

Epigenetische Funktion des mutierten Tumorsuppressors p53 in humanen Mammakarzinoma

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) am Department Biologie der
Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der
Universität Hamburg



vorgelegt von
Dipl. Biol. Lars Tögel
aus Rödermark

Hamburg 2007

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. W. DEPERT
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. W. SCHÄFER
Tag der Disputation: 01. Februar 2008

Hamburg, den 18. Januar 2008



Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2004 bis Dezember 2007 am Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie der Universität Hamburg in der Abteilung Tumorstudiologie von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert angefertigt und von Herrn Dr. Genrich Tolstonog betreut.

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Deppert, Heinrich-Pette-Institut Hamburg
 2. Gutachter: Prof. Dr. Wilhelm Schäfer, Universität Hamburg
-

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGEN	IV
ZUSAMMENFASSUNG	VII
SUMMARY	IX
1 EINLEITUNG	1
1.1 DER TUMORSUPPRESSOR P53	2
1.2 STRUKTUR DES TUMORSUPPRESSORS P53	2
1.2.1 Das TP53 Gen	2
1.2.2 Die Struktur des p53-Proteins	3
1.3 STABILITÄT UND AKTIVIERUNG DES TUMORSUPPRESSOR P53	6
1.3.1 Proteosomale Degradation	6
1.3.2 Regulation und Aktivierung des p53-Proteins	7
1.4 FUNKTIONEN DES TUMORSUPPRESSORS P53	10
1.4.1 Zellzyklus Kontrolle	10
1.4.2 Induktion der Apoptose	11
1.4.3 DNA-Reparatur, Rekombination und Replikation	12
1.5 MUTATIONEN IM TUMORSUPPRESSOR P53	13
1.5.1 Dominant-negativer Effekt	14
1.5.2 Gain of function	15
1.5.2.1 Direkte und indirekte DNA-Interaktionen von mutp53	16
1.5.2.2 knock down von mutp53	18
1.6 DER TUMORSUPPRESSOR P53 ALS NUKLEINSÄURE-BINDENDEN PROTEIN	18
1.6.1 Interaktion mit DNA	19
1.6.2 Interaktion mit RNA	22
1.7 AUFGABENSTELLUNG	24
2 ERGEBNISSE	26
2.1 CHARAKTERISIERUNG UND DYNAMIK DER P53-EXPRESSION IN DEN ZELLINIEN MDAMB231, MDAMB468 UND MCF7	26
2.1.1 Analyse der TP53 Gen Transkription und der p53-Expression	28
2.1.2 Verifizierung der Transkripte für endogen exprimiertes mutp53	31
2.2 DNA BINDUNGSANALYSEN ENDOGEN EXPRIMIERTER MUTP53-PROTEINE MITTELS CHROMATIN IMMUNPRÄZIPITATION (CHIP-SEQ)	32
2.2.1 Verteilung der mutp53 Bindestellen im Genom	35
2.2.2 Genomische Lokalisation der mutp53-Bindestellen	37
2.2.3 Eigenschaften der mutp53-Bindestellen Sequenzen	39
2.3 EXTRAKTIONSANALYSEN ENDOGEN EXPRIMIERTER P53-PROTEINE	42
2.4 RNA IMMUNPRÄZIPITATION ZUR ANALYSE DER P53/RNA INTERAKTION <i>IN VIVO</i>	45
2.4.1 Spezifische Präzipitation p53-gebundener RNA	46
2.4.2 Genomische Verteilung der kodierenden Regionen der p53-gebundenen Transkripte	48
2.4.3 Sequenzeigenschaften der p53-gebundenen Transkripte	51
2.4.4 Strukturelle Analyse der p53-gebundenen Transkripte	53
2.4.5 Identifizierung der kodierenden Bereiche der p53-gebundenen Transkripte	54
2.4.6 Analyse der <i>in vivo</i> Interaktion von p53 mit seiner eigenen mRNA	57
2.4.7 Wtp53-gebundene Transkripte von klassischen Zielgenen	58
2.5 GEGENÜBERSTELLUNG DER GENOMISCHEN LOKALISATION DER MUTP53 DNA BINDESTELLEN UND DER KODIERENDEN BEREICHE DER MUTP53-GEBUNDENEN TRANSKRIPTE	60
2.6 ABSCHALTEN DER EXPRESSION DES TP53 GENS (<i>GENE SILENCING</i>) DURCH RNA INTERFERENZ	63
2.6.1 Versuch zur Generierung eines stabilen mutp53 knock downs in MDAMB231 und MDAMB468 Zellen	64
2.6.2 Dynamik des transienten mutp53 knock downs	67
2.6.2.1 Zeitkinetik des mutp53 knock downs in MDAMB231 Zellen	69

3 DISKUSSION	74
3.1 MUTP53 AUS MDAMB231 UND MDAMB468 ZELLEN BINDET AN DNA-BEREICHE MIT STRUKTURELLER FLEXIBILITÄT	74
3.1.1 Beurteilung der <i>in vivo</i> ChIP-Seq Methode	78
3.2 MUTP53 AUS MDAMB231 UND MDAMB468 ZELLEN BESITZT RNA-BINDEKAPAZITÄT	78
3.2.1 Beurteilung der <i>in vivo</i> RIP Methode	83
3.3 GLOBALE KORRELATION DER MUTP53 BINDESTELLEN UND TRANSKRIPT-KODIERENDEN REGIONEN AUS CHIP-SEQ UND RIP	84
3.4 DIE EXPRESSION EXOGENER SHRNA GEGEN MUTP53 ÜBERLAGERT SICH MIT DER RNA-BINDUNGSEIGENSCHAFT VON MUTP53 UND DESTABILISIERT DIE INTEGRITÄT DER ZELLE	86
3.5 WTP53 AUS MCF7 ZELLEN INTERAGIERT MIT RNA <i>IN VIVO</i>	88
3.5.1 <i>wtp53</i> bindet an seine eigene mRNA und die mRNA spezifischer Zielgene	89
3.6 EPIGENETISCHES MODELL DES <i>MUTP53</i> -INTERAKTOMS IN MDAMB231 UND MDAMB468 ZELLEN	90
4 MATERIAL	92
4.1 CHEMIKALIEN	92
4.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN	93
4.3 GERÄTE	94
4.3.1 Waagen	94
4.3.2 Schüttler und Mischgeräte	94
4.3.3 Zentrifugen	94
4.3.4 Mikroskope	94
4.3.5 Gelsysteme	94
4.3.6 Geräte für Arbeiten im prokaryotischen System	94
4.3.7 Geräte für Arbeiten im eukaryotischen System	94
4.3.8 Spannungsquellen	94
4.3.9 Weitere Geräte	95
4.4 KITS	95
4.5 GRÖßENSTANDARDS	95
4.5.1 DNA-Größenstandard	95
4.5.1 Protein-Größenstandards	95
4.6 ENZYME	96
4.7 STAMMLÖSUNGEN	96
4.8 PUFFER UND LÖSUNGEN	96
4.9 NÄHRMEDIEN FÜR DIE BAKTERIENKULTUR	99
4.10 BAKTERIENSTÄMME	99
4.11 PLASMIDE	99
4.12 EUKARYOTISCHE ZELLEN	100
4.13 NÄHRMEDIEN FÜR EUKARYOTISCHE ZELLEN	100
4.13 OLIGONUKLEOTIDE	101
4.13.1 Primer für Klonierungen	101
4.13.2 Primer für PCR, cDNA-Synthese und Sequenzierungen	101
4.13.3 Primer für die quantitative RT-PCR	102
4.14 ANTIKÖRPER	102
4.15 COMPUTER-SOFTWARE	103
5. METHODEN	104
5.1 ALLGEMEINE ARBEITEN IM PROKARYOTISCHEN SYSTEM	104
5.1.1 Kompetente Bakterienzellen	104
5.1.1.1 Chemisch kompetente Bakterien (Inoue et al., 1990)	104
5.1.2 Transformation	104
5.1.2.1 Blau-Weiss-Selektion	105
5.1.3 Präparation von Plasmid-DNA	105
5.1.3.1 Mini-Präparation (Plasmid Isolierung im kleinen Maßstab)	105
5.1.3.2 Maxi-Präparation (Plasmid Isolierung im großen Maßstab)	105
5.2 ALLGEMEINE ARBEITEN IM EUKARYOTISCHEN SYSTEM	106
5.2.1 Allgemeine Zellkulturtechniken	106
5.2.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen	106
5.2.1.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen	107
5.2.1.3 Zählen der Zellen	107
5.2.2 Transfektion	107

5.2.2.1 Stabile Transfektion.....	108
5.3 ALLGEMEINE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	108
5.3.1 Isolierung genomischer DNA.....	108
5.3.2 Isolierung von Nuklei.....	109
5.3.3 Isolierung von RNA.....	109
5.3.4 Quantitative Erfassung der Nukleinsäure-Konzentration.....	109
5.3.5 Reverse Transkriptase Reaktion (cDNA Synthese).....	110
5.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	111
5.3.5.1 Methode und Durchführung der Reaktion.....	111
5.3.5.2 Aufreinigung der PCR-Produkte (Phenol-Chloroform Extraktion).....	112
5.3.5.3 Phosphorylierung der PCR-Produkte.....	112
5.3.6 Quantitative Real-Time PCR (Q-RT-PCR).....	112
5.3.6.1 Datenanalyse der relativen Genexpression.....	113
5.3.7 Klonierung.....	114
5.3.7.1 DNA-Restriktionsverdau.....	114
5.3.7.2 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	114
5.3.7.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	114
5.3.7.4 Dephosphorylierung geschnittener DNA.....	115
5.3.7.5 Hybridisierung einzelsträngiger Oligonukleotide.....	115
5.3.8 Ligation.....	115
5.3.9 Sequenzierung von DNA.....	115
5.4 BIOCHEMISCHE METHODEN.....	116
5.4.1 Präparation eines totalen Zellysats.....	116
5.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	116
5.4.3 Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	116
5.4.3.1 Coomassie-Färbung von Proteingelen.....	117
5.4.4 Western-Blot Analyse.....	117
5.5 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	118
5.5.1 Fluorescence-activated cell sorting (FACS).....	118
5.5.1.1 Präparation der Zellen für den FACS-Sort.....	119
5.5.2 Induktion der P53 Expression in MCF7.....	119
5.5.3 Immunfluoreszenz.....	119
5.5.3.1 Herstellung des 4% Paraformaldehyd (PFA) Fixative.....	120
5.5.3.2 Herstellung des Einbettmediums Mowiol.....	120
5.5.4 RNA-Interferenz (RNAi).....	120
5.6 CHROMATIN IMMUNPRÄZIPITATION (CHIP-SEQ).....	121
5.6.1 Kreuzvernetzung DNA-gebundener Proteine und Aufreinigung der Protein/DNA Komplexe.....	121
5.6.2 Immunpräzipitation der Protein/DNA Komplexe.....	122
5.6.3 Elution und Auflösen der Vernetzung.....	122
5.6.4 Analyse der DNA-Fragmente.....	123
5.7 RNA IMMUNPRÄZIPITATION (RIP).....	123
5.7.1 Analyse der präzipitierten RNA.....	124
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	125
ANHANG.....	XI
A1 MUTP53-BINDESTELLEN AUS CHIP EXPERIMENTE.....	XI
A1.1 MDAMB468.....	XI
A1.2 MDAMB231.....	XI
A2 P53-GEBUNDENE TRANSKRIPTE AUS RIP EXPERIMENTE.....	XV
A2.1 MCF7.....	XV
A2.2 MDAMB231.....	XVI
A2.3 MDAMB468.....	XVII
A3 VEKTORKARTEN.....	XVIII
A3.1 pBluescript II sk (+).....	XVIII
A3.2 pENTR/H1/TO.....	XVIII
A3.3 pMaxGFP.....	XIX
A3.4 pSuper.p53.....	XIX
A3.5 pSuperior.neo.GFP.....	XX
A4 KARYOGRAMME DER ZELLINIEN.....	XXI

ABKÜRZUNGEN

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ARF	<i>alternative reading frame</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	ATM- und Rad3 verwandte Proteinkinase
bp	Basenpaare
BCRA1	<i>breast cancer 1</i>
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
cDNA	„copy“ DNA
ChIP-Seq	Chromatin Immunpräzipitation; Sequenzierung
C-Terminus	Carboxyl-terminus
$\Delta p53$	deltap53 (Deletion)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DBD	DNA-Bindedomäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FCS	Fötale Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
G	Guanosin
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
GOF	<i>gain of function</i> ; Funktionsgewinn
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HPRT1	Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1
HRP	Peroxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
IPTG	Isopropyl beta-D-thiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Leu	Leucin
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
M	Molar
mA	Milliampere
Mdm2	mouse double minute chromosome 2
mg	Milligramm

min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MoMuLV	Moloney Muriner Leukämie Virus
MOPS	3-(N-morpholino)Propansulfonyl Säure
mRNA	messenger RNA
mt	mitochondrial, dem Mitochondrium entsprechend
mutp53	mutiertes p53
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
nt	Nukleotid
ncRNA	<i>non-coding RNA</i> (nicht kodierende RNA)
NEAA	nicht essentielle Aminosäuren
NES	Kernexportsignal
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisationsignal
nm	Nanometer
NMR	Kernresonanzspektroskopie
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PB	Primer Bindestelle
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PGS	Protein G-Sepharose
Phe	Phenylalanin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
Pu	Purine
Py	Pyrimidine
RD	Regulatorische Domäne
rec.	rekombinant
RIP	RNA Immunpräzipitation
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Ser	Serin
shRNA	short-hairpin RNA (RNA Interferenz)
S/MAR	<i>scaffold/ matrix attachment region</i>
ss	einzelsträngig
SSDB	Sequenz-spezifische DNA Bindung
SSC	<i>side scatter</i>
T	Thymidin
TAE	Tris-Acetat/EDTA Elektrophoresepuffer
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBE	Tris-Borat/EDTA Elektrophoresepuffer
TD	Tetramerisierungsdomäne

TEMED	N,N,N',N'-tetramethyldiamin
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
Tween®20	Polyoxeethylen-Sorbitan-Monolaurat
U	Unit; Aktivitätseinheit
ü.N.	über Nacht
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
W	Watt
wtp53	Wildtyp p53
wtp53-RE	wtp53 <i>response element</i> (DNA Konsensus Sequenz)
w/v	Gewicht pro Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranosid

ZUSAMMENFASSUNG

Missense Punktmutationen im *TP53* Gen stellen die häufigste genetische Alteration in menschlichen Tumorgeweben und etablierten Tumorzelllinien dar. Im Gegensatz zum Wildtyp Protein (wtp53) entgeht mutiertes p53 (mutp53) der Kontrolle über den Mdm2-abhängigen proteolytischen Abbau und hat die Eigenschaften eines Zielgen-spezifischen Transkriptionsfaktors verloren. Jedoch ist die Fähigkeit zur Bindung von Nukleinsäuren erhalten geblieben. Anhand der Resultate experimenteller Arbeiten mit Tumorzelllinien und transgenen Mäusen wird angenommen, dass mutp53 der Krebszelle einen Überlebensvorteil während der Tumorevolution verschafft.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den auf der Interaktion mit Nukleinsäure basierenden Wirkmechanismus von endogen exprimierten mutp53-Proteinen in humanen Mammakarzinom-Zelllinien zu charakterisieren. Im ersten Teil der Arbeit wurde eine Methode etabliert, welche die Chromatin Immunpräzipitation mit anschließender Sequenzierung der präzipitierten Sequenzen koppelt (ChIP-Seq). Diese Methode ermöglichte die Identifikation einiger mutp53-Bindestellen in den Zelllinien MDAMB231 und MDAMB468. Die bioinformatische Analyse der Bindestellen ergab, dass zwei Drittel der Sequenzen in intergenischen Regionen des Genoms lokalisiert sind und hauptsächlich repetitive DNA-Elemente beinhalten. Eine allgemeingültige Nukleotid-Konsensus-Sequenz konnte nicht identifiziert werden. Da repetitive Elemente, wie beispielsweise LINEs und SINEs, der DNA strukturelle Flexibilität verleihen, wird die Interaktion von mutp53 mit DNA vermutlich über eine Struktur-selektive Bindung (DSSB) reguliert.

Der Struktur-selektive Bindungsmechanismus ist möglicherweise auch für Wechselwirkungen von mutp53 bzw. wtp53 mit RNA verantwortlich. Im zweiten Teil der Arbeit wurde daraufhin mittels RNA Immunpräzipitation (RIP) und anschließender bioinformatischer Analyse der präzipitierten Transkripte potentielle Interaktionen von mutp53 bzw. wtp53 mit RNA untersucht. Die Analyse ergab, dass sowohl mutp53 als auch wtp53 präferentiell mit verkürzten Transkripten oder nicht kodierenden RNAs (ncRNA) interagiert. In spezifischen Analysen wurden Transkripte von bestimmten wtp53-Zielgenen auf ihre Assoziation mit wtp53-Proteinen hin untersucht. In der Tat konnte die Interaktion mit einigen Transkripten dieser Gene nachgewiesen werden.

Zur Entschlüsselung der biologischen Relevanz der mutp53-Expression in MDAMB231 und MDAMB468 Zellen sollte das Protein durch RNAi stabil ausgeschaltet werden. Dieser Ansatz war jedoch nicht erfolgreich, da exogene RNAs in diesen Zellen vermutlich einen durch die dsRNA-abhängige Protein Kinase (PKR) vermittelten Stopp der Proteinbiosynthese induzieren, was den Zellzyklusarrest und Zelltod zur Folge hat. Durch mutp53 würden freie RNAs gebunden und somit eine Induktion der PKR verhindert. In der transienten Überexpression von shRNAs konnte eine erhöhte Transkription von mutp53 festgestellt werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass mutp53 auch zur Regulierung der globalen Konzentration freier RNA gebildet wird.

Zusammenfassend lässt sich mutp53 als neuer epigenetischer Faktor klassifizieren und folgendes Modell für die biologische Funktion von mutp53 in der Tumorzelle postulieren: durch die Bindung von mutp53-Proteinen an repetitive DNA-Regionen kommt es zu einer globalen Veränderung der Chromatinarchitektur. Dadurch wird die Rekrutierung von funktionell gekoppelten Genen an transkriptionell aktive Multiprotein-Komplexe ermöglicht. An diesen Komplexen kann die koordinierte Transkription der Gene und eine RNA Prozessierung stattfinden. Eine neue und wesentliche Komponente der postulierten übergeordneten Regulation der Genexpression ist die RNA-Bindekapazität von mutp53. Die Entfernung von mutp53 aus diesem ausgeglichenen System oder die Überexpression von exogenen RNAs verschiebt die fein abgestimmten Balance zwischen Protein-gebundenen und freien RNAs mit drastischen Folgen für die Proliferation der Krebszelle.

SUMMARY

Missense point mutations in the TP53 gene represent the most frequent genetic alterations in human tumor tissues and established tumor cell lines. In contrast to wild type p53 (wtp53), mutated p53 (mutp53) escapes the control of the Mdm2-dependent proteolytic degradation and has lost the ability to act as a sequence specific transactivator. The ability to bind nucleic acids, however, remains. Based on experimental work with tumor cell lines and transgenic mice it is assumed that endogenous mutp53 provides the tumor cell with an advantage for survival during tumor development.

The aim of this work was to characterize the function of endogenously expressed mutp53 in breast cancer cell lines depending on its interaction with nucleic acids.

In the first part of this work a method was established which couples chromatin immunoprecipitation (ChIP) with subsequent bioinformatic analysis of the precipitated sequences (ChIP-Seq). Using this method it was possible to identify several mutp53 binding sites in the human breast cancer cell lines MDAMB231 and MDAMB468. Two thirds of the identified sequences were located in intergenic regions and contained mainly repetitive DNA elements. No common nucleotide binding sequence was evident. However, as repetitive DNA elements such as LINEs and SINEs are known to endow DNA with structural flexibility, the interaction of mutp53 with DNA is probably dependent on specific DNA topology (DNA structure-selective binding, DSSB).

DSSB might also be crucial for the interaction of mutp53 and/or wtp53 with RNA. To analyze such potential interactions, RNA Immunoprecipitation (RIP) and subsequent bioinformatic analysis of the precipitated transcripts was applied in the second part of this work. This revealed that both mutp53 and wtp53 preferentially interact with truncated transcripts or non-coding RNAs (ncRNA). In further experiments the interaction of wtp53 proteins with transcripts of specific target genes was examined. Indeed, transcripts of some of these genes were found to be bound by wtp53.

To understand the biological relevance of the mutp53 expression in MDAMB231 and MDAMB468 cells, it was attempted to stably switch off the protein by RNAi. However, this approach was not successful, possibly due to activation of dsRNA dependent protein kinase (PKR) by exogenous RNAs which mediates the shutdown of protein biosynthesis, consequently leading to cell cycle arrest and cell death. Mutp53 would bind free RNAs and

thereby prevent induction of PKR. Transient overexpression of shRNAs led to upregulation of mutp53 transcription, indicating that mutp53 is produced for the regulation of the global concentration of free RNA.

In summary, mutp53 can be classified as a new epigenetic factor and the following model for the biological function of mutp53 in the tumor cell is postulated: Binding of mutp53 to repetitive DNA elements causes a global change in the chromatin architecture. Thereby, the physical recruitment of functionally coupled genes to transcriptionally active multi-protein complexes is facilitated. At these complexes, both coordinated transcription of the respective genes as well as RNA processing can occur. In this setting, the RNA-binding capacity of mutp53 represents a novel and important component involved in the postulated higher order regulation of gene expression. Removal of mutp53 from this equilibrated system, or overexpression of exogenous RNAs interrupts the delicate balance between protein-bound and free RNA, resulting in drastic consequences for the proliferation of the tumor cell.

1 EINLEITUNG

Der menschliche Organismus besteht durchschnittlich aus 10 bis 100 Billionen Zellen. Abgesehen von den Erythrozyten (roten Blutkörperchen) und den Thrombozyten (Blutplättchen) ist jede dieser Zellen Träger einer Kopie des menschlichen Erbguts, der DNA. Täglich wird die Zelle mit endogenen Vorgängen (z.B. Replikation) und exogenen Einflüssen (z.B. UV-Strahlung) konfrontiert, die nachhaltig die DNA verändern und schädigen können. Es besteht die Gefahr, dass sich Mutationen manifestieren und zur genetischen Instabilität der Zelle und deren Nachfolgenerationen führen. Um diesem Prozess entgegen zu wirken, besitzt die Zelle ein fein abgestimmtes Netzwerk von Molekülen, das es ihr ermöglicht, DNA-Schäden zu detektieren, einen Zellzyklus-Arrest einzuleiten und schließlich den Schaden zu reparieren. Sind die Veränderungen im Erbgut irreparabel, wird der programmierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet.

Betreffen somatische Mutationen Gene, die an der Regulierung des Zellzyklus und der Zelldifferenzierung beteiligt sind, kann das zu unkontrollierter Proliferation führen. Durch die deregulierte Zellteilung besteht die Gefahr, dass sich mit zunehmenden Zellzyklen weitere Mutationen akkumulieren und die genetische Instabilität erhöht wird. Sie gilt als zentrale Eigenschaft der Krebszelle, die nicht nur für die Tumorentstehung, sondern auch für die Progression von entarteter Zelle zu malignem Tumor verantwortlich ist (Nowell, 1976).

In nicht transformierten Zellen werden Zellteilung, Zelldifferenzierung und Zelltod durch zwei Klassen von Genen streng kontrolliert, den Protoonkogenen und den Genen, die für Tumorsuppressorproteine kodieren. Diese Genklassen gewährleisten die Integrität einer jeden Zelle im Zellverband. Die Produkte der Protoonkogene stimulieren Zellwachstum und Zellproliferation, wobei Mutationen im Gen zu einem überaktivierten Onkogen (Vogelstein et al., 2000) führen. Zu den Onkogenen gehören z.B. *ras*, *myc* und *sis*. Tumorsuppressorproteine fungieren als Protoonkogen-Antagonisten, indem sie die Zellproliferation inhibieren oder die Apoptose einleiten (Vogelstein et al., 2000). Hier müssen beide Allele deletiert oder verändert sein, damit es zu der Tumورprogression kommt. Zu dieser Genklasse gehören Regulatoren des Zellzyklus, Kinase-Inhibitoren und Transkriptionsfaktoren. Die prominentesten Vertreter sind das Retinoblastomgen (*pRb*) und das *TP53* Gen.

1.1 Der Tumorsuppressor p53

Das p53-Protein wurde 1979 im Komplex mit dem vom onkogenen *Simian Virus 40* (SV40) kodierten großen T-Antigen isoliert (Kress et al., 1979; Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979). Erste Studien zeigten, dass das p53-Protein in transformierten Zell-Linien stark exprimiert wird, in normalen Zellen jedoch kaum zu detektieren ist (DeLeo et al., 1979; Lane and Crawford, 1979). Weitere Arbeiten deckten einen Zusammenhang zwischen Zellproliferation und erhöhter p53-Expression auf (Milner, 1984; Reich and Levine, 1984). Aufgrund dieser positiven Korrelation von Transformation/Proliferation und Protein-Expression wurde p53 zunächst als Protoonkogen klassifiziert. Erst zehn Jahre später stellte sich heraus, dass die Untersuchungen mit mutiertem Protein (mutp53) durchgeführt wurden. Da das natürlich vorkommende Wildtyp p53-Protein (wtp53) kein transformierendes Potenzial besitzt und eigentlich der Transformation entgegenwirkt (Eliyahu et al., 1989; Finlay et al., 1989), wurde wtp53 schließlich der Status eines Tumorsuppressors zugesprochen (Baker et al., 1989; Finlay et al., 1989).

1.2 Struktur des Tumorsuppressors p53

1.2.1 Das *TP53* Gen

Das humane *TP53* Gen (Abbildung 1A) umfasst 19200 bp (Basenpaare) und ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (17p13.1) lokalisiert (Isobe et al., 1986; Rowley, 1982). Es beinhaltet 11 Exone, von denen die Exone zwei bis 11 für 393 Aminosäuren kodieren. Aus der Anzahl der Aminosäuren errechnet sich für das p53-Protein ein Molekulargewicht von ca. 43,7 kDa. In der SDS-PAGE zeigt das Protein ein aberrantes Laufverhalten bei 53 kDa, woraus schließlich die Bezeichnung p53 resultierte (Oren, 1985).

Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass das *TP53* Gen unter der Kontrolle eines einzigen Promotors steht (Tuck and Crawford, 1989) und Spleißen zu drei Isoformen führen kann. Vor zwei Jahren wurden ein alternativer Promotor stromaufwärts des Exons 1, sowie ein interner Promotor im Intron 4 identifiziert (Bourdon et al., 2005) und die Anzahl möglicher Isoformen auf neun erweitert. Zusätzlich wurde beschrieben, dass alternatives Spleißen zu einem Sequenzverlust im Exon 7 führt (Rohaly et al., 2005), was die Expression der Δ p53-Isoform zur Folge hat. Die Ergebnisse werden jedoch kontrovers diskutiert (Bourdon, 2007; Chan and Poon, 2007).

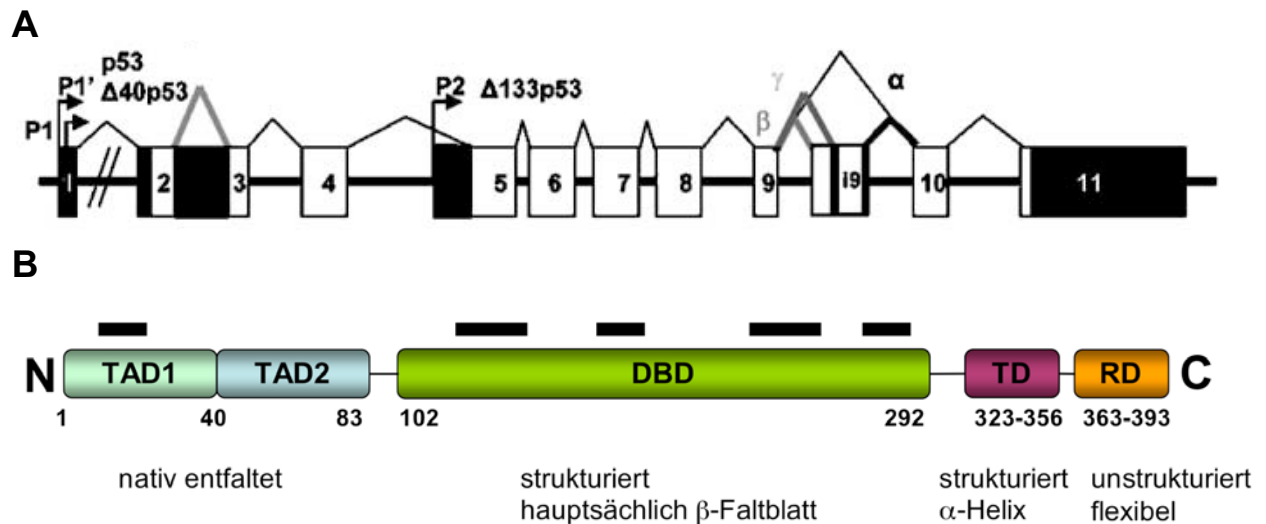


Abbildung 1 Genstruktur und Proteindomänen des humanen Tumorsuppressors p53

A) Schema des *TP53* Gens: α , β und γ zeigen alternative Spleißstellen und P1, P1' sowie P2 alternative Promotoren an. Zur Vereinfachung ist das Intron 1 verkürzt dargestellt. Verändert nach (Murray-Zmijewski et al., 2006). (B) Domänen des p53-Proteins: Schwarze Balken markieren konservierte Regionen. Die Ziffern geben die Abfolge der Aminosäuren an. TAD = Transaktivator-domäne; DBD = DNA-Bindedomäne; TD = Tetramerisierungsdomäne; RD = Regulatorische Domäne.

1.2.2 Die Struktur des p53-Proteins

Das p53-Protein lässt sich in drei funktionelle Bereiche unterteilen, die sich durch verschiedene Strukturelemente und biochemische Aktivitäten voneinander abgrenzen (Abb.1b).

Der N-Terminus (AS (Aminosäuren) 1~100) trägt einen hohen Anteil an sauren Aminosäuren und ist nativ entfaltet (Bell et al., 2002; Dawson et al., 2003). Hier liegt die aus zwei Untereinheiten bestehende Transaktivierungsdomäne (TAD) von p53 (TAD1: AS 1-40 und TAD2: AS 40-83) (Candau et al., 1997; Fields and Jang, 1990; Zhu et al., 2000; Zhu et al., 1998). Über diese Domäne interagiert p53 mit einer Vielzahl von Proteinen, u.a. mit den viralen Proteinen E1B und HBx (Truant et al., 1995) oder mit zellulären Komponenten der Transkriptionsmaschinerie (Lu and Levine, 1995; Thut et al., 1995), und kann so die Transkription von unterschiedlichen Promotoren aus aktivieren (Candau et al., 1997; Unger et al., 1993). Die Aminosäure Leucin an der Position 22 und Tryptophan an der Position 23, welche in einer konservierten Region (AS 13-23) liegen, sind für diese Funktion essentiell (Lin et al., 1994). Neben diesen Aminosäuren spielen die Reste an Position 19 (Phenylalanin) und 26 (Leucin) eine wichtige Rolle bei Wechselwirkungen der N-terminalen Domäne mit

dem p53-Antagonisten *Mdm2* (mouse double minute chromosome 2; im humanen System auch *Hdm2* genannt) (Bottger et al., 1997; Lin et al., 1994). Die Interaktion führt zu einer Inhibierung der Transaktivierungsfunktion von p53 (Leng et al., 1995; Momand et al., 1992; Zauberman et al., 1993). Ferner wurde in dieser Region ein Kernexportsignal (*nuclear export signal*, NES: AS 11-27) identifiziert (Zhang and Xiong, 2001). Überlappend mit der zweiten Untereinheit der Transaktivierungsdomäne des Tumorsuppressors p53 findet man eine Prolinreiche Region, die sich aus fünf Wiederholungen des Motivs PXXP zusammensetzt (P= Prolin, X= beliebige AS). Sie ist notwendig für die Apoptose-Induktion und die Supressoreigenschaft des Proteins (Venot et al., 1998; Walker and Levine, 1996).

