

Aus dem Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und
Immunologie an der Universität Hamburg-

Wissenschaftlicher Direktor: Herr Dr. Heinrich Hohenberg

**Funktionelle Interaktionen von p53 mit
Telomerasekomponenten und Regulation der
Telomeraseaktivität durch p53**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin (Dr. med. dent.)
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Kamila Irena Iwanski

Hamburg, Januar 2008

Diese Dissertation wurde am Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg in der Abteilung für Tumorstudiologie bei Prof. W. Deppert durchgeführt und von PD Dr. Cagatay Günes betreut.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

an der Universität Hamburg am: 28.02.2008

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. C. Günes

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. R. Friedrich

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	3
1.1 Telomere	3
1.2 End-Replikations-Problem	5
1.3 Zelluläre Seneszenz und Wachstumsarrest	6
1.4 Telomerase	7
1.5 Die Rolle des Tumorsuppressorproteins an den Telomeren	10
1.6 p53-Telomerase-Interaktionen	13
1.7 Die Rolle von p53 bei der Regulation der Telomeraseaktivität	14
Fragestellung	15
2. Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Biologisches Material	16
Zellen	16
2.1.2 Molekularbiologisches Material	16
Enzyme	16
Peptide	17
Größenmarker	17
Kits	17
Antikörper	17
Primer	18
2.2 Chemikalien	18
2.3 Lösungen und Puffer	19
2.4 Geräte	22
2.5 Methoden	24
2.5.1 Zellbiologische Methoden	24
2.5.1.1 Die Zellkulturen	24
2.5.1.2 Das T-Rex-System	25

2.5.2 Molekularbiologische Methoden	26
2.5.2.1 RNA-Isolierung und RT-PCR	26
2.5.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung	26
2.5.2.3 Polymerase-Kettenreaktion	26
2.5.2.4 DNA-Gelelektrophorese	28
2.5.3 Proteinbiochemische Methoden	28
2.5.3.1 Der TRAP-Assay	28
2.5.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	29
2.5.3.3 Der Western Blot	30
3. Ergebnisse	31
3.1 Interaktionen des Tumorsuppressorproteins p53 mit Telomerasekomponenten	31
3.1.1 wtp53 hemmt die Telomeraseaktivität <i>in vitro</i>	31
3.1.2 mutp53 hemmt die Telomeraseaktivität <i>in vitro</i>	33
3.1.1 Die Hemmung der Telomeraseaktivität durch wtp53 kann durch Zugabe von TEP1 Peptiden aufgehoben werden	35
3.2 Regulation der Telomeraseaktivität durch p53	37
3.2.1 Überexpression von p53 in H1299-Zellen korreliert mit der Abnahme der <i>hTERT</i> Genexpression	37
3.3 Unter welchen physiologischen Bedingungen reguliert p53 die Telomeraseaktivität?	41
3.3.1 γ -Strahlung hat keinen Einfluss auf die Telomeraseaktivität in H1299-Zellen	42
3.3.2 Serumentzug und γ -Strahlung haben keinen Einfluss auf die Telomeraseaktivität in H1299-Zellen	43
3.3.3 Die Induktion von wtp53 in H1299wtp53-Zellen weist eine inverse Korrelation zur <i>hTERT</i> Expression nach γ -Bestrahlung auf	44
3.3.4 γ -Strahlung hat keinen Einfluss auf die Telomeraseaktivität in H1299-Zellen, führt dagegen zur <i>hTERT</i> Hochregulierung	46
3.3.5 Serumentzug und γ -Bestrahlung haben keinen Einfluss auf Telomeraseaktivität in HCT116-Zellen	48

Diskussion	50
4.1 Interaktionen des Tumorsuppressorproteins p53 mit Telomerasekomponenten	51
4.2 Regulation der Telomeraseaktivität durch p53	52
4.2.1 Die Induktion von wtp53 in H1299wtp53-Zellen weist eine inverse Korrelation zur hTERT Expression auf	52
4.2.2 Einfluss von γ-Strahlung auf die p53 und hTERT Expression in H1299-Zellen	55
4.2.3 Einfluss von γ-Strahlung auf die p53 und hTERT Expression in HCT116-Zellen	56
4.3 Relevanz der Ergebnisse für <i>in vivo</i> Experimente	57
4.4 Ausblick	57
Literaturverzeichnis	59
Abkürzungsverzeichnis	66
Danksagung	68
Lebenslauf	69
Eidesstattliche Versicherung	70

Zusammenfassung

Das Tumorsuppressorprotein p53 ist ein Multifunktionsprotein, dessen Funktionen hauptsächlich in der Überwachung des Zellteilungsprozesses und des Replikationsvorganges liegen. Die wichtigste Aufgabe des p53-Proteins ist die Aufrechterhaltung der Integrität der genetischen Information. Es wird auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet.

Die Telomerase ist ein Enzym, welches in der Lage ist, Chromosomenenden, die Telomere, bei der Replikation zu verlängern. Sie besteht aus mindestens drei Komponenten, der katalytischen Untereinheit hTERT, der RNA-Untereinheit hTERC und DKC1, dem Dyskerin Protein. Darüber hinaus ist der Telomerasekomplex mit dem TEP1 Protein, dessen Funktion bislang unbekannt ist, assoziiert. Die Telomerase ist beim Menschen lediglich in stark proliferierenden somatischen Zellen, wie den Korneazellen des Auges, aber auch in den Geschlechtszellen aktiv. In allen anderen Zellen ist die Telomerase reprimiert. Auf der anderen Seite ist die Telomerase in den meisten menschlichen Tumoren aktiviert.

Auch das Tumorsuppressorprotein p53 ist in über der Hälfte der menschlichen Tumoren in seinen Funktionen gestört und inaktiv. Da p53, die Telomere und Telomer-assoziierte Proteine zentrale Komponenten des komplexen zellulären Überwachungs- und Reparatursystems der Zelle sind und die Telomerase normalerweise nicht aktiviert ist, wird ein Zusammenhang zwischen der Regulation der Telomeraseaktivität und p53 vermutet. Ob und welche Interaktionen zwischen p53, Telomeren und Telomerasekomponenten stattfinden, ist bisher nicht ausreichend geklärt.

Ziel dieser Doktorarbeit war es einerseits, mögliche regulative Zusammenhänge des Tumorsuppressorproteins p53 und der Telomerase auf Transkriptionsebene zu untersuchen. Dieses wurde anhand der humanen Tumorzelllinien H1299 und HCT116 untersucht, welche Telomerase positiv sind und in denen p53 entweder endogen (HCT116) exprimiert wird oder ektopisch und induzierbar (H1299) überexprimiert werden kann. Die Experimente mit beiden Zelllinien zeigten, dass die Induktion von p53, sowohl im ektopen als auch im endogenen System, mit einer Hemmung der *hTERT* Expression einherging. Es besteht also ein Zusammenhang zwischen p53 und der Regulation der *hTERT* Expression auf transkriptioneller Ebene.

Andererseits sollte untersucht werden, ob Interaktionen zwischen p53 und Telomerase auf Proteinebene stattfinden. Dazu wurde im TRAP-Assay, einer sehr sensitiven Methode zum Nachweis von Telomeraseaktivität, gereinigtes Wildtyp-53 (wtp53) zu Telomerase positiven

Kernextrakten aus HeLa-Zellen gegeben. Es zeigte sich, dass die Telomeraseaktivität in Abhängigkeit von der Konzentration des gereinigten p53 abnimmt, p53 die Telomeraseaktivität also hemmen kann. Dieses Ergebnis konnte auch beim Einsatz von gereinigten p53-Mutanten (mutp53) beobachtet werden, was zunächst verwunderlich ist, da mutp53 und Telomerase in vielen Tumoren gemeinsam vorliegen. Eine eindeutige Antwort auf dieses unerwartete Resultat konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht gefunden werden. Vermutlich kommt es zu einer Bindung von p53 bzw. mutp53 an TEP1, die Protein-assoziierte Untereinheit der Telomerase. In einem weiteren Versuch wurden deshalb Telomerase positiven Kernextrakten zusätzlich zu wtp53 auch synthetisierte TEP1 Peptide hinzugegeben, um herauszufinden, ob p53 und TEP1 interagieren können. Hierbei stellte sich heraus, dass bei gleichzeitiger Zugabe von wtp53 und einem TEP1 Peptid die Telomeraseaktivität nicht abnimmt. Das kann als Hinweis gelten, dass das TEP1 Peptid die Bindung von p53 an die Telomerase verhindert und somit die Unterdrückung der Telomeraseaktivität durch p53 aufheben kann.

Man kann also zusammenfassend sagen, dass p53 sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranslationaler Ebene an der Regulation der Telomerasefunktion beteiligt ist.

1 Einleitung

1.1 Telomere

Telomere sind die Endstrukturen linearer Chromosomen (aus dem Griechischen abgeleitet *telos* „Ende“ und *meros* „Teil“) und bestehen aus Tandemwiederholungen kurzer DNA-Sequenzen (Müller et. al, 1939). Telomere kommen bei den unterschiedlichsten Organismen vor und unterscheiden sich in ihrer Sequenz und Länge. Die Telomersequenz wurde erstmals bei Ciliaten, einer wichtigen Gruppe der Protozoen, von J.G. Gall und E. Blackburn 1978 entschlüsselt. Beim Menschen sowie bei allen anderen Wirbeltieren lautet diese Sequenz *TTAGGG* und wurde von R. Moyzis und seinen Mitarbeitern 1988 veröffentlicht. Die Länge der Telomere variiert beträchtlich zwischen den Organismen. Beim Menschen beträgt die Telomerlänge je nach Organ und Entwicklungsstadium zwischen 5-15 kbp (Moyzis *et al.*, 1988). Dagegen sind die Telomere von *Mus musculus* (Kipling *et al.*, 1990) mit bis zu 150 kbp sehr viel länger und bei *Saccharomyces cerevisiae* (Zakian *et al.*, 1989) mit 300 bp wesentlich kürzer als beim Menschen. Bei Vertebraten umfasst die Telomer-DNA einen langen, doppelsträngigen Anteil sowie einen etwa 150 Basen langen, einzelsträngigen 3'-Überhang des G(reichen)-Stranges.

Die Funktion der Telomere besteht im Schutz der Chromosomen vor Degradation sowie vor End-zu-End Fusionen. Zu diesem Zweck ist die Telomer-DNA mit mehreren Proteinen assoziiert, unter anderem den Telomer-bindenden Proteinen TRF1 und TRF2 (*TTAGGG repeat binding factor 1* bzw. *TTAGGG repeat binding factor 2*). TRF1 (Chong *et al.*, 1995; Broccoli *et al.*, 1997; Shen et.al, 1997) reguliert die Telomerlänge über einen negativen Mechanismus (Smogorzewska *et al*, 2000). TRF2 (*TTAGGG repeat binding factor 2*, van Steensel *et al*, 1998) hingegen ist für die Stabilisierung der Loop-Struktur der Telomere notwendig. Neuere Daten belegen darüber hinaus die Bindung von DNA-Reparaturproteinen, wie den Ku-Proteinen oder dem hMRE11/Rad50/NBS1- Komplex, an Telomere (Bianchi & de Lange, 1999; Hsu *et al.*, 1999). Durch Elektronenmikroskopie wurde die Struktur der Telomere von Mensch und Maus aufgeklärt (Griffith *et al.*, 1999). Diese Arbeiten haben gezeigt, dass die Chromosomen in einer großen, doppelsträngigen Schleife (Telomeric (T)-Loop) enden. Eine Reihe von Proteinen, vor allem aber das oben erwähnte TRF2 Protein wird für die Bildung bzw. Stabilisierung der T-Loops verantwortlich gemacht. Die Struktur dieses Nukleoproteinkomplexes (s. Abb. 1) führt dazu, dass das einzelsträngige 3'-Ende „verborgen“ ist. Durch die Bildung des T-Loops werden die Chromosomenenden vor

Degradation durch Enzyme sowie vor End-zu-End Fusionen geschützt. Der Verlust der T-Loop Struktur infolge der Telomerverkürzung bzw. funktioneller Inaktivierung der beteiligten Proteine resultiert in der Aktivierung so genannter „Checkpoints“, die die Integrität des Genoms überwachen.

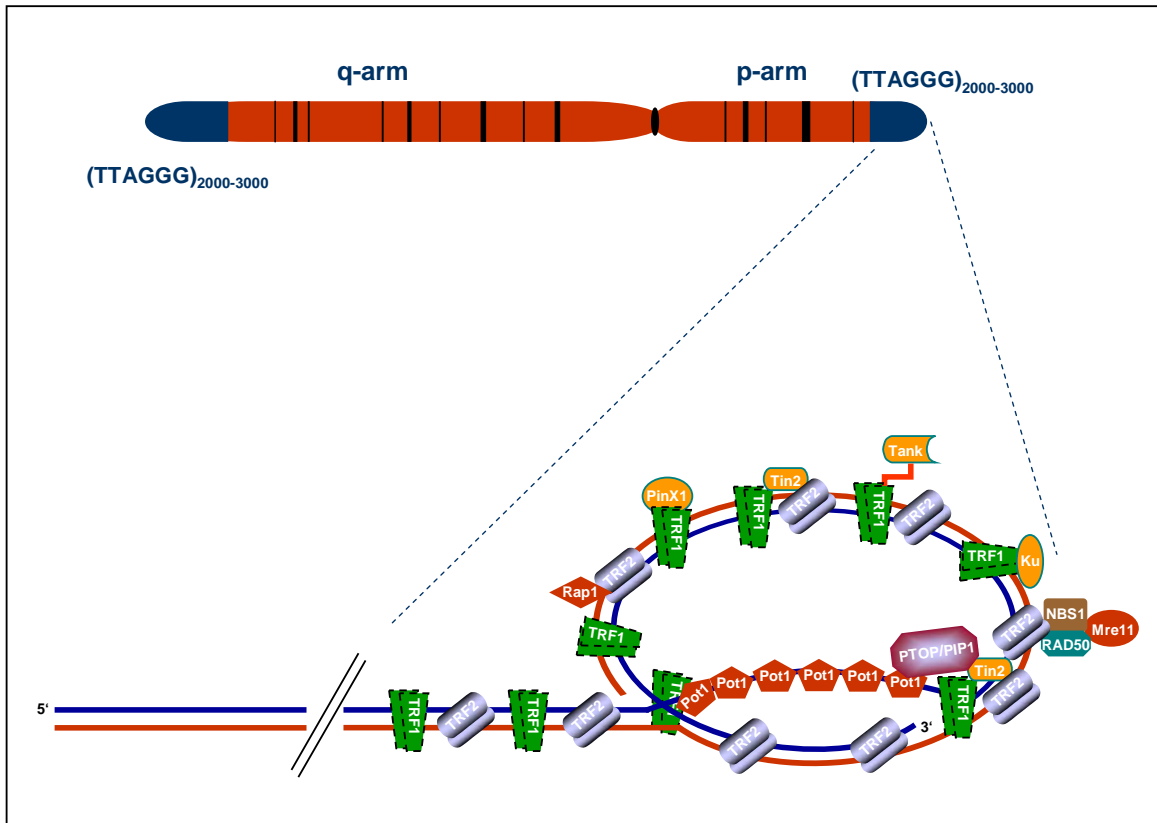


Abb. 1 Modellstruktur des T-Loops an Chromosomenenden. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. C. Günes

1.2 End-Replikations-Problem

Aufgrund der Biochemie des Replikationsvorgangs können die äußersten Enden der Chromosomen nicht repliziert werden, was als das so genannte End-Replikations-Problem bezeichnet wird. Dieses entsteht dadurch, dass die DNA-Polymerase die Polymerisation nur in eine Richtung, und zwar vom 5'- zum 3'-Ende ausüben kann. Sie braucht dazu einen initialen RNA-Primer, der aus 8-12 Nukleotiden besteht und von der Primase synthetisiert wird. Dieser RNA Primer wird nach und nach abgebaut und die dadurch entstehenden Lücken können wiederum von der DNA-Polymerase aufgefüllt werden, die am 3'-Ende an neu synthetisierten Okazakifragmenten binden kann. Wenn allerdings der äußerste Primer am Ende der Replikationsgabel des Folgestranges entfernt wird, fehlt der Startpunkt der DNA-Polymerase, so dass diese Enden nicht repliziert werden können (s. Abb. 2). Bei Fehlen eines Kompensationsmechanismus gehen auf diese Weise bei jeder Zellteilung ca. 50-200 bp verloren (Harley *et al.*, 1990, Levy *et al.*, 1992).

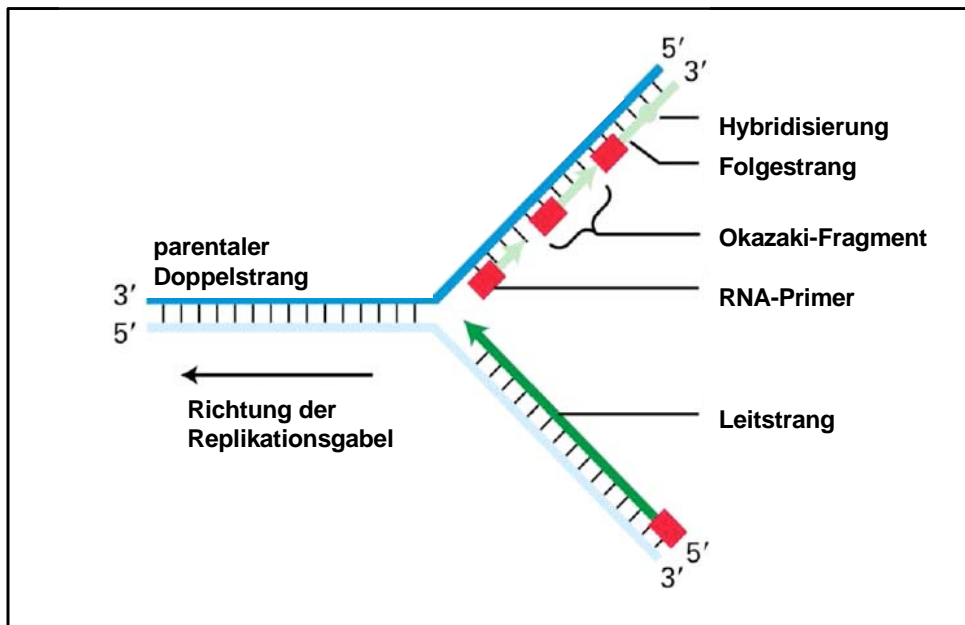


Abb. 2 Schema des End-Replikations-Problems. Erläuterung s. Text.

1.3 Zelluläre Seneszenz und Wachstumsarrest

Wie bereits erwähnt, verkürzen sich die Telomere infolge des End-Replikations-Problems (s. oben) bei jeder Zellteilung einer somatischen Zelle um ca. 50 - 200 Basenpaare (Levy *et al.*, 1992). Diese molekulare Erosion definiert ein Limit für die Zahl der möglichen Zellteilungen und stellt damit eine Art „mitotische Uhr“ dar, die die Lebensspanne einer Körperzelle begrenzt, das so genannte *Hayflick Limit* (replikative bzw. zelluläre Seneszenz, Hayflick *et al.*, 1961). In Abwesenheit eines Telomer-Erhaltungsmechanismus, wie der Aktivierung der Telomerase oder des ALT-Mechanismus (s. unten), verkürzen sich allerdings die Telomere weiter, und die Folge ist eine nicht tolerierbare chromosomale Instabilität. Die Zellen gehen dann in die sogenannte Seneszenz über, einen Zustand, der dadurch charakterisiert ist, dass keine Replikation und Zellteilung mehr stattfindet. Man geht davon aus, dass diese Zellen nach einiger Zeit vom Organismus beseitigt werden, da sie nicht mehr in den Zellzyklus eintreten können. Bei DNA-Schäden, die beispielsweise durch genotoxischen Stress verursacht wurden, gehen wiederum die Zellen mit intaktem wtp53 bzw. intakten p53-Zielgenen in einen Wachstumsarrest über, in welchem Reparaturvorgänge an den geschädigten Stellen stattfinden können. Diese Zellen sind nach erfolgreicher Reparatur in der Lage, wieder in den Zellzyklus einzutreten und sich erneut zu teilen. Sind die DNA-Schäden nicht zu beheben gehen die betroffenen Zellen direkt in den programmierten Zelltod (Apoptose), der von p53 eingeleitet wird ('crisis' oder Mortality Stage 2, M2). Sind aber die Kontrollmechanismen der Zellen defekt (z.B. bei defekter p53- bzw. Rb(Retinoblastomprotein)-Funktion), kann der Wachstumsarrest umgangen werden, und die Zellen können sich weiter teilen. Immortale Zellen haben zwei mögliche Mechanismen, um ihre Telomerlänge und damit die chromosomale Integrität zu stabilisieren. In der Regel erfolgt dieses über die Reaktivierung der Telomerasefunktion (in etwa 85-90 % der Fälle). Einige Zellen aber können ihre Telomerlänge über einen alternativen Mechanismus, den sogenannten ALT-Mechanismus (Alternative Lengthening of Telomeres, Bryan *et al.*, 1997) stabilisieren und erlangen somit Immortalität. Die Verlängerung der Telomere durch diese Mechanismen führt zu einer ungehemmten Teilungsrate genetisch instabiler bzw. defekter Zellen und ist ein wichtiger Schritt zur Tumorentstehung (s. Abb. 3).

Seneszenz und Apoptose sind zwei wichtige Wege des Organismus, DNA-instabile bzw. -geschädigte Zellen aus dem Zellzyklus zu eliminieren und einer Tumorentstehung durch Proliferation solcher Zellen vorzubeugen. Durch die oben erwähnten Faktoren kann es jedoch passieren, dass sich solche Zellen weiter teilen und sich zu Tumorzellen entwickeln.

