo, R.X., Harbour, J.W., and Dean, D.C. 2000. Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell* **101**(1): 79-89.
- Zhang, Y. and Xiong, Y. 2001. Control of p53 ubiquitination and nuclear export by MDM2 and ARF. *Cell Growth Differ* **12**(4): 175-186.
- Zhou, B.B. and Elledge, S.J. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**(6811): 433-439.
- Zhou, X.Y., Wang, X., Hu, B., Guan, J., Iliakis, G., and Wang, Y. 2002. An ATM-independent S-phase checkpoint response involves CHK1 pathway. *Cancer Res* **62**(6): 1598-1603.
- Zhu, L., van den Heuvel, S., Helin, K., Fattaey, A., Ewen, M., Livingston, D., Dyson, N., and Harlow, E. 1993. Inhibition of cell proliferation by p107, a relative of the retinoblastoma protein. *Genes Dev* **7**(7A): 1111-1125.
- Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J., and Roussel, M.F. 1998. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* **12**(15): 2424-2433.
- Zou, L. and Stillman, B. 2000. Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase. *Mol Cell Biol* **20**(9): 3086-3096.
- Zupanska, A., Dziembowska, M., Ellert-Miklaszewska, A., Gaweda-Walerych, K., and Kaminska, B. 2005. Cyclosporine a induces growth arrest or programmed cell death of human glioma cells. *Neurochem Int* **47**(6): 430-441.

VIII. SICHERHEITSTECHNISCHE DATEN

VIII.1. Gefahrenstoffe

Die folgende Liste beinhaltet sämtliche Verbindungen und Lösungsmittel, mit denen während dieser Arbeit umgegangen wurde. Die Gefahrstoffe sind, soweit vorhanden, mit den jeweiligen Gefahrensymbolen, R- und S-Sätzen versehen worden.

Substanzname	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze
2-Mercaptoethanol	T, N	R 22-24-34-51/53	S 26-36/37/39-45-61
2-Propanol	F, Xi	R 11-36-67	S 7-16-24-26
3-Aminophthalhydrazid	Xi	R 36/37/38-20/21/22-40-50/53	S 24/25
4-Cumarsäure	Xi	R 36/37/38	S 24/25-22-26-36/37/39
Aceton	F, Xi	R 11-36-66-67	S 9-16-26
Acrylamid	T	R 45-46-20/21-25-36/38-43-48/23/24/25-62	S 53-45-24-36/37
Ammoniumperoxodisulfat	O, Xn	R 8-22-36/37/38-42/43	S 22-24-26-37
Bisacrylamid	Xn	R 22-20/21/22	S 24/25-36/37
Chloroform	Xn	R 22-38-40-48/20/22	S 36/37
Diethylpyrocarbonat	Xn	R 22-36/37/38	S 26-37/39
Dimethylformamid	T	R 61-20/21-36	S 53-45
Dithiothreitol	Xn	R 22-36/38	S 24/25
Essigsäure 100 %	C	R 10-35	S 23.2-26-45
Ethanol	F	R 11	S 7-16
Ethidiumbromid	T+	R 22-26-36/37/38-68	S 26-28.2-36/37
Ethylendiamin-tetraessigsäure	Xi	R 22-36/37/38	S 26-36
Isoamylalkohol	Xn	R 10-20	S 24/25
Methanol	F, T	R 11-23/24/25-39/23/24/25	S 7-16-36/37-45

N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin	F, C	R 11-20/22-34	S 16-26-36/37/39-45
Natriumazid	T+, N	R 28-32-50/53	S 28.1-45-60-61
Natriumdodecylsulfat	Xn	R 21/22-36/37/38	S 26-36/37
Natriumhydroxid	C	R 35	S 26-37/39-45
Phenol	T	R 24/25-34	S 28.6-45
Salzsäure 37 %	C	R 34-37	S 26-36/37/39-45
Trishydroxymethylaminomethan	Xi	R 36/38	S 24/25
Wasserstoffperoxid 30 %	C	R 34	S 3-26-36/37/39-45

VIII.2. Verzeichnis der Gefahrensymbole

O	Brandfördernd
C	Ätzend
F	Leichtentzündlich
T	Giftig
T+	Sehr giftig
Xn	Gesundheitsschädlich
Xi	Reizend
N	Umweltgefährlich

VIII.3. Verzeichnis der R- und S- Sätze

Gefahrenhinweise (R-Sätze)