Die Kernregion (AS 102-292) oder DNA-Bindedomäne (DBD) von p53 ist hochgradig konserviert (siehe Abbildung 1B) und äußerst resistent gegenüber proteolytischem Verdau (Bargonetti et al., 1993; Pavletich et al., 1993). Sie ist verantwortlich für die Sequenzspezifische DNA Bindung (SSDB) von p53 (Bargonetti et al., 1993; Kern et al., 1991) und folglich essentiell für die zentrale Funktion des Proteins als Transaktivator bestimmter Zielgene. Hierbei interagiert die DBD von p53 mit spezifischen DNA Regionen (*wtp53 response element; wtp53-RE*) über eine degenerierte Konsensus-Sequenz, die sich aus zwei Dekameren der Nukleotidfolge 5'-PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy-3' aufbaut (el-Deiry et al., 1992) (siehe auch Abschnitt 1.6). Die beiden Kopien (*half sites*) können durch 0 bis 13 bp getrennt sein. In einer Reihe von Promotoren bekannter p53-Zielgene wie *mdm2* (Wu et al., 1993), *gadd45* und *p21^{Waf1/CIP1}* (Chin et al., 1997; el-Deiry et al., 1993) konnte die Konsensus-Sequenz identifiziert werden.

Die DBD besteht aus zwei antiparallel angeordneten, über eine Schleife (AS 124-135) verbundenen β -Faltblättern, welche die Basis für ein Schleife-Faltblatt-Helix-Motiv bilden. Zwei α -Helices (AS 177-181 und AS 166-168) dieses Motivs interagieren direkt mit der DNA (Canadillas et al., 2006; Cho et al., 1994). Über 90 % aller Tumor-assoziierten Mutationen (siehe Abbildung 3) finden sich in der DBD und führen in den meisten Fällen im Vergleich zu *wtp53* zu einer Verringerung der thermodynamischen Stabilität des Proteins (Bullock et al., 1997; Joerger et al., 2006). Die Mutationen lassen sich in zwei unterschiedliche Klassen einteilen. Klasse I Mutationen beeinträchtigen die Protein-DNA Interaktion (Kontaktmutanten), wohingegen Klasse II Mutationen die räumliche Struktur des Proteins verändern (Konformationsmutanten) (Rolley et al., 1995) (siehe auch Abschnitt 1.5). Neben der primären Funktion der Kernregion als DNA-bindendes Element wurde auch eine 3'-5'-gerichtete Exonukleaseaktivität dieser Domäne beschrieben (Mummenbrauer et al.,

1996), die eine Funktion von p53 in DNA-Reparaturprozessen und der Replikation impliziert. In nachfolgenden *in vitro* Studien konnte tatsächlich eine gewisse Substratspezifität der Exonukleasefunktion für einzelsträngige DNA, Nukleotidfehlpaarungen (*mismatch*) und Doppelstrangbrüche detektiert werden (Bakhanashvili, 2001; Skalski et al., 2000). Als regulatorische Einheit für diese Funktion fungiert die C-terminale Region von p53 (Janus et al., 1999).

Der basische C-Terminus ist über eine flexible Linkerregion (AS 300-323) mit der Kerndomäne verbunden. Hier sind drei Kernlokalisierungssignale (NLS: AS 316-325; AS 379-375; AS 379-384) (Shaulsky et al., 1990) und ein Kernexportsignal (NES: AS 340-351) (Stommel et al., 1999) lokalisiert. Weiter findet man im C-Terminus eine strukturierte Domäne, für die man bisher annahm, dass über deren Strukturelemente die einzelnen p53-Moleküle oligomerisieren (Sturzbecher et al., 1992) (Tetramerisierungsdomäne, TD, AS 323-356; siehe Abbildung 1B). Die TD besteht aus einem β -Strang und einer α -Helix, die über ein Glycin verbunden sind und im monomeren Zustand eine V-Konformation einnehmen (Clore et al., 1995; Jeffrey et al., 1995; Mittl et al., 1998). P53-Monomere bilden Dimere, indem sich die β -Stränge der Monomere antiparallel zu einem β -Faltblatt zusammenlagern. Hierbei bündeln sich die beiden α -Helices, die wiederum mit dem α -Helix-Bündel des zweiten p53-Dimers assoziieren und die Tetramerisierung komplettieren. Die Oligomerisierung von mehreren p53-Molekülen ist für die SSDB von entscheidender Bedeutung (Hainaut et al., 1994). DNA-bindendes, transkriptionell aktives p53 liegt im tetrameren Zustand vor, wobei sich das Tetramer aus zwei identischen p53-Dimeren zusammensetzt (Clore et al., 1995; Jeffrey et al., 1995). In Lösung besteht ein Gleichgewicht zwischen Dimeren und Tetrameren, das sich bei Anwesenheit von spezifischen Bindesequenzen zugunsten der p53-Tetramere verschiebt (Weinberg et al., 2004). Eine aktuelle Strukturstudie des nativen p53-Tetramers, die auf cryoelektronenmikroskopischen Daten beruht, stellt jedoch den klassischen Oligomerisierungsmechanismus über die TD in Frage (Okorokov et al., 2006) (siehe Abschnitt 1.6).

Im Anschluss an die TD liegt eine unstrukturierte regulatorische Einheit des Moleküls (Regulatorische Domäne, RD, AS 363-393; Abb. 1B). Die RD wurde in zwei unterschiedlichen Modellen als negativer Regulator für die SSDB von p53 beschrieben (Anderson et al., 1997; Hupp and Lane, 1994; Hupp et al., 1992). Diese Modelle werden jedoch kontrovers diskutiert und die exakte Aufklärung des inhibitorischen Mechanismus durch den C-Terminus bleibt noch unaufgeklärt (Ahn and Prives, 2001) (siehe Abschnitt 1.6).

Weitere Eigenschaften der äußersten C-terminalen Region sind die unspezifische Bindung einzel- und doppelsträngiger DNA, sowie von RNA *in vitro* und die Interaktion mit geschädigter DNA (Bakalkin et al., 1995; Reed et al., 1995; Riley et al., 2006; Riley et al., 2007). Ferner katalysiert der C-Terminus die Hybridisierung von Einzelstrang-DNA und/oder RNA zu Doppelstrangmolekülen (Nedbal et al., 1997; Oberosler et al., 1993).

1.3 Stabilität und Aktivierung des Tumorsuppressor p53

In normal proliferierenden Zellen wäre eine erhöhte Expression des wtp53 Proteins toxisch, da es die Progression durch den Zellzyklus, die DNA-Replikation und schließlich die Zellproliferation inhibiert. Deswegen wird wtp53 normalerweise relativ schnell wieder degradiert. Die Protein-Halbwertszeit ist auf weniger als 30 Minuten reduziert (Kubbutat et al., 1997; Lu et al., 1996). Mutp53 hingegen weist eine um ein Vielfaches erhöhte Halbwertszeit auf (Hinds et al., 1990; Hollstein et al., 1991). Infolge zellulären Stresses wird wtp53 aufgrund posttranslationaler Modifikationen stabilisiert und aktiviert. Daraus resultiert eine erhöhte Halbwertszeit (Liu et al., 1994; Muralidhar et al., 1996) und das wtp53-Protein akkumuliert im Zellkern, wo es spezifische Zielgene transaktiviert. Verschiedene Mechanismen tragen dazu bei, die Konzentration des wtp53-Proteins in der Zelle zu regulieren und auf den jeweiligen Bedarf anzupassen.

1.3.1 Proteosomale Degradation

Die Degradation von wtp53 findet über eine von Mdm2 initiierte Ubiquitin-vermittelte Proteolyse statt (Kubbutat et al., 1997; Momand et al., 2000). Der p53-Antagonist fungiert hier als E3-Ligase (Fang et al., 2000), die bei geringen Konzentrationen von Mdm2 Monoubiquitinierung und den Kernexport von p53 induziert, wohingegen hohe Mdm2-Konzentrationen zur Polyubiquitinierung von p53 führen und dessen Degradation im Kern fördern (Li et al., 2003). Wichtige negative Regulatoren für die Mdm2-Konzentration und Mdm2-Funktion in der Zelle sind die Proteinkinase ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) (Khosravi et al., 1999; Maya et al., 2001) und das Produkt des *p16^{INK4A}/p14^{ARF}* Gens, der als Tumorsuppressor ARF (*alternative reading frame*) oder auch als p14^{ARF} (p19^{ARF} in Maus) bezeichnet wird (Weber et al., 1999; Zhang et al., 1998). Die Bindung von Mdm2 an p53 wird über Bereiche in den N-terminalen Domänen und den Kernregionen beider Proteine vermittelt, wobei die Interaktion der N-terminalen Domänen durch eine sterische Maskierung der Aminosäuren Phe19, Trp23 und Leu26 von p53 hauptsächlich zu einer Inhibierung der

Transaktivierungskapazität von p53 führt (Kussie et al., 1996). Die Interaktion der beiden Kernregionen scheint jedoch entscheidend für die Ubiquitinierung des Tumorsuppressors zu sein (Ma et al., 2006a; Shimizu et al., 2002). In Abbildung 2 sind die von mdm2 ubiquitinierten Aminosäurereste im C-terminus des Tumorsuppressors p53 gezeigt.

In Abschnitt 1.2.2 wurde bereits erwähnt, dass p53 die Transkription seines Antagonisten Mdm2 kontrolliert und die Transaktivierungskapazität von p53 wiederum durch Mdm2 beeinflusst wird. Daraus ergibt sich eine fein abgestimmte negative Rückkopplungsschleife (*negative feedback loop*) (Wu et al., 1993), die zusammen mit der oben beschriebenen E3-Ligasefunktion von Mdm2 die Konzentrationen beider Proteine in der Zelle streng reguliert. Zusätzlich zu *Mdm2* wurden in den letzten Jahren noch weitere Ubiquitinligasen und p53-Inhibitoren identifiziert (Dornan et al., 2004; Gu et al., 2002; Leng et al., 2003; Shmueli and Oren, 2005; Shvarts et al., 1997). Sie deuten darauf hin, dass die Regulation des p53-Abbaus einen komplexeren Mechanismus darstellt, als bisher angenommen.

Es gibt Hinweise darauf, dass die Regulation der p53-Konzentration in der Zelle nicht nur von der Degradationsrate des Proteins abhängig ist, sondern auch auf posttranskriptionaler Ebene stattfindet. Mosner *et al.* konnte *in vitro* zeigen, dass murines p53 in ungestressten Zellen an seine eigene mRNA bindet und die Translation inhibiert (siehe Abschnitt 1.6) (Mosner et al., 1995).

1.3.2 Regulation und Aktivierung des p53-Proteins

Führt die C-terminale Markierung des Tumorsuppressors p53 mit Ubiquitin hauptsächlich zur Degradierung des Proteins, sind andere posttranslationale Modifizierungen vorrangig für die Stabilisierung und funktionelle Regulierung von p53 verantwortlich. Zu diesen Modifizierungen gehören Azetylierung, Neddylierung und Sumoylierung von Lysinresten, sowie Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten (siehe Abbildung 2).

P53 enthält mehrere Serin- und Threoninreste als potentielle Phosphorylierungsstellen (Bode and Dong, 2004; Olsson et al., 2007), die über das gesamte Protein verteilt sind, jedoch in den N- und C-terminalen Bereichen akkumuliert vorliegen (siehe Abbildung 2). Obwohl die Mehrheit dieser Stellen nur in Folge unterschiedlicher zellulärer Stresssignale reversibel phosphoryliert werden, konnte in bestimmten Zellsystemen gezeigt werden, dass einige Stellen konstitutiv phosphoryliert sind (z.B. Ser378 in MCF7 Zellen) und/ oder in Folge bestimmter DNA-Schäden dephosphoryliert werden (z.B. Ser376 in MCF7 oder Thr55 in

U2OS Zellen) (Li et al., 2007; Li et al., 2004; Waterman et al., 1998). Im Gegensatz zu den Serin- und Threoninresten konnte für die neun Tyrosinreste im p53-Protein bisher keine Phosphorylierung nachgewiesen werden (Bode and Dong, 2004). Wichtige Signaltransduktionswege, die infolge von DNA-Schäden zur Phosphorylierung beitragen, werden von den Proteinkinasen ATM (siehe Abschnitt 1.3.1) und ATR (ATM- und Rad3 verwandte Proteinkinase) vermittelt. Die ATM-Kinase wird durch DNA-Doppelstrangbrüche, die z.B. infolge von ionisierender Strahlung auftreten, induziert. Sie phosphoryliert p53 an Ser15 (Canman et al., 1998) und aktiviert die Kinase Chk2 (Ahn et al., 2000), welche wiederum p53 an Ser20 phosphoryliert (Hirao et al., 2000). Die Modifikation des Ser20 hat eine Schwächung der p53/Mdm2 Wechselwirkung zur Folge und verhindert dadurch die Degradierung von p53 (Chehab et al., 2000; Shieh et al., 2000). Ob die Phosphorylierung des Ser15 eine ähnliche Rolle bei der p53/Mdm2 Interaktion spielt, ist nicht eindeutig geklärt (Dumaz and Meek, 1999; Shieh et al., 1997). Eher scheint phosphoryliertes Ser15 die Transaktivierungskapazität von p53 zu fördern (Dumaz and Meek, 1999). Die ATR-Kinase wird durch UV-Strahlung aktiviert und phosphoryliert ebenfalls Serin 15 und Serin 37 (Shieh et al., 1997; Tibbetts et al., 1999) sowie die Kinase Chk1. Chk1 modifiziert Serin 20 mit den gleichen Auswirkungen wie Chk2.

Phosphorylierungen in der Kerndomäne führen eher zur Destabilisierung des p53-Proteins als zur Aktivierung seiner Transaktivierungskapazität. Bech-Otschier *et al.* zeigten, dass das COP9-Signalosom in ungestressten Zellen Thr155 von p53 phosphoryliert und den Abbau des Tumorsuppressors durch eine Ubiquitin-vermittelte Proteolyse einleitet (Bech-Otschir et al., 2001).

Für die Phosphatmodifikationen des C-terminalen Bereichs (z.B. Ser315, Ser378 und Ser392) postulierte man eine vorrangige Rolle bei der Regulation der SSDB und der Tetramerisierung von p53 (Sakaguchi et al., 1997; Takenaka et al., 1995; Wang and Prives, 1995). Jedoch konnten nicht alle der Beobachtungen in aktuelleren Studien verifiziert werden (Kim et al., 2004).

Eine für die Transaktivierung von apoptotischen Genen wichtige Phosphorylierungsstelle ist das Serin an Position 46, das von mehreren Kinasen modifiziert werden kann (Bulavin et al., 1999; D'Orazi et al., 2002; Taira et al., 2007). Ferner scheint die Phosphorylierung an dieser Stelle einen direkten Einfluss auf die Azetylierung des Lysinrests 382 zu haben, was zur Aktivierung von p53 beiträgt (Hofmann et al., 2002).

Azetylierungen des p53-Proteins betreffen in der Kerndomäne den Lysinrest 120, dessen Modifikation essentiell für die p53-abhängige Apoptose ist (Tang et al., 2006), und mehrere carboxyterminale Lysine (siehe Abbildung 2), welche die Aktivierung und Funktion von p53 regulieren (Nakamura et al., 2002; Saito et al., 2002; Wang et al., 2003). Die Azetylierung wird über Histon-Azetyltransferasen (HAT) wie PCAF und p300 katalysiert und durch Histon-Deazetylasen umgekehrt (Barlev et al., 2001; Gu and Roeder, 1997; Gu et al., 1997; Luo et al., 2001). Da im Allgemeinen die Azetylierungen der Lysine von einer vorherigen Phosphorylierung bestimmter Serine und/ oder Threonine abhängt, spricht man bei der Aktivierung von p53 infolge zellulären Stresses auch von einer Phosphorylierungs- und Azetylierungskaskade (Sakaguchi et al., 1998).

Neben der in Abschnitt 1.3.1 besprochenen Modifizierung des C-terminus mit Ubiquitin wird p53 auch durch Ubiquitin-verwandte Moleküle reguliert, die ebenfalls an die Ubiquitin-Bindestellen angelagert werden. Hierbei handelt es sich um SUMO1 (*small ubiquitin-related modifier1*) und NEDD8 (*neural precursor cell-expressed developmentally down-regulated*), die eine gegensätzliche Wirkung auf die Transaktivierungskapazität von p53 haben (Gostissa et al., 1999; Rodriguez et al., 1999; Xirodimas et al., 2004).

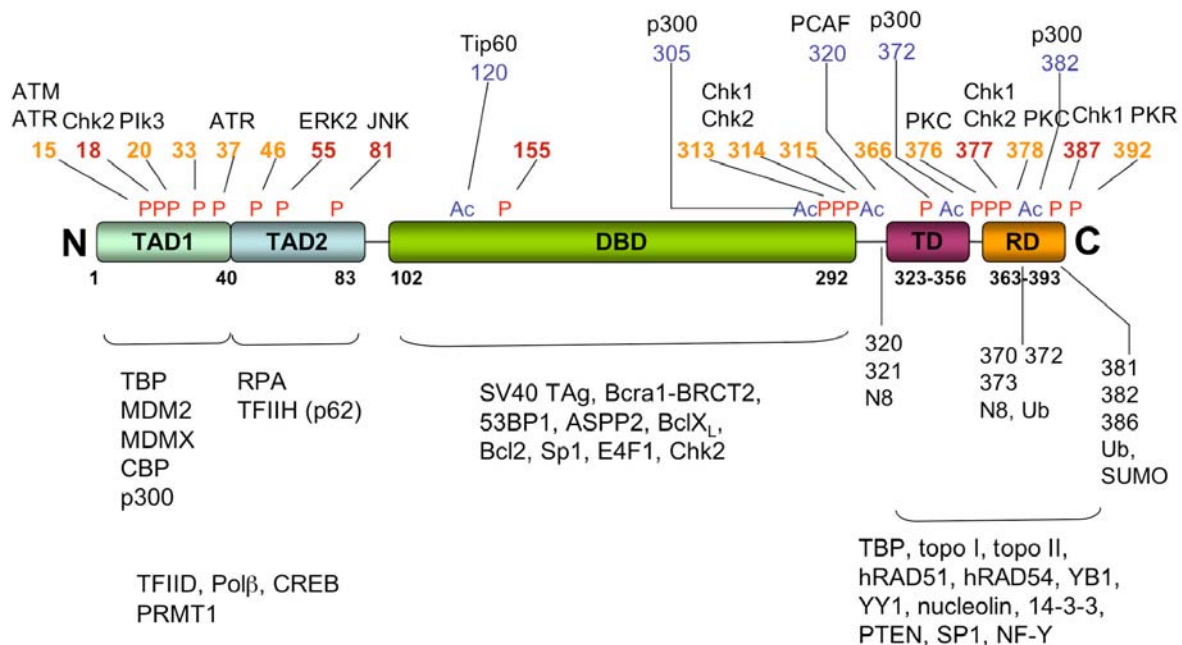


Abbildung 2 Postranskriptionelle Modifikationen und Protein-Interaktionspartner des humanen Tumorsuppressors p53

Zur Vereinfachung sind nur einige der bisher postulierten und bekannten Modifikationen dargestellt: P = Phosphorylierungen, wobei Threonine rot und Serine orange markiert sind;

Ac = Azetylierungen; N8 = Neddylierung; Ub = Ubiquitinierung; SUMO = Sumoylierung; zum Teil sind die modifizierenden Enzyme mit angegeben.

Unterhalb der Darstellung sind Interaktionspartner den jeweiligen Bindedomänen zugeordnet.

Verändert nach: C.W. Anderson, Homepage

1.4 Funktionen des Tumorsuppressors p53

Nach dem heutigen Verständnis fungiert der Tumorsuppressor p53 als „Wächter des Genoms“ (*guardian of the genome*) (Lane, 1992), der aufgrund zellulären und genotoxischen Stresses stabilisiert und aktiviert wird. Die Stress-Stimuli basieren auf unterschiedlichen zellulären und exogenen Ursachen, wie Hypoxie, Nukleotid-Depletion, Virusinfektionen, Aktivierung von Onkogenen und DNA-schädigende Strahlung (z.B. ionisierende Strahlung oder UV-Licht). Anhand des jeweiligen Stimulus wird ein spezifischer Signalweg gestartet, der die posttranslationale Modifikation des p53-Proteins zur Folge hat (siehe oben). Je nach Grad der resultierenden DNA-Schäden transaktiviert p53-Zielgene, die den Zellzyklusarrest initiieren, an der DNA-Reparatur teilnehmen oder gegebenenfalls die Apoptose einleiten (Helton and Chen, 2007; Offer et al., 1999; Zhou et al., 2001).

1.4.1 Zellzyklus Kontrolle

Der Zellzyklus gliedert sich in eine Synthese-Phase (S-Phase) in der die DNA repliziert wird und in eine Phase der Zellteilung (Mitose, M-Phase), in der die Chromosomen auf die Tochterzellen verteilt werden. Diese Phasen sind durch die gap-Phasen G₁ und G₂ voneinander getrennt. Hier existieren verschiedene Kontrollpunkte, an denen die Integrität des Genoms überprüft wird. Bei einer Detektierung von Fehlern im Erbgut kommt es zu einem p53-vermittelten Arrest der Zellteilung, und verschiedene Reparaturprozesse können gestartet werden. Dieser Mechanismus verhindert, dass die Schäden an folgende Zellgenerationen weitergegeben werden und sich Mutationen manifestieren können.

Der G₁/S- Arrest ermöglicht die Reparatur von DNA-Schäden bevor das Erbgut in der S-Phase repliziert wird. P53 wird entweder über den ATM- oder den ATR-Signalweg durch Phosphorylierung stabilisiert und aktiviert (siehe Abschnitt 1.3.2). Die Arretierung des Zellzyklus in der G₁-Phase ist von der Transaktivierung des *p21^{Waf1/Cip1}* Gens durch p53 abhängig (el-Deiry et al., 1993). Das Produkt dieses Gens wird CDKN1A (*cycline-dependent kinase inhibitor 1*) oder auch p21 genannt und inhibiert die Cyclin-abhängige Kinasen 2 (Cdk2) und Cdk4/6 (Xiong et al., 1993), die daraufhin den Tumorsuppressor pRb nicht mehr sequentiell phosphorylieren können. Hypophosphoryliertes pRb komplexiert mit dem Transkriptionsfaktor E2F und unterbindet dadurch die Transkription von Genen, die für den Übergang aus der G₁-Phase in die S-Phase benötigt werden (Ewen et al., 1993; Harper et al., 1993; Hinds et al., 1992).

Die Kontrolle des G₂/M Übergangs schützt Zellen davor, die Mitose in Anwesenheit von DNA-Schäden zu durchlaufen. Essentiell für den Übergang ist Cdc2 (*cell division cycle*, auch als Cdk1 bezeichnet), das am Threoninrest 161 phosphoryliert und im Komplex mit CyclinB1 aktiviert vorliegt (Pines, 1995). Um einen Arrest zu induzieren scheinen verschiedene Mechanismen und p53-Zielgene verantwortlich zu sein. Zum einen verhindert die Expression des Phosphataseinhibitors 14-3-3σ eine Migration des CyclinB1/Cdc2 Komplex in den Nukleus, da 14-3-3σ den Komplex im Zytoplasma sequestriert (Chan et al., 1999; Hermeking et al., 1997). Zusätzlich bindet und inaktiviert 14-3-3σ die Phosphatase Cdc25C, die normalerweise Cdc2 aktiviert (Sanchez et al., 1997). Neben seiner Funktion im G₁/S-Arrest scheint p21 auch beim Übergang zur Mitose eine regulatorische Rolle zu spielen. Möglicherweise inhibiert p21 das Enzym CAK (CDK-aktivierende Kinase), das essentiell für die Aktivierung von Cdc2 ist (Smits et al., 2000). Ein weiteres Zielgen von p53, das nach DNA-Schäden den Übergang in die Mitose verhindert, ist *GADD45* (*growth arrest and DNA-damage inducible protein 45*). Das *GADD45* Genprodukt wirkt direkt auf den CyclinB1/Cdc2 Komplex, indem es die Ausbildung dieses Komplexes blockiert (Zhan et al., 1999).

1.4.2 Induktion der Apoptose

Die Apoptose beschreibt die Mechanismen einer Zelle, sich aufgrund zellulärer Instabilität kontrolliert und aktiv aus einem Zellverband zu eliminieren. Grundlegende Schritte der Apoptose sind die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien, die Interaktion des Cytochroms mit APAF-1 (*apoptosis activating factor 1*) und die darauf folgende Aktivierung einer Caspase-Kaskade (Caspase, *cysteiny-l-aspartate specific protease*). Der programmierte Zelltod wird entweder durch externe Stimuli oder durch einen intrinsischen Signalweg ausgelöst.

Der intrinsische Signalweg wird über das Verhältnis von pro-apoptotischen zu anti-apoptotischen Faktoren der BCL-2 Proteinfamilie gesteuert (Danial and Korsmeyer, 2004). Infolge von irreparablen DNA-Schäden verschiebt p53 das Verhältnis über transkriptionelle Transaktivierung zugunsten der pro-apoptotischen Proteine (Miyashita and Reed, 1995). Zu den p53-abhängigen pro-apoptotischen Genen gehören *BAD*, *BAX*, *BAK*, *BID*, *PUMA* und *NOXA* (Jiang et al., 2006; Miyashita and Reed, 1995; Nakano and Vousden, 2001; Oda et al., 2000; Sax et al., 2002). Zu den Vertretern der anti-apoptotischen Gene, die unter der Kontrolle von p53 stehen, gehören BCL-2 und BCL-X_L (Boise et al., 1993).

Der extrinsische Signalweg wird über p53-abhängige Gene vermittelt, die für die Todesrezeptoren CD95 (Fas/APO-1) und Killer/DR5 codieren (Muller et al., 1998; Wu et al., 1997). Im Gegensatz zu der Wildtyp Form von p53 reprimiert mutp53 die Expression von CD95 (Fas/APO-1), was folglich die Induktion der Apoptose über diesen Signalweg unterdrückt (Zalcenstein et al., 2003).

Zusätzlich zu der Transkriptions-abhängigen Induktion der Apoptose kann p53 auch direkt über die Wechselwirkung mit BCL-2, BCL-X_L, BAD oder BAX im Zytoplasma an den Mitochondrien das Zelltodprogramm auslösen (Jiang et al., 2006; Marchenko et al., 2000; Mihara et al., 2003; Speidel et al., 2006). Der Komplex mit BAX konnte auch für eine Transaktivierungs-defiziente Mutante von p53 beschrieben werden (Speidel et al., 2006), wohingegen eine Assoziation von mutp53 mit BCL-2 oder BCL-X_L jedoch nicht nachgewiesen werden konnte (Mihara et al., 2003; Tomita et al., 2006).

1.4.3 DNA-Reparatur, Rekombination und Replikation

Infolge von DNA-Schäden ist der Tumorsuppressor in der Lage, durch transkriptionelle Transaktivierung bestimmter Gene den Zellzyklus zu arretieren und die Reparatur des Schadens einzuleiten. Einige der Gene, die unter der Kontrolle von p53 stehen, sind PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) (Shivakumar et al., 1995), p53R2 (*p53-inducible ribonucleotide reductase small subunit 2*) (Tanaka et al., 2000) und MSH2 (*MutS homologue-2*) (Warnick et al., 2001).

Neben dieser indirekten Teilnahme am Reparatur-Mechanismus der Zelle mehren sich Hinweise, dass p53 auch direkt und aktiv bei der Beseitigung von DNA-Schäden beteiligt ist. Diese Idee resultiert einerseits aus der Beobachtung, dass p53 über den C-Terminus Sequenz-unspezifisch an unterschiedliche DNA-Strukturen, die unter anderem auch durch DNA-Schäden entstehen, binden kann (Übersicht in (Liu and Kulesz-Martin, 2001)). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass p53 mit einer vergleichbaren Affinität wie der humane *mismatch repair* Komplex (MMR) an DNA-Wölbungen (*bulged DNA*) oder Basenfehlpaarungen (*mismatches*) bindet (Lee et al., 1995) und mit der nuklearen Matrix assoziieren kann (Jiang et al., 2001). Nicht zuletzt trägt auch die von Mummenbrauer *et al.* beschriebene 3'-5'-Exonukleaseaktivität der Kernregion dazu bei, für p53 eine direkte und aktive Beteiligung an DNA-Reparatur, Replikations- und Rekombinationsprozessen zu postulieren (Mummenbrauer et al., 1996).

In folgenden Studien konnte dann eine direkte Beteiligung von p53, unabhängig von seiner Transaktivierungsfunktion, an der *nucleotide excision repair* (NER) und an der *base excision repair* (BER) nachgewiesen werden (Rubbi and Milner, 2003; Zhou et al., 2001; Zurer et al., 2004). Die direkte Beteiligung des Tumorsuppressors an der MMR und an der homologen Rekombination ist bisher nicht eindeutig geklärt, jedoch deuten einige Arbeiten darauf hin, dass p53 mit Proteinen der MMR synergistisch in diesen Prozessen wirkt (Subramanian and Griffith, 2002; Zink et al., 2002). In γ -bestrahlten Zellen konnte vor allem während der S-Phase eine Kolo-kalisation von p53 im Komplex mit MSH2 und mit den Rekombinationsproteinen RAD50 und RAD51 dargestellt werden (Zink et al., 2002).

1.5 Mutationen im Tumorsuppressor p53

In nahezu allen menschlichen Krebserkrankungen sind die Tumor-supprimierenden Funktionen von wtp53 gestört oder ausgeschaltet. Dies geschieht zum einen durch genetische und epigenetische Veränderungen, welche der wtp53 Funktion entgegenwirken und diese unterdrücken oder zum Verlust des Gens führen. Zum anderen ist das *TP53* Gen in ca. 40-50 % der Tumore selbst Ziel von Mutationen (Greenblatt et al., 1994; Soussi et al., 2006).

Normalerweise manifestieren sich Mutationen in Tumorsuppressorgenen wie beispielsweise bei *pRb* und *BCRA1*, durch Deletionen, Insertionen und/ oder Leserasterverschiebungen. Diese Ereignisse führen zur Expression eines trunkierten Proteins oder zur Inaktivierung des Gens und zum totalen Verlust des Proteins. Interessanterweise sind im Fall von p53 80 % der genetischen Veränderungen *missense* Punktmutationen (Soussi and Lozano, 2005), von denen wiederum fast alle (≥ 90 %) in der DBD (Abbildung 3) des Proteins lokalisiert sind. Wie schon in Abschnitt 1.2.2 angesprochen, unterscheidet man Kontaktmutanten (Klasse I) von Konformationsmutanten (Klasse II). Bei Klasse I Mutanten ist ein für die DNA Bindung essentieller Aminosäurerest vertauscht, wobei aber die globale DNA Bindungsstruktur des Proteins erhalten bleibt (Joerger et al., 2006). Ziele dieser Mutationen sind beispielsweise die Arginine an den Positionen 248, 273 (die am häufigsten mutierten Aminosäuren) oder das Arginin 280. Zu den Klasse II Mutanten gehören beispielsweise die Mutationen an Position 175, 245, 249 und 282. Diese Aminosäurereste vermitteln über Salz- und Wasserstoffbrücken zu anderen Aminosäuren die strukturelle Integrität der DBD. Eine Veränderung der Aminosäure destabilisiert folglich die gesamte Domänenstruktur.