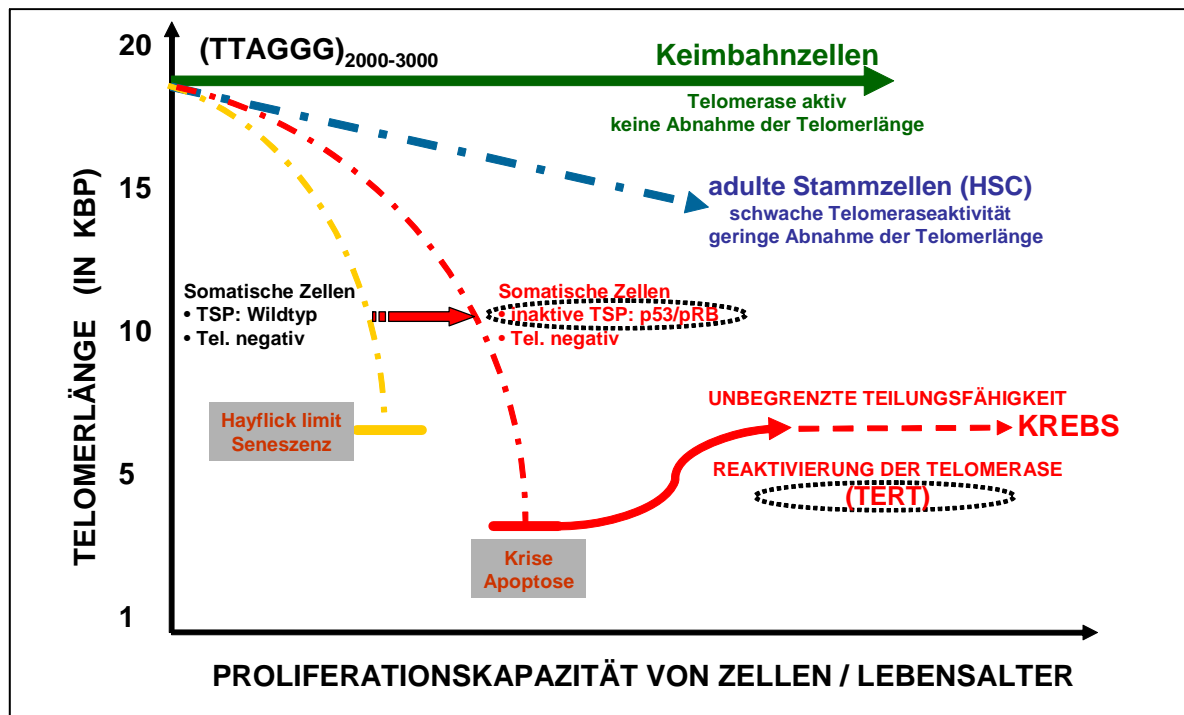


Abb. 3 Tumorentstehung durch Telomerverkürzung und Telomeraseaktivierung.
Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. C. Günes

1.4 Telomerase

Die Telomerase ist ein Ribonukleoproteinkomplex, der für die vollständige Verdoppelung der chromosomalen Enden, der Telomer-DNA, bei der Zellteilung verantwortlich ist (s. Abb. 5). Bis heute wurden drei Komponenten, die beim Menschen mit Telomeraseaktivität assoziiert sind, identifiziert. Die RNA Komponente wird vom *hTERC* Gen kodiert (human telomerase RNA component, Blasco *et al.*, 1995; Feng *et al.*, 1995). Sie fungiert als Matrize für die Verlängerung der repetitiven Telomer-DNA und wird in allen Zellen konstitutiv exprimiert (Avilion *et al.*, 1996). Diese Komponente ist damit sehr wahrscheinlich nicht für die Regulation der Telomeraseaktivität verantwortlich. Dasselbe gilt für das Produkt des *hTEPI* (human telomerase associated protein 1) Gens, welches ebenfalls konstitutiv exprimiert wird und dessen Genprodukt mit Telomeraseaktivität assoziiert ist (Harrington *et al.*, 1997). Die dritte Komponente, die katalytische Untereinheit der Telomerase, kodiert für das Protein hTERT (human telomerase reverse transcriptase, s. Abb. 4), welches große Homologie zu RNA-abhängigen DNA-Polymerasen (reversen Transkriptasen) aufweist (Meyerson *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu *hTERC* wird die Expression des *hTERT* Gens in den meisten somatischen Zellen unterdrückt. Lediglich in

stark proliferierenden Zellen, wie Stammzellen, Keimbahnzellen oder Progenitorzellen konnte *hTERT* Expression und somit Telomeraseaktivität nachgewiesen werden (Matsutomi *et al.*, 2003). Für die Rekonstitution der Telomeraseaktivität *in vitro* werden nur die Genprodukte von *hTERC* und *hTERT* benötigt (Beattie *et al.*, 1998). Durch Transfektionsexperimente der *hTERT* cDNA in Telomerase negative Zellen konnte gezeigt werden, dass die *hTERT* Expression den limitierenden Faktor für die Telomeraseaktivität darstellt (Weinrich *et al.*, 1997; Nakayama *et al.*, 1998).

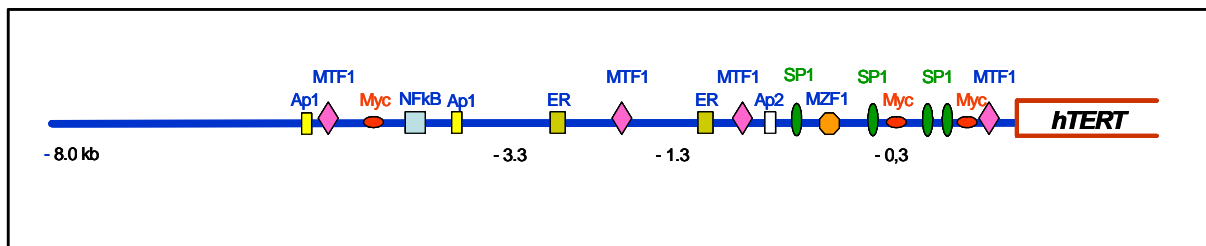


Abb. 4 Schematische Darstellung des *hTERT* Gens. Sp1 und Myc sind u.a. Transkriptions-Aktivatoren der *hTERT* Genexpression.

Die Regulation der Telomerase erfolgt auf Transkriptionsebene. Das *hTERT* Gen unterliegt hier einer stringenten Kontrolle durch Transkriptionfaktoren wie p53 und p21, aber auch c-Myc/Mad/Max-Komplex, Sp1, Östrogenrezeptor-Komplexe, WT1 und E2F1 (Shats *et al.*, 2004; Xiang *et al.*, 2002; Dean *et al.*, 1986; Won *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2004; Poole *et al.*, 2001). Durch retrovirale Überexpression des *c-myc* Onkogens konnte in Telomerase negativen Zellen die Telomeraseaktivität induziert werden (Wang *et al.*, 1998). Gegenspieler der Telomerase ist der Myc/Max-Komplex, dessen Wechsel zum Mad/Max-Komplex eine Hemmung der *hTERT*-Promotoraktivität bewirkt (Gunes *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001; Kyo *et al.*, 2002), aber auch p53, wie in dieser Arbeit gezeigt werden kann.

Mittlerweile wurden viele putative Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren im *hTERT*-Promotor identifiziert, deren Beitrag zur *TERC*-Expression und Telomerase-Aktivität noch ungeklärt ist (s. Abb. 4).

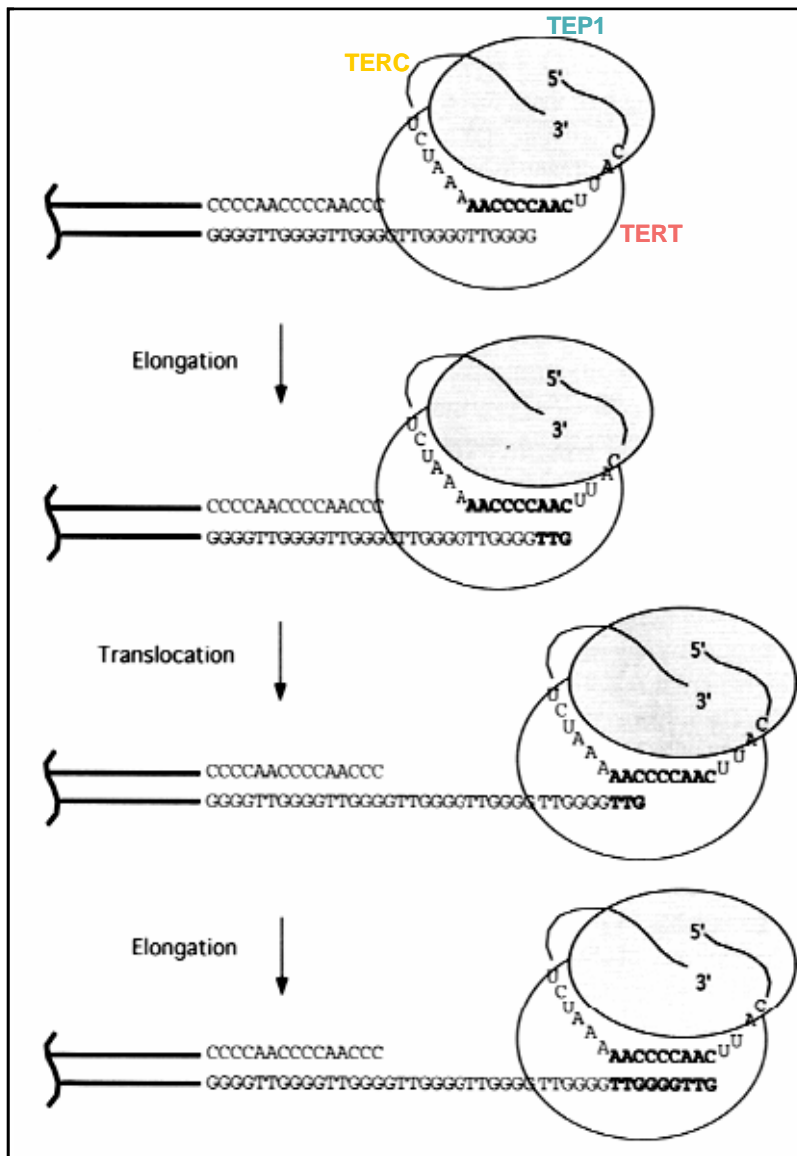


Abb. 5 Die Funktion der Telomerase. Die Telomerase verlängert mit Hilfe ihrer RNA-Komponente (TERC) und der katalytischen Komponente (TERT) das Telomer schrittweise um die Sequenz TTAGGG. Die Funktion des TEP-1 Proteins ist bislang unklar. Modifiziert nach Harley 2002.

Wie in Abbildung 5 gezeigt, geht man davon aus, dass zwei unabhängige Regionen der Telomerase mit einem Primer interagieren; zum einen die Region, welche die RNA und die katalytische Untereinheit enthält und sich an das 3'-Ende des Primers setzt, um diesen zu verlängern, zum anderen die Region, die an das 5'-Ende bindet und den Weg für den neu entstandenen Strang stabilisiert. Auf diese Weise bleibt das Enzym auch nach vollzogener Synthese eines „Templates“ am Strang haften, auch wenn dieser sich weiterbewegt, um ein neues „Template anzuhängen“ (Greider 1991). Für die Synthese eines DNA-Stranges benötigt das Enzym Nukleosidtriphosphate und einen DNA-Primer, an den die Sequenzen in 5'-3'-Richtung angefügt werden.

1.5 Rolle des Tumorsuppressorproteins p53 an den Telomeren

Innerhalb der Tumorsuppressoren nimmt p53 eine zentrale Rolle ein, die dadurch unterstrichen wird, dass das *P53* Gen das am häufigsten mutierte Gen in menschlichen Tumoren ist. In ca. 50% aller Tumoren ist das *P53* Gen inaktiviert (Hollstein *et al.*, 1996). p53 ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 lokalisiert, besteht aus 11 Exons und umfasst etwa 20 kbp. Das humane p53 Protein setzt sich aus vier funktionellen Domänen zusammen, die für die Erforschung seiner funktionellen Interaktionen mit anderen Proteinen und auch der Telomerase entscheidend sind: N-terminale Transaktivierungsdomäne, zentrale DNA-Bindungsdomäne, C-terminale Tetramerisierungsdomäne und Regulationsdomäne (s. Abb. 6)

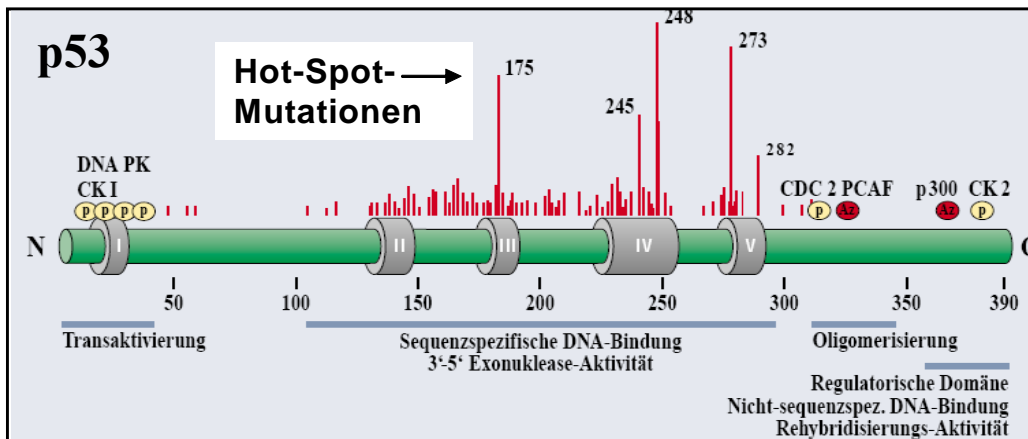


Abb. 6 Schematische Darstellung des linearisierten p53-Moleküls (grün), mit seinen vier Domänen (dunkelblau) und den häufigsten Punktmutationen (rot).

Der Tumorsuppressor p53 ist ein multifunktionelles Protein, dem einer malignen Entartung von Zellen eine zentrale Rolle zukommt (s. Abb. 7). p53 erfüllt diese Funktion in erster Linie als ein sequenz-spezifischer Transkriptionsfaktor und aktiviert vor allem den Zellzyklusinhibitor p21 (Zykin abhängiger Kinase-Inhibitor 1A) als Folge von genotoxischem Stress (Kern *et al.*, 1991), um so die Reparatur der geschädigten DNA zu ermöglichen. Andererseits aktiviert p53 infolge von irreparablen DNA-Schäden BAX und weitere proapoptische Gene und leitet somit die Apoptose ein (Miyashita & Reed, 1995; Polyak *et al.*, 1997). Der C-Terminus von p53 erkennt sowohl Doppelstrang (ds) wie auch Einzelstrang (ss) DNA, und interne DNA-Loops (Wiesmüller *et al.*, 1996; Bertrand *et al.*, 1997). Es wurde postuliert, dass nicht nur die Anwesenheit einer spezifischen Sequenz, sondern auch strukturelle Eigenschaften der DNA-Bindungsstelle entscheidende Parameter

bei der Interaktion von p53 mit seinen spezifischen Bindungselementen darstellen (Kim *et al.*, 1997, 1999). In normalen Zellen wird p53 nur in geringen Mengen exprimiert und hat eine Halbwertszeit von ca. 20 min. Es wird über einen negativen Rückkopplungsmechanismus durch das Protein hMDM2 (human mouse double minute 2) reguliert (Levine *et al.*, 1997; Prives and Hall, 1999; Vogelstein *et al.*, 2000). Die Rolle als Transkriptionsfaktor erfüllt p53 einerseits durch seine Stabilisierung als Protein und andererseits durch die Aktivierung der p53-abhängigen Transkription (Anderson und Appella, 2002). Dieses geschieht, wie schon erwähnt, als Reaktion der Zelle auf toxische Stressfaktoren und daraus resultierende Schäden an der DNA. Die Expression des *p53* Gens führt zur Akkumulation des Proteins im Zellkern und zu seiner Stabilisierung (Shieh *et al.*, 1997). p53 reguliert als Transkriptionsfaktor über *p53-response-elements* die Expression von über 150 Genen (El Deiry *et al.*, 1992; Zhao *et al.*, 2000). So wird beispielsweise über die Aktivierung von p21 der Wachstumsarrest der Zelle eingeleitet (Deng *et al.* 1995; Brugolas *et al.*, 1995) und ermöglicht die Reparatur von DNA-Schäden.

Die Regulation des Zellzyklus erfolgt über die Kontrolle von Rb durch p53. Das Rb liegt dann in dephosphorylierter Form an E2F-Faktoren gebunden vor und hält dadurch die Zelle in der G1-Phase arretiert (Dowdy *et al.*, 1993; Ewen *et al.*, 1993). Auch ein Zellzyklusarrest in der G2-Phase wird von p53 über die Aktivierung von p21 reguliert (Hermeking *et al.*, 1997; Utrera *et al.*, 1998).

In Zusammenhang mit der Entstehung von Krebs ist bekannt, dass p53 in über 50% der Krebsarten mutiert ist (Greenblatt *et al.*, 1994; Hollstein *et al.*, 1994; Levine *et al.*, 1997; Beroud and Soussi, 1998; Hainaut *et al.*, 1998; Hernandez-Boussard *et al.*, 1999; Sigal and Rotter, 2000). Dabei handelt es sich zu ca. 90% um Punktmutationen, die auf dem Austausch einer Aminosäure basieren. Hierdurch ist p53 in seiner Funktion als „Wächter des Genoms“ (Lange, 1992) gestört, so dass es über die Aktivierung von Onkogenen zur Entartung der Zellen kommen kann. Besonders häufig kommen Hotspotmutationen in den Aminosäuren 175, 245, 248, 249, 273 und 282 vor (Hollstein *et al.*, 1991; Deppert *et al.*, 1994). Durch diese Mutationen in der zentralen DNA-Bindungsdomäne ist p53 an der sequenzspezifischen Bindung an seine Zielgene und somit an der Regulation für den Zellzyklus entscheidender Faktoren gehindert. Es wird angenommen, dass bestimmte p53-Mutationen infolge der transdominanten Unterdrückung von wtp53 (dominant-negativer Effekt) oder durch den wtp53-unabhängigen onkogenen Funktionsgewinn (Gain of Function, GOF) einen Selektionsvorteil aufweisen. Die GOF-Mutanten charakterisieren sich dadurch, dass sie einen direkten Einfluss auf die Tumorgenese haben (Roemer *et al.*, 1999; Deppert *et al.*, 2000).

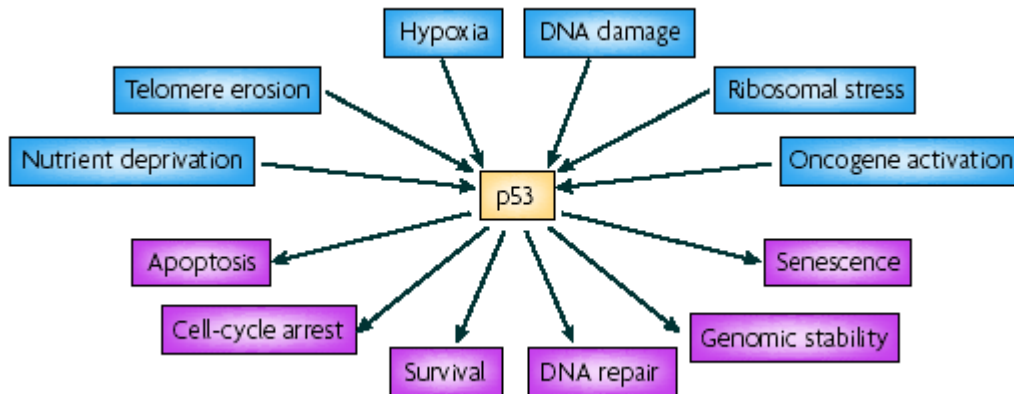


Abb. 7 Aktivatoren (blau) und Funktionen (violett) des Tumorsuppressorproteins p53

Interessanterweise konnte vor kurzem die Bindung von wtp53 an Telomere nachgewiesen werden, wobei p53 an den T-Loops lokalisiert war (s. Abb. 8, Stansel *et al.*, 2002). Die genaue Funktion von p53 an den Telomeren ist unklar. Überexpression einer dominant negativen Variante des TRF2 Proteins führt zum Absterben von Zellen durch Apoptose in Abhängigkeit des Tumorsuppressorproteins p53 (Karlseder *et al.*, 1999). Dieses könnte darauf hinweisen, dass p53 über die intakte Struktur bzw. Funktion der Telomer Loops wacht, da sonst als Folge der Telomerverkürzung die genomische Integrität gefährdet wäre, was eine der Voraussetzungen für tumorigene Konversion von normalen Zellen zu Tumorzellen ist.

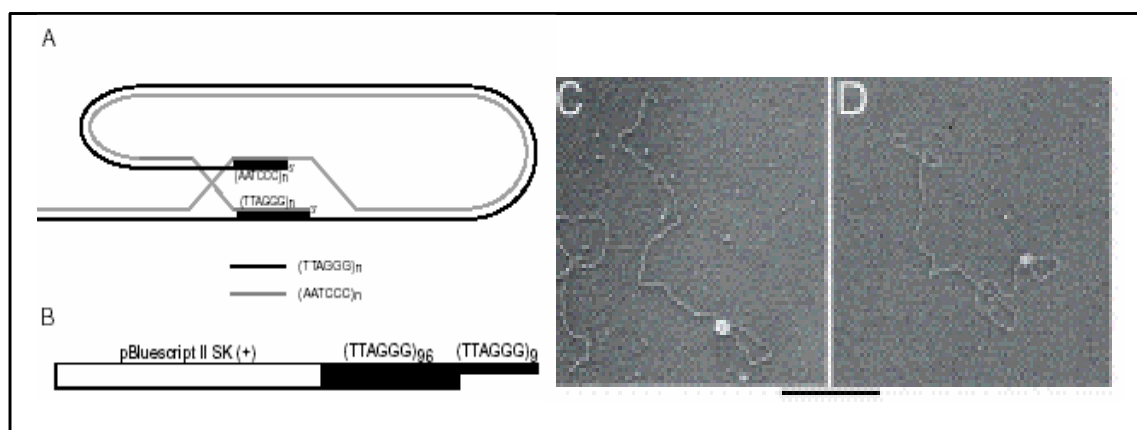


Abb. 8 p53 bindet an Telomer-DNA

A) Schematische Darstellung des T-Loops an Chromosomenenden.

B) pRST-5 Plasmid als Modell Telomer-Template zur Analyse der T-Loops Bindung von p53 (Stansel *et al.*, 2002). Das pRST-5 Plasmid ist ein pBS II-SK (+) Derivat, in das ca. 500 bp Telomer-DNA (96 x TTAGGG) inkloniert wurden. Der 3' Überhang wird durch Ligation eingebaut.

C)D) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von p53 Bindung an dem Modell Telomer Template. Der Pfeil zeigt auf das p53 Protein (helle Punkte) am Telomer Loop.

Aus Cell 1999

1.6 p53-Telomerase-Interaktionen

Wie oben erwähnt, wurde neben TERC (RNA Untereinheit) und TERT (katalytische Untereinheit) das TEP1 als Telomerase-assoziierte Komponente beschrieben. Bislang konnte dem TEP1 Protein keine klare zelluläre Funktion zugeordnet werden. Allerdings wurde für das humane TEP1 Protein gezeigt, dass es *in vitro* mit p53 interagiert. Dieses deutet auf eine mögliche Beteiligung von TEP1, zusammen mit p53, an der posttranslationalen Regulation der Telomeraseaktivität hin (Li *et al.*, 1999). Ob und unter welchen zellulären Bedingungen die Interaktion von p53 mit Telomerasekomponenten *in vivo* stattfindet, ist bislang nicht geklärt. Diese Fragestellung ist aber besonders interessant, da p53 in Abhängigkeit von unterschiedlichen Stresssignalen entweder Wachstumsarrest, Seneszenz oder Apoptose einleitet und Telomeraseaktivität bei allen genannten Prozessen beteiligt ist. Normale humane Zellen mit ektopter Expression der Telomerase können replikative Seneszenz überwinden, und die Aktivität der Telomerase schützt vor Stress-induzierter Apoptose (Holt *et al.*, 1999; Gorbunova *et al.*, 2002). Auf der anderen Seite ist die Aktivität der Telomerase für eine vollständige Replikation der DNA, z.B. für die Proliferationsfähigkeit der Zellen, essentiell. Darüber hinaus häufen sich Hinweise auf eine anti-apoptotische Funktion der Telomerase, welche unabhängig von ihrer Telomer-DNA verlängernden Funktion zu sein scheint (Haendeler *et al.*, 2003). Interessant ist der Befund von Smith *et al.*, (Smith *et al.*, 2003), dass die konstitutive Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase, des TERT Proteins, die Expression von wachstumsfördernden Genen induziert (u.a. Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) und gleichzeitig die von pro-apoptotischen Genen, u.a. TRAIL reprimiert. Es ist also naheliegend anzunehmen, dass nach genotoxischem Stress p53 neben der Aktivierung von p21 auch die Telomeraseaktivität unterdrückt. Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung von p53 an der transkriptionellen Regulation der katalytischen Untereinheit der Telomerase (Kyo *et al.*, 2000). Darüber hinaus könnte p53 auch die enzymatische Aktivität der Telomerase durch direkte Protein-Protein-Interaktionen modulieren. Insbesondere unter dem Gesichtspunkt, dass der Telomerasekomplex eine sehr lange Halbwertszeit (ca. 24 h) hat, wäre eine bloße transkriptionelle Regulation der Telomerase seitens p53 für eine schnelle Reaktion der Zelle in Stresssituationen ineffizient.