R 8	Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen
R 10	Entzündlich
R 11	Leichtentzündlich
R 20	Gesundheitsschädlich beim Einatmen
R 22	Gesundheitsschädlich beim Verschlucken
R 24	Giftig bei Berührung mit der Haut
R 25	Giftig beim Verschlucken
R 26	Sehr giftig beim Einatmen
R 28	Sehr giftig beim Verschlucken

R 32	Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase
R 34	Verursacht Verätzungen
R 35	Verursacht schwere Verätzungen
R 36	Reizt die Augen
R 37	Reizt die Atmungsorgane
R 38	Reizt die Haut
R 40	Verdacht auf krebserzeugende Wirkung
R 43	Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich
R 45	Kann Krebs erzeugen
R 46	Kann vererbare Schäden verursachen
R 61	Kann das Kind im Mutterleib schädigen
R 62	Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen
R 66	Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen
R 67	Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen
R 68	Irreversibler Schaden möglich

Kombination der R-Sätze

R 20/21	Gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut
R 20/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken
R 20/21/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
R 21/22	Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
R 23/24/25	Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
R 24/25	Giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
R 36/38	Reizt die Augen und die Haut
R 36/37/38	Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut
R 39/23/24/25	Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
R 42/43	Sensibilisierung durch Einatmen und Hautkontakt möglich
R 48/20/22	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken

- R 48/23/24/25 Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
- R 50/53 Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben
- R 51/53 Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben

Sicherheitsratschläge (S-Sätze)

- S 3 Kühl aufbewahren
- S 7 Behälter dicht geschlossen halten
- S 9 Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren
- S 16 Von Zündquellen fernhalten - nicht rauchen
- S 22 Staub nicht einatmen
- S 23.2 Dampf nicht einatmen
- S 24 Berührung mit der Haut vermeiden
- S 26 Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren
- S 28.1 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser
- S 28.2 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Wasser und Seife
- S 28.6 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel Polyethylenglycol 400 und anschließende Reinigung mit viel Wasser
- S 36 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen
- S 37 Geeignete Schutzhandschuhe tragen
- S 45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)
- S 53 Exposition vermeiden - vor Gebrauch bes. Anweisungen einholen
- S 60 Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen
- S 61 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen

Kombination der S-Sätze

- S 24/25 Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden
- S 36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen
- S 36/37/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen
- S 37/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen

DANKSAGUNG

An dieser Stelle sei all jenen gedankt, die einen Anteil am Gelingen dieser Arbeit haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert für die Möglichkeit, dieses interessante Thema in seiner Abteilung bearbeiten zu können, für seine stetige Diskussionsbereitschaft und die Begutachtung dieser Arbeit.

Gleichermaßen danke ich Herrn PD Dr. Wolfgang Bohn für die kompetente Betreuung dieser Arbeit, sein beständiges Interesse am Fortschritt der Untersuchungen und seine Unterstützung bei Problemen.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Hahn möchte ich herzlichst für seine Bereitschaft danken, das Dissertationsgutachten zu dieser Arbeit anzufertigen, Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein und Dr. Patrick Ziegelmüller danke ich für die Begutachtung der Disputation.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Thomas Dobner für die Bereitstellung des E1A-12S Expressionsvektors und bei Herrn Prof. Dr. Ludger Hengst für den Zyklin A-Expressionsvektor.

Ein herzliches Dankeschön geht an alle Mitarbeiter der Abteilung Tumorstudiologie und der Abteilung Molekulare Zellbiologie für das freundliche Arbeitsklima, selbstverständlich entgegengebrachte Unterstützung und Hilfsbereitschaft und viel Spass. Ein besonderer Dank gilt dabei Dr. Rudolph Reimer für die Einführung in die Fluoreszenzmikroskopie, kompetente Unterstützung bei Computerproblemen und das geduldige Korrekturlesen, Dr. Daniel Speidel für seine Unterstützung bei der FACS-Analyse und anregende Diskussionen, und Beata Szalay für ihre tägliche Unterstützung im Labor.

Dr. Stefan Terjung möchte ich ganz herzlich für das sorgfältige Korrekturlesen danken.

Meinen Freunden, meiner Familie und Luis bin ich sehr dankbar für den nötigen Rückhalt, viel Verständnis und moralische Unterstützung während der gesamten Zeit.

Für die Förderung dieser Arbeit bedanke ich mich bei der Deutschen Krebshilfe e.V.