Diese Punktmutationen führen zur Expression eines stabilen Proteins mit erhöhter Halbwertszeit, das jedoch im Nukleus akkumuliert und die wtp53-spezifischen Eigenschaften teilweise oder ganz verloren hat.

Da es während der malignen Transformation meistens zu einem Verlust des *wtp53* Allels und zur Expression von funktionellen mutierten p53-Formen kommt, wird angenommen, dass das veränderte p53-Protein der Krebszelle einen Selektionsvorteil in der Tumorentwicklung verschafft (Kern et al., 1992). Zwei postulierte Eigenschaften von mutp53 können hierzu beitragen: der dominant-negative Effekt von mutp53 gegenüber wtp53 und der wtp53-unabhängige onkogene Funktionsgewinn von mutp53 (*gain of function*, GOF) (Dittmer et al., 1993; Srivastava et al., 1993). Eine klare Abgrenzung beider Phänomene ist nicht möglich, da sie oft ineinander übergreifen.

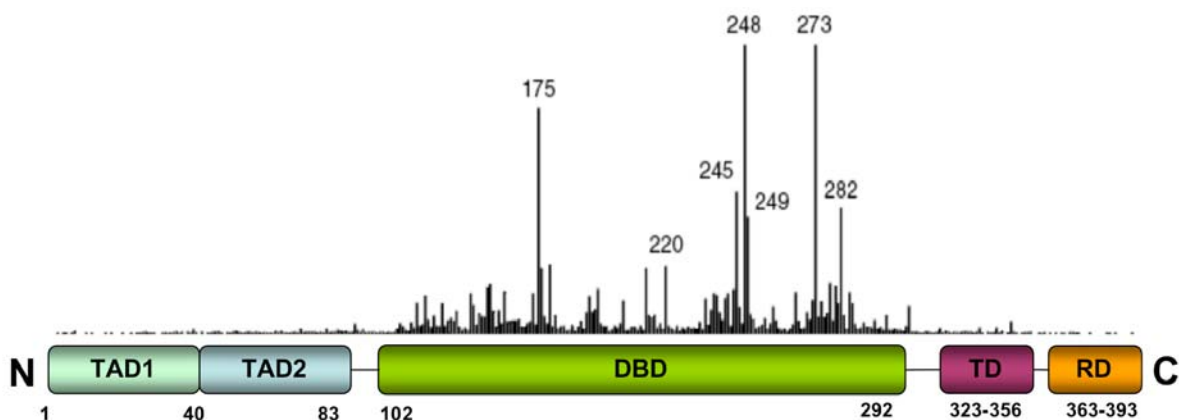


Abbildung 3 Mutationen im Tumorsuppressor p53

Darstellung der Aminosäurepositionen im p53-Protein, für die Mutationen beschrieben wurden. Die Länge der schwarzen Balken gibt die relative Häufigkeit der Mutationen in humanen Tumoren wieder. Die Aminosäurepositionen der *hot-spot* Mutationen sind angegeben.

Verändert nach Joerger und Fersht, 2007

1.5.1 Dominant-negativer Effekt

Der dominant-negative Effekt beschreibt die beobachtete Eigenschaft von mutp53, die Transaktivierungsfunktion von wtp53 in einem heterozygoten Kontext zu eliminieren. Phänotypisch äußert sich dies vor allem in genomischer Instabilität, Inhibierung der p53-vermittelten Apoptose und Immortalisierung der Zelle.

Die molekularen Mechanismen, die zu der dominant-negativen Wirkung von mutp53-Proteinen führen, sind bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Zahlreiche *in vitro* und

in vivo Arbeiten deuten darauf hin, dass es zu einer Heterooligomerisierung zwischen wtp53 und mutp53 kommt (Milner and Medcalf, 1991; Milner et al., 1991). Das daraus resultierende Heterotetramer weist eine verminderte SSDB auf, was schließlich zu einer geringen oder inhibierten Transaktivierungsfunktion von wtp53 führt (Nicholls et al., 2002; Willis et al., 2004). Transfektions-Studien zeigten jedoch, dass in einem heterozygoten Kontext nicht alleine die Expression von mutp53 ausreicht, um einen dominant-negativen Effekt zu erzeugen, sondern dass mutp53 vor allem in einem molaren Überschuss vorliegen muss (Chen et al., 1990; Davis et al., 1996; Williams et al., 1995). Für die Mutationen in den Aminosäuren 273 und 249 konnte beispielsweise gezeigt werden, dass mindestens drei mutierte Moleküle pro Heterotetramer nötig sind, um die Transaktivierungsfunktion von wtp53 zu inaktivieren (Chan et al., 2004).

Dass sich die Eigenschaft des dominant-negativen Effekts nicht allgemeingültig auf jede p53-Mutation übertragen lässt, wurde in einer aktuellen Studie diskutiert. Dearth *et al.* fanden, dass ein Drittel von insgesamt 76 analysierten Mutationen (zu der Gruppe gehörten auch alle untersuchten Temperatur-sensitiven Mutanten) nicht in der Lage waren, die wtp53-Funktionen zu unterdrücken (Dearth et al., 2007).

1.5.2 Gain of function

Der Erwerb neuer Eigenschaften (*gain of function*; GOF) setzt die Inaktivierung der wtp53-Funktionen voraus. Dies wird einerseits durch den Verlust des Wildtyp Allels (*loss of heterozygosity*; LOH) erreicht, andererseits kann dies durch den oben beschriebenen dominant-negativen Effekt vermittelt werden. Auf zellulärer Ebene äußert sich GOF in einer verstärkten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika, einem Anstieg der genomischen Instabilität und einem erhöhten onkogenen Potenzial (Blandino et al., 1999; Dittmer et al., 1993; Hsiao et al., 1994; Murphy et al., 2000).

Die molekularen Mechanismen, die dem Funktionsgewinn von mutp53 zugrunde liegen, sind noch nicht vollständig aufgedeckt. Es liegt jedoch nahe, eine Erklärung der Mechanismen aus intrinsischen Funktionen und Aktivitäten von wtp53 abzuleiten. Als Transaktivator ist wtp53 in der Lage, an Promotoren zu binden und mit Komponenten der Transkriptionsmaschinerie zu interagieren. Beides führt zur Kontrolle von bestimmten Zielgenen. Um GOF zu erklären wurden anhand von molekularbiologischen Beobachtungen zwei Modelle vorgeschlagen, die auf diesen funktionellen Eigenschaften von wtp53 basieren.

Zum einen interagiert mutp53 mit spezifischen Proteinen, die eine entscheidende Rolle beim Wachstumsarrest, bei der Antwort auf Chemotherapeutika oder bei der Apoptose spielen. Diese Wechselwirkung verhindert eine Rekrutierung der Proteine zu ihren Wirkungsorten. Tatsächlich konnten die p53-Familienmitglieder p63 und p73 als solche Zielproteine identifiziert werden, wobei die Interaktion über die Kerndomäne von mutp53 vermittelt wird (Irwin et al., 2003; Lang et al., 2004; Strano et al., 2002; Gaiddon et al., 2001). Da wtp53 nicht in der Lage ist, mit p63 und p73 zu heteromerisieren (Davison et al., 1999), kann man hier eindeutig von einem GOF von mutp53 sprechen.

Ein anderes Modell definiert den Mechanismus für GOF über eine wtp53-unabhängige Transaktivierungskapazität des mutp53. Hierfür spricht eine Studie, in der die Regulation des *MDR-1* Gens (*multi-drug resistance gene-1*) untersucht wurde (Lin et al., 1995). Der Promotor von *MDR-1* wird durch wtp53 reprimiert, wohingegen mutp53 die Expression des Gens aktiviert (Chin et al., 1992). Werden nun zwei für die Genaktivierung wichtige, N-terminale Aminosäuren (Leu22, Trp23) mutiert, kann die daraus resultierende Dreifachmutante die Genexpression nicht mehr transaktivieren (Lin et al., 1995). Ergänzend konnte in einer anderen Arbeit gezeigt werden, dass in Anwesenheit des Transkriptionshemmers Actinomycin D die mutp53-induzierte Apoptoseresistenz aufgehoben wurde (Li et al., 1998). Beide Befunde weisen darauf hin, dass mutp53 durch den Funktionsgewinn in der Lage ist, gezielt Gene zu transaktivieren und direkten Einfluss auf den Verlauf der Tumorgenese zu nehmen. Bestätigt wird dies durch die bisher identifizierten mutp53-transaktivierten Gene, die wichtige Funktionen bei Zellproliferation (z.B. *EGFR* und *IGF-II*), Transformation (z.B. *c-MYC*), antiapoptotischen Mechanismen und der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika (z.B. *MDR-1*) einnehmen (Deb et al., 1992; Frazier et al., 1998; Iwanaga and Jeang, 2002; Lee et al., 2000; Ludes-Meyers et al., 1996; Margulies and Sehgal, 1993; Mizuarai et al., 2006; Scian et al., 2005). Zusätzlich zu den positiv regulierten Genen wurden auch von mutp53 spezifisch reprimierte Gene wie *CD95 (FAS/APO1)* und *MSP/MST-1* identifiziert (Zalcenstein et al., 2003; Zalcenstein et al., 2006). Deren Repression führt zu einer erhöhten Chemotherapie-Resistenz

1.5.2.1 Direkte und indirekte DNA-Interaktionen von mutp53

Obwohl eine bedeutende Anzahl von mutp53-regulierten Genen beschrieben wurde, ist bis heute nicht eindeutig geklärt, ob mutp53 direkt an DNA bindet oder indirekt im Komplex mit anderen Faktoren an die jeweiligen Promotoren rekrutiert wird.

Für die Aktivierung des oben beschriebenen *MDR-1* Gens ist sowohl die Interaktion von mutp53 mit dem Transkriptionsfaktor Ets-1, als auch die Ets-1 Bindestelle im Promotor des Gens nötig (Sampath et al., 2001), was eine indirekte Bindung an den Promotor impliziert. In der Tat ist die Assoziation von mutp53 an einige Promotoren von den DNA-Bindeeigenschaften anderer Sequenz-spezifischer Transkriptionsfaktoren abhängig. Neben Ets-1 sind weitere Vertreter dieser SSDB-Proteine die Transkriptionsfaktoren Sp1 und NF-Y (Chicas et al., 2000; Di Agostino et al., 2006). Interessanterweise vermitteln diese Transkriptionsfaktoren meistens gleichfalls die Bindung von wtp53 an ihre spezifischen Promotoren, was jedoch zu einem gegensätzlichen transkriptionellen Effekt führt, da wtp53 diese Promotoren reprimiert (Imbriano et al., 2005; Kim et al., 2003).

Während für wtp53 eine Konsensus-Sequenz und die daraus resultierende SSDB beschrieben worden ist, konnte bis heute für mutp53 keine spezifische DNA-Bindesequenz identifiziert werden. Obwohl einige Sequenzmotive für bestimmte p53-Mutanten entziffert werden konnten, verhindert die starke Heterogenität dieser Sequenzen die Detektion eines Konsensus und eine allgemeingültige Darstellung der SSDB von mutp53. Allerdings konnte gezeigt werden, dass mutp53 *in vitro* mit hoher Affinität an DNA Sekundärstrukturen bindet, wie zum Beispiel an SAR/MAR- Elemente (*scaffold/ matrix attachment regions*; S/MAR) (Deppert, 1996; Muller et al., 1996; Will et al., 1998a; Will et al., 1998b). Über S/MAR-Elemente ist die DNA mit der Kernmatrix assoziiert, was zur dynamischen Organisation des Chromatins in funktionelle Bereiche führt. Wesentliche Sequenzmerkmale von S/MAR-Elementen sind repetitive Sequenzen und AT-reiche Regionen, die es den Elementen erlauben, unter superhelikalem Stress eine nicht-B DNA Struktur einzunehmen (Will et al., 1998a; Will et al., 1998b). In diesem Zusammenhang konnte durch Chromatin Immunpräzipitations-Experimente (ChIP) für eine endogene p53-Mutante die Bindung an repetitive DNA-Elemente *in vivo* nachgewiesen werden (Koga and Deppert, 2000). In darauf folgenden *in vitro* Studien konnte anhand der Interaktion mit repetitiven und strukturierten Oligonukleotiden gezeigt werden, dass die Assoziation von mutp53 ausschließlich von der stereo-spezifischen DNA Konfiguration abhängig ist (Gohler et al., 2005; Walter et al., 2005). Diese Sequenz-unspezifische, Struktur-vermittelte Bindung ist kein exklusives Merkmal der mutp53-DNA Assoziation, sondern basiert auf der intrinsischen DNA Struktur-abhängigen Bindung (*DNA structure-dependent binding*; DSDB) von wtp53 (Gohler et al., 2002; Walter et al., 2005).

1.5.2.2 *knock down* von mutp53

In ca. der Hälfte aller Tumoren ist das Wildtyp *TP53* Allel im Laufe der Karzinogenese inaktiviert worden oder verloren gegangen, wobei das mutierte Allel erhalten geblieben ist und exprimiert wird. Dies lässt vermuten, dass während der Tumorprogression positiv auf eine p53-Mutation hin selektioniert wurde und die neu erworbenen Eigenschaften entscheidend zur Aufrechterhaltung des malignen Status der Zelle beitragen.

Die exogene Überexpression von mutiertem p53 in Modell-Zelllinien reflektiert nur zum Teil die Eigenschaften der mutp53-Proteine, da die Mutation nicht im natürlichen Kontext untersucht wird. Die Technologie der RNA Interferenz (RNAi) ermöglicht die Studie der mutp53-Funktionen im endogenen System. Eine der ersten Arbeiten hierzu beschrieb die Expression von *anti-sense* Oligonukleotiden von einem Plasmid. Dies hatte nicht nur eine Herunterregulierung des p53-Proteins zur Folge, sondern beeinträchtigte auch deutlich die DNA Syntheserate der Zellen (Shohat et al., 1987). Der Effekt resultierte direkt aus dem p53 *knock down*, da in einer p53-Null Zelllinie die Expression der *anti-sense* Oligonukleotide keine Auswirkung auf die DNA Synthese hatte. Übereinstimmend mit mutp53-Transfektionsversuchen konnte in folgenden RNAi Studien gezeigt werden, dass in Krebszellen die Regulation des Zellzyklusarrests, eine verstärkte Zellproliferation und sowohl basale als auch Stress-induzierte anti-apoptotische Prozesse von der Expression endogener p53-Mutanten abhängig sind (Bossi et al., 2006; Di Agostino et al., 2006; Janicek et al., 1997; Ma et al., 2006b; Scian et al., 2004). Damit qualifiziert sich die Ausschaltung von p53 über RNAi als potentes Werkzeug für die Analyse von GOF in Tumorzellen.

1.6 Der Tumorsuppressor p53 als Nukleinsäure-bindendes Protein

In der Literatur wurden mehrere Proteine beschrieben, die sowohl an DNA als auch an RNA binden und daraufhin verschiedene Funktionen ausüben.

Die im Phagen-Gen 43 (*pg43*) kodierte T4 DNA Polymerase beispielsweise ist eine wichtige Komponente der DNA Replikase von Bakterienphagen. Neben dieser Funktion erkennt die Polymerase spezifisch über eine Haarnadelstruktur im 5'UTR die eigene mRNA und unterdrückt deren Translation (Pavlov and Karam, 2000). Bei Kompetitionsversuchen konnte eine um etwa 100 fach höhere Affinität der Polymerase zu RNA als zu DNA-Substraten beobachtet werden (Pavlov and Karam, 1994). Ein Austausch der Thymin durch Uracil in den DNA-Substraten führte zu keiner erhöhten Bindungsaffinität. Dies deutet darauf hin, dass für die Substrat-Selektivität die Sekundärstruktur entscheidend ist (Pavlov and Karam, 1994).

In Hefe konnte das Ku-Protein als DNA/RNA-bindendes Protein identifiziert werden. Ku bindet an DNA-Enden und ist als Komponente der DNA-abhängigen Protein Kinase (DNA-PK) bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen und der V(D)J Rekombination essentiell. Peterson *et al.* beschrieben die Interaktion von Ku mit dem RNA-Anteil der Hefe-Telomerase. Sie postulierten, dass Ku durch diese Wechselwirkung die Telomerase an die Telomerenden rekrutiert und aktiviert (Peterson et al., 2001).

Auch in höheren Organismen gibt es Proteine, die sowohl mit DNA, als auch mit RNA interagieren. Während der Larvenentwicklung bei *Drosophila melanogaster* aktiviert der Transkriptionsfaktor *bicoid* (*bcd*), abhängig von seiner lokalen Konzentration, bestimmte Zielgene und reprimiert die Translation der mRNA des Transkriptionsfaktors *caudal* (*cad*). Dubnau *et al.* fanden heraus, dass die Repression der *cad* Translation durch eine direkte Bindung zwischen dem *bcd*-Protein und der *cad* mRNA zustande kommt (Dubnau and Struhl, 1996).

Für den Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA) konnte gezeigt werden, dass er in frühen Entwicklungsstadien der Oozyten vom Krallenfrosch die Expression der 5S rRNA aktiviert und gleichfalls mit der 5S rRNA mRNA akkumuliert (Honda and Roeder, 1980). In reifen Stadien hingegen war TFIIIA abwesend, woraus man schließen kann, dass dieser Transkriptionsfaktor abhängig vom jeweiligen Entwicklungsstadium die Expression zusätzlich posttranskriptionell reguliert.

Die funktionelle Verwandtschaft des Tumorsuppressors p53 mit den Transkriptionsfaktoren TFIIIA und *bicoid* lässt erahnen, dass p53 neben seiner DNA-Bindungskapazität auch zur Bindung an RNA befähigt ist und folglich die Genexpression auf mehreren Ebenen regulieren kann.

1.6.1 Interaktion mit DNA

Die Hauptaufgabe und wohl am besten charakterisierte biologische Funktion des Tumorsuppressors p53 ist die eines Transkriptionsaktivators. Infolge zellulären Stresses aktiviert p53 bestimmte Gene, die entweder den Zellzyklusarrest einleiten oder an der Apoptose beteiligt sind. Wie schon in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, ist die spezifische Bindung von p53 an doppelsträngige DNA abhängig von einer degenerierten Konsensus-Sequenz (wtp53-RE), die sich aus zwei durch einen *Spacer* getrennten dekameren *half sites* der Nukleotid-Folge 5'-PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy-3' zusammensetzt (el-Deiry et al., 1992). Die Affinität, mit der p53 seine Konsensus-Sequenz bindet, variiert mit der

tatsächlichen Sequenz des wtp53-RE. Generell bindet p53 mit hoher Affinität an wtp53-RE von Genen, die in den Zellzyklusarrest involviert sind, wohingegen apoptotische Gene mit geringer Affinität gebunden werden (Weinberg et al., 2005). Darüber hinaus wurde *in vivo* beobachtet, dass für eine funktionelle Bindestelle ein äußerst kurzer *Spacer* oder sogar das Fehlen des *Spacers* notwendig ist (Tokino et al., 1994). Dies wurde auch in einer aktuellen Arbeit von Wei *et al.* bestätigt. Die Gruppe koppelte die ChIP Methode mit der PET (*paired end ditag*) Sequenzierung. Hierbei werden die durch ChIP angereicherten DNA-Fragmente in einen Vektor kloniert, der *Mme I* Schnittstellen an der Insertionsstelle trägt. Die Restriktionsendonuklease *Mme I* schneidet 18 bis 20 bp hinter der Erkennungssequenz die flankierenden Bereiche der ChIP Fragmente (PET Sequenzen). Diese Teilstücke werden ligiert und in einen weiteren Vektor inseriert. Aus mehreren dieser Vektoren werden die Konstrukte ausgeschnitten und hintereinander ligiert. Die daraus entstehenden Concatemere werden anschließend sequenziert. Die PET-Sequenzen werden dann dem Genom zugeordnet, wobei genomische Bereiche, in denen sich die PET-Sequenzen konzentrieren (PET-Cluster), als mögliche Bindestellen interpretiert werden. Mit dieser Methode identifizierten die Forscher rund 540 potentielle Bindestellen von p53 *in vivo* (Wei et al., 2006) und waren nicht nur in der Lage, die durchschnittliche Länge des *Spacers* neu zu definieren, sondern auch eine überarbeitete starke Konsensus-Sequenz mit der Folge 5'AGACATG(C/T)CC 3' zu postulieren.

In vitro Studien zeigten, dass am C-Terminus unmodifiziertes p53 nur sehr schwach an kurze Oligonukleotide, welche wtp53-RE enthalten, bindet. Daraufhin wurde unstimuliertes wtp53 als „latentes p53“ bezeichnet, bei dem die C-terminale Region die wtp53-Aktivitäten inhibiert. Wie schon in Abschnitt 1.2.2 angesprochen, wurden mehrere Modelle für die Überführung der latenten in die aktive Form von p53 nach zellulärem Stress aufgestellt. Das allosterische Modell geht davon aus, dass im latenten Zustand die C-terminale Domäne mit der DBD interagiert und folglich die intramolekulare Wechselwirkung der DBD mit der DNA verhindert wird. Aufgrund C-terminaler Modifikationen kommt es zu einer Konformationsänderung des p53-Moleküls und die SSDB wird ermöglicht (Ahn and Prives, 2001; Hupp and Lane, 1994; Hupp et al., 1992). Dagegen sprechen NMR-Untersuchungen, die nahezu keinen Unterschied in der Konformation von latenten und aktivierten p53-Molekülen aufzeigten (Ayed et al., 2001). Ein anderes Modell besagt, dass die C-terminale Domäne in ungestressten Zellen Sequenz-unspezifisch an kurze doppelsträngige Oligonukleotide bindet und so die Interaktion der DBD mit der DNA sterisch verhindert

(Anderson et al., 1997). Wurden jedoch für die Interaktionsstudien superhelikale Plasmid-DNA oder lange lineare DNA-Fragmente eingesetzt, ließ sich eine Sequenz-unspezifische Bindung des C-terminus und der DBD von „latentem“ p53 nachweisen (Palecek et al., 2001; Yakovleva et al., 2001). Diese Beobachtungen führten zu dem „Zwei-Bindestellen-Modell“, welches besagt, dass die Sequenz-unspezifische Bindung des C-Terminus die Orientierung der DBD relativ zur DNA ändert. Hierdurch können einige für die SSDB nötige Strukturen der DBD nicht mit der DNA interagieren. Andere Bereiche in der DBD sind jedoch weiterhin dazu in der Lage und es kommt lediglich zu Sequenz-unspezifischen DNA Interaktionen mit der DBD (Yakovleva et al., 2001).

Im Gegensatz zur SSDB von wtp53 an lineare B-DNA, bei der die Bindung von der Modifikation des C-Terminus abhängig ist, ist die SSDB an strukturierte nicht B-DNA von der Topologie des wtp53-RE abhängig (Gohler et al., 2002; Kim et al., 1997; Kim et al., 1999). DNA-Bindungsstudien mit zirkulärer DNA (McKinney and Prives, 2002), superhelikaler DNA (Palecek et al., 2004), Chromatinstrukturen (Espinosa and Emerson, 2001) und DNA-*hairpins* (Gohler et al., 2002) zeigten, dass „latentes“ p53 fähig ist, Sequenz-spezifisch an strukturierte DNA zu binden und sich ein unmodifizierter C-Terminus positiv auf die Interaktion auswirkt.

Der Tumorsuppressor p53 bindet an spezifische wtp53-RE in einem tetrameren Komplex, der aus zwei identischen Dimeren aufgebaut ist. Kürzlich konnten die Kristallstrukturen einiger Komplexe, bestehend aus p53-Kerndomänen und kurzen ds Oligonukleotiden mit unterschiedlichen *half site* Motiven, dargestellt werden (Kitayner et al., 2006). In diesen Komplexen binden zwei Kerndomänen-Monomere an eine *half site* und bilden ein Dimer. Zwei dieser Dimere lagern sich über Protein-Protein-Interaktionen und Basenpaar-Interaktionen mit der gebundenen DNA zu einem Tetramer zusammen (Kitayner et al., 2006). Diese Beobachtungen unterstützen *in vitro* Untersuchungen mit linearer DNA, die zeigten, dass beide *half sites* für eine stabile Assoziation des Tetramers mit der spezifischen Bindestelle nötig sind (Friedman et al., 1993; McLure and Lee, 1998). Für DNA in nicht-linearer Konformation konnte jedoch gezeigt werden, dass die Interaktion von nur einem Dimer mit seiner *half site* für eine stabile Bindung ausreichend ist (Gohler et al., 2002). Diese einseitige Bindung lässt sich mit einem aktuellen Strukturmodell erklären, in dem das native p53-Tetramer die Form eines hohlen Würfels annimmt (Okorokov et al., 2006). In diesem Modell interagieren die C-Termini mit den N-Termini zweier p53-Moleküle, um ein Dimer zu formen. Ein Tetramer ergibt sich aus der Interaktion der Kerndomänen mit den C/N-Termini-

Verbindungen beider Dimere. Dies steht im Gegensatz zu der bisher postulierten Anlagerung der p53-Moleküle über die Tetramerisierungsdomäne (TD) (Sturzbecher et al., 1992) (vgl. Abschnitt 1.2.2). Die von Okorokov *et al.* postulierte würfelförmige Struktur des p53-Tetramers besitzt folglich zwei gegenüberliegende Seiten, mit denen das Tetramer an wtp53-RE binden kann. Durch diese dreidimensionale Anordnung erhält das p53-Tetramer die Fähigkeit, auch mit zwei voneinander entfernten *half sites* zu interagieren und diese in räumliche Nähe zu bringen.

1.6.2 Interaktion mit RNA

Ein Großteil der RNA liegt in der Zelle nicht als „nacktes“ Molekül vor, sondern ist in funktionelle RNA-Proteinkomplexe organisiert. Diese Komplexe findet man beispielsweise in Ribosomen, Spliceosomen, dem RISC (*RNA-induced silencing complex*) und anderen RNPs (*ribonucleoprotein particles*) (Luhrmann et al., 1990; Martinez et al., 2002; Moore, 1998; Varani and Nagai, 1998). Die Affinität der RNA/Protein Bindung in einem RNP ist abhängig von der Dynamik des zellulären Metabolismus und steht unter dem Einfluss weiterer Komponenten des RNPs. Im Gegensatz zur Wechselwirkung mit DNA binden Proteine spezifische RNAs selten über bestimmte Sequenz-Bindemotive, sondern eher über bestimmte Strukturen der RNA. Sie erlauben eine Interaktion von Proteinstrukturen mit dem RNA-Rückgrat. Die meist einzelsträngige RNA besitzt eine hochrangige strukturelle Flexibilität, die es ihr erlaubt, kurze A-Form Doppelhelices, Haarnadelstrukturen (*stem-loops* und *hairpins*), Ausstülpungen (*bulges*) und Pseudoknoten auszubilden. Besonders *stem-loops* und *bulges* tragen zur spezifischen Erkennung und Bindung der RNA durch Proteine bei (Nagai, 1996).

Zur Identifizierung und Beschreibung von spezifischen RNA/Protein Interaktionen wurden verschiedene *in vitro* und *in vivo* Techniken, wie zum Beispiel Filterbindungsstudien, EMSA, *footprinting*, SELEX und RNA Immunpräzipitation angewendet.

Einen Hinweis auf eine mögliche Interaktion des Tumorsuppressors p53 mit RNA ergibt sich aus seiner intrinsischen Eigenschaft, mit hoher Affinität an strukturierte Nukleinsäuren zu binden (siehe Abschnitt 1.6.1). Dies lässt sich auch auf mutp53 übertragen (Gohler et al., 2005). Andererseits kontrolliert p53 das Proteinexpressionsschema einer Zelle infolge von verschiedenen Stress-Stimuli. Hierbei könnte eine schnelle und adäquate Induktion der Proteinexpression auch über die posttranskriptionale Regulation der mRNA durch p53 erfolgen.

Einen ersten Nachweis der direkten p53/RNA Interaktion erbrachte die Gruppe um Robert A. Carroll. Sie fand, dass in SV40-transformierten murinen Zellen sowohl endogenes wtp53 als auch exogenes mutp53 stabil mit dem 5'-Ende einer RNA assoziiert ist. Da die Assoziation die sehr stringenten Aufreinigungsschritte von p53 überstand, wurde postuliert, dass es sich um eine kovalente Bindung handelt und die RNA wohl eine strukturelle Komponente anstatt ein Reaktions-Intermediat von p53 darstellt (Samad and Carroll, 1991). Ein Jahr darauf wurde die RNA von der gleichen Gruppe als 5,8S rRNA identifiziert, woraufhin dann vermutet wurde, dass p53 eine Rolle in der Prozessierung und/ oder im Transport der ribosomalen Transkripte spielt (Fontoura et al., 1992). Oberosler *et al.* erbrachten einen weiteren Hinweis, dass p53 auch ein RNA-bindendes Protein ist. Sie zeigten in *in vitro* Studien, dass p53 mit größerer Affinität an RNA als an DNA bindet und darüber hinaus durch eine RNA/RNA Rehybridisierungsaktivität RNA Strukturen verändern kann, also RNA/RNA Interaktionen remodelliert (Oberosler et al., 1993). Mosner *et al.* konnten für murines wtp53 zeigen, dass es die *in vitro* Translation seiner eigenen mRNA inhibiert, indem es an eine vermutete *stem-loop*-Struktur im 5'UTR der mRNA bindet und diesen *loop* über seine RNA/RNA Rehybridisierungsaktivität aufrechterhält. Auf Proteinebene wurde der C-Terminus als essentiell für diese Interaktion eingestuft (Mosner et al., 1995). In weiteren Arbeiten konnte die Prägnanz der Sekundärstrukturen im 5'-Bereich für die Bindung und translationale Regulation durch p53 auch auf andere mRNAs übertragen werden. Es wurde gezeigt, dass p53 spezifisch mit Sekundärstrukturen im 5'UTR der *cdk4*-mRNA interagiert (Ewen and Miller, 1996). Die Interaktion und Inhibierung der Translation ist zwar unabhängig von der Transaktivierungskapazität und der Oligomerisierung (lokalisiert in den extremen N- und C-Termini), jedoch sind die Prolin-reiche Region und die Rehybridisierungsfähigkeit von wtp53 dafür essentiell (Ewen and Miller, 1996; Miller et al., 2000).

Die oben genannten Beobachtungen und Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Tumorsuppressors p53 neben seiner allgemein anerkannten Funktion als DNA-bindender Transaktivator zusätzlich eine entscheidende Rolle als RNA-bindendes Protein bei der posttranskriptionellen Regulation des Transkriptomts einer Zelle spielt.

1.7 Aufgabenstellung

Als Nukleinsäure-bindendes Protein ist mutp53 hauptsächlich im hoch organisierten und mit Chromatin dicht gepackten Raum des Zellkerns aktiv. Üblicherweise liegen spezialisierte Transkriptionsfaktoren in einer verhältnismäßig geringen Konzentration im Nukleus vor. Hingegen ist mutp53 in Tumorzellen deutlich überexprimiert, was einen globalen Wirkmechanismus von mutp53 in diesen Zellen vermuten lässt.