1.7 Die Rolle von p53 bei der Regulation der Telomeraseaktivität

Während der Differenzierung verlieren die meisten somatischen Zellen die *TERT* Genexpression und somit die Telomeraseaktivität. Dagegen kann in etwa 85-90% der menschlichen Tumore eine starke *TERT* Genexpression und folglich auch eine hohe Telomeraseaktivität nachgewiesen werden (Kim *et al.*, 1994; Meyerson *et al.*, 1997). Es wird daher angenommen, dass die Regulation des *hTERT* Gens einen der kritischen Schritte während der Tumorentstehung darstellt. Die Aktivität der Telomerase wird primär auf der Ebene der transkriptionellen *TERT* Genexpression kontrolliert. In den letzten Jahren wurden einige Transkriptionsaktivatoren, u.a. c-myc, Sp1, bmi-1, E2F-1 und USF-1 (Wu *et al.*, 1999; Dimri *et al.*, 2002; Goueli & Janknecht, 2003), sowie Repressoren, u.a. Mad1 (Gunes *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2001) und p53 (Kusumoto *et al.*, 1999; Kanaya *et al.*, 2000; Stampfer *et al.*, 2003), beschrieben, die *in vitro* die *hTERT* Genexpression regulieren. Der Beitrag des Tumorsuppressorproteins p53 zur *hTERT* Regulation ist allerdings umstritten (Lin & Elledge, 2003). In einigen humanen Tumoren korreliert der Verlust der Wildtyp p53 Funktion mit der Aktivierung der Telomerase, was für einen Zusammenhang zwischen p53 und Repression des *TERT* Gens spricht. So fanden Wisman *et al.* (Wisman *et al.*, 2003), dass die Inaktivierung von p53 durch Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne mit einer erhöhten Telomeraseaktivität in Ovarialtumoren einhergeht. Ähnliche Beobachtungen wurden in Karzinomen des Endometriums (Dong *et al.*, 2004), nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (Kiyooka *et al.*, 1999), Leberkarzinomen (Dai *et al.*, 2001) und Mammakarzinomen (Roos *et al.*, 1998) gemacht.

Fragestellung

Die Aktivität der Telomerase wird über die Expression ihrer katalytischen Untereinheit (TERT, telomerase reverse transcriptase) reguliert, die in menschlichen somatischen Zellen herunterreguliert, in den meisten menschlichen Tumoren aber hoch exprimiert ist. In einigen humanen Tumoren korreliert die Aktivierung der Telomerase mit dem Verlust der Wildtyp p53 Funktion und *in vitro* Analysen zeigen, dass ektoxische Überexpression von Wildtyp p53 in humanen Tumorzellen zu einer rapiden Abnahme der *TERT* Genexpression führt. Auf der anderen Seite geht die Inaktivierung von p53 durch Mutationen in der DNA Bindungsdomäne mit einer erhöhten Telomeraseaktivität einher, was für einen Zusammenhang zwischen p53 und Repression des *TERT* Gens spricht. Darüberhinaus deuten *in vitro* Experimente auf eine potentielle Interaktion von p53 mit dem Telomerasekomplex, insbesondere mit dem Telomerase assoziierten Protein TEP1. In der Literatur wurde bereits über die Regulation des humanen *TERT* Gens durch p53 berichtet. Jedoch sind die molekularen Details der p53-Telomere Interaktionen und der p53-regulierten *TERT* Genexpression sind bislang nicht eindeutig geklärt. Ebenso unklar ist unter welchen physiologischen Bedingungen diese Interaktionen in der Zelle stattfinden.

Unter Einsatz von biochemischen und Zellkulturexperimenten sollte im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden, ob und unter welchen zellulären Bedingungen (z.B. nach genotoxischem Stress) Interaktionen zwischen p53 und Telomerasekomponenten stattfinden. Weiterhin sollte die mögliche transkriptionelle und posttranslationale Regulation der Telomerase durch p53 untersucht werden.

Methodisch sollten diese Fragestellungen mit Hilfe von Zellkultur- und biochemischen Experimenten, v.a. durch Bestimmung der Telomeraseaktivität *in vitro* (TRAP-Assay) bei Zugabe von gereinigtem p53 Proteinen untersucht werden.

Weiterhin soll die mögliche transkriptionelle und posttranslationale Regulation der Telomerase durch p53 mit Hilfe von *in vitro* Experimenten (PCR, Western Blot, TRAP-Assay) erschlossen werden. In der Literatur wurde bereits über die Regulation des humanen *TERT* Gens durch p53 berichtet. Wie und wann diese Regulation erfolgt ist bislang nicht geklärt und soll in dieser Arbeit untersucht werden. p53 kann die Repression von Genen entweder durch Sequenz-spezifische Promotorbindung (Peterson *et al.*, 2003) oder durch Beeinflussung von DNA-Bindungseigenschaften von Transkriptionsfaktoren vermitteln (Kim & Deppert, 2003).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Biologisches Material

Zellen

H1299

Etablierte Zelllinie eines humanen kleinzelligen Bronchialkarzinoms.

Die Induktion mit Tetrazyklin oder Doxyzyklin führt bei H1299-wtp53-Zellen zu einer Überexpression des Tumorsuppressorproteins p53 (s. Abschnitt 2.5.2.1., T-Rex-System).

HCT 116

Zelllinie eines humanen Kolonkarzinoms. Es gibt p53^{+/+}-, p53^{-/-}- und p53^{+/-}-Zelllinien. In den Experimenten wurden die p53^{+/+}- und p53^{-/-}-Zellen verwendet.

HeLa

Humane Tumorzelllinie aus einem Zervixkarzinom (ATCC: CC2TM). Die Zellen sind Telomerase positiv.

2.1.2 Molekularbiologisches Material

Enzyme

E. coli RNaseH

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Proteinase K

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Taq-DNA-Polymerase

Eppendorf, Hamburg

Trypsin (1: 250) 2,5 % (w/v)

Biochrom AG, Berlin

Peptide

In den TRAP-Assays wurden folgende Peptide eingesetzt:

TEP1-5 ^{385wt}HRAKRHPRRPPRSPG
 TEP1-6 ^{385m}HRAKAHPARPPASPG
 TEP1-7 ^{385m2}HAAALAHPARPQASPG
 TEP1-8 ⁹⁴³WGVTEEETRRNRQLEVC

Diese synthetischen Peptide wurden für die Experimente freundlicherweise von Dr. Heukeshoven (†2006) im Heinrich-Pette-Institut hergestellt.

Größenmarker

Gene Ruler TM 100 bp DNA-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot
Gene Ruler TM 1 kbp DNA-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot
SDS 7B Prestained Mixture	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Kits

DC-Protein Assay	Biorad, München
Erase-It TM Background Eliminator Pierce	Biotechn., Rockford IL, USA
PeqGOLD RNA PURE solution	Peqlab, Erlangen
ThermoScript TM RT-PCR System	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TRAPeze Telomerase Detection Kit	Qbiogene, Heidelberg
Turbo DNA-free TM	Ambion, Austin TX, USA

Antikörper

Für die Durchführung der Western Blots wurden folgende Antikörper eingesetzt:

Primäre Ak: PAB 1801: Monoklonaler Anti-p53 (Maus), 1:1000
 SC 6243: Monoklonaler Anti-p53 (Kaninchen), 1:500

SC 6246: Monoklonaler Anti-p21 (Maus), 1:500

SC 1616: Monoklonaler Anti-Aktin (Ziege), 1:500

Sekundäre Ak: Anti-Hase (aus Esel), 1:10000

Anti-Maus (aus Esel), 1:10000

Anti-Ziege (aus Esel), 1.5000

Primer

Für die PCR-Reaktionen wurden folgende Primer eingesetzt (PCR-Produkt):

GAPDH-For: ACCACAGTCCATGCCATCAC (452 bp), 23 Zyklen

GAPDH-Rev: TCCACCACCCTGTTGCTGTA

hTERT-For: TCTGGATTTGCAGGTGAACAGCC (451 bp), 33 Zyklen

hTERT-Rev: GGGTGGCCATCAGTCCAGGATGG

p53 6U1-For: Pos. 2472 (270bp), 30 Zyklen

p53 8L2R-Rev: Pos. 3733

2.2 Chemikalien

Die Experimente wurden mit handelsüblichen Chemikalien folgender Firmen durchgeführt: Fluka (Seelze), Gibco (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München). Außerdem wurden folgende Materialien für die Experimente eingesetzt:

[α - ³² P] dCTP	Hartmann Analytics, Braunschweig
Bradford Reagenz	BioRad, München
DMEM	Gibco (Invitrogen GmbH), Karlsruhe
DMSO	Calbiochem, San Diego, USA
peqGOLD dNTP-Set (je 25 μ mol)	Peqlab, Erlangen

2.3 Lösungen und Puffer

Block-Puffer (Western Blot)	5 % (w/v) Magermilchpulver in 1 × TBST
DEPC-H₂O	0,1 % (v/v) DEPC in H ₂ O _{deion} über Nacht bei RT, autoklavieren
DMEM + 5 % FCS	3,38 g/l DMEM-Pulver 3,7 g/l NaHCO ₃ in H ₂ O _{deion} , pH 7,3 sterilfiltrieren 5 % (v/v) FCS
dNTP-Mix	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP
5 × DNA-Gelladepuffer	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 30 % (v/v) Glycerol
FACS-PBS	0,1 % (w/v) EDTA in PBS
Pi-Färbelösung	PBS + 1:15 Pi(Propidiumiodid)-Stock + 1:30 RNaseA-Stock
Pi-Stock	0,5 mg/ml Pi in Natriumcitrat 380 mM, pH 7,0

10 × PBS	1,37 M NaCl 0,027 M KCl 0,08 M Na ₂ HPO ₄ 0,015 M KH ₂ PO ₄
RNaseA-Stock	10 mg/ml nach Maniatis (v/v) Glycerol
5 × RNA-Gelladepuffer	1 Spatelspitze Bromphenolblau 1 × Gebrauchslösung : 3µl 5 × RNA-Gelladepuffer 50 % 12µl Formamid
SDS-Page Laufpuffer	25 mM Tris HCl 200 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer	1 M Tris-HCl (pH 8,0) 0,9 % (w/v) DTT 34 % (v/v) Glycerol 1 % (w/v) SDS 0,01 % (w/v) Bromphenolblau
SDS-PAGE-Sammelgel	0,1 % (w/v) SDS 4 % (v/v) Acrylamid (30 %) 130 mM Tris-HCl 0,09 % (w/v) APS 0,3 % TEMED
SDS-PAGE-Trenngel	0,1 % (w/v) SDS 4 % (v/v) Acrylamid (30 %) 130 mM Tris-HCl (pH 8, 0) 0,05 % (w/v) APS 0,12 % TEMED

TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat, pH 8,0 1 mM EDTA
TBE-Puffer	89 mM Tris 89 mM Borsäure 2 mM EDTA, pH 8,0
10 × TBST	0,2 M Tris-HCl, pH 7,4 1,37 M NaCl pH 7,6 einstellen 1 % (v/v) Tween 20
TE	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 8,0 0,1 % (w/v) Trypsin 0,5 mM EDTA in 1 × PBS

2.4 Geräte

Brutschrank B6060	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Entwicklermaschine	Classic E.O.S.AGFA, Köln
Eismaschine AF 30	Scotsman, Vernon Hills, USA
Feinwaage H53AR	Mettler Toledo, Gießen
Filterpapier Whatman 3MM	Schleicher & Schüll, Dassel
Gamma-Zähler LS 6500	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Gefrierschrank -80 °C	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Gefriertruhe -80 °C	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Geldokumentation BioDocAnalyze	Whatman Biometra, Göttingen
Gelkammer Prot. Resolve Maxi DC	Phase, Lübeck
Gelkammer Model 40-0911	Peqlab, Erlangen
Gelkammer Horizon 11.14	Whatman Inc., Dassel
Geltrockner G2000	Fröbel Labortechnik, Lindau
Handschuhe Latex, Nitril	Kimberly-Clark, Zaventem, B
Heizblock Techne Dri-Block DB 2A	Thermo-Dux, Wertheim
Imaging Plate Bas-IP MP2040P	Fuji Magnetics, Kleve
Inkubationsschüttler Multitron 2	Infors AG, Bottmingen-Basel, CH
Kühlfalle RT100A	Savant Instruments, Farmingdale, NY, USA
Kühlschrank 4-8 °C	Liebherr, Biberach
Magnetrührer COMBIMAG NEO	IKA, Staufen
Magnetrührer MR2002	Heidolph, Schwabach
Membran-Vakuumpumpe MZ2C/1,7	Vakuumbrand, Wertheim
Mikroskop IMT-2	Olympus, Hamburg
Mikroskop CK 40	Olympus, Hamburg
Mikrowelle NN3256	Panasonic, Hamburg
Mini-Transilluminator	BioRad, München
Orbitalschwenker Polymax 2040	Heidolph, Schwabach
PCR Gefäße 0,2 ml	Biozym, Hess, Oldendorf
PCR Maschine PTC-200	MJ Research, Watertown MA, USA
pH-Meter PHM82 Standard	Radiometer, Kopenhagen, DK
Phosphoimager Bas 2500	Fuji Magnetics, Kleve

Pipetten 20, 200, 1000 µl	Gilson, Bad Camberg
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald
Reaktionsgefäße 1,5, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagenz- und Zentrifugenröhrchen 15, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilme	CEA Deutschland GmbH, Hamburg
Reinwassersystem Milli-Q ^R Academic	Millipore, Schwalbach
Schwenker GFL3015	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Spectrophotometer Ultrosec 3000pro	Amersham pharmacia biotech, NY, USA
Sterilbank HERA safe KS18	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Sterilbank HERA safe KS12	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Superfrost- Objektträger	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank -20 °C	Liebherr, Biberach
Vortexer Vortex-Genie	Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Waage PE360	Mettler Toledo, Gießen
Waage PM460	Mettler Toledo, Gießen
Waage PB3001-S/FACT	Mettler Toledo, Gießen
Wasserbad GFL1003	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zellkulturschalen	Nunclon TM Surface, Nunc, Roskilde, DK
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments, Düsseldorf
Zentrifuge RC50 Plus	Sorvall, Bad Homburg
Zentrifuge 4 °C 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 4 °C 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Omnifuge 2.0RS	Heraeus Instruments
Zentrifuge Rotana 96	Hettrich Zentrifugen, Tuttlingen

2.5 Methoden

2.5.1 Zellbiologische Methoden

2.5.1.1 Die Zellkulturen

Die **Kultivierung der Zellen** erfolgte nach den Standardmethoden. Die Zellen wurden für optimale Wachstumsbedingungen in Inkubatoren bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Alle Zellen wurden mit DMEM-Medium mit 5 % FCS versorgt. Die H1299wtp53-Zellen wurden in Selektionsmedium mit Zeozin (250 µg/ml) und Blastizidin (3 µg/ml) gehalten. Um permanentes Wachstum durch Teilung zu ermöglichen, wurden die Zellen, je nach Zelllinie, alle 3 bis 4 Tage geteilt und erneut 1:10 auf 10 cm-Schalen ausgesät. Vor jeder Teilung wurden die Zellen mit PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) gewaschen. Das Ablösen der adhären wachsenden Zellen erfolgte durch Zugabe von 1 ml Trypsin auf eine 10 cm Schale. Danach wurde das Trypsin sofort wieder abgesaugt, so dass die Zellen nur noch von einer dünnen Schicht bedeckt wurden. Nach einer kurzen Einwirkzeit wurden die abgelösten Zellen wieder in Medium aufgenommen und auf neue Schalen verteilt.

Beim **Ernten der Zellen** für die Proteinextraktion wurden die Zellen vor dem Trypsinieren zwei Mal mit PBS gewaschen, für die Gewinnung von RNA nur mit Medium. Die gelösten Zellen wurden nach dem Trypsinieren in PBS bzw. Medium aufgenommen und 15 min bei 300 xg runterzentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellpellets bei -80° eingefroren, sofern nicht gleich mit der weiteren Prozedur fortgefahren wurde.

Das **Einfrieren der Zellen** erfolgte durch Resuspension der Zellpellets in FCS mit 10% (v/v) DMSO und Abfüllen von jeweils 1,5 ml in Kryoröhrchen. Diese wurden anschließend langsam heruntergekühlt, um letztlich in flüssigem Stickstoff gelagert zu werden.

Zum **Auftauen der Zellen** wurden die Kryoröhrchen kurz im Wasserbad bei 37°C gehalten und anschließend zum Verdünnen des DMSO in 5 ml Medium getropft und durch Zentrifugation pelletiert. Das Zellpellet wurde dann in Medium resuspendiert und auf eine neue Schale gegeben.

2.5.1.2 Das T-Rex-System

Bei dem T-Rex-System handelt es sich um ein Tetrazyklin- bzw. Doxyzyklin-induzierbares System zur Expression von wtp53 in H1299-Zelllinien (etabliert von Frau Dr. Maria Brazdova in der Abteilung für Tumorstudiologie von Prof. Dr. W. Deppert). Grundlage hierfür sind zwei in das Genom der Wirtszellen integrierte Vektoren:

- 1) Der regulatorische Vektor pcDNA6TR mit Blastizidin-Resistenz-Gen, der den Tetrazyklin-Repressor TetR kodiert.
- 2) Der induzierbare Expressionsvektor pcDNA4TO mit Zeozin-Resistenz-Gen und zwei TetR *operator sites*, der für das Transgen kodiert.

Die stabile Integration der Vektoren in den H1299-Zellen wurde durch ein Zeozin (250 µg/ml) und Blastizidin (3 µg/ml) enthaltendes Selektionsmedium (DMEM + 5% FCS) aufrechterhalten. Die Induktion des Expressions-Vektors erfolgte mit 1µg/ml Tetrazyklin.

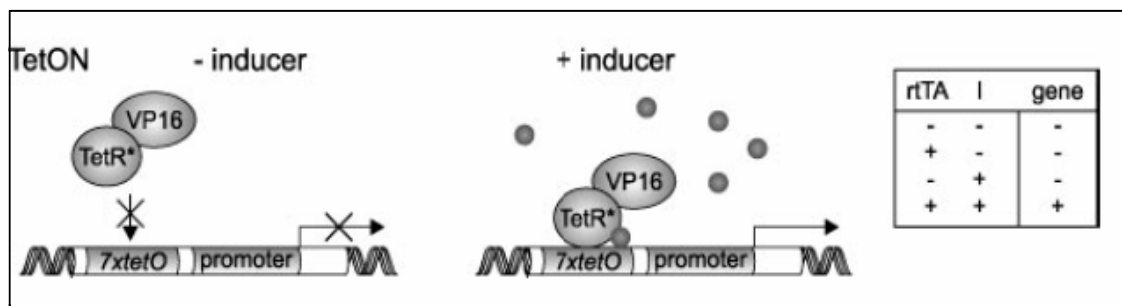


Abb. 9 Schematische Darstellung des T-Rex-Systems. Das rtTA-Protein ist nur in der Lage den Operator (TRE, *Tetrazyklin Response Element*) zu binden wenn es durch Tetrazyklin oder seinem Analogon Doxyzyklin gebunden wird. Dies führt zu der Expression des gewünschten Transgens in unveränderter, nicht toxischer Form, allerdings auch in unphysiologisch hohen Mengen. Das System basiert auf einer mutierten Form des Tet-Repressors mit der gleichen DNA-Bindungsspezifität aber veränderter Regulation der DNA-Bindung durch Tetrazyklin (*Tet-on*).

2.5.2 Molekularbiologische Methoden

2.5.2.1 RNA-Isolierung und RT-PCR

Für die Gewinnung von ca. 50 µg RNA wurden 1×10^6 Zellen eingesetzt. Die Isolierung der RNA erfolgte nach dem Protokoll von PeqGold. Anschließend wurde zur Vermeidung einer DNA-Kontamination ein DNaseI-Verdau mit Turbo DNA-freeTM durchgeführt. Anhand eines 1 %igen Agarose-Gels mit TBE- Puffer wurde zunächst die Qualität der RNA überprüft. Zuvor wurde die RNA in Ladepuffer 5 min bei 70 °C erhitzt, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Die Herstellung der cDNA erfolgte dann mit dem ThermoScriptTM RT-PCR System. Es wurde 1 µg RNA eingesetzt. Die Reaktion lief 1 h bei 50 °C in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 100 ng oligo(dT)₂₀. Durch 15 minütige Inkubation bei 75 °C wurde die Aktivität der reversen Transkriptase gestoppt. Die verbleibende RNA wurde dann durch zwei Einheiten RNaseH bei 37 °C für 15 min verdaut. In der darauf folgenden PCR-Reaktion wurden 2 µl cDNA eingesetzt.

2.5.2.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der RNA-Konzentrationen erfolgte photometrisch durch das Messen der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm am Nanodrop. Hierbei wurden 2 µl RNA unverdünnt auf die vorgegebene Fläche getropft. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht etwa 40 µg/ml RNA. Für die RT-PCR wurde insgesamt 1 µg RNA eingesetzt.

2.5.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)** dient der spezifischen Amplifikation von DNA-Fragmenten *in vitro*. Die hierzu erforderliche hitzestabile DNAPolymerase ist die Taq-Polymerase, die die DNA-Synthese bei hohen Temperaturen erlaubt.

Zunächst wird die zu amplifizierende DNA bei 94 °C denaturiert, so dass die doppelsträngige DNA einzelsträngig wird. Im zweiten Schritt wird die Temperatur gesenkt (je nach Primer 40-70 °C), um ein Hybridisieren der Oligonukleotid-Primer an die Ziel-DNA zu ermöglichen. In der darauf folgenden Elongationsphase (ca. 72 °C) synthetisiert die Taq-Polymerase den komplementären Gegenstrang. Die Zahl der Amplifikate wächst exponentiell mit jedem PCR-Zyklus. Für die Standard-PCR wurden folgende Komponenten eingesetzt:

1 x PCR-Puffer, dNTP's (0,2 mM), Primer For/Rev (0,2 µM), 10 % DMSO, Taq-Polymerase (1 Einheit), ggf. 0,1 MBq [α -³²P] dCTP. 2 µl der cDNA und als Positivkontrolle bis zu 10 pg Plasmid-DNA wurden für RT-PCR-Analysen eingesetzt.