Für die spezifische DNA-Bindung durch wtp53 und der daraus resultierenden Regulation von Zielgenen wurde eine Konsensus-Sequenz postuliert (el-Deiry et al., 1992). Daher wurde angenommen, dass auch mutp53 seine transkriptionelle Aktivität über die Interaktion mit spezifischen Sequenzen ausübt. Ein Grossteil der in der Literatur beschriebenen Daten beruht auf *in vitro* Experimenten, in denen der Einfluss von exogen exprimiertem mutp53 in p53-Null Zelllinien (z.B. Saos-2 und H1299) auf die Expressionsstärke bestimmter Promotoren gemessen wurde. Da in diesen Studien die Interaktion mit Promotorsequenzen unabhängig vom Zelldifferenzierungs-spezifischen Chromatinkontext analysiert wurde, sind die Resultate wenig aussagekräftig und die realen physiologischen Bedingungen eher schlecht reflektiert.

Zur Charakterisierung der mutp53-Wirkmechanismen im zellulären Kontext sollen während der Doktorarbeit die zwei Mammakarzinom-Zelllinien MDAMB231 und MDAMB468 mit unterschiedlichen Punktmutationen im *TP53* Gen (Arg280Lys bzw. Arg273His) untersucht werden. Anhand dieser Zelllinien soll die Verteilung der mutp53-Bindestellen im Genom und der Einfluss dieser Interaktion auf die Organisation des Chromatins entschlüsselt werden. Außerdem soll anhand der gewonnenen Daten eine Aussage über die von unserer Arbeitsgruppe postulierte epigenetische Wirkung von mutp53 auf das Transkriptom der Krebszelle gemacht werden.

Eine Voraussetzung für diese Arbeit ist die Etablierung einer Chromatin Immunpräzipitations-Methode, die Einsicht in das DNA-Bindevverhalten von endogen exprimierten mutp53-Proteinen gewährt. Dazu muss das allgemein angewandte ChIP Protokoll, das üblicherweise nur die Analyse von bestimmten vorhergesagten Zielsequenzen erlaubt, weiter modifiziert werden. Mittels Formaldehyd-Kreuzvernetzung der Protein/DNA Komplexe, hoch spezifischer Immunpräzipitation und anschließender Sequenzierung der präzipitierten DNA soll das globale Bindevverhalten von mutp53 entschlüsselt werden. Diese Methode (ChIP-Seq) erlaubt theoretisch, sämtliche potentielle Bindestellen des Proteins zu analysieren und folglich bisher unbekannte Bindestellen zu entschlüsseln.

Vorarbeiten haben gezeigt, dass mutp53 an genomische Elemente bindet, die S/MAR Charakteristika aufweisen (Koga and Deppert, 2000). Das Chromatin ist im Nukleus über S/MARs in funktionelle Bereiche eingeteilt. Von unserer Arbeitsgruppe wird nun postuliert, dass die Interaktion von mutp53 mit diesen S/MARs zu einer globalen Veränderung in der Chromatinstruktur führt. Dies kann dann folglich zu der veränderten Genexpression, wie sie bei der Tumorgenese beobachtet wird, beitragen. Um die biologische Relevanz der Zielsequenzen von mutp53 in den oben genannten Zelllinien zu testen, soll über RNAi die mutp53-Expression abgeschaltet werden und das veränderte Transkriptionsmuster analysiert werden.

Neben der Lokalisation der mutp53-Bindestellen im Genom, sollen auch die mutp53-RNA-Bindungseigenschaften untersucht werden. Eine Reihe der Beobachtungen und Ergebnisse unserer und anderer Gruppen deutet darauf hin, dass der Tumorsuppressor p53 neben seiner DNA-Bindungskapazität auch mit hoher Affinität an RNA bindet (Fontoura et al., 1992; Miller et al., 2000; Mosner et al., 1995; Oberosler et al., 1993; Samad and Carroll, 1991). Durch die Entwicklung einer vernetzungsfreien Methode zur Präzipitation Protein-gebundener RNA (RNA Immunpräzipitation, RIP) sollen wtp53- und mutp53-gebundene Transkripte identifiziert und mit bioinformatischen Ansätzen auf ihre Struktureigenschaften hin untersucht werden.

Die in der Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die funktionelle Interaktion von mutp53 mit Nukleinsäuren sollen schließlich zur Formulierung eines Modells beitragen, das den Wirkmechanismus von endogenen mutp53-Proteinen in Tumorzellen beschreibt.

2 ERGEBNISSE

2.1 Charakterisierung und Dynamik der p53-Expression in den Zelllinien MDAMB231, MDAMB468 und MCF7

Die Modell-Zelllinien MDAMB231, MDAMB468 und MCF7 sind Adenokarzinomzelllinien aus humanem Milchdrüsengewebe und wurden aus Pleuraergüssen der jeweiligen Patientinnen isoliert (Brandes and Hermonat, 1983; Brinkley et al., 1980; Cailleau et al., 1978; Cailleau et al., 1974; Sugarman et al., 1985). Die Morphologie dieser drei Zelllinien wird im Allgemeinen als epithelial beschrieben, wobei jedoch MDAMB231 in Kultur anstatt der typischen epithelialen Form eine spindelförmige Gestalt ausbildet (siehe Abbildung 4). Darüber hinaus lässt sich in MDAMB231 filamentöses Vimentin, ein Marker für mesenchymale Zellen, detektieren.

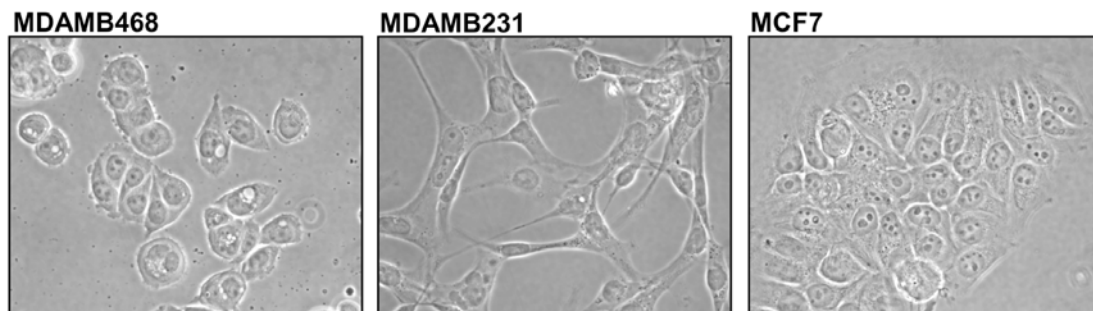


Abbildung 4 Darstellung der Zellmorphologie von MDAMB468, MDAMB231 und MCF7

Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausplattiert und im Inkubator gelagert. Nach 48 Stunden erfolgte die Fixierung der Zellen mit 4 % Formaldehyd und anschließend die Analyse der Zellmorphologie bei einer 400 fachen Vergrößerung im Phasenkontrastmikroskop.

Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung in Abbildung 5A zeigt Zellen der drei Linien, in denen p53 mit einem spezifischen polyklonalen Antikörper und einem Alexa 568-gekoppelten Zweitantikörper zur Visualisierung markiert wurde. Zur Kompartimentierung der Zellen in Nukleus und Zytoplasma wurde das Intermediärfilament Zytokeratin mit einem Gemisch verschiedener monoklonaler Antikörper und einem Alexa 488-gekoppelten Zweitantikörper angefärbt. Die Lokalisation des p53-Proteins beschränkte sich in allen Zelllinien hauptsächlich auf den Zellkern, wobei ein geringer Teil des Proteins auch im

Zytoplasma detektierbar war. Wie erwartet, zeigten die beiden p53-Mutanten-Zelllinien MDAMB231 und MDAMB468 in der Immunfluoreszenzfärbung ein starkes p53-Signal, was aus dem deregulierten Abbau des mutierten Proteins in diesen Zellen resultiert. In MCF7 Zellen hingegen wurde eine heterogene, jedoch hauptsächlich basale p53-Expression detektiert.

Wtp53-Protein in MCF7 Zellen wird durch verschiedene DNA-schädigende Stress-Stimuli wie beispielsweise freie Radikale, Chemikalien oder ionisierende Strahlung aktiviert und stabilisiert, was zu einer erhöhten Konzentration des Proteins führt. Abbildung 5B zeigt MCF7 Zellen, die entweder mit 25 J/m^2 UV-C oder mit 10 Gy γ -Strahlen behandelt und zu den angegebenen Zeitpunkten für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung fixiert wurden. Gebildetes p53-Protein wurde durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Beide Stimuli induzieren einen Anstieg der p53-Konzentration, wobei das Maximum der p53-Expression bei mit γ -Strahlen behandelten Zellen zwei Stunden früher erreicht wurde als bei UV-C bestrahlten Zellen. Dies lässt sich mit der Schwere der induzierten DNA-Schäden erklären: UV-C Strahlung verursacht Dimerisierungen benachbarter Pyrimidine, wohingegen γ -Strahlen einerseits direkt das Zuckerrückgrat der DNA angreifen und andererseits durch das Freisetzen von reaktiven Sauerstoffspezies Einzel- und Doppelstrangbrüche in der DNA induzieren. Auffällig war, dass selbst 10 Gy ionisierende Strahlung von MCF7 Zellen toleriert wurde und sie weiter proliferierten.

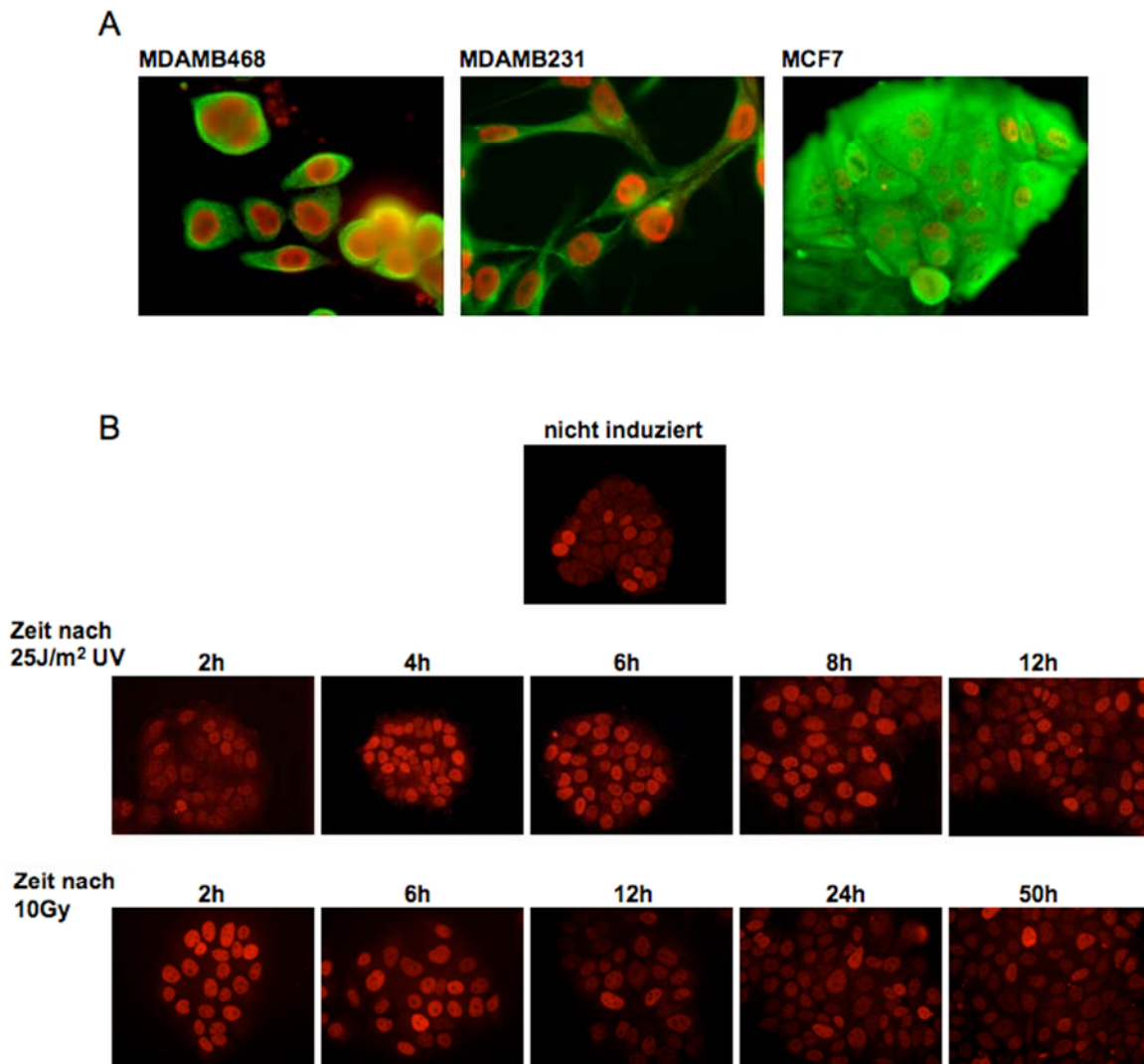


Abbildung 5 Darstellung der p53 Expression in MDAMB468, MDAMB231 und MCF7

Die Expression und Lokalisation von p53 wurde zwei Tage nach dem Ausplattieren mittels Immunfluoreszenz bei einer 400 fachen Vergrößerung analysiert. (A) p53 wurde in der indirekten Immunfluoreszenz mit polyklonalem p53 Antikörper aus Ziege (FL-393, Santa Cruz) markiert und mit einem Alexa 568 gekoppelten Sekundärantikörper gegen Ziegen-IgG detektiert (rotes Signal). Zytokeratine (grün) wurden durch ein Gemisch monoklonaler Antikörper (C2562, Sigma) und einen Alexa 488-gekoppelten Sekundärantikörper visualisiert. (B) Zeitkinetik der p53 Expression in MCF7 infolge verschiedener Stress-Stimuli. Die Zeitangaben beziehen sich auf den Zeitpunkt der Fixierung nach dem jeweiligen genotoxischen Stress. p53 ist rot dargestellt.

2.1.1 Analyse der *TP53* Gen Transkription und der p53-Expression

Neben der wtp53-exprimierenden Zelllinie MCF7 wurde hauptsächlich mit Zellen der Linie MDAMB231 und MDAMB468, die endogen mutp53 exprimieren, gearbeitet. Werden Zellen der p53-Mutanten-Linien in Nacktmäuse injiziert, sind diese, im Gegensatz zu MCF7 Zellen, hochgradig kanzerogen. Bei der Mutation im *TP53* Gen der jeweiligen Zelllinie handelt es

sich um eine Punktmutation in der zentralen DBD, durch die nachhaltig die DNA-Bindung beeinflusst wird (Kontaktmutante, siehe Einleitung). Bei MDAMB231 ist das Codon 280 (Arg→Lys) und bei MDAMB468 ist das Codon 273 (Arg→His) von einer Mutation betroffen. Zum Nachweis der Transkription des *TP53* Gens wurde aus 1×10^6 Zellen Gesamt-RNA aufgereinigt, wobei 100 ng davon in cDNA umgeschrieben und mit spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert wurde. In Abbildung 6A sind die Ergebnisse der RT-PCR dargestellt. Ein Vergleich der jeweiligen Banden für die p53-Transkripte zeigte, dass im Gegensatz zum unterschiedlich hohen p53-Proteingehalt der Zelllinien (vgl. Abbildung 6B), die Menge der Transkripte nicht drastisch variierte. Dies weist darauf hin, dass die p53-Konzentration in den Zelllinien nicht auf transkriptioneller Ebene reguliert wird, sondern durch posttranskriptionelle Ereignisse bestimmt wird. Besonders verdeutlicht sich dies bei einem Vergleich der p53-Expression von induzierten mit nicht induzierten MCF7 Zellen. In Abbildung 6B wurde der p53-Proteingehalt vom Gesamt-Zelllysat von nicht behandelten mit dem p53-Gehalt von UV-C bestrahlten MCF7 Zellen über Western Blot Analysen verglichen. Obwohl ein offensichtlicher Anstieg der p53-Proteinkonzentration infolge zellulären Stresses beobachtet wurde, änderte sich, wie in Abbildung 6A gezeigt, die Transkriptionseffizienz des *TP53* Gens kaum.

Zur relativen Quantifizierung der p53-Transkription in behandelten und unbehandelten MCF7 Zellen wurde eine quantitative RT-PCR (Q-RT-PCR) durchgeführt. Die Werte wurden auf eine endogene Kontrolle (das konstitutiv exprimierte *HPRT1* Gen (Vandesompele et al., 2002)) normalisiert und die Transkription in unbehandelten MCF7 Zellen als Referenzwert gesetzt. Hierfür wurde die Gesamt-RNA aus unbehandelten und aus behandelten MCF7 Zellen (vier Stunden nach 25 J/m^2 UV-C) isoliert und in cDNA umgeschrieben. In Abbildung 6C sind die Messergebnisse von Triplikaten in einem Balkendiagramm zusammengefasst und die jeweilige Standardabweichung dargestellt. Zusätzlich zur relativen Expression des *TP53* Gens wurden Werte für unterschiedliche p53-Zielgene ermittelt. Werte unterhalb 1 weisen auf eine Verringerung der Transkription, Werte oberhalb 1 auf eine Steigerung der Transkription infolge UV-C hin. Die Expression der Zielgene wurde infolge des Stress-Stimulus deutlich hoch reguliert (*p21^{Waf1/Cip1}* ca. 7,5 fach; *GADD45* ca. 13 fach; *Mdm2* ca. 2 fach). Hingegen lag der Wert für p53 bei 0,75, was auf eine annähernd konstante Transkription des *TP53* Gens nach Induktion durch UV-C Bestrahlung in MCF7 Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen hinweist.

Diese Divergenz zwischen erhöhter p53-Proteinkonzentration und gleich bleibender p53-Transkriptionseffizienz lässt sich zum einen durch posttranslationale Modifikationen und der damit verbundenen erhöhten Stabilität des p53-Proteins erklären. Zum anderen kann auch eine erhöhte Translationsrate der Transkripte, zum Beispiel durch Ausschalten inhibitorischer Effekte, zu einem Anstieg des Proteinprodukts beitragen.

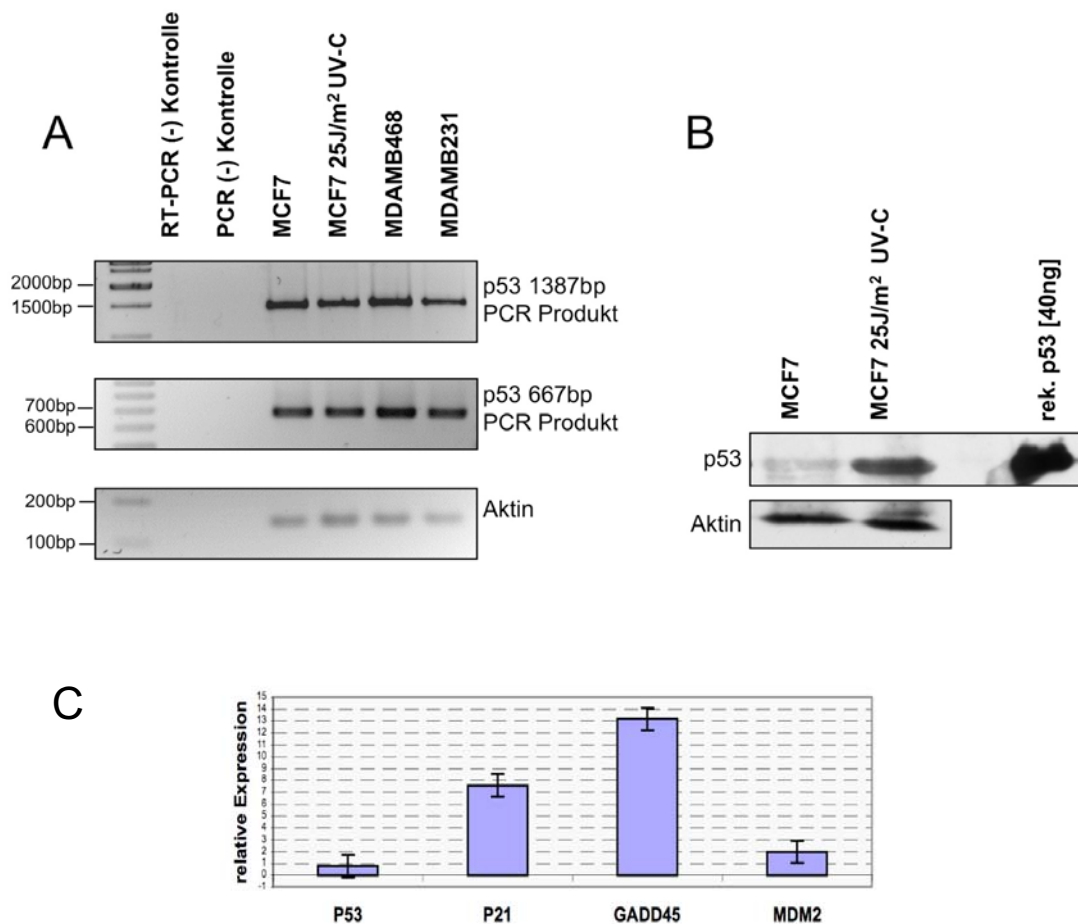


Abbildung 6 Transkription und differentielle Expression des TP53 Gens

A) mRNA aus 100 ng isolierter Gesamt-RNA wurde mit dem Poly T-CDS Oligonukleotid in cDNA umgeschrieben und mit p53-spezifischen Primern (hp53-A1 und hp53-B1 ergaben ein 1387 bp Produkt; hp53-A1 und 5L1R ergaben das 667 bp Produkt) amplifiziert. Aktin (Primer hs-ACTB-A und hs-ACTB-B; 140 bp Produkt) diente als endogene Ladekontrolle. Die Auftrennung des langen PCR-Fragmentes erfolgte in einem 1 % Agarosegel, die Auftrennung des kurzen PCR-Fragmentes und der Aktin-Kontrolle erfolgte in einem 2 % Agarosegel. (B) Western Blot Analyse von MCF7 Zellen. 1×10^6 Zellen wurden in 500 μ l 2x SDS Probenpuffer lysiert und 1/10 der Probe über ein 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion von p53 mit dem polyklonalem p53 Antikörper (FL-393) und die Visualisierung mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (705-035-147, Dianova). Die Aktivierung von p53 (zweite Spur von links) erfolgte im Stratalinker bei 25 J/m² UV-C. (C) Analyse der Transkription von TP53 und der wtp53-Zielgene *p21^{Waf1/Cip1}*, *GADD45* und *Mdm2* in MCF7 Zellen (vier Stunden nach 25 J/m²) mittels quantitativer RT-PCR. Die relative Expression des jeweiligen Gens in unbehandelten MCF7 Zellen entspricht dem Wert 1. Die Proben wurden auf die Expression des Haushaltsgens *HPRT1* normalisiert.

2.1.2 Verifizierung der Transkripte für endogen exprimiertes mutp53

Die Integrität der Sequenz der jeweiligen mutp53-Transkripte wurde durch Sequenzierung der isolierten cDNA verifiziert. Die relevanten Ausschnitte der Chromatogramme sind in Abbildung 7 dargestellt. Dabei wurde in allen analysierten mutp53-Sequenzen für MDAMB468 Zellen ein Prolin im Codon 72, für das ein Arginin/Prolin Polymorphismus in der p53-Sequenz bekannt ist, festgestellt (siehe Abbildung 7B).

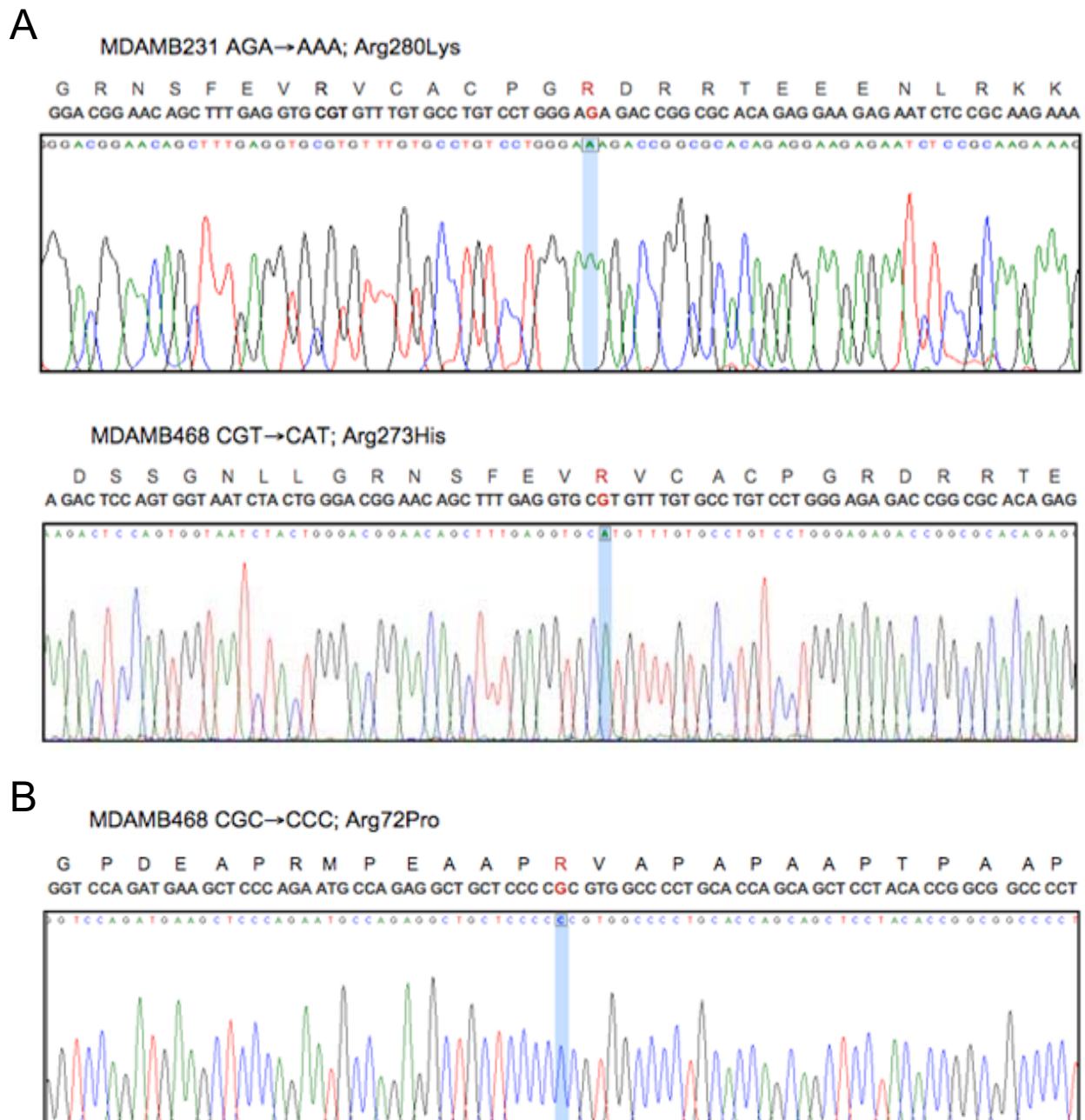


Abbildung 7 Verifizierung der endogenen mutp53-Transkripte aus MDAMB231 und MDAMB468

(A) Ausschnitte der Chromatogramme aus den Sequenzierungen der cDNA. Die Punktmutation bzw. der Polymorphismus in der Sequenz ist blau unterlegt. (B) Detektierter Prolin-Polymorphismus an der AS Position 72 in der cDNA für p53 aus MDAMB468. Oberhalb der Chromatogramme sind die wtp53 Codons und die translatierten AS für den Abschnitt angegeben. Dargestellt sind repräsentative Chromatogramme aus mindestens drei unabhängigen Sequenzierungsreaktionen.

Das Codon 72 liegt im Exon 4 und kodiert für eine Aminosäure in der Prolin-reichen Region, die eine wichtige Funktion bei der Induktion der Apoptose durch p53 hat. Die wtp53-Varianten im Codon 72 unterscheiden sich deutlich in ihrem biochemischen und biologischen Verhalten. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass Prolin-Isoformen *in vitro* eine höhere Affinität zu den Transkriptionsfaktoren TAFII32 und TAFII70 aufweisen und folglich die Transkription von einigen p53-Zielgenen stärker induzieren (Thomas et al., 1999). Jedoch sind diese Isoformen in ihrer Fähigkeit, die Apoptose einzuleiten, deutlich beeinträchtigt (Dumont et al., 2003).

2.2 DNA Bindungsanalysen endogen exprimierter mutp53-Proteine mittels Chromatin Immunpräzipitation (ChIP-Seq)

Die wichtigste biologische Eigenschaft von wtp53 ist die eines Transaktivators. Infolge zellulären Stresses transaktiviert p53 eine Vielzahl unterschiedlicher Zielgene, die in ihren Promotorsequenzen die degenerierte p53-Konsensus-Sequenz aufweisen. In fast der Hälfte aller Tumore ist p53 mutiert und hat die Fähigkeit zur Sequenz-spezifischen Transaktivierung der Wildtyp Zielgene verloren. Die Inaktivierung der Wildtyp Funktionen des Tumorsuppressors ist ein entscheidendes Ereignis in der Tumorentstehung und malignen Progression. Inwiefern mutp53 als Transaktivator an der Regulation des Transkriptomts einer malignen Zelle beteiligt ist, ist weitgehend ungeklärt. Obwohl die transkriptionelle Regulation einiger Gene von bestimmten Sequenzmotiven abhängig zu sein scheint (Tsutsumi-Ishii et al., 1995; Zalcenstein et al., 2003), verhindert die starke Heterogenität dieser Sequenzen die Formulierung einer mutp53-Konsensus-Sequenz. Das macht eine Vorhersage möglicher mutp53-Bindestellen im Genom schwierig.

Zur Identifizierung potentieller DNA-Bindestellen von endogen exprimierten mutp53-Proteinen in MDAMB231 und MDAMB468 Zellen wurden *in vivo* ChIP-Seq Experimente durchgeführt. Die Durchführung des Chromatin Immunpräzipitations-Experiments ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt.

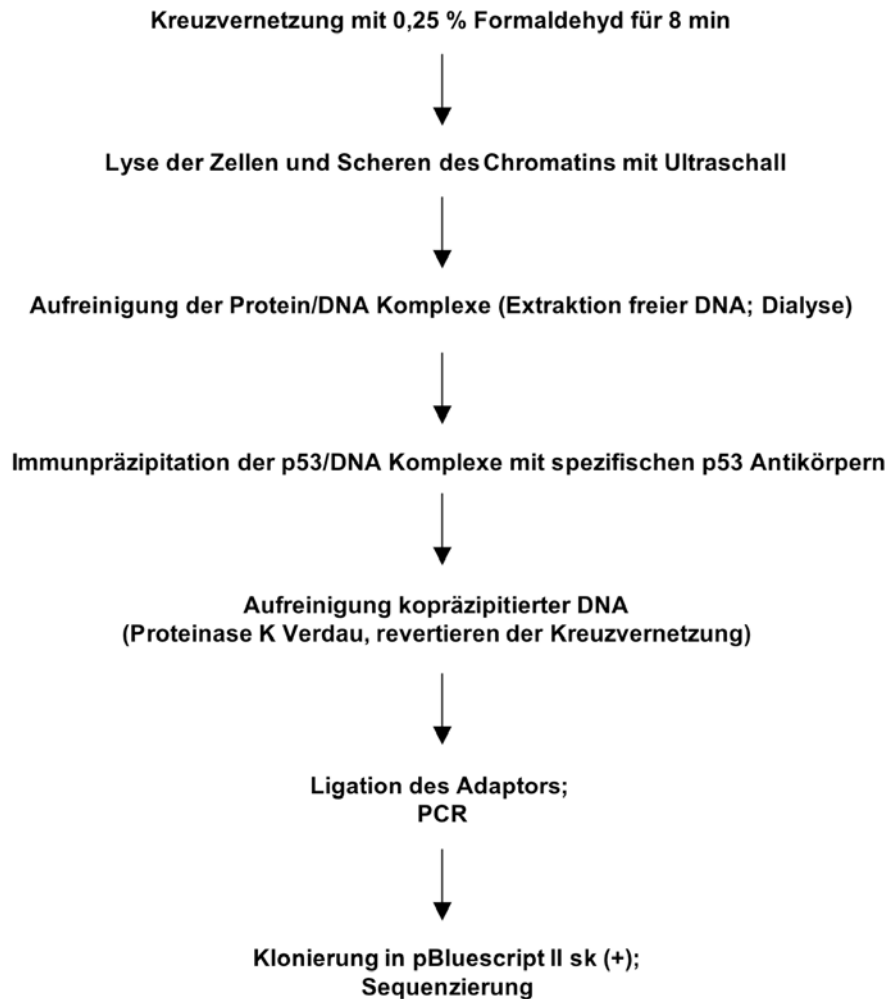


Abbildung 8 Flussdiagramm des experimentellen Aufbaus eines ChIP-Seq Experiments

Hierfür wurden DNA-gebundene Proteine mit Hilfe des Vernetzungsreagenz Formaldehyd kovalent an ihre Bindestellen fixiert und nach der Lyse der Zellen mit einem spezifischen Antikörper gegen p53 präzipitiert. Die kopräzipitierte DNA wurde anschließend aufgereinigt, per PCR amplifiziert, kloniert und sequenziert. Ein Großteil der DNA ist nach der Vernetzungsreaktion nicht in einem Protein/DNA Komplex gebunden, sondern liegt als freies Molekül vor. Um auszuschließen, dass verschleppte Reste dieser DNA-Moleküle in der Sequenzanalyse falsch-positive Ergebnisse erzeugen, musste die freie DNA nach der Zell-Lyse aus der Probe extrahiert werden (siehe Abbildung 9A). Im Anschluss an die Isolation der Protein/DNA Komplexe wurde die Konzentration des Gesamtproteingehalts photospektrometrisch bestimmt und die Anwesenheit von p53 biochemisch verifiziert. Abbildung 9B zeigt die Coomassiefärbung einer elektrophoretischen Auftrennung der Zell-Lysate bei gleicher Proteinkonzentration und die spezifische Detektion von p53-Proteinen aus repräsentativen ChIP-Seq Proben. Die Coomassiefärbung verdeutlicht, dass die ChIP-Seq

Probe vor der Immunpräzipitation eine Vielzahl von unterschiedlich großen Protein/DNA Komplexen beinhaltete. Die niedermolekularen Banden repräsentieren die unterschiedlichen Histone, ein Nachweis dafür, dass die Methode eine Isolation DNA-gebundener Proteine ermöglichte.

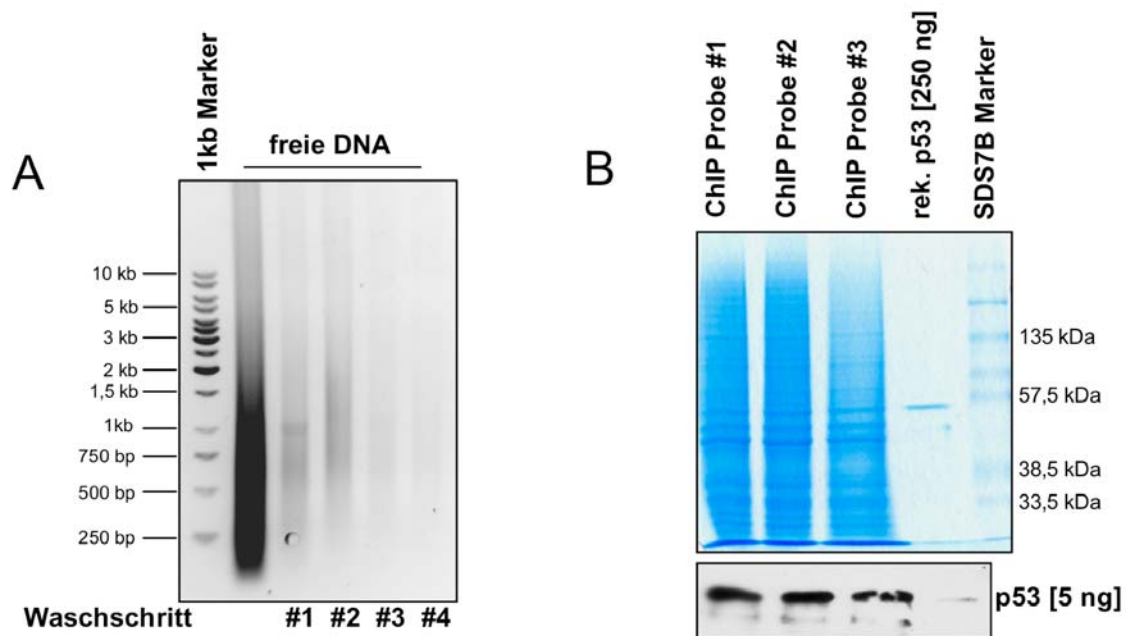


Abbildung 9 Isolierung Formaldehyd-vernetzter Protein/DNA Komplexe

A) KCl Dodecylsulfat Präzipitation der freien DNA. 5×10^7 Zellen wurden mit 0,25 % Formaldehyd behandelt und lysiert. Kreuzvernetzte Protein/DNA Komplexe wurden durch mehrmalige KCl Dodecylsulfat Präzipitation (Waschschr.) von freier DNA getrennt. Der Gehalt der ungebundenen DNA in 1/20 des Überstands wurde auf einem 1 % Agarosegel analysiert. (B) Analyse des p53-Gehalts in ChIP-Seq Proben nach der Aufreinigung der Protein/DNA Komplexe. Nach der photospektrometrischen Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in den ChIP Proben wurden 25 μ g Gesamtprotein für die Coomassiefärbung und 15 μ g Gesamtprotein für den Western Blot über 10 % SDS Polyacrylamidgele aufgetrennt. P53 wurde mit dem polyklonalen p53-Antikörper (FL-393) detektiert und die Visualisierung erfolgte mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (705-035-147, Dianova).

P53/DNA Komplexe wurden durch Immunpräzipitation mit polyklonalem p53-Antikörper aus der ChIP-Seq Probe isoliert, wobei Proben ohne Antikörper als Negativkontrollen fungierten. Nach dem Aufreinigen der kopräzipitierten DNA aus dem p53/DNA Komplex, erfolgte die Amplifikation der DNA durch PCR. In Abbildung 10 ist exemplarisch eine elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate eines ChIP-Seq Experiments im Agarosegel dargestellt. Zwei der drei Proben mit Antikörper zeigen eine deutliche Anreicherung an DNA-Fragmenten im Vergleich zu den Negativkontrollen ohne Antikörper. Dies ist einerseits ein Hinweis darauf, dass die präzipitierten DNA-Fragmente tatsächlich im Komplex mit p53-Proteinen vorlagen, andererseits lässt sich aus dem Ergebnis der ChIP-Seq Probe #1

schließen, dass die Methodik eine hohe Sensitivität gegenüber Kontaminationen aufweist. Das Bandensignal aus unterschiedlich langen DNA-Fragmenten (ca. 200 bp bis 1 kb) resultiert aus der ungerichteten Zerstückelung des zellulären Genoms durch Ultraschall am Anfang des CHIP-Seq Protokolls (siehe Abschnitt 5.6). DNA-Fragmente aus den CHIP-Seq Proben #2 und #3 wurden in den Klonierungsvektor pBluescript II sk (+) ligiert und zur Amplifikation in kompetente Bakterien transformiert. Aufgereinigte Plasmide wurden schließlich im Bereich des Inserts sequenziert.

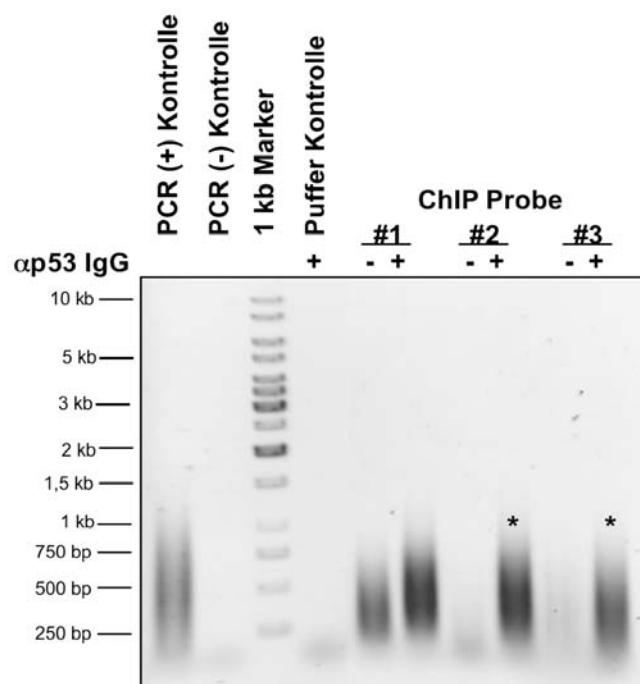


Abbildung 10 Exemplarische Darstellung einer gelelektrophoretischen Analyse von präzipitierten DNA-Fragmenten aus CHIP-Seq Experimenten

Formaldehyd vernetzte p53/DNA Komplexe wurden mit einem polyklonalen Antikörper gegen p53 (FL-393) und PGS aus der Probe immunpräzipitiert. Die Anwesenheit des Antikörpers in der IP ist mit (+) gekennzeichnet, die Abwesenheit mit (-). Die DNA wurde aufgereinigt und mit einem Adaptormolekül ligiert. Anschließend wurde die DNA mit spezifischen Primern für die endständigen Adaptoren über PCR amplifiziert. Dargestellt ist die analytische Auftrennung der DNA-Fragmente in einem 1 % Agarosegel. Sterne markieren Proben, die kloniert und sequenziert wurden. Die Pufferkontrolle enthielt keine p53/DNA Komplexe.

2.2.1 Verteilung der mutp53 Bindestellen im Genom

Eine Analyse der genomischen Verteilung der Sequenzen erfolgte über Online-Programme (Human Blat Search, Version 2004: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat> (Kent et al., 2002) bzw. NCBI Blast: <http://130.14.29.110/BLAST/>). Insgesamt wurden 176 Sequenzen (Liste der Bindestellen in Anhang A1) aus MDAMB231 Zellen analysiert und anhand ihrer

Nukleotidabfolge unterschiedlichen Chromosomen zugeordnet. Abbildung 11 zeigt die relative Verteilung der einzelnen Bindestellen pro Chromosomenlänge in Basenpaaren. Allgemein lässt sich sagen, dass die Verteilung im Genom bei dieser Probenmenge annähernd gleichförmig verläuft, mit einer leichten Anreicherung auf den Chromosomen 2, 10 und 19. Auf Chromosomen 3, 7, 13 und 18 sind die mutp53-Bindestellen im Verhältnis zu den anderen Chromosomen leicht unterrepräsentiert. Für MDAMB468 Zellen konnten bisher 24 Bindestellen identifiziert (Anhang A2) und analysiert werden. Daher ist hier nur eine tendenzielle Aussage über die Verteilung der Bindestellen möglich. Diese scheint zumindest teilweise mit der Verteilung der Bindestellen in MDAMB231 zu korrelieren. Folgende ChIP-Seq Experimente müssten diesen Trend noch bestätigen (siehe Abbildung 11).

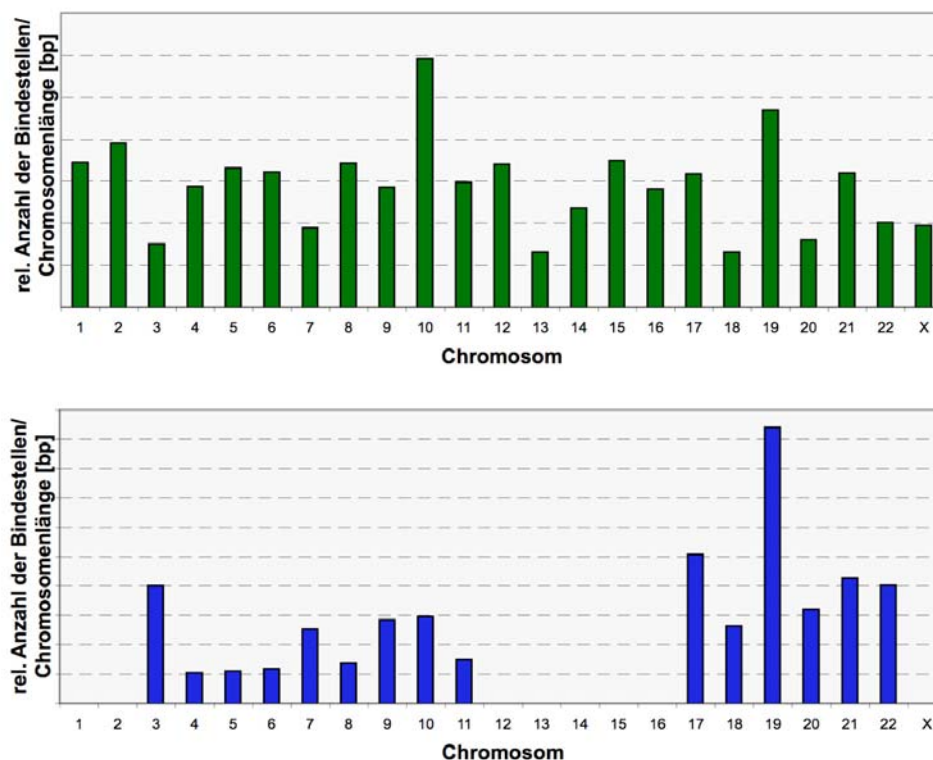


Abbildung 11 Zusammenfassung der genomischen Verteilung von mutp53 Bindestellen

Die Balken symbolisieren die relative Anzahl der durch ChIP detektierten Bindestellen pro Chromosomenlänge [bp]. Oben (grün): Verteilung der 176 potentiellen Bindestellen für mutp53 in MDAMB231 Zellen. Unten (blau): Verteilung der 24 potentiellen Bindestellen für mutp53 in MDAMB468 Zellen

Um einen tieferen Einblick in das Bindevverhalten der mutp53-Proteine zu erhalten, wurde die Verteilung der potentiellen Bindestellen auf den jeweiligen Chromosomen genauer untersucht. In Abbildung 12 ist die chromosomale Verteilung der potentiellen Bindestellen

aus den ChIP-Seq Experimenten für MDAMB231 und MDAMB468 dargestellt. Mindestens zwei Bindeloci mit einem Abstand von höchstens einer Millionen Basenpaaren zueinander wurden als ein Binde-Cluster definiert und sind in der Abbildung 12 grau unterlegt. Die lokale Anreicherung von mutp53-Bindestellen im Genom deutet auf funktionelle Eigenschaften des Proteins für die Chromatin-Schleifenbildung hin. Für MDAMB231 konnten, gemäß der Parameter, 21 geclusterte Bindestellen identifiziert werden; allein drei dieser Cluster lagen auf dem Chromosom 10. Der Abstand zwischen den Bindestellen in einem Cluster betrug 2 kb bis 950 kb. Für MDAMB468 konnte, wegen der geringen Anzahl identifizierter Sequenzen, keine Cluster definiert werden. Jedoch ergab ein Vergleich der Bindestellen beider Zelllinien drei Übereinstimmungen zwischen den Zelllinien in Loci auf den Chromosomen 4 (7 kb Abstand zwischen den Bindestellen), 17 (280 kb Abstand zwischen den Bindestellen) und 22 (315 kb Abstand zwischen den Bindestellen), die in der Abbildung 12 mit rot gestrichelten Kästen hervorgehoben sind.

2.2.2 Genomische Lokalisation der mutp53-Bindestellen

In der weiteren Analyse wurden die mutp53-Bindestellen auf eine mögliche Lokalisation in kodierenden Bereichen der DNA hin untersucht. Für MDAMB231 ergab die Auswertung, dass ca. 36 % (64 aus 176) der gefundenen Bindestellen intragenisch lokalisiert sind, darunter befand sich auch eine Bindestelle im *TP53* Gen. 64 % der Bindeloci wurden nicht-kodierenden Bereichen oder hypothetisch kodierenden Regionen zugeordnet. Die große funktionelle Heterogenität der identifizierten Gene machte es jedoch unmöglich, eine allgemeingültige biologische Funktion der DNA-Bindung durch mutp53 zu entschlüsseln (Tabelle 1, S. 41). Alle bis auf zwei der intragenischen Sequenzen wurden ausschließlich in Intronen lokalisiert, wobei mehr als $\frac{1}{4}$ (26,5 %) der intragenischen Sequenzen im ersten Intron lagen. Neun von den 24 identifizierten Bindestellen in MDAMB468 Zellen lagen in Genen (exklusiv in Intronen), was einem Anteil von 37,5 % an den Sequenzen entspricht. Wie auch schon bei der Zelllinie MDAMB231, kodieren diese Gene für Komponenten, die an unterschiedlichen molekularbiologischen Mechanismen beteiligt sind. Folglich ist auch hier eine eindeutige biologische Funktion der mutp53/DNA Interaktion in MDAMB468 Zellen nicht zu erkennen.

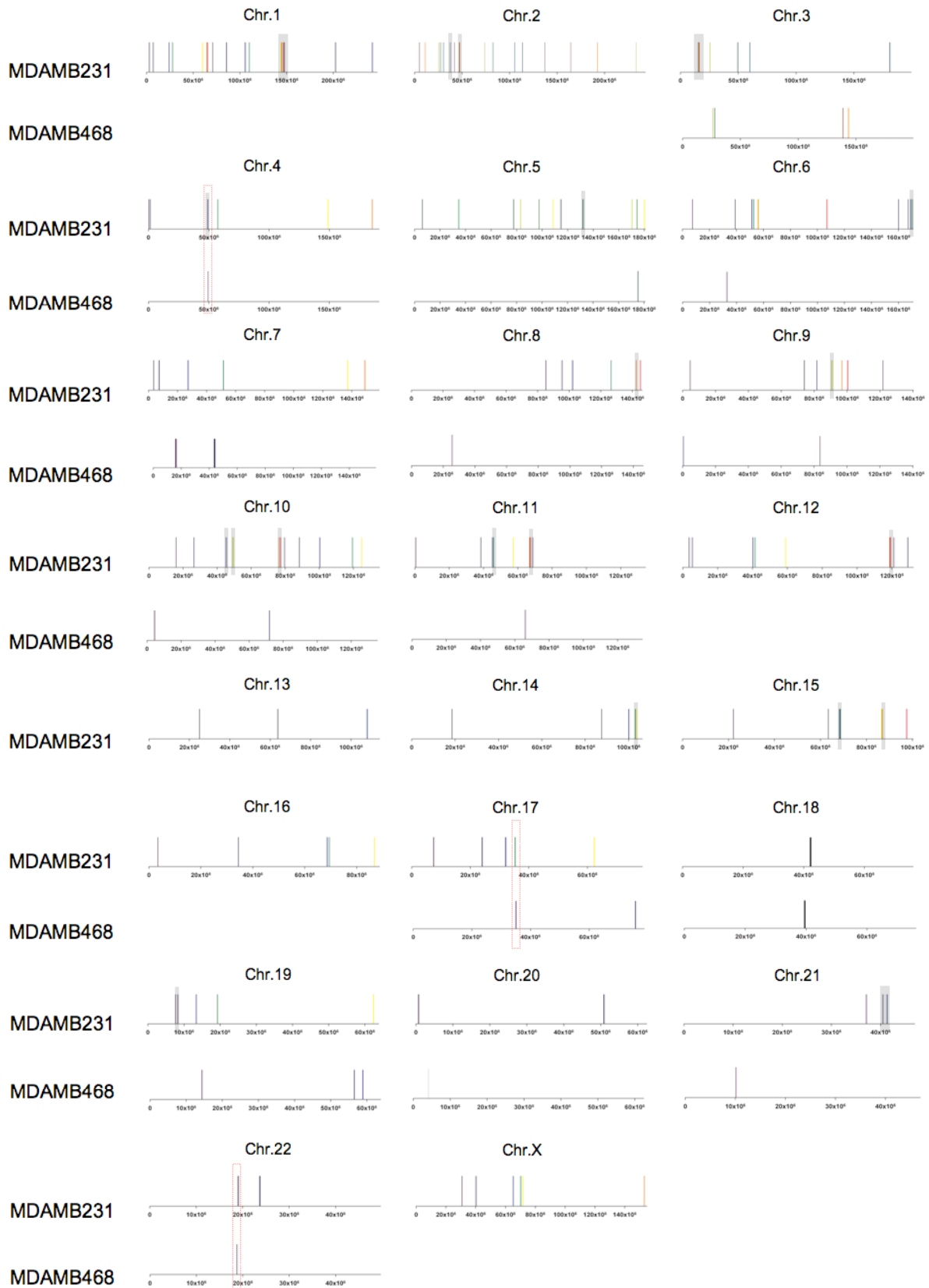


Abbildung 12 Chromosomale Verteilung der potentiellen mutp53 Bindestellen

Bindestellen, die weniger als 1 Mb entfernt zueinander liegen, wurden als Cluster definiert. In der Abbildung sind Cluster, die in einer Zelllinie identifiziert werden konnten, grau unterlegt. Cluster, die durch lokal überlappende Bindestellen beider Zelllinien gebildet werden, sind mit rot gestrichelten Kästchen hervorgehoben.

Zur Erlangung weiterer Hinweise auf eine mögliche transkriptionelle Regulation durch mutp53 in MDAMB231 Zellen wurden die Abstände der Bindestellen zu den nächsten Transkriptions-Initiationstellen (*transcription start sites*, TSS) berechnet. Mit der bioinformatischen Analyse, die von Mark Koudritsky und Tal Shay aus der Gruppe von Eytan Domany am Weizmann Institut in Israel durchgeführt wurde, konnten 70 der 176 Sequenzen innerhalb von 100 kb zur nächsten TSS identifiziert werden. Davon lagen 22 Sequenzen in einem Abstand von 10 kb und nur drei Sequenzen in einem Abstand von 1kb von der nächsten TSS entfernt.

2.2.3 Eigenschaften der mutp53-Bindestellen Sequenzen

Mit Hilfe des Online-Algorithmus CLUSTALW (<http://align.genome.jp/>) und der Jalview-Software (Clamp et al., 2004) wurden die Sequenzen der Bindestellen in MDAMB231 und MDAMB468 verglichen und auf mögliche Konsensus-Motive hin untersucht. Jedoch konnte keine signifikante Konsensus-Sequenz, wie sie für wtp53 definiert wurde (el-Deiry et al., 1992), gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Anders als bei wtp53 scheinen für mutp53 eher repetitive DNA-Elemente entscheidend für die Wechselwirkung zu sein, da 70 % der Sequenzen aus MDAMB231 und ca. 79 % der Sequenzen aus MDAMB468 mindestens eine Art repetitiver DNA-Elemente enthielten. Den höchsten Anteil machten hierbei SINES (*short interspersed nuclear element*), LINES (*long interspersed nuclear element*) und LTRs (*long terminal repeat*) aus. Abbildung 13A zeigt die Verteilung der repetitiven Elemente anhand ihres Vorhandenseins in den Bindestellen. Besonders deutlich wird die Präferenz von mutp53 für repetitive Sequenzen, wenn man die Gesamtverteilung der einzelnen repetitiven DNA-Elemente der Bindestellen mit der Verteilung repetitiver Elemente im humanen Genom vergleicht (siehe Abbildung 13B). So sind im Verhältnis fast dreimal mehr SINES in den Bindestellen von MDAMB231 und MDAMB468 Zellen enthalten als im menschlichen Genom. Auch ist die Häufigkeit der LTRs 1,5mal (MDAMB231) und mehr als zweimal (MDAMB468) größer in den Bindestellen als im Genom. Satelliten-DNA war in den identifizierten Bindestellen beider Zelllinien deutlich unterrepräsentiert.

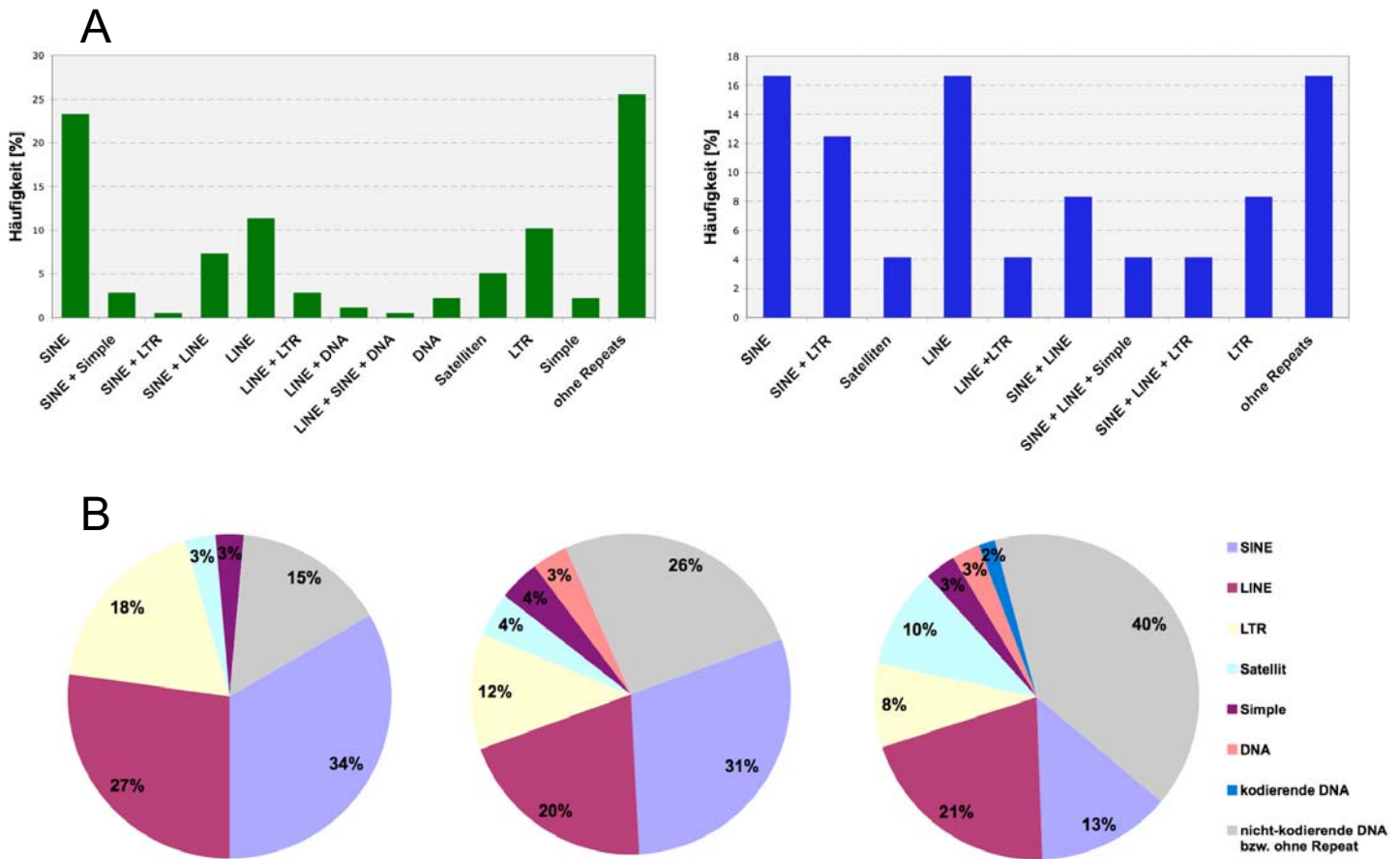


Abbildung 13 Analyse der Sequenz-Eigenschaften der mutp53-Bindestellen

(A) Vorhandensein einzelner repetitiver DNA-Elemente in den Bindestellen. Links: Balkendiagramm für Sequenzen aus MDAMB231 Zellen. Rechts: Balkendiagramm für Sequenzen aus MDAMB468 Zellen. (B) Relative Verteilung der repetitiven DNA-Elemente in MDAMB468 (links) und MDAMB231 (mitte) im Vergleich zur Verteilung im humanen Genom (rechts).

Anhand der Ergebnisse aus den ChIP-Seq Experimenten ließ sich ein bestimmtes DNA-Bindevverhalten endogen exprimierter mutp53-Proteine in MDAMB231 Zellen ableiten. Wegen der geringen Probenmenge konnte für MDAMB468 keine klare Aussage gemacht werden, jedoch ließen sich anhand der Tendenz der Ergebnisse die Beobachtungen in MDAMB231 bestätigen. So waren mutp53-Bindestellen im Genom nahezu gleichförmig verteilt, wobei 21 Cluster mit mindestens zwei Bindestellen in einer Entfernung von weniger als 1 Mb zueinander identifiziert werden konnten.

Fast zwei Drittel der Sequenzen waren in nicht-kodierenden Bereichen lokalisiert. Die bioinformatische Berechnung der Entfernung der 176 identifizierten Bindestellen zu den nächsten Initiationsstellen der Transkription (*transcriptional start sites*, TSS) zeigte, dass lediglich 22 dieser Bindestellen innerhalb einer Entfernung von 10 kb lagen. Der Großteil der Sequenzen befand sich demnach weiter als 10 kb von der nächsten berechneten TSS entfernt.

Gene, in denen potentielle mutp53-Bindestellen identifiziert wurden, ließen sich unterschiedlichen funktionellen Gruppen zuordnen (Tabelle 1). Ob nun die DNA-Interaktion von mutp53 zu einer transkriptionellen Regulation der gebundenen Genregion führte, konnte anhand der ChIP-Seq Experimente nicht aufgeklärt werden. Jedoch deuten Bindestellen in Intronen, denen aufgrund einiger intronischen Strukturen eine transkriptionell regulatorischen Kapazität zugeordnet werden kann, darauf hin. Unterstützt wird dies dadurch, dass lediglich zwei der 64 intragenischen Bindestellen exklusiv in Exonen gefunden wurden.

<i>Funktionelle Gruppe</i>	<i>Beispiel (Gen Referenznummer)</i>
Zelladhäsion	CTNND1 (CR749275), SDK1 (NM_152744)
Tumorsuppression	TP53 (NM_000546), CAMTA1 (NM_015215)
Extrazelluläre Matrix	HPSE2 (NM_021828)
ATPasen	ATP8A2 (AK127263), ATP6AP2 (NM_005765)
neuronale Organisation/ synaptische Signaltransduktion	BSN (NM_003458), NTF3 (NM_001102654.1)
Ionenkanäle	CACNA1A (NM_023035), CHRNG (NM_005199)
Immunantwort	MARCH8 (NM_001002265), IL1F10 (NM_032556)
Zellwachstum/ Differenzierung	RPS6KA2 (NM_001006932), LASS2 (NM_181746)
Intrazellulärer Transport	DNAH8 (NM_001371), MYO3A (NM_017433)
Nukleärer Transport	RANBP17 (NM_022897)
Zytoskelett	PXN (NM_002859)
Intrazelluläre Signaltransduktion	ARHGAP22 (NM_021226)
Transkription	MONDOA (NM_014938)
Epigenetische Modifikation	MYST4 (NM_012330), DNMT3A (NM_022552)
DNA Reparatur	CRY2 (NM_021117)

Tabelle 1 Einteilung der potentiellen intragenischen mutp53-Bindestellen aus MDAMB231 in funktionelle Gruppen

Interessanterweise sind repetitive DNA-Elemente, insbesondere SINEs und LTRs, in den potentiellen mutp53-Bindestellen signifikant überrepräsentiert, was auf eine wichtige Rolle dieser Elemente in der mutp53/DNA Interaktion hindeutet. Hingegen konnte eine Konsensus-Sequenz, wie sie in der Literatur für wtp53 beschrieben wurde, nicht gefunden werden.