Standard PCR-Programm:

94 °C 2 min (Initiale Denaturierung)

94 °C 30 sec (Denaturierung)

55 °C 30 sec (Hybridisierung)

72 °C 1 min (Elongation)

} 23–35 Zyklen

Der lineare Bereich der Amplifizierung wurde für jede PCR im Vorwege bestimmt und lag bei nicht-radioaktiven PCR's zwischen 23 und 35 Zyklen und bei radioaktiven PCR's zwischen 19 und 28 Zyklen. Der Vorteil radioaktiver PCR's ist, dass es sich um eine sehr sensitive Methode handelt, die eine Quantifizierung der PCR-Produkte erlaubt. Im Anschluss an die PCR wurden die PCR-Produkte in einem Agarosegel (nicht-radioaktive PCR) bzw. einem 4 %igen PAA-Gel (radioaktive PCR) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit Ethidiumbromid (nicht-radioaktive PCR) oder bei radioaktiven PCR's mit Hilfe von Röntgenfilmen oder einer „Imaging Plate“ im „Phosphoimager“. Die Expressionsmengen wurden auf das ubiquitäre Haushaltsgen *GAPDH* (Ercolani *et al.*, 1988) mit Hilfe des Programms TINA 2.0 (Raytest, Straubenhardt) normalisiert.

2.5.2.4 DNA-Gelelektrophorese

DNA wandert im elektrischen Feld aufgrund des negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrats zum Pluspol. Als Matrix verwendet man meistens Agarosegele, die eine Auftrennung der DNA nach ihrem Molekulargewicht ermöglichen.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA hängt von ihrer Größe und Faltung, der Agarosekonzentration, den Pufferbedingungen und der Stromstärke ab. Lineare, doppelsträngige DNA-Moleküle wandern mit einer Geschwindigkeit durch die Agarosematrix, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größen ist. Für PCR-Analysen wurde der Ansatz mit 5 x Gelladepuffer versetzt und auf ein 1-2 %iges Agarosegel aufgetragen. Zur Gelherstellung wurde TAE oder TBE als Puffersystem benutzt. Zusätzlich enthielt das Agarosegel Ethidiumbromid (0,5 µg/ml), das in die DNA interkaliert, so dass sie unter UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. Die Elektrophorese erfolgte bei 10 V/cm Gellänge. Als Größenstandard dienten die „Gene Ruler™ 100 bp und 1 kbp“ DNA-Leitern.

2.5.3 Proteinbiochemische Methoden

2.5.3.1 Der TRAP-Assay

Der TRAP (Telomer repeat amplification protocol)-Assay ist eine auf der reversen Transkriptase Funktion der Telomerase basierende Nachweismethode der enzymatischen Aktivität der Telomerase. Bei dieser Methode wird ein synthetisches Oligonukleotid, das die Telomer-DNA darstellt, als Substrat mit Zellkern- oder Gesamtzellextrakten inkubiert und von der Telomerase durch die Addition der 6 bp-Nukleotidfolgen (nämlich der repetitiven Telomer-Sequenz TTAGGG) verlängert, wenn die Extrakte Telomerase positiv sind (s. Abb. 10). Die verlängerten Produkte werden dann in einem zweiten Schritt mittels PCR amplifiziert und auf einem 10 %igen PAA-Gel aufgetrennt, was als eine DNA Leiter zu sehen ist. Durch den Einsatz von radioaktiven Nukleotiden ($[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP) ist dies eine sehr sensitive und semi-quantitative Nachweismethode der Telomeraseaktivität.

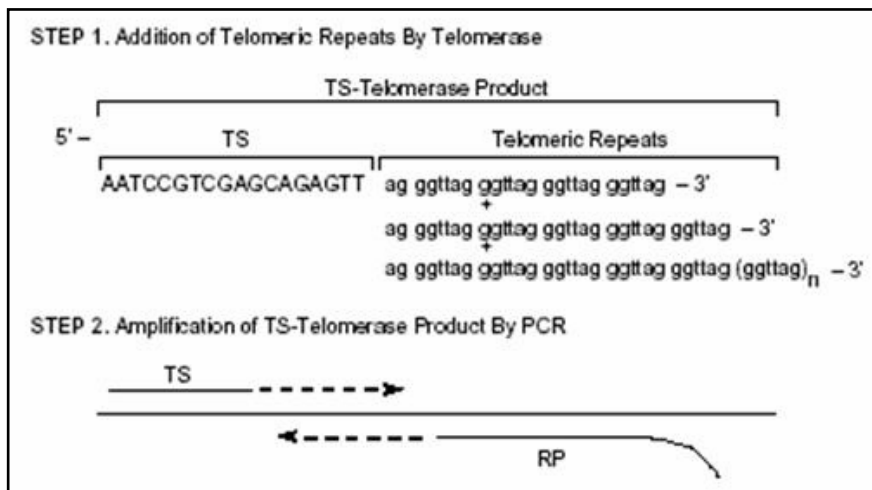


Abb. 10 Schematische Darstellung des TRAP-Assay (aus TRAPeZe™-Kit der Firma Chemicon). TS steht für Template Sequence (synthetisches Oligonukleotid) und RP steht für Reverser Primer.

Der TRAP-Assay wurde nach dem Protokoll der Firma Chemicon durchgeführt.

2.5.3.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration von Zellextrakten wurde eine Eichgerade im Bereich von 1 bis 10 µg mit BSA erstellt. Dazu wurden 1 bis 10 µg BSA in 800 µl H₂O_{deion} mit je 200 µl Bradford-Reagenz versetzt (Bradford, 1976), und die OD₅₉₅ wurde nach 5 minütiger Inkubation photometrisch bestimmt. 1 µl der Zellextrakte wurde mit 799 µl H₂O und je 200 µl Bradford-Reagenz versetzt und photometrisch bei 595 nm gemessen. Mit Hilfe der Eichgeraden konnte die Proteinkonzentration berechnet werden.

Im Western Blot wurden 30 µg Gesamtprotein eingesetzt. Im TRAP-Assay wurden 200 ng Gesamtprotein eingesetzt.

2.5.3.3 Der Western Blot

Die Zellextrakte wurden zunächst in 2-fachem Probenpuffer verdünnt und anschließend für 5 min bei 95 C° erhitzt. Danach wurden 30 µg Gesamtprotein auf ein 10 %iges PAA-Gel für einen p53-Western Blot bzw. ein 13 %iges PA-Gel für einen p21-Western Blot aufgetragen. Als Marker diente hierbei der SDS7B-Marker und als Positivkontrolle gereinigtes wtp53-Protein bzw. p21-Lysat. Das Sammelgel lief bei 2 mA, das Trenngel bei 4 mA für insgesamt 2½ h. Nachdem die Proteine aufgetrennt waren, wurden sie auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran bei 60 V für 70 min geblottet. Die unspezifischen Bindungsstellen für die Antikörper wurden dann mindestens 30 min lang mit 5 % Magermilch in 0,2 % TBST geblockt. Anschließend wurde die Membran im Erstantikörper über Nacht bei 4 C° geschwenkt. Darauf folgten 3 Waschvorgänge mit 0,1 %igem TBST à 15 min. Der Zweitantikörper wurde bei Raumtemperatur 1 h lang inkubiert, worauf dann noch einmal die 3 Waschschritte folgten. Die markierten Proteine auf der Membran wurden anschließend mit PIERCE-Lösung als Banden auf einem Röntgenfilm dargestellt. Je nach Belichtungszeit des Films konnte die Intensität der Signale gesteuert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Interaktionen des Tumorsuppressorproteins p53 mit Telomerasekomponenten

Es konnte bereits gezeigt werden, dass p53 mit dem humanen TEP1 Protein, der als Telomerase assoziierte Komponente bezeichneten Untereinheit der Telomerase, *in vitro* eine Bindung eingehen kann. Die dadurch mögliche Interaktion zwischen p53 und der Telomerase könnte eine posttranslationale Regulation der Enzymaktivität zur Folge haben (Li *et al.*, 1999). Ob und unter welchen zellulären Bedingungen diese Interaktionen in der Zelle vorkommen, ist bislang unklar. Es ist ebenfalls unklar, ob weitere Telomerasekomponenten an diesen potentiellen Interaktionen beteiligt sind. Eine weitere Frage betrifft die subnukleäre Lokalisation möglicher Interaktionspartner: Vor allem für Telomerase wurde eine Zellzyklus abhängige Lokalisation in den Nukleoli normaler Zellen beschrieben, wogegen in transformierten Zellen (vor allem in SV40-T-Ag transformierten Zellen, bei denen wtp53 inaktiv ist) Telomerasekomponenten im Nukleoplasma verteilt sind.

Mögliche Interaktionen von p53 mit Telomerasekomponenten wurden im Folgenden untersucht.

3.1.1 wtp53 hemmt die Telomeraseaktivität *in vitro*

Um den Effekt von p53 auf die Telomeraseaktivität *in vitro* zu untersuchen, eignet sich die Methode des TRAP-Assays am besten (s. Abschnitt 2.5.3.1.). In diesen Experimenten wurde der radioaktive TRAP-Assay mit [α -³²P]-markierten dCTP durchgeführt, der eine sehr sensitive Detektion der Telomeraseaktivität ermöglicht. Ist diese in den Zellen vorhanden, bildet sich in der Gelelektrophorese ein Leitermuster, welches nach Anzahl der Leitersprossen und Intensität des Musters zu bewerten ist. Je mehr Sprossen vorhanden sind und je intensiver sich die Leiter darstellt, umso stärker ist die Telomeraseaktivität. Es wurden in den ersten Experimenten Telomerase positiven Kernextrakten (KE) aus humanen HeLa-Zellen unterschiedliche Konzentrationen von gereinigtem wtp53 hinzugefügt. Dieses wurde

freundlicherweise von Frau Dr. Maria Brazdova und Herrn Lars Tögel zur Verfügung gestellt. Der TRAP-Assay zeigt eine deutliche Inhibition der Telomeraseaktivität bei Zugabe von 5 und 1 ng gereinigten wtp53, wobei dieser Effekt konzentrationsabhängig ist (s. Abb.11a). Der inhibierende Effekt von p53 auf Telomeraseaktivität *in vitro* ist an der abnehmenden Intensität des Leitemusters, sowie an der Abnahme der Sprossen erkennbar (s. Abb. 11a). Das heißt, je mehr gereinigtes wtp53 zu den Telomerase positiven Kernextrakten zugefügt wird, umso weniger Telomeraseaktivität ist detektierbar. Dieser Effekt ist sowohl bei einer Konzentration der Kernextrakte von 20 ng/ μ l, als auch bei einer Konzentration von 5 ng/ μ l zu sehen. Es ist jedoch ein signifikanter Unterschied in der inhibierenden Wirkung des wtp53 auf die Telomeraseaktivität in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten HeLa-Kernextrakten zu erkennen: Bei 20 ng/ μ l HeLa-Kernextrakte, der höheren Konzentration, ist der Effekt sichtlich geringer, als bei 5 ng/ μ l HeLa-Kernextrakte (s. Abb. 11a) Die Volumina aller Proben sind gleich (50 μ l). Dieser beinhaltet jeweils 2 μ l HeLa-Kernextrakte (20 oder 5 ng/ μ l) und 2 μ l gereinigtes wtp53. Die Pufferbedingungen waren somit überall gleich.

Ein Charakteristikum der Inhibition von Telomeraseaktivität durch p53 ist eine im TRAP-Assay nur unter diesen Bedingungen erkennbare unspezifische Bande, die unterhalb der 50 bp-Bande (Hauptbande der Telomeraseaktivität, s. Abschnitt 2.5.3.1) verläuft und deren Bedeutung bislang unklar ist (s. Abb. 11a). Die Intensität dieser Bande scheint mit der Höhe der Konzentration von wtp53 zuzunehmen.

Durch die Zugabe von BSA, anstatt des gereinigten wtp53, konnte im zweiten Versuch ein unspezifischer „Protein-Effekt“ auf die Telomeraseaktivität ausgeschlossen werden (s. Abb. 11b). Hier zeigt sich kein inhibierender Effekt von BSA auf die Telomeraseaktivität, was auf eine spezifische Inhibition von wtp53 auf die Telomeraseaktivität schließen lässt.

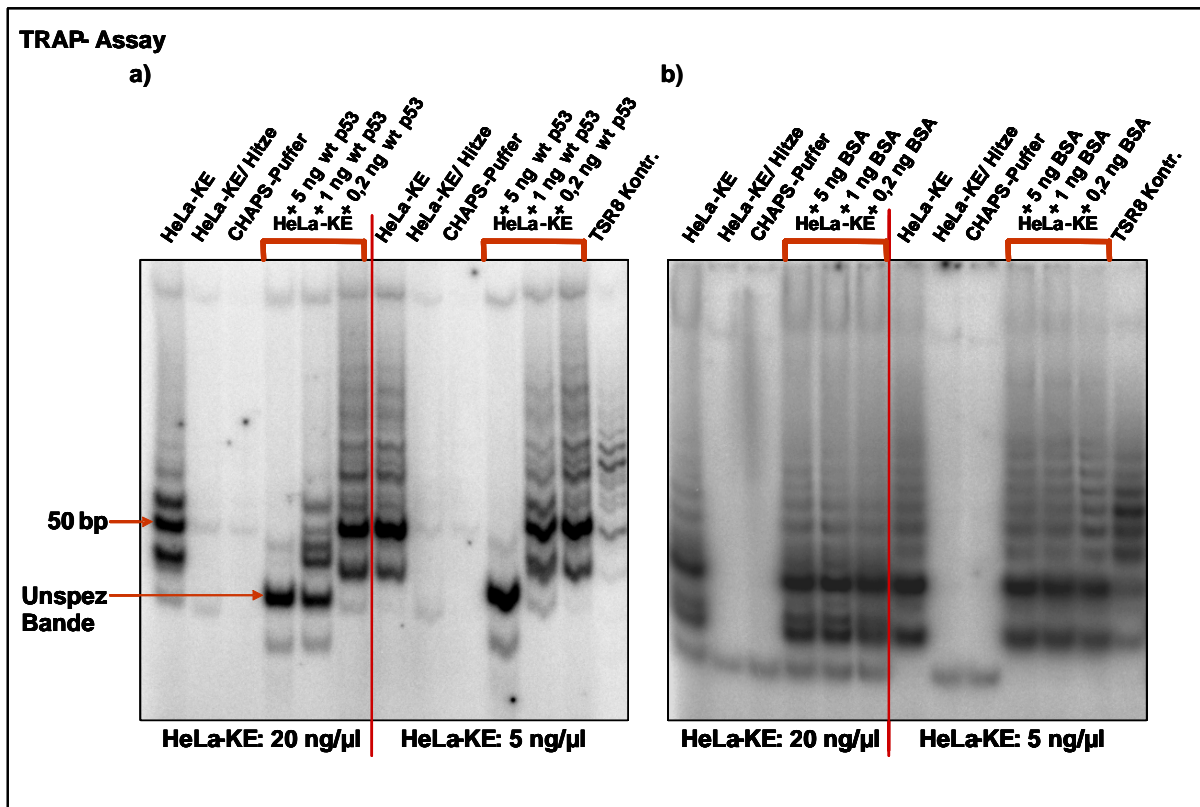


Abb. 11 wtp53 hat einen hemmenden Einfluss auf die Telomeraseaktivität

- a) Die Zugabe von gereinigtem wtp53 in steigender Konzentration zu Telomerase positiven HeLa-Kernextrakten (HeLa-KE) zeigt eine Abnahme der Telomeraseaktivität. Hitze-inaktivierte Kernextrakte und CHAPS-Puffer sind Negativkontrollen, TSR8 ist eine Positivkontrolle.
- b) Der gleiche Versuch mit BSA anstatt von wtp53 zeigt keine Abnahme der Telomeraseaktivität.

3.1.2 mutp53 hemmt die Telomeraseaktivität *in vitro*

Als nächstes wurde untersucht, ob auch bestimmte Mutanten des Tumorsuppressorproteins p53 imstande sind, die Telomeraseaktivität *in vitro* zu inhibieren. Hierzu wurde der gleiche Versuch durchgeführt wie oben beschrieben (s. Abschnitt 3.1.1). Anstelle des gereinigten wtp53 wurden mit derselben Prozedur aufgereinigte p53-Mutanten^{R273H} und ^{G245S} eingesetzt. Im TRAP-Assay zeigte sich deutlich ein ähnlicher Effekt beider p53-Mutanten auf die Telomeraseaktivität, wie der von wtp53. Bei Zugabe von 5 bzw. 1 ng mutp53 kommt es zu einer Hemmung der Telomeraseaktivität (s. Abb.12). Bei Zugabe von 0,2 ng mutp53 ist die

Telomeraseaktivität wieder vergleichbar intensiv, wie bei der Positivkontrolle HeLa-Kernextrakte (HeLa-KE), jedoch sind dort weniger Leitersprossen erkennbar (s. Abb. 12). Im direkten Vergleich zueinander erscheint die inhibierende Wirkung von mutp53^{G245S} jedoch etwas stärker als die von mutp53^{R273H} (s. Abb.12). Dieses könnte daran liegen, dass die beiden Proteine bei der Aufreinigung unterschiedliche Eigenschaften aufweisen und die Konzentration deshalb nicht optimal angepasst war.

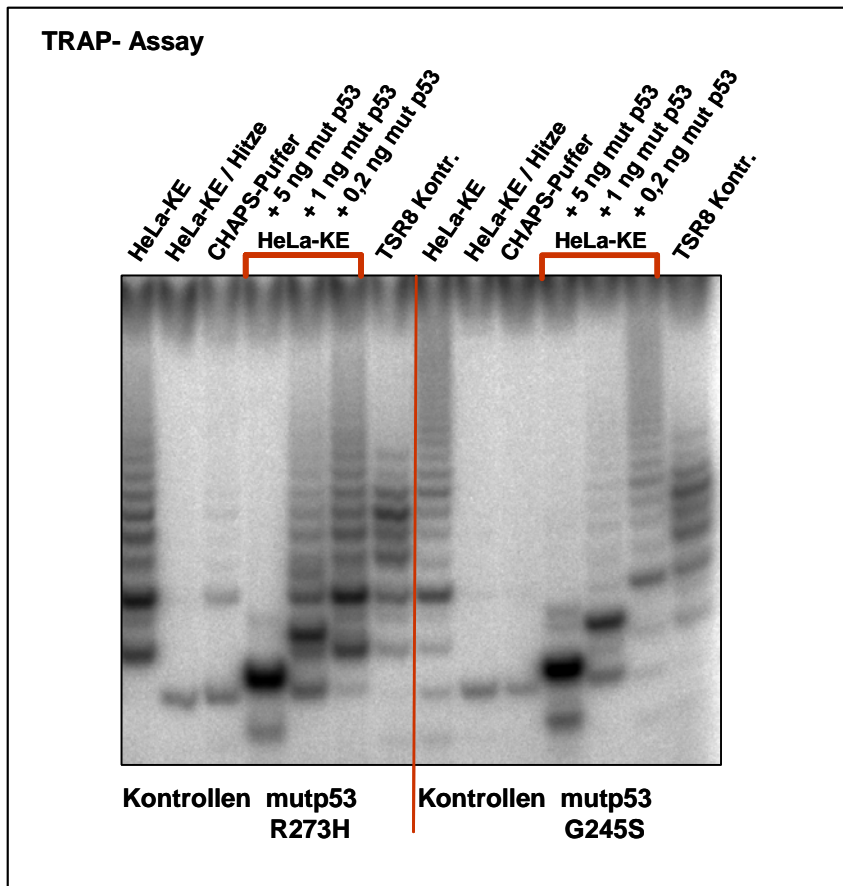


Abb. 12 Der Effekt von mutp53 auf die Telomeraseaktivität Der radioaktive TRAP-Assay zeigt eine inhibierende Wirkung von mutp53^{R273H} und ^{G245S} auf die Telomeraseaktivität. Sie ist vergleichbar mit dem inhibierenden Effekt von wtp53 auf die Telomeraseaktivität. Telomerase positive Kernextrakte aus HeLa-Zellen und TSR8 sind Positivkontrollen. Hitzeinaktivierte HeLa-KE und CHAPS-Puffer sind Negativkontrollen.

3.1.3 Die Hemmung der Telomeraseaktivität durch wtp53 kann durch Zugabe von TEP1 Peptiden aufgehoben werden

Es konnte in einem TRAP-Assay bereits gezeigt werden, dass p53 mit dem Telomerase assoziierten Protein TEP1 interagiert (Li *et al.*, 1999). Um die Relevanz dieser Interaktion zu analysieren, wurde in der vorliegenden Arbeit ein ähnlicher experimenteller Ansatz gewählt. Dabei wurde Telomerase positiven Kernextrakten aus humanen HeLa-Zellen gereinigtes wtp53 zusammen mit synthetisch hergestellten TEP1 Peptiden unterschiedlicher Konzentration hinzugefügt.

Hierzu wurden vier verschiedene TEP1 Peptide mit jeweils einer anderen Mutation in der Sequenz synthetisiert (freundlicherweise hergestellt von Dr. Heukeshoven, †2006):

TEP1-5, TEP1-6, TEP1-7 und TEP1-8:

TEP1-5 ^{385wt}HRAKRHPRRPPRSPG

TEP1-6 ^{385m}HRAKAHPARPPASPG

TEP1-7 ^{385m2}HAALAHPARPQASPG

TEP1-8 ⁹⁴³WGVTEEETRRNRQLEVC

Die angegebenen Zahlen (hochgestellt) entsprechen der Position der jeweiligen Aminosäure im TEP1 Protein, wobei TEP1-5 der bereits publizierten Sequenz entspricht. Der Versuchsansatz sollte nun dahingehend ausgebaut werden, zu untersuchen, an welches Peptid und somit an welche Sequenz des TEP1 Peptids p53 binden könnte. Die in Abschnitt 3.1.1 beschriebene inhibierende Wirkung des wtp53 auf die Telomeraseaktivität konnte durch die Zugabe der Peptide aufgehoben werden. Die Proben, in denen zusätzlich zu wtp53 TEP1-5 Peptide hinzugefügt wurden, zeigen das typische Leitermuster, welches im TRAP-Assay die Telomeraseaktivität darstellt. Im Vergleich dazu ist in der Kontrolle mit gereinigtem wtp53, jedoch ohne TEP1 Peptid, ein stark reduziertes Leitermuster zu erkennen (s. Abb. 13). Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass p53 direkt an die freien TEP1-5 Peptide bindet und nicht mehr in der Lage ist, die Enzymaktivität zu beeinträchtigen. Die Proben, die die TEP1-5 Peptide enthalten, jedoch kein wtp53, zeigen eine insgesamt schwächere Telomeraseaktivität im Vergleich zu den Proben, die zusätzlich zu den Peptiden wtp53 enthalten. Dieses Ergebnis lässt eine inhibierende Wirkung von TEP1-5 selbst auf die Telomeraseaktivität im Sinne eines negativen Rückkopplungsmechanismus vermuten.

Anschließend wurde das Ausgangsexperiment mit Einsatz der TEP1-6 bis TEP1-8 Peptide durchgeführt. Hier zeigten sich in den TRAP-Assays keine Hinweise auf eine Bindung von wtp53 an die Peptide. Die Telomeraseaktivität wurde erneut durch p53 inhibiert (Ergebnisse nicht gezeigt).