2.3 Extraktionsanalysen endogen exprimierter p53-Proteine

Im Vergleich zu nicht bestrahlten MCF7 Zellen besteht in MDAMB231 und MDAMB468 Zellen eine permanent hohe nukleäre p53-Proteinkonzentration (siehe Abbildung 5A). Wie in der Literatur beschrieben und in Abbildung 5B bzw. 6B dargestellt, akkumuliert wtp53 in MCF7 Zellen erst infolge zellulären Stresses. Es sollte nun die Frage geklärt werden, welcher Anteil des p53-Proteinanteils mit DNA assoziiert ist. Da die Dynamik der wtp53/DNA Interaktion in zahlreichen Publikationen beschrieben wurde, sollte in den Extraktionsanalysen das DNA-Bindeverhalten der wtp53-exprimierende Zelllinie MCF7 als Vergleichswert dienen. Zur näheren Charakterisierung der DNA Bindung endogen exprimierter p53-Proteine wurde mit Hilfe unterschiedlicher Puffersysteme der lösliche Bestandteil der Zellen extrahiert. Im ersten Teil der Extraktionsexperimente wurde der lösliche Anteil von MDAMB231 und MCF7 Zellen mit CSK I Puffer extrahiert, der entweder 0,5 % oder 0,05 % des Detergenz Triton X-100 enthielt. Der verbleibende unlösliche Zellbestandteil wurde in äquivalenter Menge 2x SDS Probenpuffer mit Hilfe eines Gummischabers von der Zellkulturschale abgekratzt. Gleiche Mengen beider Fraktionen wurden über ein 10 % SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gesamt-Proteinextrakte im Gel durch Coomassie Färbereagenz sichtbar gemacht. Zur Visualisierung spezifischer Proteine wurde die Gesamt-Proteinextrakte über Western Blot Analysen auf eine PVDF-Membran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. MCF7 Zellen wurden 2 h vor Extraktion durch Bestrahlung mit 10 Gy behandelt (Abbildung 14A).

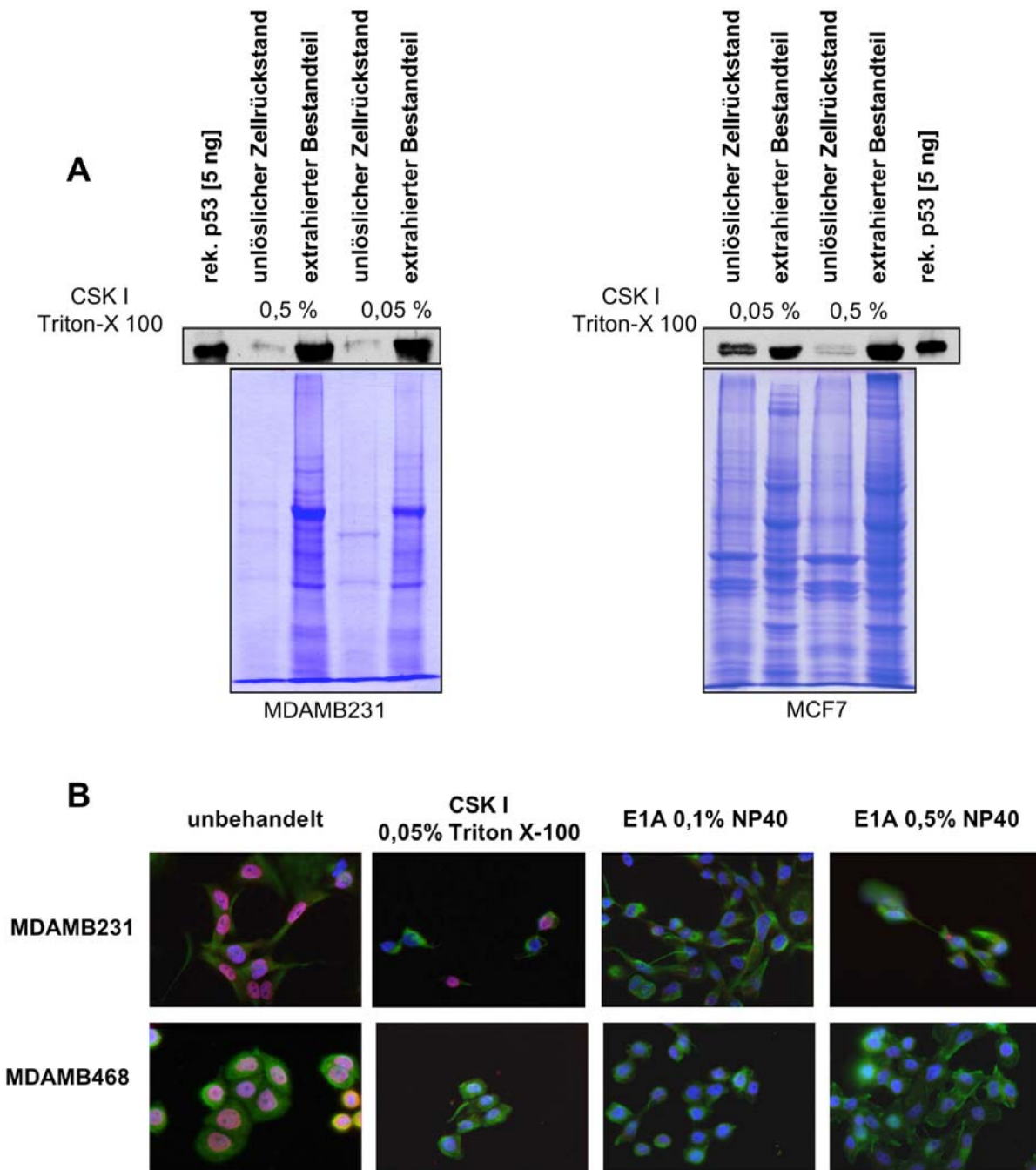


Abbildung 14 Extraktion endogen exprimierter p53-Proteine in MDAMB231, MDAMB468 und MCF7 Zellen

(A) Biochemische Darstellung der extrahierten Proteine. 1×10^7 Zellen von MDAMB231 bzw. MCF7 wurden mit CSK I Puffer, mit 0,05 bzw. 0,5 % Triton X-100, in der Zellkulturschale inkubiert. Nach fünf Minuten wurde der Überstand abgenommen und die unlösliche Fraktion im gleichen Volumen (2 ml) 2x SDS Lysepuffer aufgenommen. Je 30 μ l der Fraktionen wurden über 10 % SDS Polyacrylamidgele aufgetrennt. Das Gesamt-Proteinextrakt ist in der Coomassie-Färbung dargestellt. P53 wurde im Western Blot mit polyklonalem p53-Antikörper detektiert und mit einem HRP-konjugierten Sekundärantikörper visualisiert. P53 wurde in MCF7 Zellen 2 h vor Behandlung mit 10 Gy aktiviert und stabilisiert. (B) Analyse unterschiedlicher Extraktionspuffer in der indirekten Immunfluoreszenz. 1×10^5 Zellen von MDAMB231 bzw. MDAMB468 wurden mit den angegebenen Detergenz-Konzentrationen für fünf Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und fixiert. In der indirekten Immunfluoreszenzfärbung wurden Zytokeratin (grün), p53 (rot) und DNA (DAPI, blau) visualisiert.

Die Coomassie-Färbung zeigte, dass für MDAMB231 Zellen schon 0,05 % Detergenz im Puffer ausreichend war, um den Großteil des vorhandenen Proteins in Lösung zu bringen und aus MDAMB231 zu extrahieren. In MCF7 Zellen war die Behandlung weniger effektiv. Dies spiegelte sich auch in den Western Blot Analysen wieder, in denen spezifisch der p53-Anteil in den Fraktionen analysiert wurde. Schon geringe Mengen an Detergenz reichten aus, um nahezu den gesamten mutp53 Anteil aus MDAMB231 Zellen zu extrahieren, wohingegen eine vergleichbare wtp53 Extraktion in MCF7 Zellen erst mit einem hohen Detergenzanteil im Puffer (0,5 %) erreicht werden konnte (siehe Abbildung 14A). Eine Erklärung für die unterschiedliche Effektivität der Extraktion liegt in der Bindungsaffinität der exprimierten p53-Proteine. Während wtp53 zur SSDB fähig ist und an den Promotoren der Zielgene die Transkription reguliert, hat mutp53 in MDAMB231 diese Transaktivierungskapazität verloren und besitzt eine deutlich geringere DNA Bindungsaffinität. Andererseits ist nicht auszuschließen, dass die Behandlung der MCF7 Zellen mit Gammastrahlen zur Kreuzvernetzung der Proteine mit DNA führte und die Bindung stabilisiert wurde. Diese Kreuzvernetzung wurde in der Literatur beispielsweise für zellspezifische Nukleoproteine und Histone beschrieben (Mee and Adelstein, 1981; Olinski et al., 1981). Folglich kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein gewisser Teil des gebildeten wtp53 kovalent an Chromatin gebunden vorlag.

In Abbildung 14B wurde die Extraktionskapazität verschiedener Puffer gegenüber p53-Protein aus MDAMB231 und MDAMB468 getestet und mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Hierzu wurden 1×10^5 Zellen der Linien MDAMB231 und MDAMB468 auf Deckgläschen ausplattiert und mit den jeweiligen Puffern für fünf Minuten inkubiert. Nachdem der lösliche Bestandteil extrahiert worden war, wurden die Zellen mit 1 % Formaldehyd fixiert und für die indirekte Immunfluoreszenz, gemäß dem Protokoll im Material und Methodenteil, vorbereitet. P53 und Zytokeratin wurden mit spezifischen Antikörpern detektiert und das Chromatin mit DAPI visualisiert.

Die indirekte Immunfluoreszenz bestätigte die für MDAMB231 in Abbildung 14A gemachten Beobachtungen und zeigte, dass sich die Ergebnisse auf MDAMB468 übertragen lassen, wobei ein Vergleich der indirekten Immunfluoreszenz beider Zelllinien eine effektivere mutp53-Extraktion in MDAMB468 Zellen aufwies. So konnte nach der Behandlung der Zellen mit CSK I Puffer (+ 0,05 % Triton-X 100) und E1A Puffer (+0,1 % NP40) in MDAMB231 noch Reste von mutp53 detektiert werden, wohingegen MDAMB468 Zellen nach der Extraktion kein Signal für mutp53 in der indirekten Immunfluoreszenz zeigten.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass ein großer Anteil sowohl von mutp53 als auch von aktiviertem wtp53 in den untersuchten Zelllinien nicht an DNA gebunden, sondern gelöst vorliegt.

Da jedoch sowohl mutp53 in den MDAMB231 und MDAMB468 Zellen, wie auch aktiviertes wtp53 in MCF7 Zellen deutlich überexprimiert vorlagen, ergab sich die Frage, ob und in welche weiteren Mechanismen p53 jenseits der stabilen DNA Bindung involviert ist.

Ergebnisse aus der Literatur (Ewen et al., 1995; Fontoura et al., 1992; Miller et al., 2000; Oberosler et al., 1993; Samad and Carroll, 1991) und Vorarbeiten unserer Gruppe (Mosner et al., 1995) implizieren eine Funktion von wtp53 im RNA Metabolismus und könnten den nicht DNA-gebundenen Protein-Überschuss erklären.

2.4 RNA Immunpräzipitation zur Analyse der p53/RNA Interaktion *in vivo*

Protein/RNA Interaktionen können *in vitro* beispielsweise durch Wettbewerbsanalysen (*electrophoretic mobility shift assay, EMSA*) und Selektionsmethoden (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX*) oder *in silico* durch Algorithmen-basierte Analysen identifiziert werden. Mit diesen Techniken ist es jedoch weder möglich, die Protein/RNA Interaktion im zellulären Kontext zu beschreiben, noch verschiedene Interaktionsstadien infolge unterschiedlicher Stimuli zu erfassen. Mit der Methode der RNA Immunpräzipitation (RIP) können funktionelle Protein/RNA Komplexe direkt *in vivo* untersucht werden.

Das in der Arbeit verwendete Protokoll basiert auf der ChIP-Seq Methode und ist in Abbildung 15 schematisch dargestellt. Wie bei der Chromatin Immunpräzipitation werden auch hier Nukleinsäuren indirekt über den gebundenen Protein-Interaktionspartner präzipitiert und nach Aufreinigung aus diesem Komplex kloniert und sequenziert. Die meisten der in der Literatur angewendeten RIP Protokolle beinhalten einen Schritt, bei dem Proteine mit RNA kreuzvernetzt werden (Gilbert et al., 2004; Niranjanakumari et al., 2002; O'Gorman et al., 2005; Schmitz-Linneweber et al., 2005). Da dies auch zu Komplexen führen kann, in denen das untersuchte Protein über andere Faktoren indirekt mit der RNA gebunden ist, wurde dieser Schritt in dem vorliegenden Protokoll vermieden. Um ein allgemeines Bild der p53-Interaktion mit RNA zu erhalten, wurde die wtp53-exprimierende Zelllinie MCF7 in die folgenden Experimente mit einbezogen.

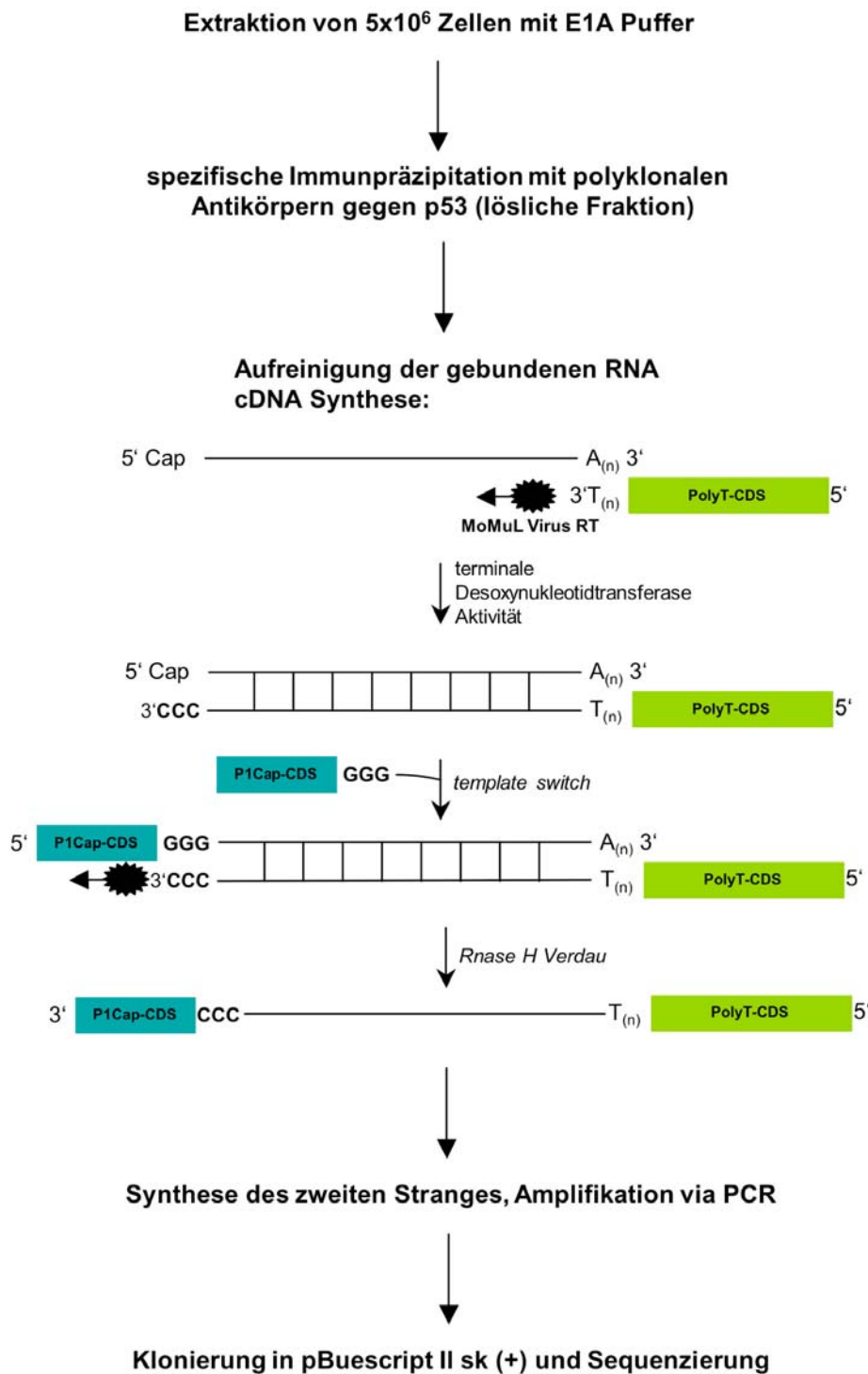


Abbildung 15 Flussdiagramm der RNA Immunpräzipitation

2.4.1 Spezifische Präzipitation p53-gebundener RNA

Im Allgemeinen wurden 5×10^6 adhärenente Zellen in der Zellkulturschale mit E1A Puffer für 5 min bei RT extrahiert. Die Probe der löslichen Fraktion wurde in zwei äquivalente Proben aufgeteilt, wobei aus einem Teil p53-Proteine mit spezifischen polyklonalen Antikörpern präzipitiert wurden. Der andere Teil diente als Negativkontrolle und wurde ohne Antikörper

inkubiert. Kopräzipitierte RNA aus p53/RNA Komplexen wurde anschließend aufgereinigt und die mRNA in cDNA umgeschrieben. Die Abbildung 16 zeigt exemplarisch eine elektrophoretische Auftrennung der Produkte aus der Synthese des zweiten Stranges und anschließender Amplifikation mittels PCR.

Da in der PCR eine heterogene cDNA-Population amplifiziert wurde, erhielt man in der Auftrennung ein Bandenmuster aus Produkten unterschiedlicher Länge, wobei die mittlere Größe ungefähr 500 bp betrug. Die Produkte der Positivkontrollen jedoch konzentrierten sich bei etwa 750 bp bis 2 kb, wobei der in der Literatur angegebene Wert der durchschnittlichen Länge von humanen mRNAs bei 2 kb liegt (Bouck et al., 2000). Ein Grund für die Abweichung vom beschriebenen Wert könnten die PCR Bedingungen sein, die zwar eine optimale Amplifikationseffizienz von DNA-Fragmenten bis 2 kb erlaubten, größere Fragmente jedoch eher schlecht amplifizierten. Zum anderen könnten die kurzen DNA-Fragmente aus den RIP Proben ein Hinweis darauf sein, dass p53 präferentiell an alternative verkürzte Transkripte bindet.

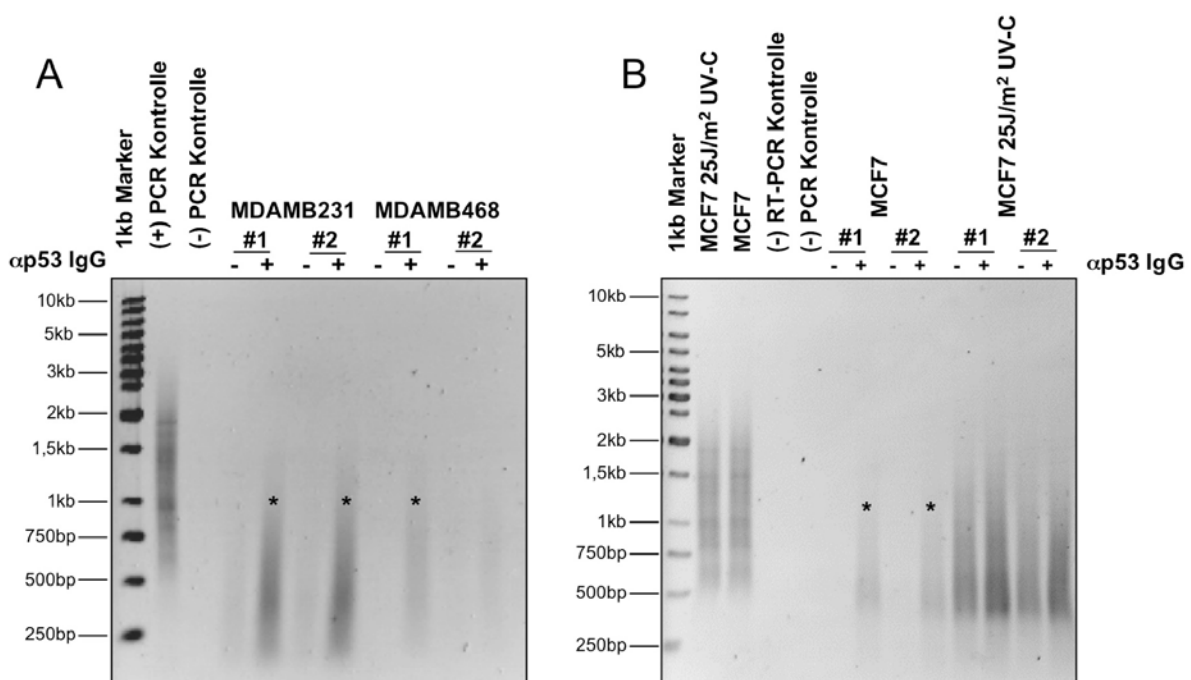


Abbildung 16 Exemplarische Darstellung gelelektrophoretischer Analysen präzipitierter Transkripte aus RIP von MDAMB231, MDAMB468, MCF7 und UV-bestrahlten MCF7 Zellen

Der lösliche Bestandteil von 5×10^6 Zellen wurde durch Zugabe von E1A Puffer mit 0,25 % NP-40 extrahiert. Die spezifische Präzipitation von p53-Proteinen erfolgte mit Hilfe polyklonaler Antikörper (FL-393) und Protein G-gekoppelten Dynabeads. Die p53-gebundenen Transkripte wurden extrahiert, in cDNA umgeschrieben und anschließend amplifiziert. Gezeigt ist die Auftrennung der PCR-Produkte in einem 1 % Agarosegel. Sterne markieren klonierte und sequenzierte DNA-Bahnen. Für die Positivkontrolle wurde 100 ng aufgereinigter Gesamt-RNA aus MDAMB231 (A) oder MCF7 (B) in cDNA umgeschrieben und anschließend 1:5 verdünnt. Für die PCR wurden 1/50 des Ansatzes eingesetzt. Die Negativkontrollen für die RT-PCR und die PCR wurde ohne Template durchgeführt. Pro Zelllinie/Aktivierungsstatus sind jeweils zwei unabhängige repräsentative Versuche dargestellt. Wtp53 wurde vier Stunden vor Extraktion der p53/RNA Komplexe durch UV-Bestrahlung ($25 \text{ J/m}^2 \text{ UV-C}$) aktiviert und stabilisiert.

Für MDAMB231 und MDAMB468 (Abbildung 16A) ist eine deutliche Anreicherung des Produkts in den Antikörper-behandelten Proben zu erkennen, wohingegen Proben, die ohne Antikörper inkubiert wurden, ein schwaches Hintergrundsignal aufwiesen. Der signifikante Unterschied, der in den Signalstärken der PCR Produkte von MDAMB231 und MDAMB468 mit Antikörper zu beobachten ist, kann mehrere Ursachen haben: (a) die endogene mutp53-Expression in MDAMB231 ist höher als in MDAMB468 (vgl. Abbildung 5A), (b) die Methodik ist nicht gleichmäßig auf unterschiedliche Zelllinien übertragbar und daher weniger effektiv in einigen Zelllinien, (c) mutp53 aus MDAMB468 bindet RNA mit einer geringeren Affinität als mutp53 aus MDAMB231, (d) mutp53 aus MDAMB468 liegt zu einem geringeren Anteil im Komplex mit RNA vor als mutp53 aus MDAMB231.

Im Gegensatz zu den mutp53-exprimierenden Zelllinien wird wtp53 in nicht bestrahlten MCF7 Zellen basal exprimiert (siehe Abbildung 5B/6B). Infolge UV-C Bestrahlung werden wtp53-Proteine stabilisiert und folglich die p53-Konzentration in der Zelle erhöht. Ferner induziert die Strahlung eine Kreuzvernetzung von Proteinen mit Nukleinsäuren und Proteinen untereinander und scheint zu einer Erhöhung des unspezifischen Hintergrundsignals beizutragen, da bestrahlte Proben, denen der Antikörper während der Immunpräzipitation fehlte, trotzdem ein verhältnismäßig starkes Bandensignal aufwiesen (siehe Abbildung 16B). Da im Fall von bestrahlten MCF7 Zellen unter den gegebenen Umständen die Gefahr bestand, falsch-positive Proben zu analysieren, wurden diese von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

2.4.2 Genomische Verteilung der kodierenden Regionen der p53-gebundenen Transkripte

Die Klonierung und anschließende Sequenzierung der PCR Fragmente aus den RIP Experimenten ergab 45 Sequenzen für unbehandelten MCF7 Zellen, 75 Sequenzen für MDAMB468 Zellen und 68 Sequenzen für MDAMB231 Zellen (Liste der gebundenen Transkripte im Anhang A2). Wie auch schon für die ChIP-Seq DNA-Fragmente beschrieben, wurden die Sequenzen mit Hilfe des Online Algorithmus Human Blat Search, Version 2004, im Genom lokalisiert. In Abbildung 17 sind die Stellen auf den jeweiligen Chromosomen markiert, denen die Sequenzen der p53-gebundenen Transkripte zugeordnet werden konnten. Fünf der Sequenzen aus MDAMB468 und vier der Sequenzen aus MDAMB231 fehlen in dieser Darstellung, da sie Bereichen auf mitochondrialer DNA zugeordnet wurden. Vergleichbar mit den Ergebnissen aus den ChIP-Seq Experimenten waren auch die Loci der p53-gebundenen Transkripte über das gesamte Genom verteilt.

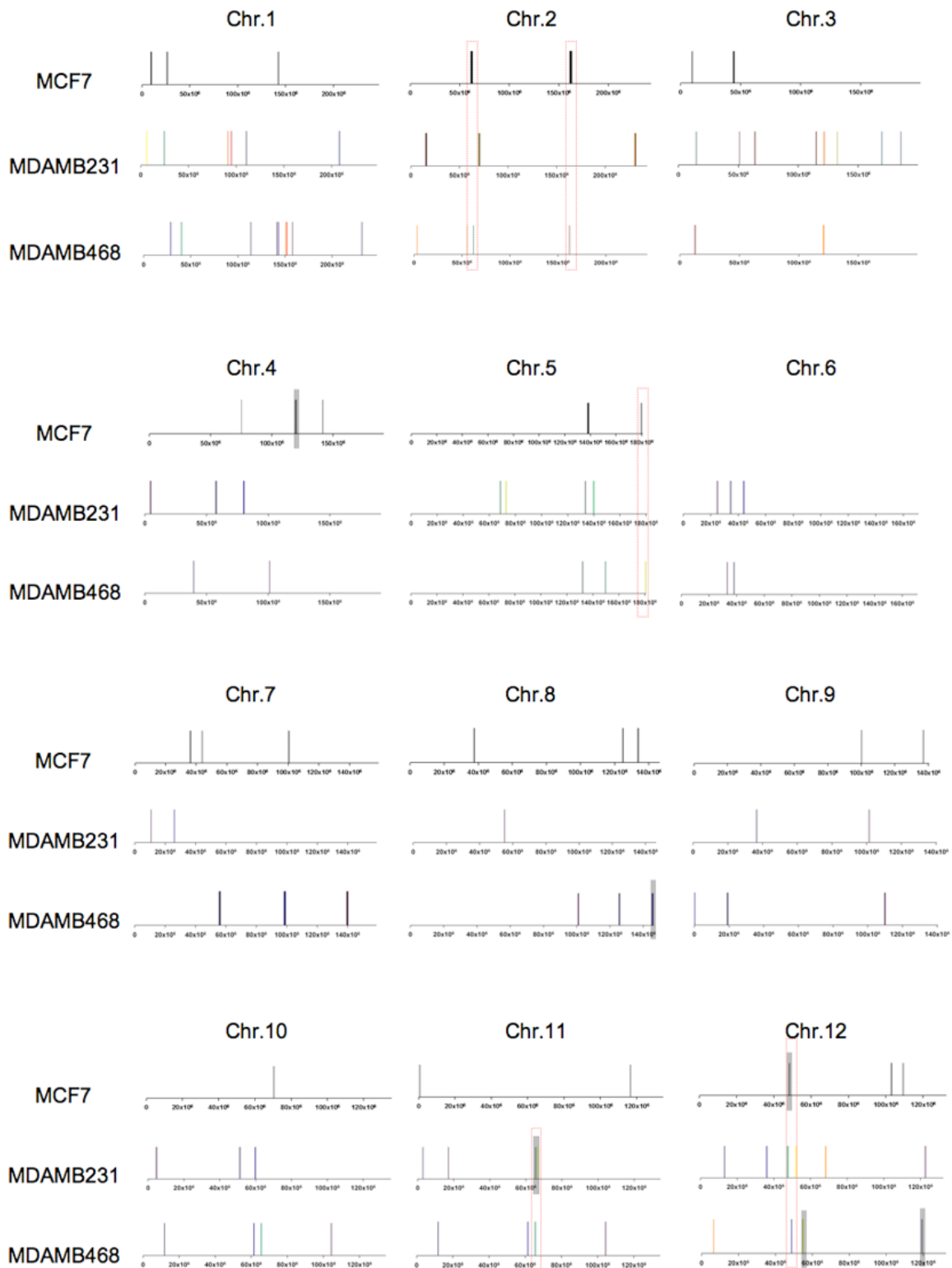


Abbildung 17 Genomische Lokalisation der kodierenden Bereiche der p53-gebundenen Transkripte

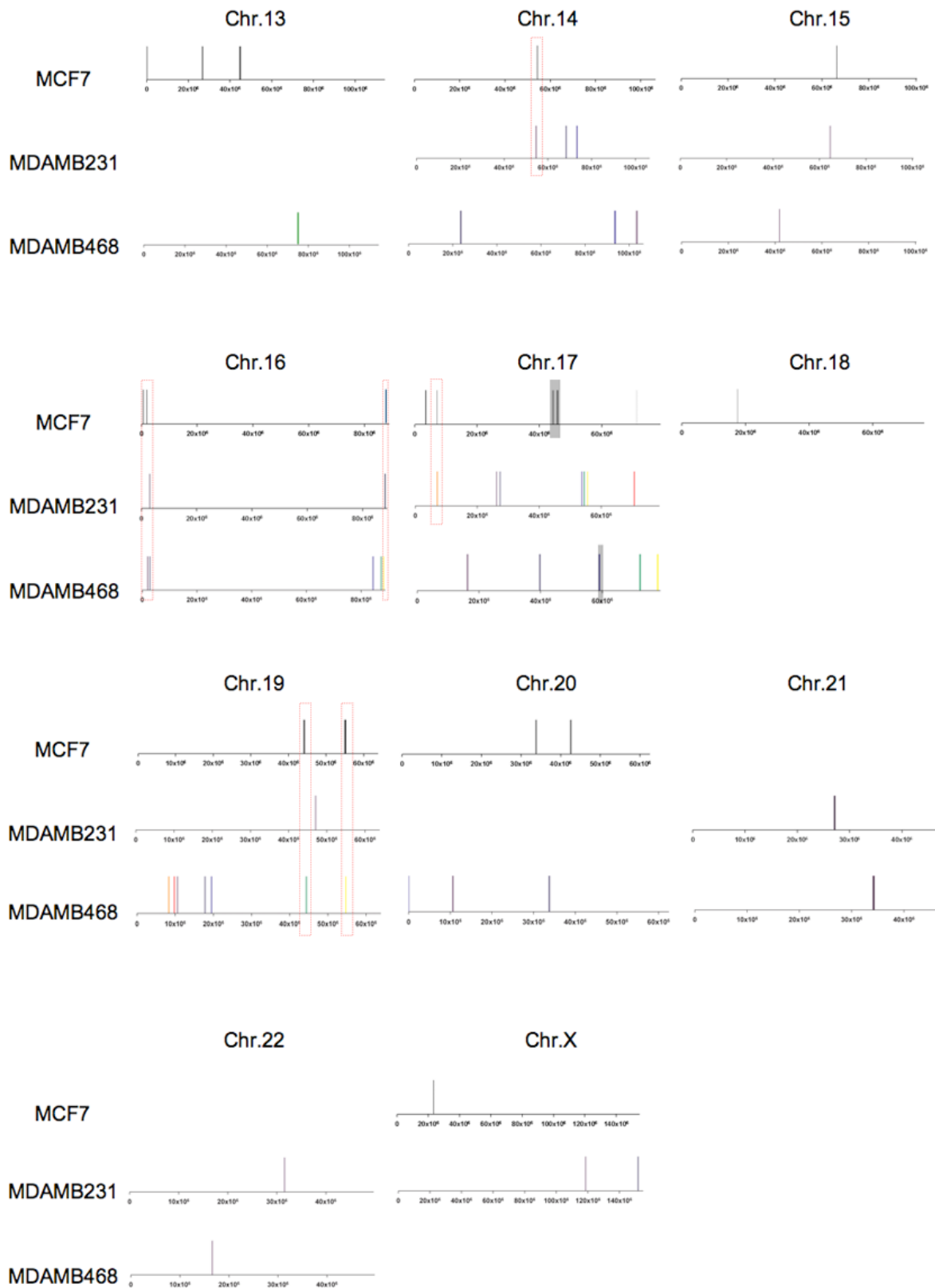


Abbildung 17 (Fortsetzung) Genomische Lokalisation der kodierenden Bereiche der p53-gebundenen Transkripte

Zur weiteren Analyse wurden Loci, die höchstens 500 kb umfassten und für mindestens zwei Transkripte kodierten als Cluster definiert. Anhand der Parameter konnten für MCF7 drei, für MDAMB468 vier und für MDAMB231 ein Cluster identifiziert werden und sind in Abbildung 17 grau unterlegt. Eine vergleichende Analyse der Transkript-Loci mit den gleichen Kriterien zwischen den drei Zelllinien ergab drei Cluster. Fünf Cluster wurden beim Vergleich von MCF7 mit MDAMB468, zwei Cluster beim Vergleich von MCF7 mit MDAMB231 und zwei Cluster wurden beim Vergleich von MDAMB231 mit MDAMB468 gefunden (gestrichelte rote Kästchen; Abbildung 17). Obwohl einige Cluster definiert werden konnten, waren diese aufgrund der geringen Anzahl im Vergleich zur Gesamtmenge der Transkripte statistisch nicht relevant. Um eine definitive Aussage zu treffen, ob die Transkripte geclustert auftreten, müsste der Probenumfang erweitert werden.

2.4.3 Sequenzeigenschaften der p53-gebundenen Transkripte

Die Sequenzen der klonierten Transkripte aus MCF7, MDAMB231 und MDAMB468 Zellen wurden mit dem CLUSTALW-Algorithmus und der Jalview-Software auf Konsensus-Sequenzen untersucht. Wie auch schon bei der voraus gegangenen Analyse der ChIP-Seq DNA-Fragmente, konnte in den aus den RIP Versuchen resultierenden Sequenzen keine signifikanten Übereinstimmungen in der Nukleotidfolge entziffert werden (Daten nicht gezeigt).

Eine Sequenz-Analyse der p53-gebundenen Transkripte ergab, dass lediglich 11 % der Transkripte aus MCF7, 17 % aus MDAMB468 und 10 % aus MDAMB231 Zellen den in Sequenzdatenbanken gespeicherten vollständigen Transkripten entsprach (siehe Abbildung 18A). Ein Teil der verkürzten Transkripte resultierte aus methodischen Gegebenheiten. So wurde zur cDNA Synthese ein Oligonukleotid (PICAP-CDS) eingesetzt, das an eine Folge aus drei Cytosine hybridisiert. Diese Pyrimidinfolge wird, wie im Flussdiagramm für RIP (Abbildung 15) gezeigt, durch die Reverse Transkriptase an die entstehende cDNA angehängt. Enthielt nun die mRNA intrinsische Cytosin-Folgen, war es durchaus möglich, dass der Primer an diese hybridisierte und es zur Synthese verkürzter cDNA kam. Einige unvollständige Transkripte konnten tatsächlich darauf zurückgeführt werden, die Mehrheit der Transkript-Fragmente jedoch resultierte aus anderen Mechanismen. So könnte alternatives Splicing oder alternative Promotoren zu verkürzten Transkripten geführt haben, die dann im Gegensatz zu den vollständigen Transkripten von p53-Proteinen gebunden wurden. Ferner ist

nicht vollständig auszuschließen, dass die RNA, trotz der Verwendung des RNase-Inhibitors *Ribonukleosid Vanadyl Komplex*, teilweise durch RNasen degradiert wurde.

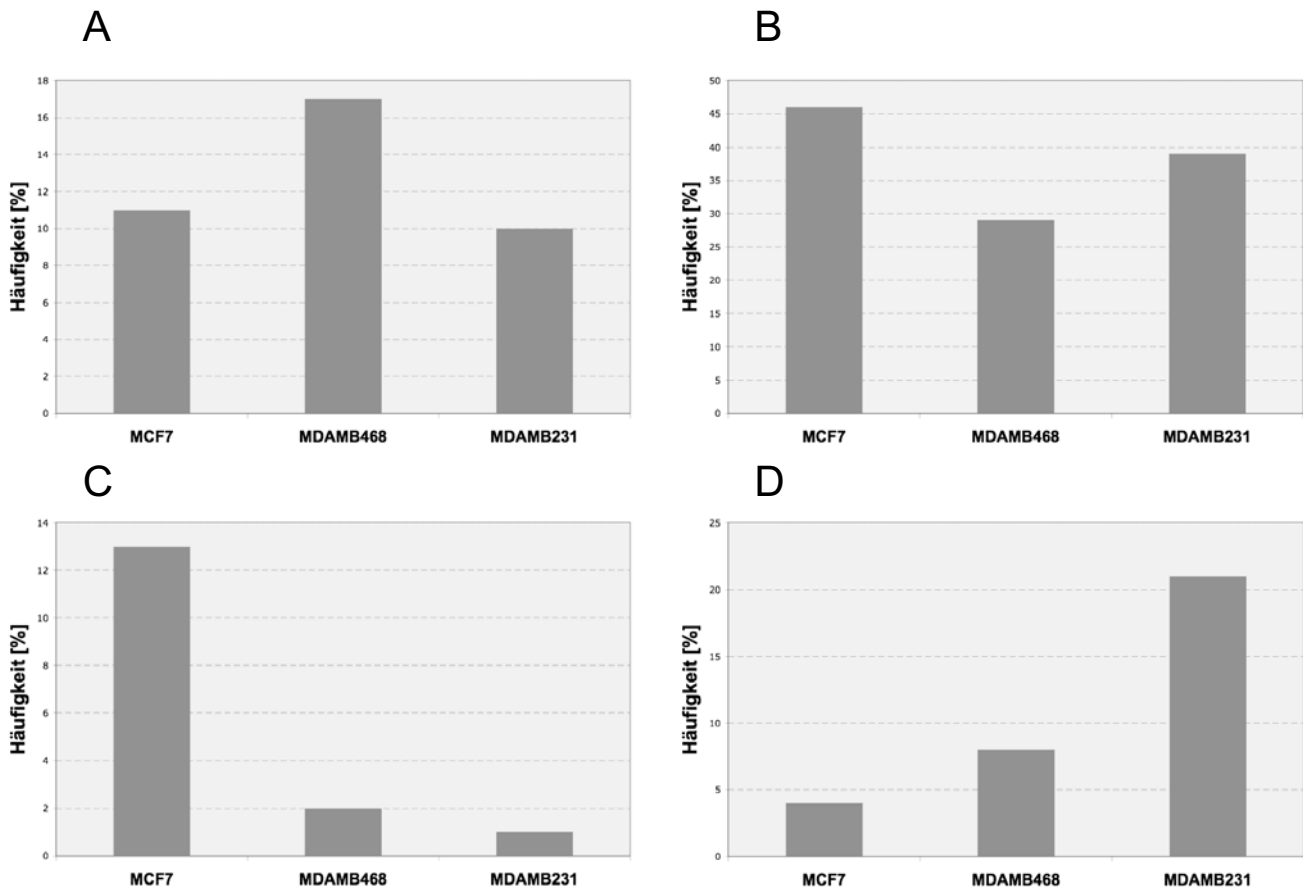


Abbildung 18 Kategorisierung der p53-gebundenen Transkripte anhand unterschiedlicher Sequenzeigenschaften

(A) Anteil der Transkripte, die einem Gentranskript voller Länge entsprechen. (B) Anteil der Transkripte, die exklusiv in der 3'UTR eines Gens detektiert wurden. (C) Anteil der exklusiv intronischen Transkripte. (D) Anteil der Transkripte, die repetitive DNA-Elemente tragen.

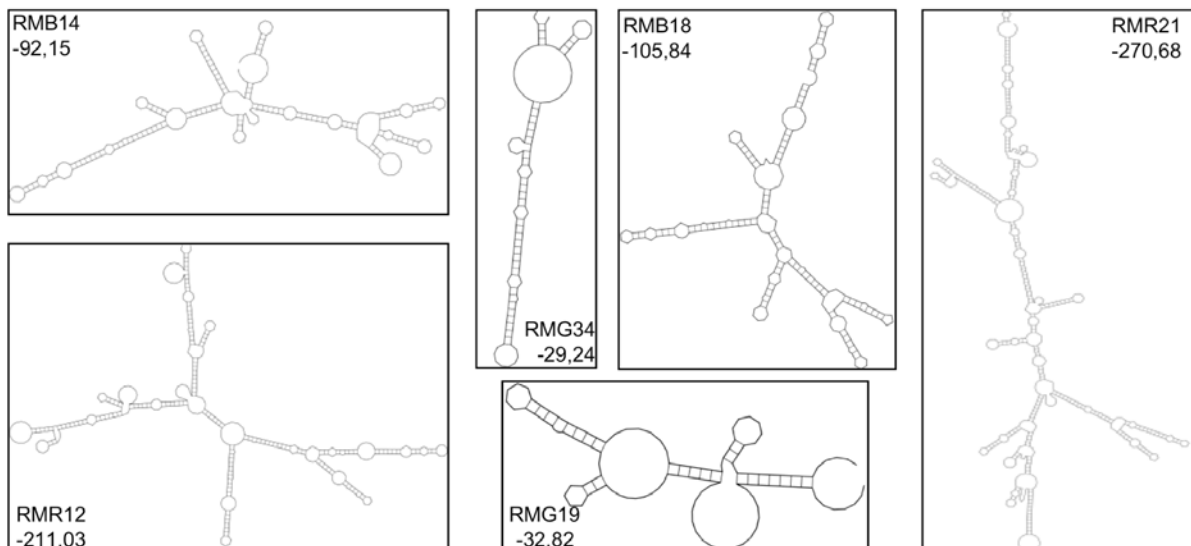
Tatsächlich wurden in allen drei Zelllinien Transkripte gefunden, die auf die Aktivität alternativer Promotoren oder auf alternatives Splicing zurück zu führen sind. Neben Transkripten, die Intronen zugeordnet werden konnten (Abbildung 18C), bestand eine Vielzahl der identifizierten Transkripten aus Sequenzen, die exklusiv der 3'UTR (*untranslated region*) von Volllänge-Transkripte zugeordnet werden konnten. Bei MCF7 Zellen machten die 3'UTR-Transkripte 46 %, bei MDAMB468 29 % und bei MDAMB231 39 % der p53-gebundenen Transkripte aus (Abbildung 18B). Eine signifikante Anreicherung von repetitiven DNA Elementen, wie für die Bindestellen aus ChIP-Seq Experimenten beobachtet wurde, konnte hier lediglich für MDAMB231 bestätigt werden (siehe Abbildung 18D). Der Anteil der Transkripte, die repetitive Elemente enthalten, betrug hier 21 %.

2.4.4 Strukturelle Analyse der p53-gebundenen Transkripte

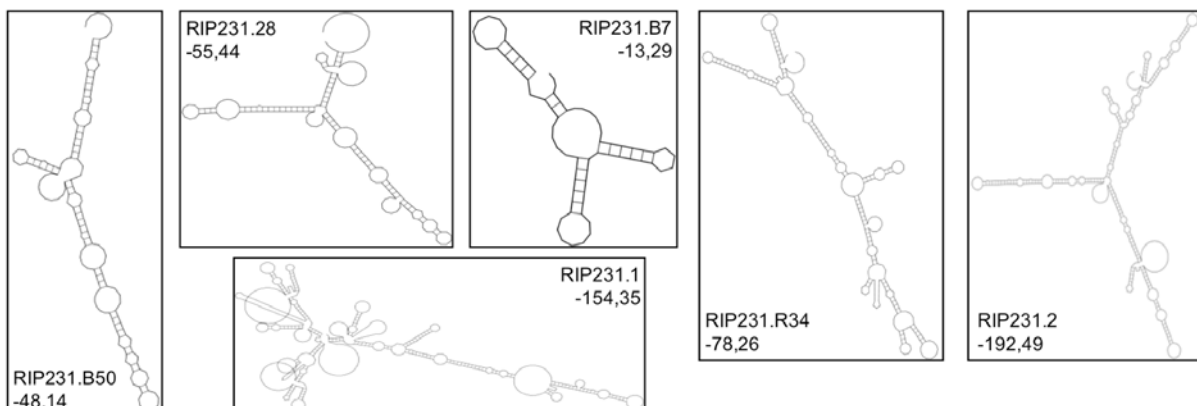
Da RNA primär als einzelsträngiges Molekül gebildet wird, können komplementäre Abschnitte durch Wasserstoffbrückenbindungen intramolekulare Doppelstränge ausbilden, was zu Sekundärstrukturen wie *hairpin loops*, *stem loops*, *bulges* und *pseudoknots* führen kann.

Zur exemplarischen Darstellung der Sekundärstrukturen wurden von jeder Zelllinie sechs zufällig ausgewählte Transkriptsequenzen mit Hilfe des Online-Programmes *Vienna RNA Package 1.6.5* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) gefaltet. In Abbildung 19 sind die Strukturen mit der geringsten freien Enthalpie [kcal/mol] dargestellt.

MCF7



MDAMB231



MDAMB468

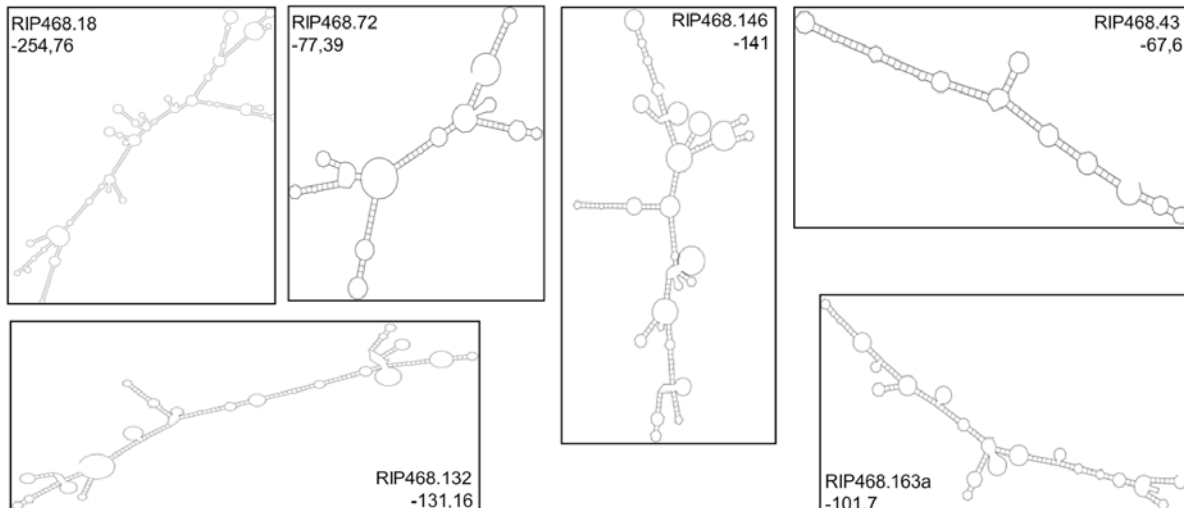


Abbildung 19 Exemplarische Darstellung der vorhergesagten Sekundärstrukturen der p53-gebundenen Transkripte

2.4.5 Identifizierung der kodierenden Bereiche der p53-gebundenen Transkripte

Die Transkript-kodierenden Regionen im Genom wurden mit Hilfe des Online Programms *Human Blat Search*, Version 2004, (vgl. Abschnitt 2.2.4) identifiziert. Die Mehrheit der Transkript-Sequenzen konnte damit in Gen-Bereichen lokalisiert werden (Transkript-Liste im Anhang A2). Lediglich elf von 75 Sequenzen aus MDAMB468 konnten keiner Gen-kodierenden Region zugeordnet werden. Vier dieser Sequenzen lagen in stark repetitiven Bereichen (3x *Alu* SINEs und 1x LTR) und fünf der Sequenzen waren auf mitochondrialer DNA kodiert. In MDAMB231 konnten insgesamt 13 der 69 Transkript-Sequenzen keinem annotierten Gen zugeordnet werden, wovon sieben Sequenzen in repetitiver DNA (2x *Alu* SINEs, 2x *MIR* SINEs, 3x *L1* LINEs) und vier in mitochondrialer DNA lagen. Von den 45 Transkripten, die im Komplex mit wtp53 aus MCF7 identifiziert wurden, lagen nur fünf der kodierenden Sequenzen in intergenischen Bereiche. Daraus ließ sich schließen, dass sowohl mutp53 als auch wtp53 präferentiell mit Transkripten komplexiert, die aus Gen-kodierenden Bereichen stammen, wobei aber eher trunkierte Transkripte bzw. 3'UTR Transkripte als Volllänge-Transkripte von p53 gebunden wurden (vgl. Abschnitt 2.4.3).

Interessanterweise lassen sich die meisten der wtp53- und mutp53-gebundenen Transkripte in funktionelle Gruppen einteilen, wie in Tabelle 2 dargestellt ist. Diese Einteilung stimmt weitgehend bei allen Zelllinien überein, wobei die Gruppe *mitochondriale Atmungskette*

ausschließlich durch Transkripte aus MDAMB231 bzw. MDAMB468 Zellen vertreten wird. Das Fehlen von wtp53-gebundenen Transkripten in dieser Gruppe könnte ein Hinweis sein, dass die Interaktion mit mitochondrialen Transkripten ein GOF der mutierten p53-Proteine darstellt. Zur Bestätigung der Aussage müsste in weiteren Experimenten der Probenumfang erhöht werden.

Neben der Gruppe *mitochondriale Atmungskette* wurde auch die Gruppe *Gen-Expression* in mehrere funktionelle Untergruppen gegliedert. Auffällig ist, dass in RIP Experimenten aller drei Zelllinien häufig ribosomale Transkripte (in Tabelle 2 *Ribosom-Komponenten*) präzipitiert werden konnten.

Neben der Zelllinien-übergreifenden Kategorisierung in Tabelle 2 konnte für MDAMB231 eine zusätzliche Gruppe definiert werden. In dieser Gruppe wurden Transkripte der Gene *FSTL1*, *ZNF185* und *NEK11* zusammengefasst. Diese Gene kodieren für Proteine, die eine mögliche Rolle bei der Zellproliferation bzw. Zellzykluskontrolle spielen. Darüber hinaus wurde ein Transkript des *SRA1* (*steroid receptor RNA activator 1*) Gens identifiziert. *SRA1* kodiert für eine Protein-kodierende mRNA und eine funktionelle nicht-kodierende RNA (ncRNA), die als transkriptioneller Coaktivator fungiert (Chooniedass-Kothari et al., 2004; Lanz et al., 1999). Die Expression des Proteins und der RNA korreliert mit der Tumorgenese in Uterus, Ovarium und Brust. Analysen der Kernsequenz der nicht-kodierenden RNA enthüllten mehrere Substrukturen, die essentiell für die Coaktivierung sind und anhand ihrer Sekundärstrukturen eine Rolle in der Interaktion mit Proteinen implizieren (Lanz et al., 2002). Welches der beiden *SRA1*-Transkripte von mutp53 aus MDAMB231 Zellen gebunden wird, konnte anhand der RIP Experimente nicht festgestellt werden.

Funktionelle Gruppe	Transkript	Zelllinie
mitochondriale Atmungskette:		
<i>Cytochrom C Oxidase Familie</i>	X15759 (mtDNA) COX17, COX4I1, COX6C	MDAMB231 MDAMB468
<i>NADH:Ubiquinon Oxidoreduktase</i>	NDUFA4 NDUFA13, NDUFB2, NDUFB9, UQCRCQ MTND5 (mtDNA)	MDAMB231 MDAMB468 MDAMB231
<i>mitochondriale ATP Synthase UE</i>	ATP5J2, ATPO	MDAMB468
Gen-Expression:		
<i>Chromatin Organisation</i>	BANF1, H2AFZ HMGN2	MDAMB468 MCF7
<i>Transkription</i>	PHF20L1 TCEB2 BTF3, TFAM (mitochond), SRA1, SUZ12, POLR2B	MCF7 MDAMB468 MDAMB231
<i>Nukleolare Proteine</i>	RBM34 HNRPA2B1 SNRPD1	MDAMB468 MDAMB231 MCF7
<i>RNA Metabolismus</i>	DDX24, RBM8A, SFRS2 DDX1, SUOPT4H1, PCBP, EIF2C3, MELK CR620487, CNOT6	MDAMB468 MDAMB231 MCF7
<i>Ribosom-Komponenten</i>	RPL13 RPS7 RPL8, RPL18A, RPL32, RPL41, RPS11, RPS14, RPS27, RPS27A, RPS28 RPL22, RPS10, RPS13, RPS19 MRPL27(mitochond.), RPL21 RPS2 (OK/KNS-cl.6)	MDAMB231 MCF7 MDAMB468 MDAMB231 MDAMB468 MDAMB231 MCF7 MDAMB468 MCF7
<i>Chaperon-Komponenten</i>	CCT4 CCT6A CCT2, NAP1L4 (Histon- Chaperon)	MDAMB468 MCF7 MDAMB468 MDAMB231
<i>Proteasomale Degradation</i>	PSMC5, PSMD14, PSME1, USP47 PSMD2, UBE2A UBE2Z, FBX027	MDAMB468 MDAMB231 MCF7
<i>intrazell. Transport/ Cytoskelett</i>	CFL1, ROHD, CNN3 DYNLL1, PAK4 ARPC3, ARPC4, TPT1	MDAMB231 MDAMB468 MCF7
<i>Signaltransduktion</i>	GNB2L1 MAP2k1, RGS20 TANK, PRDX4	MDAMB468 MDAMB231 MCF7
<i>Apoptose</i>	CASP1, BID SAP30BP, TEGT TNFRSF12A	MDAMB468 MCF7 MDAMB231

Tabelle 2 Funktionelle Gruppen der mutp53 und wtp53-gebundenen Transkripte der Zelllinien MDAMB231, MDAMB468 und MCF7

Die RIP Experimente in MCF7, MDAMB231 und MDAMB468 Zellen legten nahe, dass wtp53 und mutp53 mit Gen-Transkripten assoziieren, wobei die meisten der Transkripte in trunkierter Form gebunden wurden. Die genetische Charakterisierung der kodierenden Bereiche ergab eine Kategorisierung der Transkripte in funktionelle Gruppen, von denen die Gruppe der ribosomalen Proteine am zahlreichsten war. Inwiefern diese Interaktion von mutp53 oder wtp53 mit den jeweiligen Transkripten zur posttranskriptionellen Regulation beiträgt, konnte mit den bisherigen Experimenten nicht geklärt werden.

2.4.6 Analyse der *in vivo* Interaktion von p53 mit seiner eigenen mRNA

Mit Hilfe der RIP Experimente konnte in den untersuchten Zelllinien gezeigt werden, dass p53-Proteine tatsächlich mit RNA *in vivo* assoziieren und sich die Mehrheit der Transkripte anhand der kodierenden Bereiche in funktionelle Gruppen einteilen ließ.

Vorarbeiten unserer Gruppe im Maus-System haben gezeigt, dass *in vitro* murines wtp53 die eigene mRNA bindet und in einem negativen Rückkopplungsmechanismus seine Biosynthese autoreguliert (Mosner et al., 1995). Für murines mutp53 aus MethA Zellen konnte diese Interaktion und die daraus resultierende biologische Funktion nicht nachgewiesen werden.

In RIP Experimenten wurde die Gesamtheit der p53-gebundenen Transkripte unspezifisch amplifiziert und bis dato konnte mit dieser Methode eine Interaktion des p53-Proteins mit seiner eigenen mRNA nicht nachgewiesen werden. Mittels Amplifikation der RIP Probe durch spezifische Primer sollte nun die Frage geklärt werden, ob in den untersuchten Zelllinien p53 im Komplex mit seiner eigenen mRNA vorliegt. Da in vorangegangenen Experimenten die Expression der Volllänge-Transkripte in allen Zelllinien verifiziert werden konnte (siehe Abschnitt 2.1.1 bzw. Abbildung 6A), wurden trunkierte Transkripte in diesem Versuch nicht berücksichtigt. Als Kontrolle wurde das *housekeeping* Gen Aktin gewählt, für das eine Interaktion mit aktiviertem wtp53 auf Proteinebene beschrieben wurde (Katsumoto et al., 1995; Okorokov et al., 2002).

Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse der spezifischen Amplifikationen der Proben aus RIP Experimenten mit MCF7 Zellen. Die Auftrennung der PCR Produkte im Agarosegel zeigte Banden für p53 und Aktin in den erwarteten Größen. Die Signalstärken in den UV-C bestrahlten Proben waren sowohl mit Antikörper als auch ohne Antikörper deutlich erhöht, was erneut darauf schließen lässt, dass die Bestrahlung zur Bildung von falsch-positiven Hintergrundsignalen führt (vgl. Abschnitt 2.4.1).

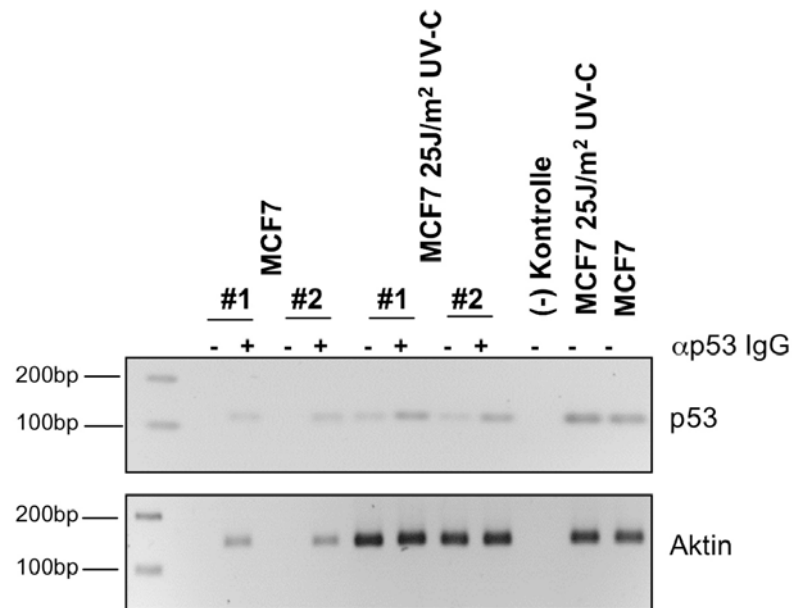


Abbildung 20 Spezifische Amplifikation p53-gebundener p53 mRNA aus MCF7 Zellen

P53-gebundene Transkripte wurden, wie vorhergehend beschrieben, isoliert, in cDNA umgeschrieben und in der spezifischen Amplifikation eingesetzt. Dargestellt ist die analytische Auftrennung der Hälfte des PCR-Ansatzes in einem 2 % Agarosegel. Die p53-Transkripte wurden mit dem Primerpaar TP53_Q1/Q2 (118 bp Produkt) und die Aktin-Transkripte mit dem Primerpaar hs-ACTB-A/B (140 bp Produkt) über PCR nachgewiesen. Als Positivkontrolle wurden 100 ng Gesamt RNA aus MCF7 Zellen eingesetzt. Die Behandlung der Zellen mit 25J/m² UV-C erfolgte 4h vor der RNA Isolation. (+) und (-) markieren die An- bzw Abwesenheit des polyklonalen Antikörper gegen p53 (FL-393) in der Immunpräzipitation. Dargestellt sind jeweils zwei unabhängige Versuche.

Im Gegensatz zu den RIP Experimenten in MCF7 Zellen, konnten bei der Untersuchung der RIP Transkripte aus MDAMB231 bzw. MDAMB468 Zellen keine p53 mRNA über PCR nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auch zusätzliche Primerkombinationen, die in Regionen der 3'UTR hybridisierten, ergaben keine PCR Produkte (Daten nicht gezeigt). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Interaktion von p53 mit seiner eigenen mRNA eine Eigenschaft des Wildtyp-Proteins ist.

2.4.7 Wtp53-gebundene Transkripte von klassischen Zielgenen

Eine wichtige biologische Funktion des intakten Tumorsuppressors p53 ist die eines Transaktivators. Infolge verschiedener Stress-Stimuli bindet wtp53 an Promotoren unterschiedlicher Gene und transaktiviert deren Transkription. Diese modulierte Genexpression führt zur Arretierung des Zellzyklus, DNA Reparatur oder Apoptose.

Klassische Zielgene, für die eine transkriptionelle Regulation durch wtp53 beschrieben wurde, sind *p21^{Waf1/Cip1}*, *Mdm2* und *GADD45*. In der Arbeit von Mosner *et al.* und in der

vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass wtp53 im nicht aktivierten Status an seine eigene mRNA bindet. Eine Erklärung hierfür war, dass die Bindung mit dem p53-Protein zu einem mRNA-Reservoir führt, aus dem infolge zellulären Stresses schnell p53-Proteine translatiert werden können. Andererseits trägt diese Interaktion zur fein abgestimmten Expressionsregulation von p53 bei.

Im Folgenden sollte nun anhand der genannten Zielgene geklärt werden, ob wtp53 im nicht aktivierten Zustand auch an mRNA von p53-regulierten Genen bindet. Hierfür wurden jeweils zwei unabhängige RIP Proben mit spezifischen Primern amplifiziert. In Abbildung 21 ist die elektrophoretische Auftrennung der PCR Proben dargestellt. Eine spezifische Amplifikation von *GADD45* Transkripten (Daten nicht gezeigt) konnte mit dieser Methode nicht detektiert werden. Es war jedoch möglich, eine Interaktion von wtp53-Proteinen mit Transkripten von *p21^{Waf1/Cip1}* und *Mdm2* nachzuweisen. Da in nicht aktivierten MCF7 Zellen wtp53 in geringen Mengen exprimiert wird, ist nicht auszuschließen, dass auch die Promotoren der Zielgene aktiviert werden. Womöglich trägt die Assoziation von wtp53 mit der mRNA dazu bei, eine Expression von basal aktivierten Genen zu verhindern.