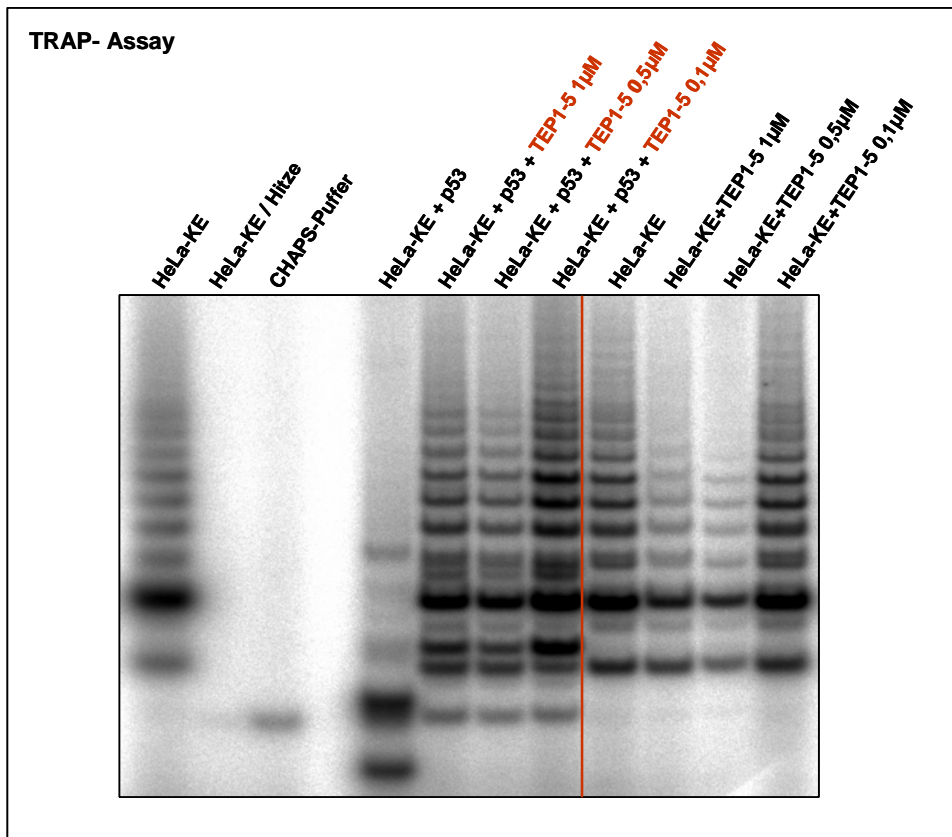


Abb. 13 Der Effekt von TEP1 Peptiden auf die Telomeraseaktivität in Anwesenheit von gereinigtem wtp53. Bei Zugabe von TEP1 Peptiden zu Telomerase positiven Kernextrakten (KE) und gereinigtem wtp53 wird der inhibierende Effekt von p53 auf die Telomeraseaktivität aufgehoben. Rechts zum Vergleich Kernextrakte und TEP1 Peptide ohne Zugabe von wtp53.

3.2 Regulation der Telomeraseaktivität durch p53

3.2.1 Überexpression von p53 in H1299-Zellen korreliert mit der Abnahme der *hTERT* Genexpression

Es wurde bereits publiziert, dass die Telomeraseaktivität auf der Ebene der Transkriptionsinitiation des *hTERT* Gens reguliert wird. Um die Wirkung von wtp53 auf die *hTERT* Genexpression zu untersuchen, wurde ein Zellsystem benutzt, in dem die Expression von wtp53 in H1299-Zellen mit Tetrazyklin induziert werden kann. Hierbei handelt es sich um ein künstliches System zur Überexpression von wtp53 in Tumorzellen (T-Rex-System, s. Abschnitt 2.5.1.2). Die H1299-Zellen exprimieren kein endogenes wtp53. H1299wtp53-Zellen enthalten ein Plasmid und exprimieren nach Induktion mit Tetrazyklin wtp53. Um den Effekt von p53 auf die *hTERT* Genexpression zeitlich verfolgen zu können, wurden die Zellen 0, 3, 6, 16, 24 beziehungsweise 48 Stunden nach Zugabe von Tetrazyklin-Medium geerntet. Im Western Blot wurde zunächst die Induktion von wtp53 bestätigt. Um die funktionelle Aktivität von p53 zu zeigen, wurde die Expression von p21, dem klassischen Ziel-Gen von p53, auf Proteinebene überprüft. Bei Bedarf leitet p53 über p21 im Zellzyklus den Wachstumsarrest ein (s. Abschnitt 1.5). Im Western Blot zeigt sich bei den H1299-Zellen kein p53 Protein (s. Abb. 14). Diese Zellen dienen als Negativkontrolle, weil sie nicht p53 induzierbar sind. Die H1299wtp53-Zellen hingegen zeigen eine zeitpunktabhängige Expression von wtp53 und p21 im Western Blot (s. Abb. 15). Erst bei 3 Stunden nach Induktion ist jeweils eine schwache Bande erkennbar, die nach 6 Stunden stark und nach 16 Stunden am stärksten ist und anschließend bei 24 und 48 Stunden wieder schwächer wird (s. Abb. 15). Dieses hängt damit zusammen, dass p53 in diesen Zellen durch die Induktion mit Tetrazyklin in unphysiologisch hohen Mengen akkumuliert und allmählich die Apoptose einleitet. Die p21 Expression ist insgesamt jedoch schwächer als die p53 Expression.

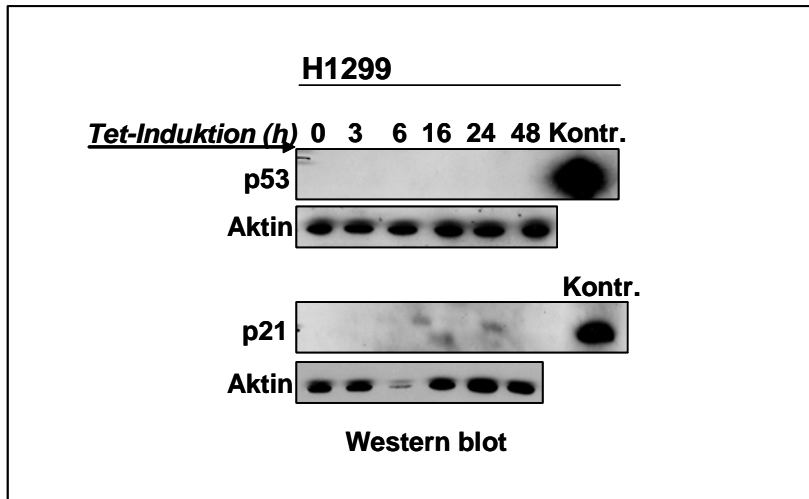


Abb. 14 H1299-Zellen exprimieren nach Induktion mit Tetrazyklin zu keinem gewählten Zeitpunkt wtp53 oder p21. Sie dienen als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle dient gereinigtes wtp53 bzw. p21-Lysat. Ladekontrolle des Western Blots ist Aktin.

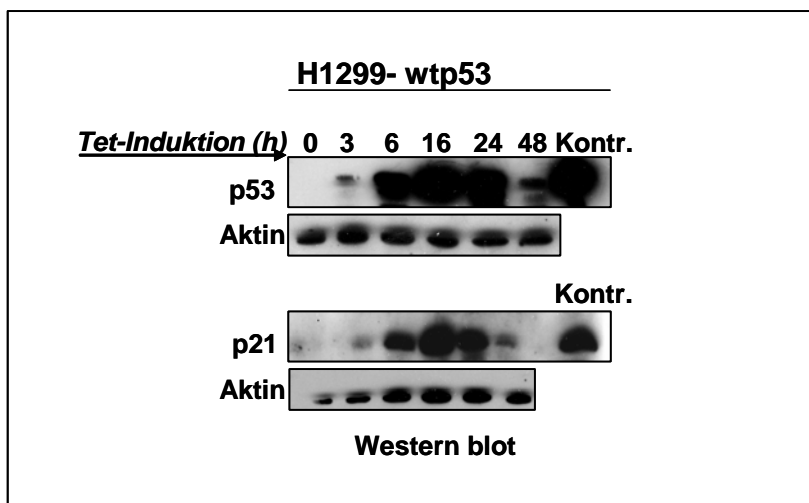


Abb. 15 H1299wtp53-Zellen exprimieren nach Induktion mit Tetrazyklin zeitpunktabhängig unterschiedlich stark wtp53 und p21. Bei 3 Stunden ist eine schwache Bande erkennbar, die bei 6 Stunden stärker und bei 16 Stunden am stärksten ist. Bei 24 Stunden geht die Bande wieder zurück und ist bei 48 Stunden wieder schwach. Als Positivkontrolle dient gereinigtes wtp53 bzw. p21-Lysat. Als Ladekontrolle des Western Blots dient Aktin.

Die Expression von *wtp53* wurde auch mittels RT-PCR überprüft, indem die *p53* mRNA Mengen bestimmt und zur *hTERT* mRNA Menge in Relation betrachtet wurden. Die H1299-Zellen (p53 Null Situation) zeigen keine *wtp53* Expression, jedoch eine deutliche Expression von *hTERT* durchgehend über alle Zeitpunkte (s. Abb. 16). Dagegen kann man in H1299wtp53-Zellen eine deutliche Zunahme von *wtp53* mRNA Mengen beobachten, die zeitpunktabhängig immer stärker wird, was mit der oben beschriebenen Zunahme der p53 Proteinmenge übereinstimmt (s. Abb.16). Ganz im Gegensatz dazu ist *hTERT* mRNA hier nur bei 0 und 3 Stunden gut detektierbar und wird in den späteren Zeitpunkten deutlich schwächer. Da die einzige Variable die Induktion von p53 ist, kann man die Abnahme der *hTERT* mRNA der Zunahme von *p53* zuschreiben. Mechanistisch konnte diese inverse Korrelation zwischen *p53* Zunahme und *hTERT* mRNA Abnahme nicht im Rahmen dieser Arbeit adressiert werden. Folge- und Parallelexperimente in unserer Arbeitsgruppe legen allerdings die Vermutung nahe, dass p53 sowohl direkt wie auch indirekt an der Repression der *hTERT* Genexpression beteiligt ist (siehe Diskussion).

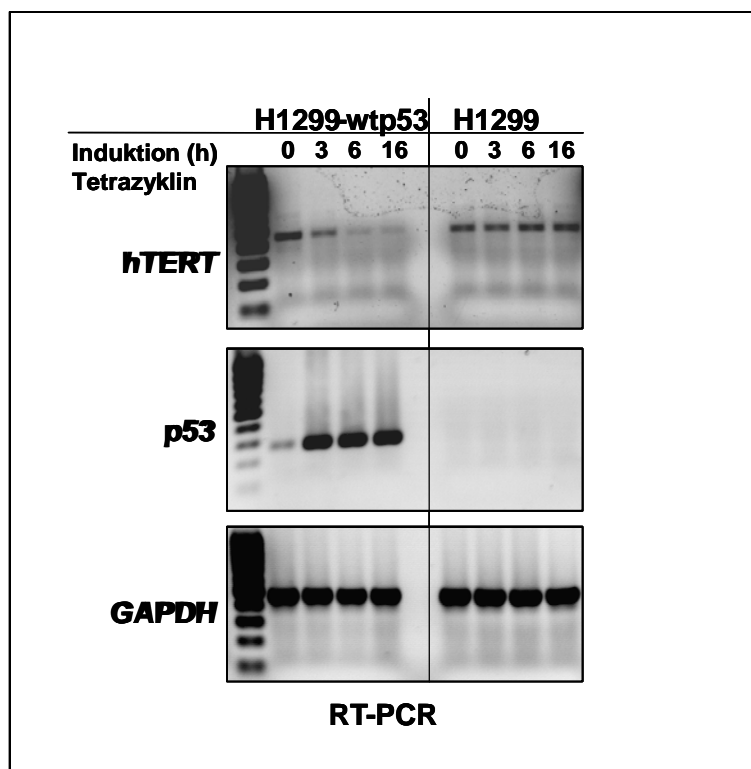


Abb. 16 Die Expression von *wtp53* in H1299wtp53-Zellen korreliert mit der Inhibition der *hTERT* Expression auf Transkriptionsebene. Links eine gleichbleibende Expression von *hTERT* in H1299-Zellen. Rechts die Induktion von *wtp53* in H1299wtp53-Zellen korreliert mit der Repression von *hTERT*. Das Haushaltsgen *GAPDH* dient als Ladekontrolle.

Da die *hTERT* Genexpression der limitierende Schritt bei der Telomeraseaktivität ist, sollte auch gezeigt werden, dass die Abnahme der *hTERT* Genexpression mit der Abnahme der Telomeraseaktivität korreliert. Um die Wirkung von *wtp53* auf die Telomerase auf enzymatischer Ebene zu untersuchen, wurden TRAP-Assays mit Lysaten aus H1299- und H1299wtp53-Zellen durchgeführt. Es wurden jeweils 200 ng Lysat eingesetzt. Wie zu erwarten war, ist bei den H1299-Zellen eine über alle Zeitpunkte der Induktion durchgehend gleich starke Telomeraseaktivität nachweisbar (s. Abb. 17). Bei den H1299wtp53-Zellen ist von 0 bis 16 Stunden eine ähnlich starke Telomeraseaktivität zu sehen, die jedoch bei 24 und 48 Stunden deutlich zurückgeht. Dieses Ergebnis stimmt mit der starken Expression von *wtp53* und der gleichzeitigen Inhibition der *hTERT* Expression überein (s. Abb. 16). Da die Halbwertszeit des Telomerasekomplexes ca. 24 h beträgt und die der *hTERT* mRNA ca. 1 h beträgt (Gunes *et al.*, 2000) erklärt sich, dass in der RT-PCR die *hTERT* Expression schon früher zurückgeht, als die Telomeraseaktivität im TRAP-Assay. Das bedeutet also, dass die Induktion von *wtp53* Expression letztlich eine Abnahme der Telomeraseaktivität zur Folge hat.

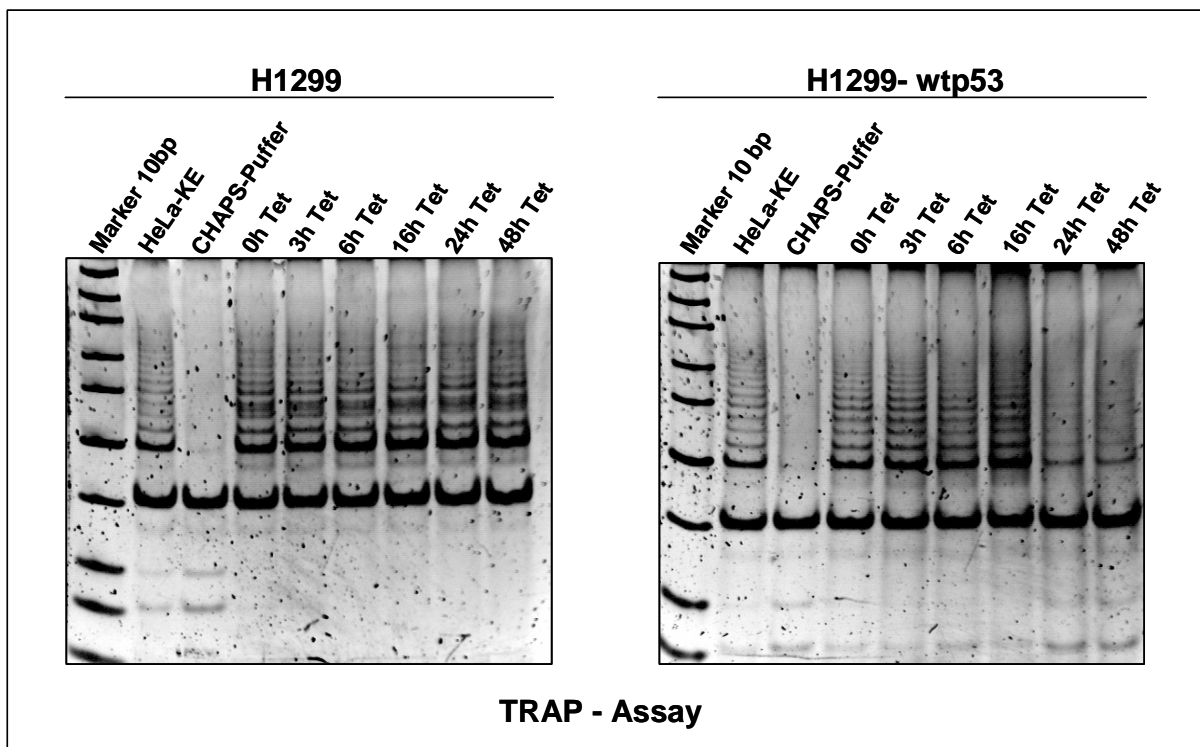


Abb. 17 *wtp53* hemmt die Telomeraseaktivität in H1299wtp53-Zellen 24 und 48 Stunden nach Induktion. Die Telomeraseaktivität ist in den H1299-Zellen zu allen Zeitpunkten gleich intensiv. In den H1299wtp53-Zellen sieht man eine Hemmung der Telomeraseaktivität bei 24 und 48 Stunden nach Induktion. HeLa-KE dienen als Positivkontrolle, CHAPS-Puffer als Negativkontrolle.

3.3 Unter welchen physiologischen Bedingungen reguliert p53 die Telomeraseaktivität?

Die vorausgehenden Experimente haben gezeigt, dass die *hTERT* Expression grundsätzlich durch wtp53 reprimiert werden kann (s. Abb. 16). Physiologisch wird p53 durch genotoxische Stimuli aktiviert und kontrolliert dadurch die Zellproliferation, indem es den G1-S-Übergang des Zellzyklus blockieren kann. Um herauszufinden, unter welchen physiologischen Stimuli p53 die Aktivität der Telomerase kontrolliert, wurden verschiedene Stressfaktoren, die die Akkumulation von p53 in der Zelle induzieren können, getestet. Es sollte herausgearbeitet werden, ob die Induktion von p53 unter physiologischen Stressbedingungen einen Einfluss auf die *hTERT* Genexpression und auf die Aktivität der Telomerase hat. Hierzu wurde in den Tumorzelllinien H1299 und HCT116 unter Auslösung von zellulärem Stress die endogene *hTERT* Genexpression mittels RT-PCR und die Telomeraseaktivität mittels TRAP-Assay bestimmt und mit der Präsenz von p53 korreliert. Dass durch Tetrazyklin induziertes wtp53 die Telomeraseaktivität in den H1299wtp53-Zellen herabsetzen kann, wurde in den oben beschriebenen Experimenten gezeigt (s. Abb. 11,13,16 und 17). Nun wurden die Zellen mit γ -Strahlung behandelt und auf *p53* Expression und Telomeraseaktivität untersucht. Im ersten Teil des Versuchs wurden die Zellen nur mit 10 Gy bestrahlt (s. Abb. 18), wogegen sie im zweiten Teil des Versuchs zunächst durch Serumentzug (FCS) für 24 Stunden in einer Zellzyklusphase arretiert werden sollten (s. Abb. 19). Danach bekamen sie für 2 Stunden serumreiches DMEM-Medium und wurden anschließend mit 10 Gy bestrahlt. Die Zellen wurden im ausgehungerten Zustand und zu bestimmten Zeitpunkten nach Zugabe von serumreichem DMEM-Medium und Bestrahlung geerntet (s. Abb. 18). Dieser Teil des Experiments hatte unter anderem das Ziel herauszufinden, ob p53 eventuell auch über posttranslationale Modifikation von Telomerasekomponenten, zellzyklusabhängig direkt die enzymatische Aktivität der Telomerase beeinflussen kann. Da die Halbwertszeit der Telomerase ca. 24 Stunden beträgt, wäre ein vermutlich transientes Abschalten der Telomerase unter genotoxischem Stress bei nicht synchronisierten Zellen nicht nachweisbar. Die Ergebnisse beider Versuche innerhalb der Zelllinien und die Zelllinien untereinander wurden anschließend verglichen. Die beiden Zelllinien bieten zwei verschiedene Systeme, die *p53* Expression zu untersuchen, da es sich einerseits, bei den H1299-Zellen, um eine Überexpression des Tumorsuppressorproteins, andererseits, bei den HCT116-Zellen, um eine endogene Expression von p53 handelt.

3.3.1 γ -Strahlung hat keinen Einfluss auf die Telomeraseaktivität in H1299-Zellen

Die H1299-Zellen und die H1299wtp53-Zellen stellen ein künstliches System zur Expression von wtp53 dar (s. Abschnitt 2.1.1 und 2.5.1.2). Die Expression von p53 kann in diesem System nur durch die Induktion der H1299wtp53-Zellen mit Tetrazyklin erreicht werden, welches als Stressfaktor über die Expression von p53 letztlich zur Apoptose der Zellen führt. Es sollte nun anhand eines anderen Stressfaktors, der γ -Strahlung, bewiesen werden, dass der oben beschriebene inhibierende Einfluss von p53 auf die Telomeraseaktivität in der H1299-Zelllinie spezifisch ist. Zunächst wurde der alleinige Einfluss von genotoxischem Stress (mittels γ -Strahlung) in den H1299- und H1299-wtp53 Zellen ohne die Induktion von p53 in nicht synchronisierten Zellen untersucht (s. Abb. 18). In den bestrahlten H1299- und H1299wtp53-Zellen ist im TRAP-Assay eine Inhibition der Telomeraseaktivität zu keinem Zeitpunkt zu erkennen (s. Abb. 18). Gleichzeitig ist, wie erwartet, keine Expression von wtp53 auf Proteinebene in den H1299wtp53-Zellen zu sehen (s. Abb. 18, Western Blot). Das bedeutet zum einen, dass die Expression von p53 in diesen Zellen unter Kontrolle vom *Tet-Operator* sehr stringent kontrolliert wird und nicht *leaky* ist. Zum anderen bedeutet das, dass ohne die Expression von p53 eine Inhibition der Telomeraseaktivität nicht möglich ist.

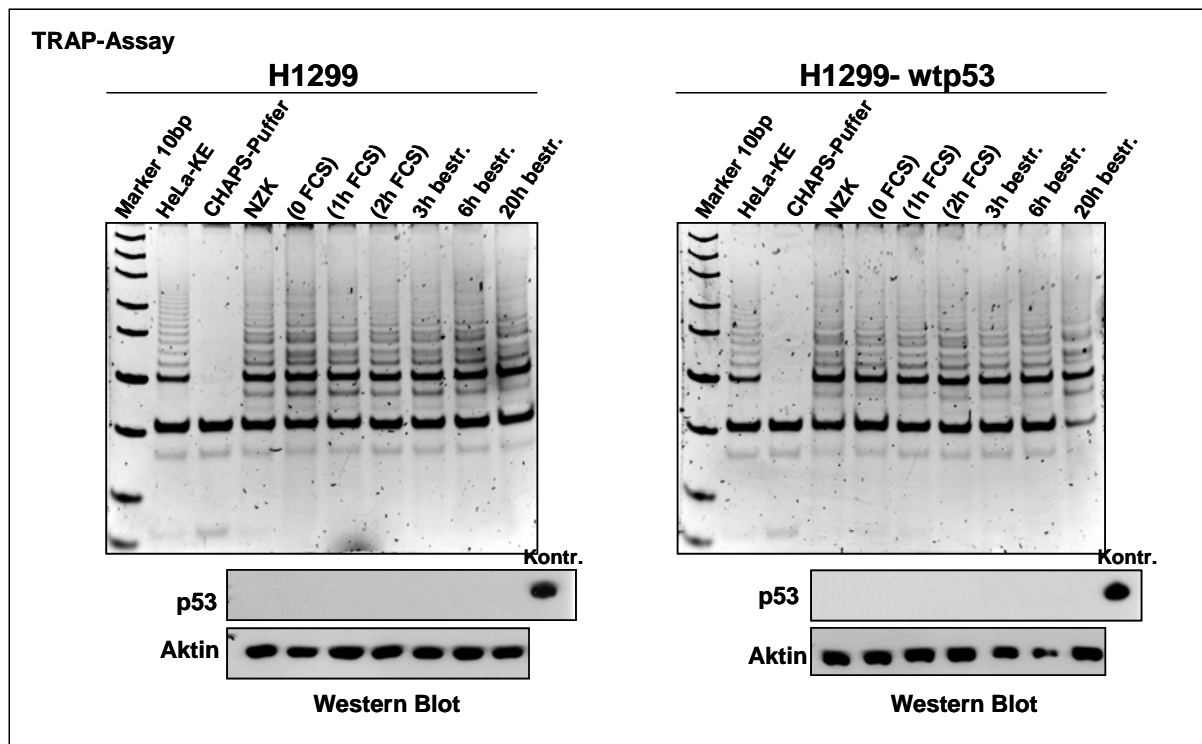


Abb. 18 γ -Strahlen haben keinen Einfluss auf die Telomeraseaktivität in H1299-Zellen.

Die Telomeraseaktivität ist bei allen Proben gleich stark. Die in Klammern gesetzten Zeitpunkte entsprechen den Zeitpunkten des Serumentzugs bzw. der erneuten Zugabe von Serum im Versuch mit Serumentzug und dienen dem Vergleich mit den Proben im Experiment mit γ -Bestrahlung (s. Abb.19). HeLa-KE ist die Positivkontrolle. CHAPS-Puffer ist die Negativkontrolle. NZK steht für normale Zellkultur. Im Western Blot sieht man weder bei den H1299- noch bei den H1299wtp53-Zellen die Expression von wtp53 auf Proteinebene.

3.3.2 Serumentzug und γ -Strahlung haben keinen Einfluss auf die Telomeraseaktivität in H1299-Zellen

In einem weiteren Versuch wurde nun der Einfluss von genotoxischem Stress (mittels γ -Strahlung) auf die Telomeraseaktivität in den H1299- und H1299wtp53-Zellen ohne die Induktion von p53 in synchronisierten Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen für 24 Stunden mit serumfreiem DMEM-Medium versorgt und nach 2 Stunden erneuter Zugabe von FCS-Medium mit γ -Strahlen (10 Gy) bestrahlt. Es zeigte sich, wie im Versuch davor, dass die Telomeraseaktivität zu keinem gewählten Zeitpunkt in der H1299-Zelllinie von p53

beeinflusst wird (s. Abb. 19). Auch hier ist kein wtp53 in den H1299wtp53-Zellen exprimiert worden.

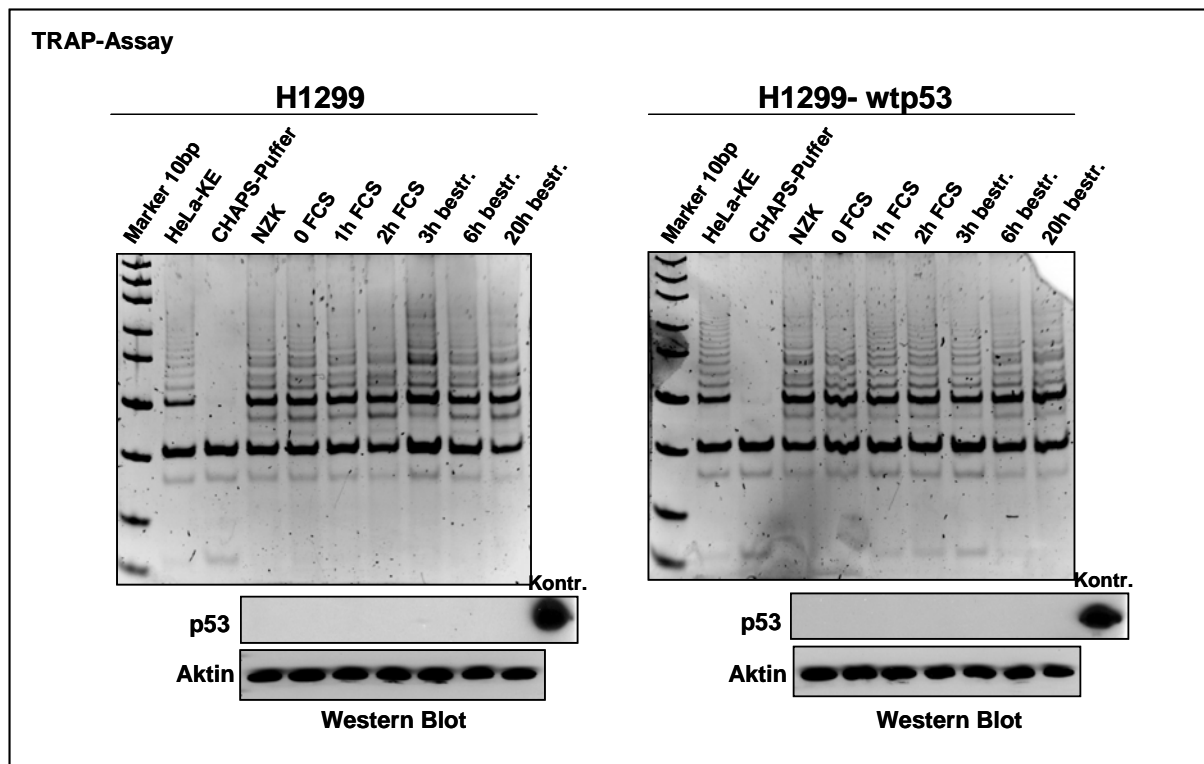


Abb. 19 Serumentzug und γ -Bestrahlung haben keinen Einfluss auf die Telomeraseaktivität in H1299-Zellen. Die Telomeraseaktivität wurde mit Hilfe des TRAP-Assays bestimmt. Sie ist bei allen Proben gleich stark. HeLa-KE ist die Positivkontrolle. CHAPS-Puffer ist die Negativkontrolle. Im Western Blot sieht man weder bei den H1299- noch bei den H1299wtp53-Zellen die Expression von wtp53 auf Proteinebene.

3.3.3 Die Induktion von wtp53 in H1299wtp53-Zellen weist eine inverse Korrelation zur *hTERT* Expression nach γ -Bestrahlung auf

Nun wurden die H1299-Zellen mit Tetrazyklin induziert (Akkumulation von p53) und anschließend mit 10 Gy bestrahlt. Die Zellen wurden nach 0, 2, 4, 6 und 16 Stunden geerntet. Im Western Blot wurde die Induktion von wtp53 und in der RT-PCR die Expression von p53 sowie *hTERT* überprüft (s. Abb. 20). Es zeigt sich eine starke Induktion von wtp53 sowohl auf Protein- als auch auf Transkriptionsebene bei 2 - 6 Stunden und deren Rückgang bei 16 Stunden in den H1299wtp53-Zellen. Gleichzeitig ist eine Inhibition der *hTERT* Expression in diesen Zellen zu sehen, was die Regulation der Telomeraseaktivität durch

wtp53 auf Transkriptionsebene bestätigt. Entscheidend ist hier hervorzuheben, dass in Abwesenheit von p53 in bestrahlten H1299-Zellen eine deutliche Induktion von *hTERT* erfolgt. p53 vermag diese Induktion zu verhindern, was darauf hinweist, dass p53 unter genotoxischem Stress die Aktivität der Telomerase zu unterdrücken vermag. Ein entscheidendes Experiment, nämlich die Bestimmung der Telomeraseaktivität ist aufgrund technischer Schwierigkeiten bislang nicht gelungen.

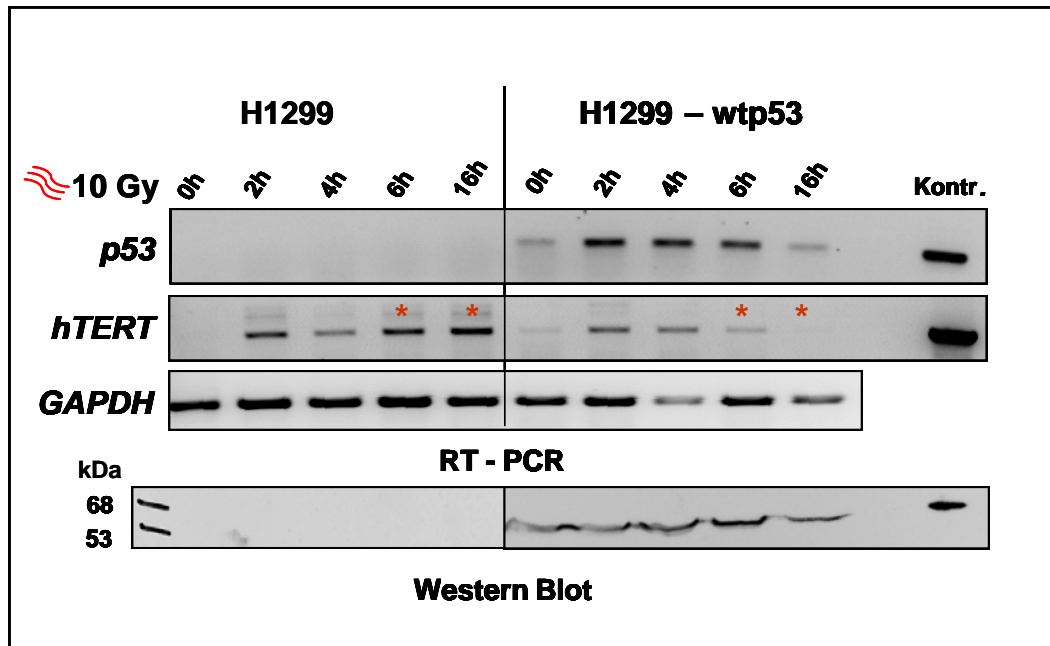


Abb. 20 Die Überexpression von wtp53 in H1299wtp53-Zellen korreliert mit der Inhibition der *hTERT* Expression nach Induktion und γ -Bestrahlung. Die H1299-Zellen zeigen auf Transkriptionsebene eine Induktion der *hTERT* Expression. Die H1299wtp53-Zellen zeigen eine Induktion von *wtp53* und eine dazu korrelierende Repression von *hTERT*. Ladekontrolle der PCR ist das Haushaltsgen *GAPDH*. Im Western Blot ist eine Induktion von wtp53 in den H1299wtp53-Zellen zu sehen.

3.3.4 γ -Strahlung hat keinen Einfluss auf die Telomeraseaktivität in HCT116-Zellen, aber *hTERT* wird hochreguliert

Die HCT116-Zellen sind humane Tumorzellen aus einem Kolonkarzinom. In diesen Zellen konnte das *p53* Gen über homologe Rekombination ausgeknockt werden, sodass die HCT116^{+/+}-Zellen *wtp53* exprimieren können und die HCT116^{-/-}-Zellen nicht. Aus diesem Grund bieten diese Zellen gute Voraussetzungen, die Regulation von Telomerase durch *p53* unter physiologischen Konzentrationen dieses Tumorsuppressorproteins zu untersuchen.

Um herauszufinden, unter welchen Bedingungen *p53* die Telomeraseaktivität reguliert, wurden dieselben zwei Versuche durchgeführt, wie mit den H1299- und H1299*wtp53*-Zellen. Zuerst wurden die HCT116^{+/+}- und HCT116^{-/-}-Zellen mit γ -Strahlen (10 Gy) bestrahlt und 3, 6 und 20 Stunden nach Bestrahlung geerntet. Im Western Blot wurde die Expression von *wtp53* und *p21* und im TRAP-Assay die Telomeraseaktivität überprüft (s. Abb. 21). Im TRAP-Assay ist, ähnlich wie bei dem Versuch mit den H1299-Zellen, nach Bestrahlung keine Veränderung der Telomeraseaktivität zu erkennen. Die Banden sind sowohl bei den HCT116^{+/+}- als auch bei den HCT116^{-/-}-Zellen über alle Zeitpunkte hinweg gleich intensiv, so wie bei der Positivkontrolle HeLa-KE (HeLa-Kernextrakte).

Im Western Blot zeigt sich, wie erwartet, bei den HCT116^{+/+}-Zellen eine Induktion der Expression von *p53* und *p21*, eine Reaktion der Zellen auf den Stressfaktor γ -Strahlung. Bei den HCT^{-/-}-Zellen sieht man dagegen kein *wtp53*, jedoch eine leichte Induktion von *p21*. Es ist bekannt, dass *p21* auch unabhängig von *p53* induziert werden kann. Das Ergebnis zeigt also, dass weder die γ -Strahlung allein bei den HCT116^{-/-}-Zellen noch die vermehrte Expression von *wtp53* bei den HCT116^{+/+}-Zellen einen Einfluss auf die Telomeraseaktivität haben.

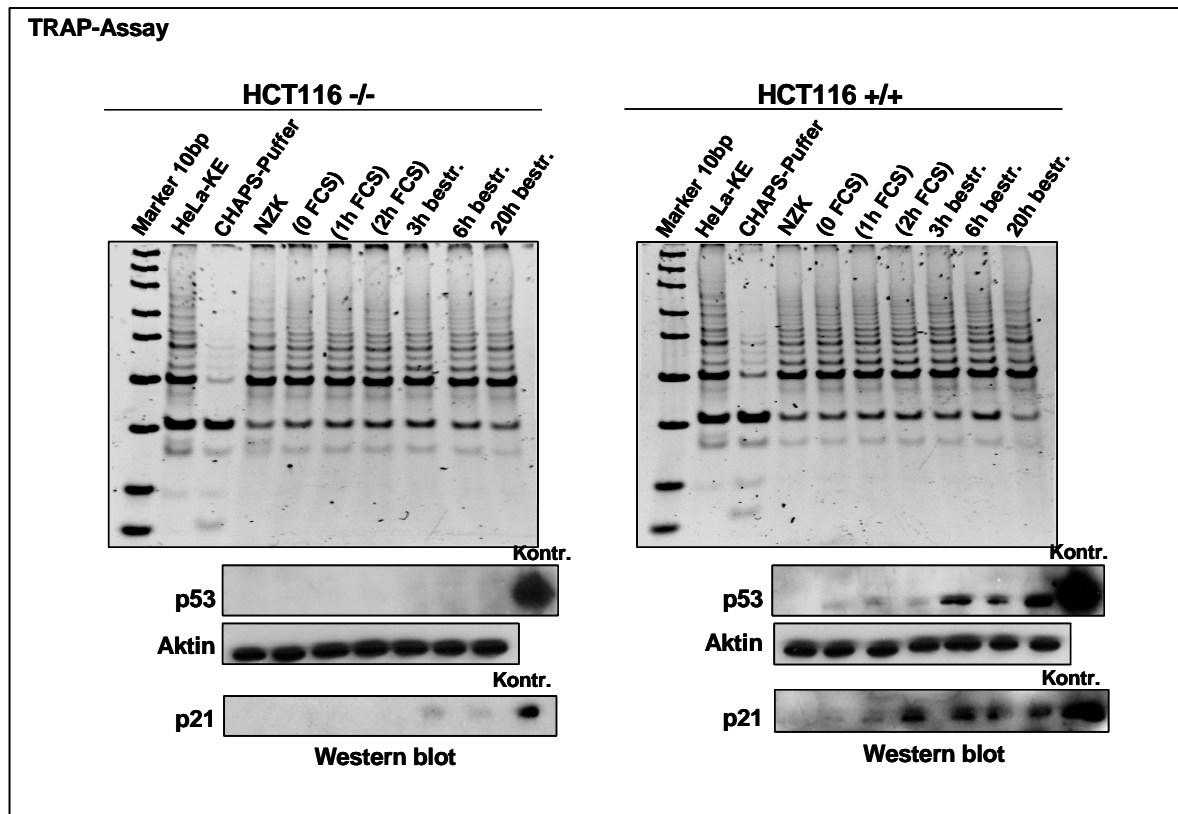


Abb. 21 γ -Strahlung hat keinen Einfluss auf die Telomeraseaktivität in HCT116^{+/+}- und HCT116^{-/-}-Zellen. Die in Klammern gesetzten Zeitpunkte entsprechen den Zeitpunkten des Serumentzugs bzw. der erneuten Zugabe von Serum im zweiten Versuch und dienen dem Vergleich mit den Proben im Versuch mit γ -Bestrahlung (s. Abb. 23). Die Telomeraseaktivität wurde mit dem TRAP-Assay gemessen, sie ist bei allen Proben gleich intensiv. Positivkontrolle sind HeLa-Kernextrakte (HeLa-KE), Negativkontrolle ist CHAPS-Puffer. Im Western Blot ist in den bestrahlten HCT116^{+/+}-Zellen deutlich die Induktion von wtp53 und p21 zu erkennen. Die HCT116^{-/-}-Zellen exprimieren kein wtp53 bzw. p21. Als Ladekontrolle des Western Blots dient Aktin.

Anschließend wurde mittels RT-PCR die Expression von *hTERT* und *p53* überprüft. Hier ist zunächst bei den synchronisierten HCT116^{+/+}-Zellen praktisch keine *p53* Expression zu sehen, im Gegensatz zu den bestrahlten, aber nicht synchronisierten HCT116^{+/+}-Zellen (s. Abb. 22). Gleichzeitig ist eine deutliche Induktion von *hTERT* in diesen Zellen unter beiden Bedingungen, Synchronisierung plus Bestrahlung und Bestrahlung ohne Synchronisierung, zu sehen. Die Banden der *hTERT* Expression sind jedoch dort stärker, wo die *p53* Expression schwächer erscheint, was auf eine inverse Korrelation zwischen *p53* Expression und *hTERT* Expression schließen lässt (s. Abb. 22, HCT116^{+/+}-Zellen, Bande „16h nach Bestrahlung“ bei den synchronisierten Zellen und Bande „6h nach Bestrahlung“ bei den Zellen ohne Synchronisierung mit Sternchen markiert). Eine Induktion von *hTERT* ist auch deutlich bei den synchronisierten HCT116^{-/-}-Zellen zu sehen, verglichen mit der Positivkontrolle, was mit

dem Ziel übereinstimmt, die Zellen in der Telomerase aktiven S-Phase des Zellzyklus zu arretieren. Im Vergleich dazu ist die *hTERT* Expression in den nicht synchronisierten HCT116^{-/-}-Zellen mäßig stark und über alle Zeitpunkte hinweg konstant, wie man es erwarten würde. Das Ergebnis auf Transkriptionsebene zeigt also, dass die inverse Korrelation zwischen der *p53* Expression und *hTERT* Expression auch hier besteht und bestätigt die Resultate, die mit H1299-Zellen erzielt wurden.

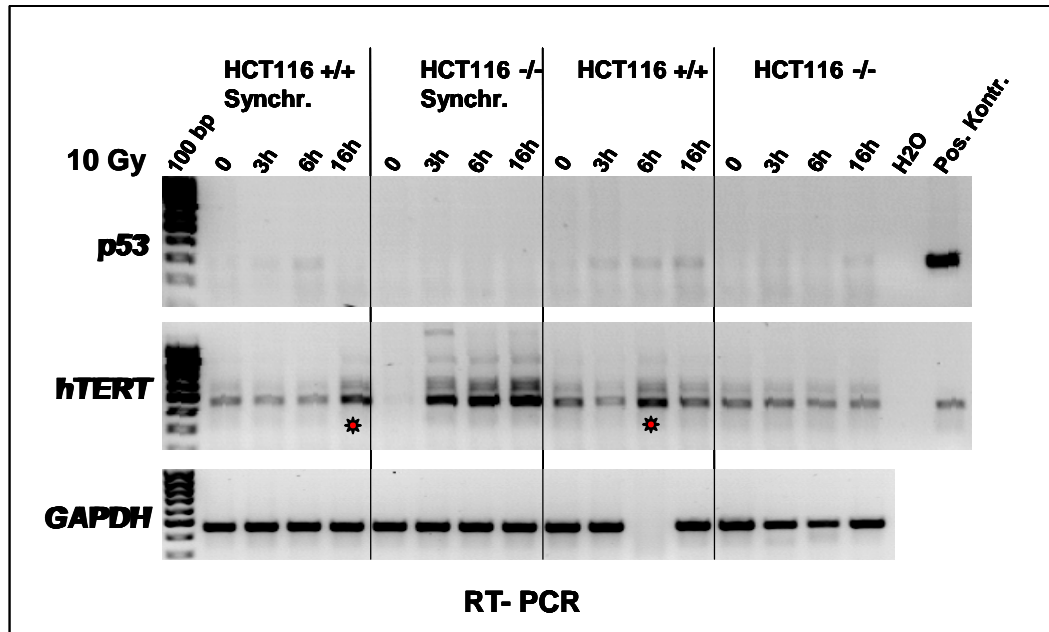


Abb. 22 *p53* und *hTERT* Expression bei HCT116^{+/+}- und HCT116^{-/-}-Zellen nach Synchronisierung mit anschließender γ -Bestrahlung und γ -Bestrahlung ohne vorherige Synchronisierung. An den mit Sternchen markierten Banden sieht man die Korrelation zwischen *p53* Expression und *hTERT* Repression. Zum Vergleich s. Western Blot oben.

3.3.5 Serumentzug und γ -Bestrahlung haben keinen Einfluss auf Telomeraseaktivität in HCT116-Zellen

Um zu überprüfen, ob *p53* eventuell auch über posttranslationale Modifikation von Telomerasekomponenten zellzyklusabhängig direkt die enzymatische Aktivität der Telomerase beeinflussen kann, wurden die HCT116-Zellen für 24 Stunden mit serumfreiem DMEM-Medium versorgt und nach 2 Stunden erneuter Zugabe von FCS-Medium γ -Strahlung (10 Gy) ausgesetzt. Die Zellen wurden nach der Bestrahlung zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Im TRAP-Assay zeigt sich auf enzymatischer Ebene keine Hemmung

der Telomeraseaktivität (s. Abb. 23). Das Leiternmuster im TRAP-Assay ist, verglichen mit der Positivkontrolle HeLa-KE (HeLa-Kernextrakte), über alle gewählten Zeitpunkte hinweg gleich intensiv (s. Abb. 23). Im Western Blot sind p53 und p21 induziert, man sieht jedoch keine Hemmung der Telomeraseaktivität.

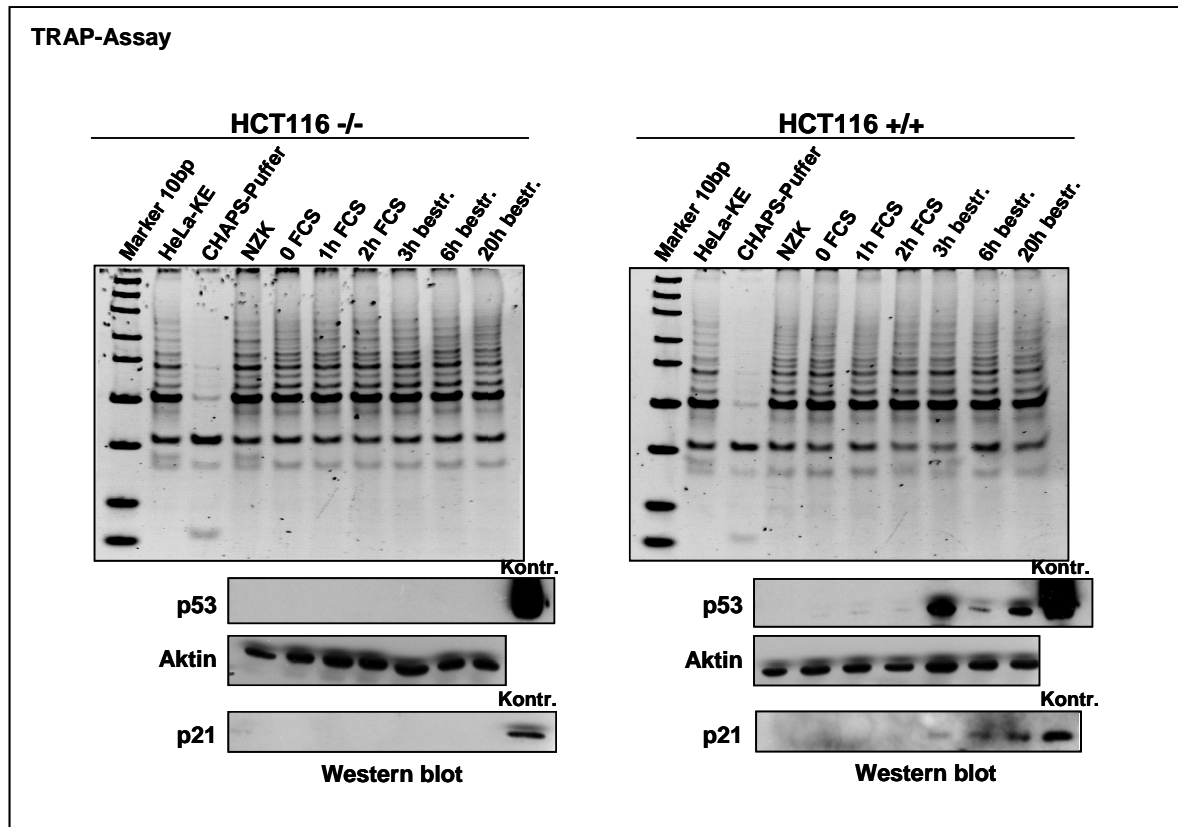


Abb.23 Serumentzug und γ -Bestrahlung haben keinen Einfluss auf die Telomeraseaktivität in HCT116-Zellen. Die Telomeraseaktivität wurde mit dem TRAP-Assay gemessen, sie ist bei allen Proben gleich intensiv. Positivkontrolle sind HeLa-Kernextrakte (HeLa-KE), Negativkontrolle ist CHAPS-Puffer. NZK steht für normale Zellkultur. Die HCT116^{+/+}-Zellen exprimieren nach Bestrahlung wtp53 und p21. Die HCT116^{-/-}-Zellen exprimieren weder wtp53 noch p21. Als Ladekontrolle des Western Blots dient Aktin.

4. Diskussion

Normale somatische Zellen haben eine limitierte Teilungsrate, denn bei jeder Zellteilung verkürzen sich die Chromosomenenden, die Telomere, bis eine kritische Länge erreicht ist und zelluläre Seneszenz, eine teilungsfreie Phase der Zelle, eintritt. Bei chromosomalen Schäden, die durch genotoxischen Stress entstehen können, wird die Zelle entweder direkt in den programmierten Zelltod (Apoptose) eingeleitet, oder es tritt ein Wachstumsarrest ein, der es erlaubt, die DNA-Schäden zu beheben. Die wichtigsten Regulatoren der Reparaturmechanismen und der Apoptose sind p21, p53 und pRb. Die Wiederherstellung der Telomerlänge durch das Enzym Telomerase oder den ALT-Mechanismus können diese Signalwege umgehen, und die Zellen proliferieren ungehemmt weiter (s. Abschnitt 1.3). Dieses Phänomen beobachtet man bei diversen menschlichen Tumoren. Hierbei korreliert die Aktivierung der Telomerase, die in den meisten normalen somatischen Zellen des Menschen deaktiviert ist, häufig mit einer Mutation des Tumorsuppressorproteins p53 (Kim *et al.*, 1994; Meyerson *et al.*, 1997). Bei den Mutationen handelt es sich überwiegend um Punktmutationen. p53 ist vermutlich einer der Signalvermittler, der die Verkürzung der Telomere und den Zellzyklusarrest bzw. die Apoptose verbindet.

Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass p53 an die Telomerase binden und die Telomeraseaktivität regulieren kann (Li *et al.*, 1999). Die Erkenntnisse über die Aktivierungs- bzw. Deaktivierungsmechanismen der Telomerase könnten einerseits in der Tumorthherapie durch das Ausschalten der Telomerase und andererseits in der chemopreventiven Therapie durch das Aktivieren der Telomerase zum Erhalt phänotypisch gesunder Zellen dienen (Aragona *et al.*, 2000). Zumal die Telomeraseaktivität *per se* nicht onkogen ist (Harley *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit wurden die möglichen Interaktionen zwischen p53 und der Telomerase und somit die Frage nach einer Regulation der Telomeraseaktivität durch p53 untersucht.

4.1 Interaktionen des Tumorsuppressorproteins p53 mit Telomerasekomponenten

Wie schon zu Anfang erwähnt, konnte bereits gezeigt werden, dass p53 mit dem humanen TEP1 Protein, das als ein Telomerase-assoziiertes Protein beschrieben wurde, *in vitro* eine Bindung eingehen kann. Die dadurch mögliche Interaktion zwischen p53 und der Telomerase könnte eine posttranslationale Regulation der Enzymaktivität vermuten lassen (Li *et al.*, 1999). Diese Hypothese konnte in unseren Experimenten bestätigt werden. Zunächst wurde ein inhibierender Effekt von sowohl wtp53 als auch mutp53 auf die Telomeraseaktivität nachgewiesen. Bei Zugabe von wtp53 zu Telomerase positiven Kernextrakten aus HeLa-Zellen konnte eine Hemmung der Telomeraseaktivität beobachtet werden. Dieser inhibierende Effekt zeigt sich auch bei der Zugabe von p53-Mutanten (mutp53^{G245S} und mutp53^{R273H}) und ist, bezogen auf p53, sowohl spezifisch als auch konzentrationsabhängig. Dieses Ergebnis zeigte sich jedoch nur *in vitro* und bei Überexpression von wtp53.

In einem zweiten Versuch konnte weiterhin gezeigt werden, dass dieser inhibierende Effekt von wtp53 auf die Telomeraseaktivität durch die Zugabe von einem spezifischen TEP1 Peptid aufgehoben werden kann. Es ist möglich, dass es zu einer Bindung des Tumorsuppressorproteins p53 an TEP1 im Sinne einer Sättigung von p53 durch die freien synthetischen Peptide bzw. einer Interaktion zwischen den beiden Proteinen kommt. Damit könnte man den Einfluss von p53 auf die Telomeraseaktivität erklären. Von den vier verschiedenen TEP1 Peptiden, die bei diesem Experiment eingesetzt wurden, konnte jedoch nur bei einem der oben beschriebene Effekt nachgewiesen werden. Die Sequenzen der anderen Peptide interferierten scheinbar nicht mit der Inhibition von p53 auf Telomeraseaktivität. Da das TEP1 Protein die einzige Komponente der Telomerase ist, die bislang in direkten Zusammenhang mit p53 gebracht werden konnte, sollten weitere Experimente mit den TEP1 Peptiden durchgeführt werden.

Li und Kollegen haben aber auch zeigen können, dass der inhibierende Einfluss von p53 auf die Telomeraseaktivität einen intakten C-Terminus des Tumorsuppressorproteins voraussetzt. Dieses ist bei den von uns verwendeten p53-Mutanten der Fall (mutp53^{G245S} und mutp53^{R273H}), da sich diese Mutationen in der Zentralregion des Moleküls befinden. Es ist bekannt, dass die zentrale Region des p53-Moleküls für die spezifische DNA-Bindung zuständig ist, wohingegen am C-Terminus die unspezifische DNA-Bindung, Oligomerisation und Erkennung von DNA-Schäden kontrolliert wird. Der N-Terminus ist

für die Transkriptionsaktivitäten des Proteins zuständig (Greenblatt *et al.*, 1994). Über seine Phosphorylierung wird bei genotoxischem Stress die Stabilisierung von p53 im Zellkern erreicht (Shieh *et al.*, 1997). Man kann also davon ausgehen, dass die Inhibierung der Telomeraseaktivität auf einer Bindung an das TEP1 Protein beruht, da sie auf einen intakten C-Terminus von p53 angewiesen ist und diese Region auch die regulatorische Bindungsdomäne ist.

Von Sood und Kollegen wurde der Zusammenhang zwischen Telomerasepositivität und unterschiedlichen p53-Mutationen in Ovarialtumoren untersucht (Sood *et al.*, 2002). Sie haben herausgefunden, dass speziell p53-Nullmutationen, welche entweder im N- oder im C-Terminus lokalisiert sind, mit einem Telomerase negativen Phänotypen der Tumore einhergehen (dem sogenannten ALT-Mechanismus der Telomerverlängerung). Über 70% der Tumoren mit Mutationen in der Zentralregion des p53 Proteins waren Telomerase positiv und nur weniger als die Hälfte waren es bei Mutationen, die im C- oder im N-Terminus lokalisiert waren. Die Frage, ob nun von p53-Telomerase-Interaktionen abhängt, ob ein Tumor Telomerase positiv ist oder nicht, muss noch geklärt werden. Man hat zudem herausgefunden, dass bestimmte p53-Genmutationen die Rekombinationsraten in Zellen erheblich steigern können (Mekeel *et al.*, 1997).

4.2 Die Regulation der Telomeraseaktivität durch p53

4.2.1 Die Induktion von p53 weist eine inverse Korrelation zur *hTERT* Expression auf

Die Aktivität der Telomerase erfolgt hauptsächlich auf der Ebene der Transkriptionsinitiation des *hTERT* Gens. In normalen somatischen Zellen ist die Expression des *hTERT* Gens, welches für die katalytische Untereinheit der Telomerase und somit die limitierende Komponente der Telomerase kodiert, reprimiert. Gleichzeitig ist in normalen Zellen der Expressionslevel des Tumorsuppressorproteins p53 sehr niedrig. Bei DNA-Schäden kann aber p53 als Wächter des Genoms aktiviert werden, in den Zellen akkumuliert und eine maligne Entartung der Zellen verhindert.

In Tumorzellen hingegen findet man eine starke Genexpression von *hTERT* und somit von Telomeraseaktivität (Kim *et al.*, 1994; Meyerson *et al.*, 1997), gleichzeitig ist in vielen

Tumoren *p53* Gen mutiert oder deletiert (Hollstein *et al.*, 1994; Levine *et al.*, 1997). Da die Aktivierung der Telomerase einer der wichtigsten Schritte der Tumorentstehung ist, wird vermutet, dass *p53* einen Einfluss auf die Aktivierung und Expression der Telomerase haben könnte. Durch Überexpression von *wtp53* konnte gezeigt werden, dass die Telomeraseaktivität gehemmt werden kann. Beide Faktoren, die Aktivierung der Telomerase und die Mutation von *p53*, begünstigen die Immortalisierung von humanen Zellen und folglich die Entstehung von Tumoren.

So haben Scian und Kollegen zeigen können, dass *p53*-Mutanten aus menschlichen Tumoren als positiver Transkriptionsfaktor im Sinne eines „Gain of Function“ (Funktionsgewinn durch Mutation) die Expression von *hTERT* und *Asparagin Synthetase* hochregulieren können (Scian *et al.*, 2004), die beide für die Proliferation von Zellen essentiell sind und von *wtp53* inhibiert werden. Sie konnten ebenfalls nachweisen, dass die *p53*-Mutanten (aus der Zentralregion des *p53*-Moleküls) imstande sind, die Expression zahlreicher Wachstumsfaktoren wie EGFR, MDR-1, IL-6 und PCNA zu induzieren. Gleichzeitig kann *mutp53* jedoch nicht an die für *wtp53* typischen DNA-Bindungsstellen binden und sind auch nicht in der Lage, die Promotoren der für die Tumorvermeidung wichtigen *p53*-Zielgene *p21/Rb*, *PUMA*, *Bax* u.a. sowie *hMDM2* zu regulieren. Die Tatsache, dass *mutp53* für die Zellproliferation wichtige Faktoren aktiviert (s. oben), lässt vermuten, dass *mutp53* auch die Telomerase positiv beeinflusst, da die Telomeraseaktivität für die Proliferation von Zellen notwendig ist. Diese Erkenntnisse widersprechen auf den ersten Blick unserem Ergebnis, wonach auch die *p53*-Mutanten *mutp53*^{R273H} und *mutp53*^{G245S} die Telomeraseaktivität *in vitro* inhibieren können (s. Abschnitt 3.1). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte die vorhin schon erwähnte Vermutung einer unspezifischen Bindung von *wtp53* und *mutp53* über seinen C-Terminus an *hTERT* oder *TEP1* sein. Direkt vergleichbar sind diese Ergebnisse jedoch nicht, da es bei dem einen Experiment um die Genexpression von *hTERT* geht und bei dem anderen um die Hochregulierung der Telomeraseaktivität *in vitro*. Transkriptionsaktivatoren des *hTERT* Gens sind u.a. *c-myc*, *Sp1*, *bmi-1*, *E2F-1* und *USF-1* (Wu *et al.*, 1999; Dimri *et al.*, 2002; Goueli und Janknecht, 2003). Als Repressoren wurden durch *in vitro* Experimente u.a. *Mad1* (Gunes *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000) und *p53* (Kusumoto *et al.*, 2000; Stampfer *et al.*, 2003) beschrieben.

Es wurde bereits ein Modell erstellt, wonach *wtp53* seine Rolle als Transkriptionsfaktor über die Aktivität bestimmter Co-Repressorproteine bewerkstelligt, die mit *p53* zusammen am Promotor des jeweiligen Zielgens (z.B. *p21* oder *SP1*) andocken (Scian *et al.*, 2004).

Mutp53 hingegen könne die Repressorfunktion an seinen Zielgenen nicht ausführen, da es zwar imstande sei dort anzudocken, jedoch nicht an den jeweiligen Co-Repressor zu binden. Hiermit geben Scian und Kollegen eine mögliche Erklärung dafür, warum mutp53 die Expression von *hTERT* nicht hemmt sondern hochreguliert.

Für unsere Experimente könnte man diese Hypothese variieren, indem man sagt, die verschiedenen p53-Mutanten könnten unterschiedliche Affinitäten zu den möglichen Co-Repressoren haben, und es könnte somit auch sein, dass einige der Mutanten doch an die Co-Repressoren binden können und dadurch die Telomeraseaktivität inhibieren können, wie wir in unseren Versuchen gezeigt haben.

Wir konnten mit einem System ektoptischer Expression des Tumorsuppressorproteins p53 in humanen Tumorzellen der Zelllinie H1299/H1299wtp53 zeigen, dass die Telomeraseaktivität in Abhängigkeit von der p53 Induktion reguliert wird. Nach der Induktion von wtp53 konnte zeitpunktabhängig in den H1299wtp53-Zellen eine Repression der *hTERT* Genexpression in der RT-PCR und ein Rückgang der Telomeraseaktivität im TRAP-Assay nachgewiesen werden (s. Abb. 16 und 17). Allerdings zeigte sich die Repression der Enzymaktivität im TRAP-Assay erst bei den Zeitpunkten 24h und 48h nach Induktion und nicht zu einem früheren Zeitpunkt wie in der PCR. Hier beginnt der Rückgang der *hTERT* Expression nämlich schon bei 3h in Korrelation mit der Induktion von wtp53. Die Erklärung hierfür ist die unterschiedliche Halbwertszeit des Telomerasekomplexes, die ca. 24 h beträgt, und die der *hTERT* mRNA, die ca. 1 h beträgt (Gunes *et al.*, 2000). Kritisch betrachtet könnte der sichtbare Rückgang der Telomeraseaktivität im TRAP-Assay jedoch auch dadurch zustande kommen, dass die Zellen zu diesen Zeitpunkten durch die Apoptose zum großen Teil zerstört sind und dadurch auch sehr wenig Telomerase vorhanden ist. Das Argument gegen dieses Ergebnis, p53 habe ja auch nur eine Halbwertszeit von ca. 20 min und sei zu den Zeitpunkten 24 bzw. 48 h nach Induktion wahrscheinlich schon abgebaut, kann in diesem Fall dadurch abgewendet werden, dass es sich bei den H1299-Zellen um eine induzierbare Tumorzelllinie handelt, die über eine konstitutive Überexpression von p53 verfügt und man somit nach 24 h und 48 h trotz abgelaufener Halbwertszeit mit genügend p53 rechnen kann, welches imstande ist, die Telomeraseaktivität zu beeinflussen (s. Abb. 17).

Die Ergebnisse dieser Arbeit waren der Grundstein für die Diplomarbeit von Frau Nicole Simon, die in der Abteilung für Tumorstudiologie angefertigt wurde. Es konnte bestätigt werden, dass p53 ein wirkungsvoller Inhibitor von *hTERT* ist. Durch ektope Überexpression von p53 in H1299wtp53-Zellen konnten drei Mechanismen einer p53

abhängigen hTERT-Regulation entschlüsselt werden. Erstens eine direkte Bindung von p53 an den hTERT Promotor. Mit Hilfe von ChIP-Assays konnte gezeigt werden, dass wtp53 an den hTERT Promotor binden kann. Es hat sich herausgestellt, dass die Bindungssequenz von p53 in einem Abschnitt liegt, der jeweils mindestens zwei Bindestellen der Transkriptionsfaktoren Sp1 und c-Myc enthält. Beides sind bekannte Regulatoren der Telomerase (Kyo *et al.* 2000). Ob p53 mit diesen Faktoren um eine Bindung konkurriert oder ob es an andere Sequenzen bindet, muss in weiteren Versuchen noch geklärt werden.

Zweitens eine Degradation des Sp1 Proteins. Es gibt Hinweise darauf, dass p53 über eine Komplexbildung mit Sp1 eine Aktivierung des hTERT Promotors verhindert (Xu *et al.*, 2000). Sp1 gehört wie oben erwähnt zu den Aktivatoren des *hTERT* Gens. Die Ergebnisse zeigten eine posttranslationale Bindungseigenschaft von Sp1 an p53 mit der Vermutung einer Degradation des Proteins durch p53, so dass der hTERT Promotor nicht aktiviert werden kann.

Drittens eine Verschiebung im Myc/Max/Mad Verhältnis zugunsten von Mad, welche auf dessen regulatorische Aufgaben zurückgeführt und als ein Wechsel von der Aktivierung zur Repression von hTERT betrachtet werden könnte.

4.2.2 Einfluss von γ -Strahlung auf die *p53* und *hTERT* Expression in H1299-Zellen

Es ist bereits bekannt, dass das Tumorsuppressorprotein p53 bei genotoxischem Stress über seine Zielgene Zellzyklusarrest oder den programmierten Zelltod induzieren kann, um den Organismus vor der Anhäufung DNA geschädigter Zellen und einer eventuellen Tumorentstehung zu schützen. Die Untersuchungen zielen darauf ab, ob der reprimierende Effekt von p53 auf die *hTERT* Expression auch mit endogenen p53 Konzentrationen unter physiologischen Stimuli erzielt werden kann. In unseren Versuchen haben wir den Einfluss des Stressfaktors γ -Strahlung (10 Gy) auf die Induktion von p53 in und in Folge dessen auf die *hTERT* Expression in der Tumorzelllinie H1299 untersucht. Die H1299wtp53-Zellen bieten ein induzierbares System zur Überexpression von wtp53.

In einem ersten Experiment haben wir zunächst an der ektopen Überexpression von wtp53 in H1299- und H1299wtp53-Zellen untersucht, inwiefern die *p53* und *hTERT* Expression durch Serumentzug und Bestrahlung mit γ -Strahlen beeinflusst werden kann. Da es sich

um ein Tet-On-System handelt und wtp53 in den H1299wtp53-Zellen nur über die Induktion mit Tetrazyklin oder Doxyzyklin exprimiert werden kann, sollte dieses Experiment zeigen, dass die zuvor gezeigte Inhibition der Telomeraseaktivität durch wtp53 *in vitro* (s. Abschnitt 3.2.1 und 4.2.1) p53 spezifisch ist.

Das Ergebnis zeigt, wie erwartet, dass wtp53 weder über alleinige Bestrahlung, noch über den Serumentzug, welcher die Zellen in einen Zellzyklusarrest führen sollte, und auch nicht durch die darauf folgende Bestrahlung mit γ -Strahlen exprimiert wird. Es ist ebenso keine Inhibition der Telomeraseaktivität im TRAP-Assay erkennbar. Dieses Ergebnis bestätigt also, dass für die Inhibition der Telomeraseaktivität *in vitro* p53 in den Zellen vorhanden sein muss.

Im zweiten Versuchsansatz wurde wtp53 in den H1299- und H1299wtp53-Zellen durch Tetrazyklin induziert und die Zellen danach mit 10 Gy bestrahlt. Auf Transkriptionsebene sieht man interessanterweise eine Induktion der *hTERT* Expression in den H1299-Zellen. Diese wird in den H1299wtp53-Zellen durch das induzierte wtp53 inhibiert. Je mehr *p53* Expression zu sehen ist, desto weniger *hTERT* ist detektierbar. Der Western Blot dazu zeigt die Expression von wtp53 auf Proteinebene. Leider fehlt zu diesem Versuch der TRAP-Assay, welcher den Einfluss der Induktion und der Bestrahlung auf die Telomeraseaktivität zeigen würde. Wir nehmen jedoch an, dass hier die Inhibition der Telomeraseaktivität in den H1299wtp53-Zellen deutlich sichtbar wäre.

4.2.3 Einfluss von γ -Strahlung auf die *p53* und *hTERT* Expression in HCT116-Zellen

Im Vergleich hierzu wurden dieselben Versuche mit der Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 durchgeführt. Diese stellen im Gegensatz zu den H1299-Zellen ein „natürliches“ System zur endogenen Induktion von wtp53 dar. Die Ergebnisse zeigen, dass in diesen Zellen auch eine deutliche Induktion der *hTERT* Expression besteht, sowohl bei Bestrahlung als auch bei Serumentzug und anschließender Bestrahlung. Auch hier scheint die *wtp53* Expression mit einem Rückgang der *hTERT* Expression zu korrelieren. Im TRAP-Assay ist dieser inhibierende Effekt jedoch gar nicht erkennbar. In diesen Zellen ist der p53-Level jedoch sehr gering, daher ist die Expression in der RT-PCR nur schwach zu sehen. Vermutlich ist die Expression nicht stark genug, um eine mögliche Abnahme der Telomeraseaktivität im

TRAP-Assay sichtbar zu machen. Auch im Western Blot sieht man eine geringe wtp53 Induktion.

4.3 Relevanz der Ergebnisse für *in vivo* Experimente

In dieser Arbeit wurden potentielle Interaktionen zwischen dem Tumorsuppressorprotein p53 und der Telomerase sowie die mögliche Regulation des *TERT* Gens durch anhand von biochemischen Methoden und in zwei Tumorzelllinien untersucht, die zwei unterschiedliche Aspekte der Expression von p53 in der Zelle und die damit verbundenen Effekte auf die Telomeraseaktivität beleuchten ließen. Zum einen die ektope Überexpression von p53 in der Tumorzelllinie H1299/H1299wtp53 durch ein induzierbares System (T-Rex-System), und zum anderen die endogene Induktion von p53 in den HCT116^{-/-}/HCT116^{+/+}-Zellen durch genotoxischen Stress (γ -Strahlung). Der in den vorausgehenden Abschnitten beschriebene inhibierende Effekt von wtp53 auf die Telomeraseaktivität und *hTERT* Expression ließ sich klar und deutlich jedoch nur durch das überexprimierte wtp53 in den H1299wtp53-Zellen erzielen, also im „künstlichen“ System zu Expression von wtp53. In den HCT116^{+/+}-Zellen, die p53 endogen exprimieren, konnte dieser Effekt durch eine physiologische Induktion von wtp53 mit genotoxischen Stress nicht eindeutig belegen. Inwieweit die mit Hilfe der H1299-Zellen erzielte Repression des *TERT* Gens durch p53 *in vivo* eine Relevanz haben könnten, kann also hier nicht abschließend beurteilt werden.

4.4 Ausblick

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden, dass die ektope Überexpression von p53 die Expression des *TERT* Gens reprimieren kann. Inwieweit sich die Überexpressionsdaten, die mit H1299-Zellen erzielt wurden, auf die *in vivo* Funktion von p53 übertragen lassen, bleibt nach wie vor zu klären und sollte unter unterschiedlichen physiologischen Stimuli getestet werden. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass zwischen p53 und Telomerase ein Zusammenhang während Differenzierungsvorgängen besteht, was in Zelllinien mit Differenzierungspotential analysiert werden könnte. Eine weiterer Aspekt sollte in zukünftigen Experimenten bedacht werden: Da p53 in der Regel

die Expression von Genen aktiviert, z.B. p21, bietet die Beobachtung hinsichtlich der Repression des *TERT* Gens eine interessante Möglichkeit zur Untersuchung der Funktion von p53 als transkriptioneller Regulator.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass p53 *in vitro* die Aktivität der Telomerase inhibieren und dass diese Inhibition durch die Zugabe von einem TEP1 Peptid aufgehoben werden kann. Auch wenn die *in vivo* Relevanz dieser Beobachtungen bislang unklar sind, deuten sie darauf hin, dass TEP1 mit der p53-Telomerase-Interaktion interferieren kann, möglicherweise durch p53-TEP1-Interaktionen. Diese Annahme könnte nun in Zellkulturarbeiten mit TEP1 Proteinmutanten untersucht werden.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits auf Kongressen präsentiert:

3rd European Workshop on Telomerase and Telomeres in Cancer and Aging
21.11. – 23.11.2004, Ladenburg

Literaturverzeichnis

Anderson, C.W., und Appella, E. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem.* 2001 May;268(10):2764-72. Review.

Avilion, A.A., Piatyszek, M.A., Gupta, Shay, J.W., Bacchetti, S. & Greider, C.W. (1996) Human telomerase RNA and telomerase activity in immortal cell lines and tumor tissues. *Cancer Res.*, 56, 645-50.

Beattie, T. L., Zhou, W., Robinson, M. O., and Harrington, L. (1998). Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr Biol* 8, 177-180.

Beroud, C., and Soussi, T. (1998). p53 gene mutation: software and database. *Nucleic Acids Res* 26 (1): 200-4.

Bertrand, P., Rouillard, D., Boulet, A., Levalois, C., Soussi, T. & Lopez, B.S.(1997). Increase of spontaneous intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells expressing a mutant p53 protein. *Oncogene*, 14, 1117-1122

Bianchi, A. & de Lange, T. (1999). Ku binds telomeric DNA in vitro. *J Biol Chem*, 274, 21223-7.

Blasco, MA., Funk, W., Villeponteau, B., and Greider, C. W. (1995). Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science* 269, 1267-1270.

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): 552-7.

Bryan, T. M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M. A., and Reddel, R. R. (1997). Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med* 3, 1271-1274.

Broccoli, D., Chong, L., Oelmann, S., Fernald, A. A., Marziliano, N., van Steensel, B., Kipling, D., Le Beau, M. M., and de Lange, T. (1997). Comparison of the human and mouse genes encoding the telomeric protein, TRF1: chromosomal localization, expression and conserved protein domains. *Hum Mol Genet* 6, 69-76.

Chong, L., van Steensel, B., Broccoli, D., Erdjument-Bromage, H., Hanish, J., Tempst, P., and de Lange, T. (1995). A human telomeric protein. *Science* 270, 1663-1667.

Dai, D., Zhai, W., Zhu, T., Zhu, H. & Ling, Y. (2001). [Expression of telomerase reverse transcriptase and its relationship with tumor suppressor gene p53 in HCC]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*, 9 Suppl, 79-81.

Dean, M., Levine, RA., Campisi, J. c-myc regulation during retinoic acid-induced differentiation of F9 cells is posttranscriptional and associated with growth arrest. *Mol Cell Biol.* 1986;6:518-524.

- Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J. and Leder, P. (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82 (4): 675-84.
- Deppert, W. (1994). The yin and yang of p53 in cellular proliferation. *Semin Cancer Biol* 5 (3): 187-202.
- Deppert, W., Gohler, T., Koga, H., Kim, E. Mutant p53: "gain of function" through perturbation of nuclear structure and function? *J Cell Biochem Suppl.* 2000;Suppl 35:115-22. Review.
- Dimri, G.P., Martinez, J.L., Jacobs, J.J., Keblusek, P., Itahana, K., Van Lohuizen, M., Campisi, J., Wazer, D.E. & Band, V. (2002). The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res*, 62, 4736-45.
- Dong, Y., Li, T., Liang, Y. & Zou, W.Z. (2004). [Human telomerase P53 estrogen and progesterone receptor expression in endometrial carcinoma]. *Beijing Da Xue Xue Bao*, 36, 61-5.
- el-Deiry, WS., Kern, SE., Pietenpol, JA., Kinzler, KW. and Vogelstein, B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* 1, 45-9.
- Ewen, ME., Sluss, HK., Sherr, CJ., Matsushime, H., Kato, J., Livingston, DM. Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell.* 1993 May 7;73(3):487-97.
- Feng, J., Funk, W. D., Wang, S. S., Weinrich, S. L., Avilion, A. A., Chiu, C. P., Adams, R. R., Chang, E., Allsopp, R. C., Yu, J. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science* 269, 1236-1241.
- Gorbunova, V., Seluanov, A. & Pereira-Smith, O.M. (2002). Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *J Biol Chem*, 277, 38540-9.
- Goueli, B.S. & Janknecht, R. (2003). Regulation of telomerase reverse transcriptase gene activity by upstream stimulatory factor. *Oncogene*, 22, 8042-7.
- Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M., Harris, C.C. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 54: 4855-78
- Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H. & de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, 97, 503-14.
- Güneş, C., Lichtsteiner, S., Vasserot, A. P., and Englert, C. (2000). Expression of the hTERT gene is regulated at the level of transcriptional initiation and repressed by Mad1. *Cancer Res* 60, 2116-2121.
- Haendeler, J., Hoffmann, J., Rahman, S., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. (2003). Regulation of telomerase activity and anti-apoptotic function by Protein-protein interaction and phosphorylation. *FEBS Letters* 536:180-186

- Hainaut, P., Hernandez, T., Robinson, A., Rodriguez-Tome, P., Flores, T., Hollstein, M., Harris, C.C., Montesano, R. (1998). *Nucleic Acids Res.* 26, 205-213
- Harley, C. B., Futcher, A. B., and Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.
- Harley, C. B. (2002). Telomerase is not an oncogene. *Oncogene* 21, 494-502.
- Harrington, L., McPhail, T., Mar, V., Zhou, W., Oulton, R., Bass, M. B., Arruda, I., and Robinson, M. O. (1997). A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 275, 973-977.
- Hayflick, L., and Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1 (1): 3-11.
- Hernandez, T., Rodriguez-Tome, P., Montesano, R., Hainaut, P.(1999). *Hum.Mutat.* 14, 1-8
- Hollstein, M., K. Rice, *et al.* (1994). "Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines." *Nucleic Acids Res* 22(17): 3551-5.
- Holt, S.E., Glinsky, V.V., Ivanova, A.B. & Glinsky, G.V. (1999). Resistance to apoptosis in human cells conferred by telomerase function and telomere stability. *Mol Carcinog*, 25, 241-8.
- Hsu, H.L., Gilley, D., Blackburn, E.H. & Chen, D.J. (1999). Ku is associated with the telomere in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 12454-8.
- Kanaya, T., Kyo, S., Hamada, K., Takakura, M., Kitagawa, Y., Harada, H. & Inoue, M. (2000). Adenoviral expression of p53 represses telomerase activity through down-regulation of human telomerase reverse transcriptase transcription. *Clin Cancer Res*, 6, 1239-47.
- Karlseder, J., Rotheneder, A., Wintersberger, E. Interaction of Sp1 with the growth- and cell cycle-regulated transcription factor E2F. *Mol Cell Biol.* 1996 Apr;16(4):1659-67.
- Karlseder, J., Broccoli, D., Dai, J., Hardy, S., de Lange, T. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science.* 1999 Feb 26;283(5406):1321-5.
- Kim, E., Albrechtsen, N. & Deppert, W. (1997). DNA-conformation is an important determinant of sequence-specific DNA binding by tumor suppressor p53. *Oncogene*, 15, 857-69.
- Kim, S. H., Kaminker, P., and Campisi, J. (1999). TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet* 23, 405-412.

- Kyo, S., Takakura, M., Taira, T., Kanaya, T., Itoh, H., Yutsudo, M., Ariga, H., and Inoue, M. (2000). Sp1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Nucleic Acids Res* 28, 669-677.
- Kiyooka, K., Maniwa, Y. & Okada, M. (1999). Analysis of mutant p53 and telomerase activity in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 5, 293-9.
- Kusumoto, M., Ogawa, T., Mizumoto, K., Ueno, H., Niiyama, H., Sato, N., Nakamura, M. & Tanaka, M. (1999). Adenovirus-mediated p53 gene transduction inhibits telomerase activity independent of its effects on cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Clin Cancer Res*, 5, 2140-7.
- de Lange, T. (1992) Human telomeres are attached to the nuclear matrix. *EMBO J.* 1992 Feb;11(2):717-24.
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88 (3): 323-31.
- Levy, MZ., Allsopp, RC., Futcher, AB., Greider, CW., Harley, CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol.* 1992 Jun 20;225(4):951-60. PMID: 1613801
- Li, H., Cao, Y., Berndt, M. C., Funder, J. W., and Liu, J. P. (1999). Molecular interactions between telomerase and the tumor suppressor protein p53 in vitro. *Oncogene* 18, 6785-6794.
- Lin, S.Y. & Elledge, S.J. (2003). Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell*, 113, 881-9.
- Masutomi, K., Yu, E. Y., Khurts, S., Ben-Porath, I., Currier, J. L., Metz, G. B., Brooks, M. W., Kaneko, S., Murakami, S., DeCaprio, J. A., *et al.* (2003). Telomerase maintains telomere structure in normal human cells. *Cell* 114, 241-253.
- Mekeel, K.L., Tang, W., Kachnic, L.A., Luo, C.M., De Frank, J.S., Powell, S.N.(1997) Inactivation of p53 in high rates of homologous recombination. *Oncogene* 14:1847-57
- Meyerson, M., Counter, C. M., Eaton, E. N., Ellisen, L. W., Steiner, P., Caddle, S. D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R. L., Davidoff, M. J., Liu, Q., *et al.* (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* 90, 785-795.
- Milner, J. (1994). Forms and functions of p53. *Semin Cancer Biol* 5 (3): 211-9.
- Miyashita, T. & Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80, 293-299.
- Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L., and Wu, J. R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6622-6626.
- Müller, H. J. (1938). The remaking of chromosomes. *Collect Net* 13, 181-198.

- Nakamura, T. M., Morin, G. B., Chapman, K. B., Weinrich, S. L., Andrews, W. H., Lingner, J., Harley, C. B., and Cech, T. R. (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277, 955-959.
- Nakayama, J., Tahara, H., Tahara, E., Saito, M., Ito, K., Nakamura, H., Nakanishi, T., Ide, T. & Ishikawa, F. (1998). Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat Genet*, 18, 65-8.
- Oh, S., Song, Y. H., Yim, J., and Kim, T. K. (2000). Identification of Mad as a repressor of the human telomerase (hTERT) gene. *Oncogene* 19, 1485-1490.
- Peterson, E.J., Bogler, O. & Taylor, S.M. (2003). p53-mediated repression of DNA methyltransferase 1 expression by specific DNA binding. *Cancer Res*, 63, 6579-82.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature*, 389, 300-305.
- Poole, J.C., Andrews, L.G., Tollefsbol, T.O. Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene*. 2001;269:1-12.
- Roemer, K. (1999). Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators. *Biol Chem* 380, 879- 87. (Review)
- Roos, G., Nilsson, P., Cajander, S., Nielsen, N.H., Arnerlov, C. & Landberg, G. (1998). Telomerase activity in relation to p53 status and clinico-pathological parameters in breast cancer. *Int J Cancer*, 79, 343-8.
- Scian, M.J., Stagliano, K.E., Deb, D., Ellis, M.E., Carchman, E.H., Das, A., Valerie, K., Deb, S.P., Deb, S. (2004) Tumor-derived p53 mutants induce oncogenesis by transactivating growth-promoting genes. *Oncogene* 4430-4443
- Shats, I., Milyawski, M., Tang, X., Stambolski, P., Erez, N., Brosh, R., Kogan, I., Braunstein, I., Tsukerman, M., Ginsberg, D., Rotter V. p53-dependent down-regulation of telomerase is mediated by p21waf1. *J Biol Chem*. 2004 Dec 3;279(49):50976-85. Epub 2004 Sep 15.
- Shen, M., Haggblom, C., Vogt, M., Hunter, T., and Lu, K. P. (1997). Characterization and cell cycle regulation of the related human telomeric proteins Pin2 and TRF1 suggest a role in mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13618-13623.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y. and Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91, 325-34.
- Sigal, A. & Rotter, V. (2000). *Cancer Res*. 60, 6788-6793
- Smith, L.L., Collier, H.A. & Roberts, J.M. (2003). Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nat Cell Biol*, 5, 474-9.
- Smogorzewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M. R., Schnapp, G., and de Lange, T. (2000). Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol* 20, 1659-1668.

- Sood, A.K., Coffin, J., Jabbari, S., Buller, R.E., Hendrix, M.J.C., Klingelutz, A..(2002). P53 Null Mutations are associated with a Telomerase Negative Phenotype in Ovarian Carcinoma. *Cancer Biology & Therapy* 1:15, 511-517
- Soussi, T. and Beroud, C. (2001). Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 1, 233-40. (Review)
- Soussi, T., Dehouche, K. & Beroud, C.(2000). *Hum.Mutat.* 15, 105-113
- Stampfer, M.R., Garbe, J., Nijjar, T., Wigington, D., Swisshelm, K. & Yaswen, P. (2003). Loss of p53 function accelerates acquisition of telomerase activity in indefinite lifespan human mammary epithelial cell lines. *Oncogene*, 22, 5238-51.
- Stansel, RM., Subramanian, D., Griffith, JD. p53 binds telomeric single strand overhangs and t-loop junctions in vitro. *J Biol Chem.* 2002 Apr 5;277(14):11625-8. Epub 2002 Feb 21. PMID: 11859067
- van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92, 401-413.
- Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000 Nov 16;408(6810):307-10.
- Wang, J., Xie, L. Y., Allan, S., Beach, D., and Hannon, G. J. (1998). Myc activates telomerase. *Genes Dev* 12, 1769-1774.
- Weinrich, S.L., Pruzan, R., Ma, L., Ouellette, M., Tesmer, V.M., Holt, S.E., Bodnar, A.G., Lichtsteiner, S., Kim, N.W., Trager, J.B., Taylor, R.D., Carlos, R., Andrews, W.H., Wright, W.E., Shay, J.W., Harley, C.B. & Morin, G.B. (1997). Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT. *Nat Genet*, 17, 498-502.
- Wiesmüller, L., Cammenga, J. & Deppert, W. (1996). In vivo assay of p53 function in homologous recombination between simian virus 40 chromosomes. *J. Virol.*, 70, 737-744.
- Wisman, G.B., Hollema, H., Helder, M.N., Knol, A.J., Van der Meer, G.T., Krans, M., De Jong, S., De Vries, E.G. & Van der Zee, A.G. (2003). Telomerase in relation to expression of p53, c-Myc and estrogen receptor in ovarian tumours. *Int J Oncol*, 23, 1451-9.
- Won, J., Yim, J., Kim, TK. Opposing regulatory roles of E2F in human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene expression in human tumor and normal somatic cells. *FASEB J.* 2002;16:1943–1945.
- Wu, K. J., Grandori, C., Amacker, M., Simon-Vermot, N., Polack, A., Lingner, J., and Dalla-Favera, R. (1999) *Nat. Genet.* 21, 220-224
- Xu, D., Wang, Q., Gruber, A., Bjorkholm, M., Chen, Z., Zaid, A., Selivanova, G., Peterson, C., Wiman, K. G., and Pisa, P. (2000). Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene* 19, 5123-5133.
- Xu, D., Popov, N., Hou, M., Wang, Q., Bjorkholm, M., Gruber, A., Menkel, A. R., and

Henriksson, M. (2001). Switch from Myc/Max to Mad1/Max binding and decrease in histone acetylation at the telomerase reverse transcriptase promoter during differentiation of HL60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3826-3831.

Zhao, R., Gish, K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffman, WH., Tom, E., Mack, DH. and Levine, AJ. (2000). Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev* 14, 981-93

Zakian, V. A. (1989). Structure and function of telomeres. *Annu Rev Genet* 23, 579-604.

6. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ALT	alternative Telomerverlängerung
APS	Ammoniumpersulfat
ATM	<i>Ataxia Teleangiectasia Mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAX	Bcl-2 associated X Protein
Bcl-2	<i>B-Cell Lymphoma</i>
bmi-1	BMI-1 Onkoprotein
BP	Blockingpuffer
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
CHAPS	3[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
cm	Zentimeter
c-myc	zelluläres Myc Protein
d	Tag
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DKC1	Dyskerin Protein 1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
E2F-1	<i>E2F Transcription Factor 1</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor</i>
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GOF	<i>gain of function</i>
G-Phase	<i>gap-phase</i>
h	Stunde
HeLa-Zellen	Tumorzellen eines Zervixkarzinoms (Pat. Henrietta Lacks)
HPI	Heinrich-Pette-Institut
hTERC	humane Telomerase-RNA (auch hTR bzw. hTER)
hTERT	humane Telomerase Reverse Transkriptase (auch hTRT)
k	Kilo
kbp	Kilobasenpaare
KE	Kernextrakte

l	Liter
μ	mikro
m	milli
m	Meter
M	molar (mol/l)
Mad	Max-Dimerisierungsfaktor
Max	Myc-assoziiertes X-Faktor
MDM2	<i>Murine Double Minute Chromosome 2</i>
MDR-1	<i>Multidrug Resistance 1</i>
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
mut	mutiert
MW	Molekulargewicht
Myc	Onkogen, zuerst gefunden im Myelozytomatose-Virus
n	nano
oD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PUMA	<i>P53 upregulated modulator of apoptosis</i>
Rb	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
S-Phase	Synthese-Phase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sp1	<i>Specificity Protein 1</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEP1	<i>Telomerase associated Protein 1</i>
TIN2	<i>TRF1 Interacting Factor</i>
TRAP-Assay	<i>Telomere Repeat Amplification Protokoll</i>
TRF1/2	<i>Telomere Repeat Binding Factor 1/2</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
USF-1	<i>Upstream Transcription Factor-1</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumenanteil
v/v	Volumen pro Volumen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

7. Danksagung

An erster Stelle geht mein Dank an Prof. Dr. W. Deppert für die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Abteilung anfertigen zu dürfen, seine Unterstützung und Vertrauen, dass ich trotz eines sehr zeitaufwendigen Studiums eine experimentelle Doktorarbeit machen konnte.

Prof. Dr. R. Friedrich danke ich für die Erstellung des Gutachtens und die anregenden Gespräche.

PD Dr. Cagatay Günes danke ich für die intensive, stets verständnisvolle und motivierende Betreuung meiner Doktorarbeit, insbesondere auch für die Schaffung einer professionellen, aber trotzdem sehr freundschaftlichen und sympathischen Atmosphäre in unserer Arbeitsgruppe. Ich war und bin sehr gerne Teil davon.

Meiner Arbeitsgruppe möchte ich von Herzen für all ihre Unterstützung und ihr Verständnis danken, ihr stetiges Bemühen, mir bei der Klärung vieler Fragen und technischen „Problemchen“, die im Laboralltag so aufkommen, zur Seite zu stehen. Ich danke besonders Britta Witt, die mich im Labor eingearbeitet und über meiner Arbeit „gewacht“ hat und Julia Weise, die immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte und mir bei der Korrektur dieser Arbeit sehr geholfen hat.

Ich möchte mich auch herzlich bei allen Mitarbeitern der Abteilung für Tumorvirologie für die vielen Hilfestellungen und die tolle kollegiale Atmosphäre bedanken. Hier danke ich besonders in erster Linie PD Dr. Wolfgang Bohn für seine Unterstützung und viele anregende Gespräche. Heike Helmbold danke ich für ihre Hilfe im Labor, und dass sie mir geduldig bestimmt an die tausend Fragen beantwortet hat. Florian Wegwitz danke ich für seine Menschlichkeit und Freundschaft, ohne Dich Flo wäre unser Labor nur halb so lustig und musikalisch gewesen!

Meiner Familie danke ich aus tiefstem Herzen für ihre Liebe und Unterstützung und die Gabe, mich auf meinem Weg immer wieder aufzufangen, wenn manchmal Zweifel aufkommen. Meiner Schwester, Gabriela Iwanski, danke ich für ihre Freundschaft und für die sehr professionelle Korrektur meiner Arbeit

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Kamila Irena Iwanski
Geburtsdatum: 27.03.1980
Geburtsort: Lublin (Polen)
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig
Konfession: Römisch-Katholisch

Schulbildung

08/1986-06/1990 Besuch der Katholischen Grundschule Farmsen, Hamburg
08/1990-06/1999 Besuch des Katholischen Gymnasiums Sophie-Barat, Hamburg

Schulabschluss

06/1999 Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Studium

10/1999-07/2000 Studium der Rechtswissenschaften an der Universität Hamburg
10/2000-07/2006 Studium der Zahnmedizin an der Universität Hamburg
07/2006 Staatsexamen in Zahnmedizin an der Universität Hamburg
und Approbation zur Zahnärztin

Beruflicher Werdegang

Seit 11/06 Assistenz Zahnärztin in der Praxis Frank Wittrin
in Kaltenkirchen

Dissertation

02/2004-11/2006 Experimentelle Doktorarbeit zum Thema „Funktionelle
Interaktionen des Tumorsuppressorproteins p53 mit
Telomerasekomponenten und Regulation der
Telomeraseaktivität durch p53“ bei Prof. Dr. W. Deppert am
Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und
Immunologie an der Universität Hamburg

Hamburg, den 07.01.2008

Eidesstattliche Versicherung

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

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

Hamburg, Januar 2008

Kamila Irena Iwanski