In diesem Versuch wurde zur Verbesserung der Methode in einigen RIP Negativproben unspezifisches IgG aus Ziege während der Immunpräzipitation eingesetzt (RIP Probe #1 Abbildung 21). Tatsächlich erhöhte der Antikörper das Hintergrundsignal im Vergleich zu der Negativprobe aus dem Versuch #2, was ihn für weitere RIP Experimente disqualifizierte.

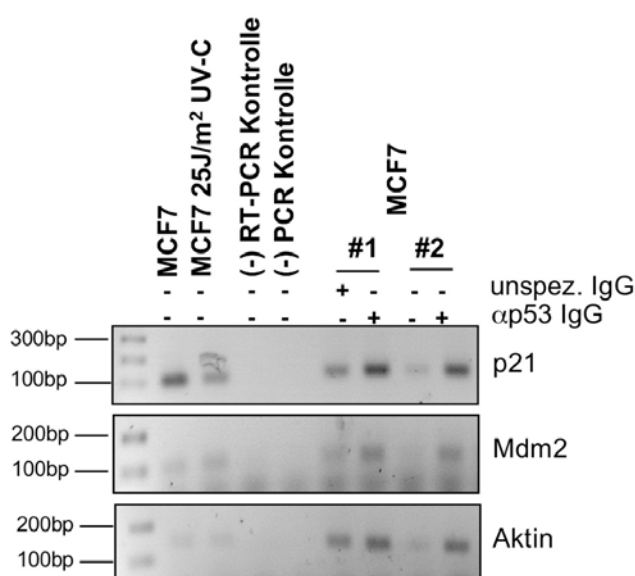


Abbildung 21 Spezifische Amplifikation von Transkripten der Zielgene *p21^{Waf1/Cip1}* und *Mdm2* aus RIP Experimenten in MCF7 Zellen

Isolierung und cDNA Synthese erfolgte wie vorher beschrieben. Die analytische Auftrennung der Hälfte des PCR-Ansatzes erfolgte in einem 2 % Agarosegel. Transkripte für *p21* wurden mit dem Primerpaar hCDKNA1_Q1/Q2, für *Mdm2* mit dem Primerpaar hMDM2_Q1/Q2 und für *beta-Aktin* mit dem Primerpaar hs-ACTB-A/B nachgewiesen. Als Positivkontrolle wurden 100 ng Gesamt RNA aus MCF7 Zellen eingesetzt. Die Behandlung der Zellen mit 25 J/m² UV-C erfolgte 4 h vor der RNA Isolation. (+) und (-) markieren die An- bzw. Abwesenheit des polyklonalen p53 Antikörpers (FL 393) bzw. des unspezifischen IgG aus Ziege in der Immunpräzipitation. Dargestellt sind jeweils zwei unabhängige Versuche.

2.5 Gegenüberstellung der genomischen Lokalisation der mutp53 DNA Bindestellen und der kodierenden Bereiche der mutp53-gebundenen Transkripte

Die Daten der ChIP-Seq Experimente aus Abschnitt 2.2 und die der RIP Experimente aus Abschnitt 2.4 verdeutlichen, dass p53 neben der Interaktion mit DNA ebenfalls funktionelle Komplexe mit RNA eingeht. Eine chromosomale Zuordnung der potentiellen DNA-Bindestellen aus ChIP-Seq Experimenten ergab, dass sich eine Vielzahl der Sequenzen in bestimmten Loci (Cluster) konzentrierte (siehe Abbildung 12). Nur ein geringer Teil der kodierenden Bereiche der p53-gebundenen Transkripte war jedoch in *cluster* organisiert (siehe Abbildung 17). Es stellte sich nun die Frage, ob es wiederum Korrelationen in der genomischen Lokalisation der Sequenzen aus ChIP-Seq und RIP Experimenten gibt. Hierzu wurden die Ergebnisse aus Abbildung 12 und Abbildung 17 in einer vergleichenden Darstellung zusammengefasst. In Abbildung 22 sind die Sequenz-Lokalisationen aus Experimenten mit MDAMB231 Zellen dargestellt. Mit rot-gestrichelten Kästchen sind mindestens zwei Sequenzen markiert, die Experiment-übergreifend in einem Bereich von höchstens 1 Mb auseinander liegen (ChIP/RIP Cluster). Zwölf dieser definierten Cluster sind in der Abbildung dargestellt. In Abbildung 23, in der die Zusammenfassung der Ergebnisse aus ChIP-Seq und RIP Experimenten in MDAMB468 Zellen gezeigt ist, wurde gemäß den Parametern nur drei dieser Cluster gefunden.

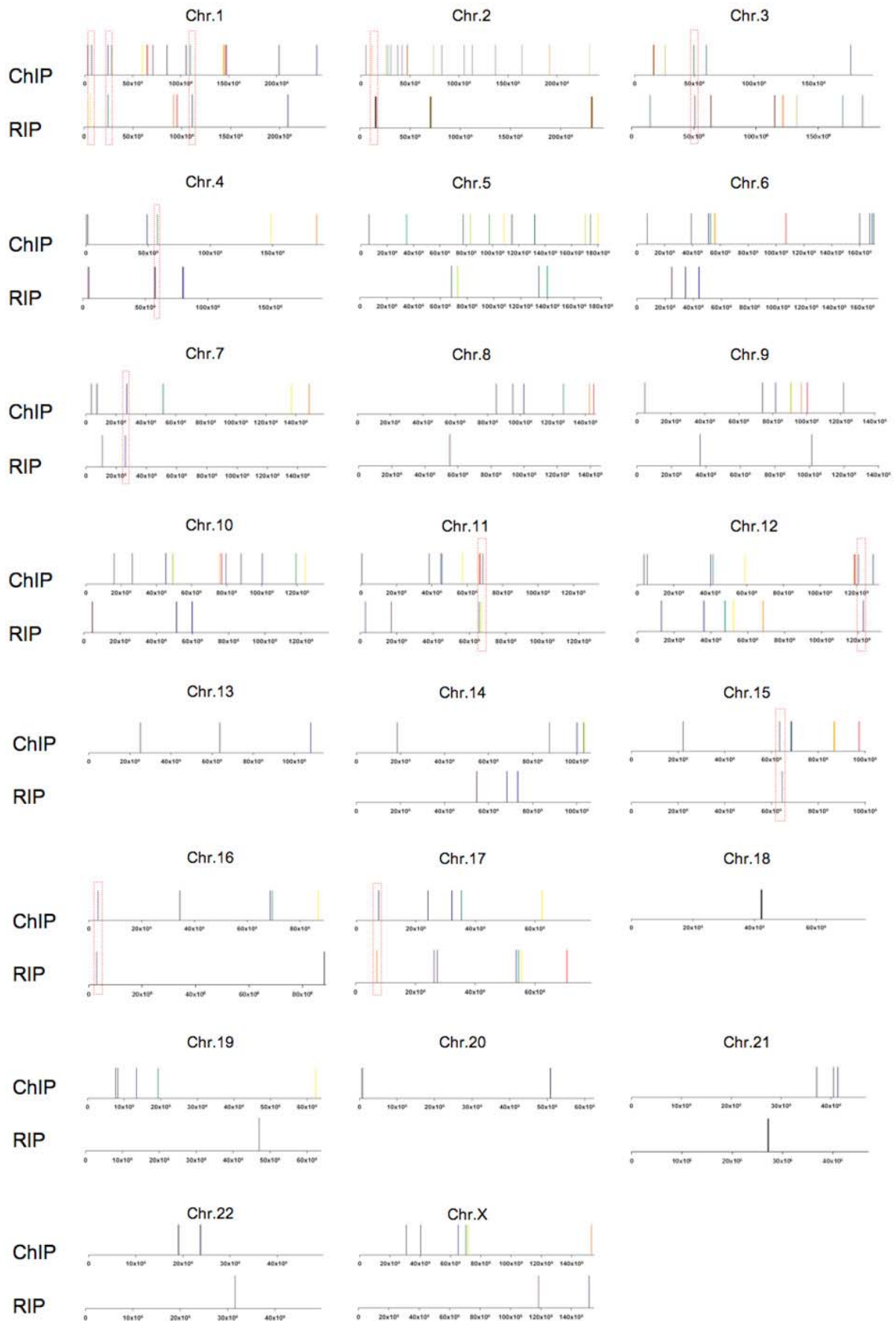


Abbildung 22 Darstellung korrelierender Loci von DNA Bindestellen (ChIP-Seq) und Transkriptkodierende Bereiche (RIP) im Genom von MDAMB231 Zellen

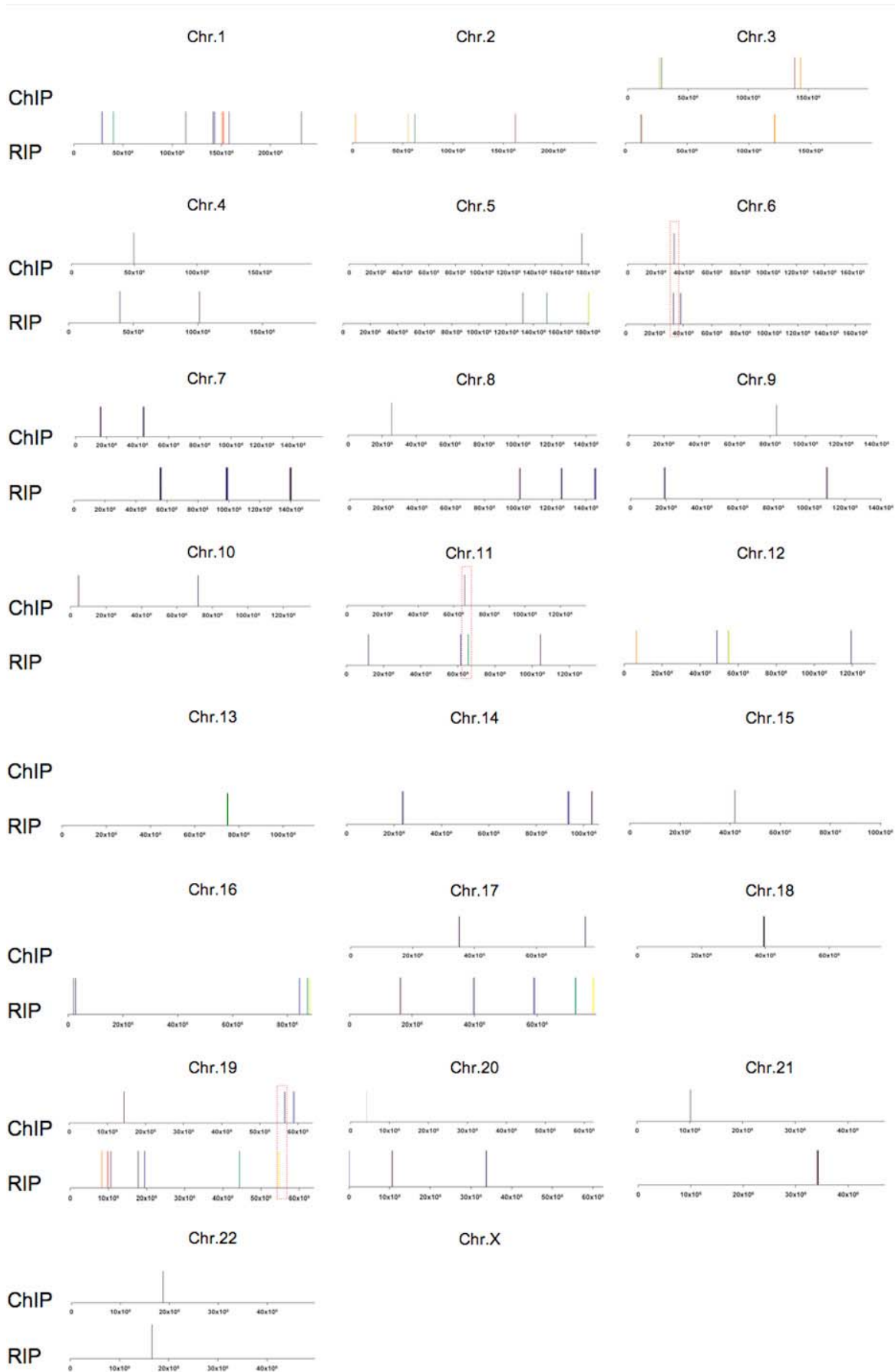


Abbildung 23 Darstellung korrelierender Loci von DNA Bindestellen (ChIP-Seq) und Transkript-kodierende Bereiche (RIP) im Genom von MDAMB468 Zellen

2.6 Abschalten der Expression des *TP53* Gens (*gene silencing*) durch RNA Interferenz

Die bisherigen Versuche weisen darauf hin, dass mutp53 aus MDAMB231 und MDAMB468 Zellen einerseits die Fähigkeit zur DNA Bindung besitzt, aber auch Interaktionen mit RNA eingeht. Die Lokalisations- und Struktur-Analysen der p53-gebundenen Sequenzen deuten darauf hin, dass die Interaktion von p53 mit den DNA Bindestellen und den Transkripten durch funktionelle und strukturelle Faktoren bestimmt wird. Darüber hinaus impliziert die mögliche Kategorisierung der p53-gebundenen Transkripte in funktionelle Gruppen einen biologischen Mechanismus in der Interaktion. Eine adäquate Methode zur genaueren Untersuchung und Charakterisierung der biologischen Funktion von endogen exprimiertem mutp53 ist das Abschalten der Genexpression durch RNA Interferenz (RNAi). Durch die Analyse des zellulären Expressionsmusters nach dem *knock down* des Gens kann direkt auf die Funktion von mutp53 in der Tumorzelle geschlossen werden und ein möglicher *gain of function* beschrieben werden.

Es wird angenommen, dass sich die zelluläre RNAi als eine Form der angeborenen Immunantwort gegenüber RNA-Viren entwickelt hat. Das zentrale Element der RNAi ist ein 20-25 nt langes ssRNA-Molekül (*siRNA*, *small interfering RNA*), das vollständig komplementär zu der kodierenden Region der mRNA des Zielgens ist. Die siRNA wird aus dsRNA Vorläufermolekülen durch die zelluläre Ribonuklease *Dicer* generiert. Die katalytische Funktionseinheit, welche die siRNA prozessiert und die Degradierung der komplementären mRNA durchführt, wird als RISC (*RNA-induced silencing complex*) bezeichnet. Ein essentieller Bestandteil des RISC-Multiproteinkomplexes ist die katalytisch aktive RNase Argonaut 2, da sie die Ziel-mRNA endonukleolytisch spaltet.

Die dsRNA Vorläufermoleküle können entweder direkt als „nackte“ Moleküle oder als *small hairpin RNA* (*shRNA*) in einem Expressionsvektor verpackt in die Zelle transfiziert werden.

2.6.1 Versuch zur Generierung eines stabilen *mup53 knock downs* in MDAMB231 und MDAMB468 Zellen

Zur Abschaltung der endogenen *mup53*-Expression wurde eine etablierte Sequenz gewählt und mit dem Originalkonstrukt (pSuper.p53) in MDAMB231 und MDAMB468 Zellen getestet (Brummelkamp et al., 2002). Hierzu wurde der Vektor mittels Elektroporation in die Zellen transfiziert und nach 24 Stunden die Verminderung der *mup53*-Expression in der indirekten Immunfluoreszenz bestätigt. In Abbildung 25 sind repräsentative Ausschnitte der mikroskopischen Präparate dargestellt.

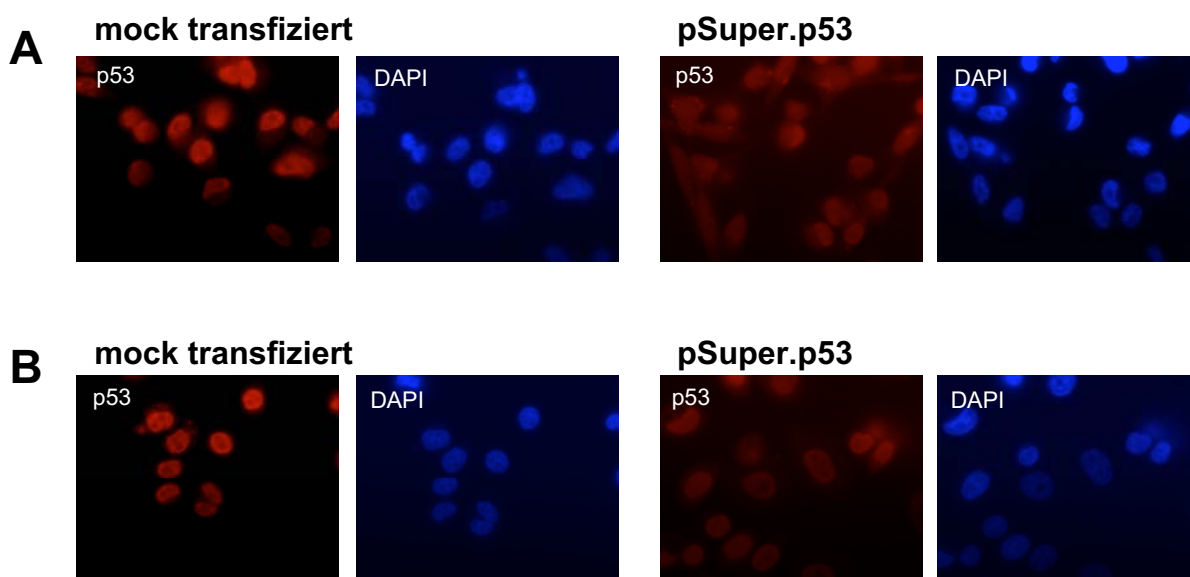


Abbildung 25 Transfektion von MDAMB231 und MDAMB468 mit pSuper.p53

1×10^6 Zellen wurden entweder ohne Vektor (links) oder mit $2 \mu\text{g}$ pSuper.p53 (rechts) transfiziert und auf Deckgläschen ausplattiert. 24 h später wurden die Zellen mit 4 % Formaldehyd fixiert und für die Immunfluoreszenz vorbereitet. P53 (rot) wurde mit polyklonalen IgG aus Ziege (FL-393) markiert und über einen Alexa 488-gekoppelten Zweitantikörper detektiert. Chromatin wurde mit DAPI (blau) angefärbt. (A) MDAMB231 (B) MDAMB468

Nachdem die Funktionalität der shRNA in MDAMB231 und MDAMB468 Zellen verifiziert wurde, sollten durch die Koftransfektion mit einem Selektionsplasmid und anschließender Antibiotika-Selektion stabile Transfektanten hergestellt werden. Jedoch überlebten die Zellen den Selektionsprozeß nicht (Daten nicht gezeigt). Als Grund hierfür wurde eine unzureichende Transfektionseffizienz des Selektionsplasmids angenommen. Um diesen Effekt zu umgehen, wurde die shRNA-Sequenz in ein anderes Vektorsystem (pENTR/H1/TO, siehe Anhang A4) kloniert, welches für den Selektionsmarker *Zeocinresistenz* kodiert. Der Vektor pENTR/H1/TO wird von der Firma Invitrogen linearisiert ausgeliefert. Folglich

musste der Vektor für die Amplifizierung in Bakterienzellen durch den Einbau eines *Linkers* (Linker2-A/B), der die Restriktionsschnittstellen für *BfuAI* und *BsaI* enthält, zirkularisiert werden (pENTRL2-A/B). Zur Klonierung der shRNA wurde der *Linker* mit Hilfe dieser Restriktionsenzyme wieder herausgeschnitten. Als Negativkontrolle wurde eine Sequenz mit gleicher Nukleotidzusammensetzung, aber willkürlichen Nukleotidabfolge mit Hilfe eines Online-Algorithmus (*siRNA Wizard* v2.6; <http://www.sirnawizard.com/scrambled.php>) generiert und ebenfalls in den Vektor kloniert. Die aus den Klonierungen hervorgegangenen Vektoren pENTRBr bzw. pENTRscr wurden in MDAMB231 und MDAMB468 Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden wurde mit der Selektion begonnen. Interessanterweise konnten nur für transfizierte MDAMB231 Zellen stabile Klone gewonnen werden, von denen fünf weiter subkultiviert wurden. Selektierte Zellklone aus der Linie MDAMB468 adherierten nach dem Umsetzen nicht mehr und starben ab. Dieses Phänomen könnte darauf hindeuten, dass mutp53 in Zellen der Linie MDAMB468 einen essentiellen Faktor für das Überleben der Tumorzelle darstellt.

Die stabilen Transfektanten der MDAMB231 Zelllinie (im Folgenden als 231pENTRBr bzw. 231pENTRscr bezeichnet) wurden auf verschiedene Aspekte hin analysiert: (a) Einbau der shRNA-Expressionskassette in das Genom, (b) korrekte Expression und Prozessierung der shRNA Moleküle und (c) Verringerung der mutp53-Expression. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 26 dargestellt. Es konnte ein Einbau der *scrambled* Expressionskassette für einige Klone eindeutig nachgewiesen werden, wohingegen das Vorhandensein der p53-shRNA Expressionskassette in der genomischen DNA nicht eindeutig detektiert werden konnte (Abbildung 26A). Auch die Expression des shRNA-Transkripts (erwartete Produktgröße: 48 nt) konnte nicht detektiert werden. Das PCR Produkt bei ca. 60 nt resultierte wohl eher aus unspezifischen Primerdimeren, da es auch in der Negativkontrolle sichtbar war (Abbildung 26B). Eine zusätzliche Überprüfung der mutp53-Transkription in den stabil transfizierten Zellen bestätigte diese Beobachtungen. Bei keinem der untersuchten 231pENTRBr-Zellklone konnte eine Reduktion der mutp53-Transkripte nachgewiesen werden (Abbildung 26C).

Obwohl aus dem Selektionsprozess resistente 231pENTRBr Zellen hervorgegangen waren, konnte kein mutp53 *knock down* in den Zellen erreicht werden. Die Ergebnisse der letzten Versuche implizieren einen fehlerhaften Einbau der Expressionskassette in das Genom und/oder die Verhinderung der shRNA Transkription in MDAMB231 Zellen.

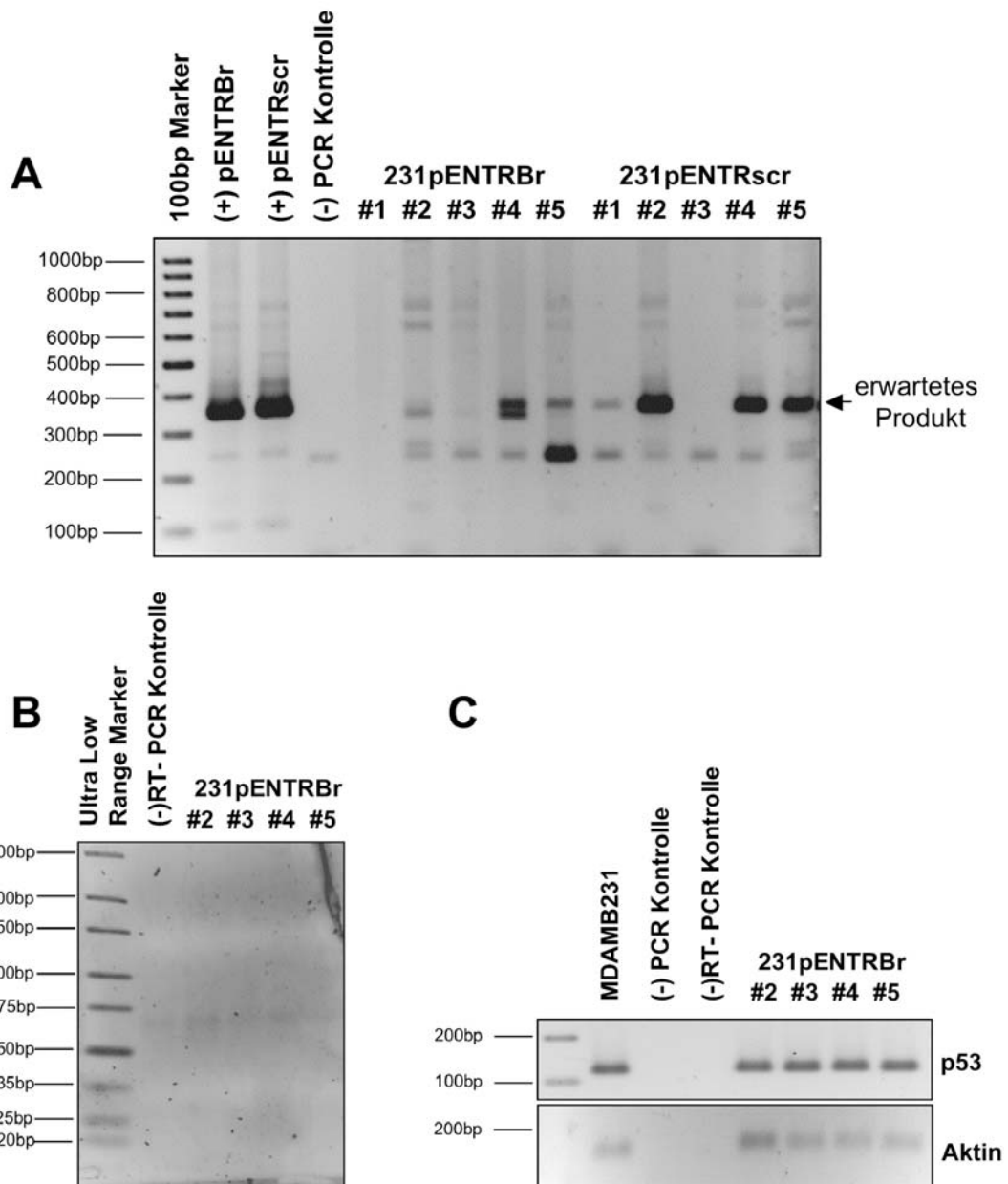


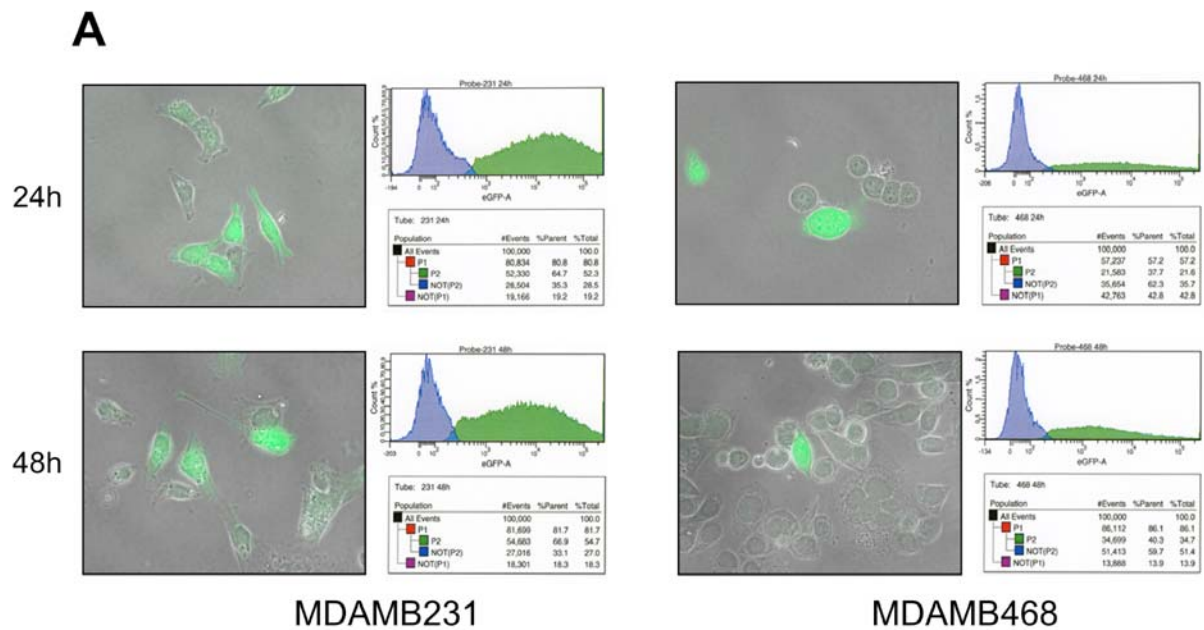
Abbildung 26 Stabile Transfektion von MDAMB231 Zellen mit pENTRBr und pENTRscr

Transfizierte Zellen wurden mit 100 µg/ml Zeocin im Medium selektioniert, und resistente Zellklone wurden subkultiviert. Aus den stabil transfizierten Zellklonen wurde genomische DNA und RNA extrahiert. (A) Verifizierung des korrekten Einbaus der shRNA-Expressionskassette. 400 ng der extrahierten genomischen DNA wurde mit Vektor-spezifischen Primern (H1_fwd und M13_rev) amplifiziert. Die Produkte wurden über ein 2 % Agarosegel aufgetrennt. Als Kontrolle dienten 400 ng der Vektoren. (B) Nachweis der shRNA Transkripte in 231pENTRBr Zellen. 100 ng RNA wurden mit den Primern P1Cap-CDS und random Hexamer in cDNA umgeschrieben und mit den Primern PCR-CDS und shp53Br-test in einer PCR amplifiziert. Die Proben wurden auf einem 3 % Metaphor-Agarosegel analysiert. (C) 100 ng mRNA wurde in cDNA (P1Cap-CDS; poly T-CDS) umgeschrieben und mit spezifischen p53-Primern (TP53_Q1/Q2) amplifiziert. Die Analyse erfolgte über ein 2 % Agarosegel. Aktin diente als endogene Ladekontrolle.

2.6.2 Dynamik des transienten mutp53 knock downs

Die vorhergehenden Versuche haben gezeigt, dass ein stabiles Abschalten des *TP53* Gens in MDAMB231 und MDAMB468 Zellen nicht möglich ist. Zur genaueren Untersuchung der molekularen Vorgänge bei der Herunterregulierung des *TP53* Gens sollten transient transfizierte Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert werden. Um eine homogene Population gleichförmig transfizierter Zellen zu gewährleisten, wurde ein Expressionsvektorsystem gewählt, das neben der shRNA auch das grün fluoreszierende Protein (hier EGFP, *enhanced green fluorescent protein*) exprimiert (pSuperior.neo.GFP; Vektorkarte in Anhang A3.4). Anhand der EGFP-Expression konnten erfolgreich transfizierte Zellen im *FACS Aria* Gerät isoliert werden. Damit wurde die Analyse einer homogenen Zellpopulation in frühen Stadien des mutp53 knock downs ermöglicht. Die schon oben erwähnte shRNA Sequenz gegen p53 (Brummelkamp et al., 2002) und die *scrambled* Sequenz wurden über die *HindIII* und *BglII* Restriktionsstellen in das Vektorgerüst kloniert. Nachdem der korrekte Einbau der Expressionskassetten in den Vektor durch Sequenzierung bestätigt wurde, konnten die Vektoren pSuperior.neo.GFP.Br und pSuperior.neo.GFP.scr in die Zellen transfiziert werden.

Da erfolgreich transfizierte Zellen im *FACS Aria* Gerät detektiert und isoliert werden sollten, wurde zunächst die Effizienz der GFP-Expression und deren Auswirkungen auf die Zellen untersucht. Hierzu wurde der Kontrollvektor pMaxGFP in die Zellen transfiziert und an verschiedenen Zeitpunkten die Autofluoreszenz des Proteins detektiert. In Abbildung 27 sind die Messungen dargestellt. Die Quantifizierung des GFP-Signals mittels FACS-Analysen ergab eine 1,5 bis 2,5 fache geringere Signalintensität für transfizierte MDAMB468 Zellen im Vergleich zu transfizierten MDAMB231 Zellen.



B

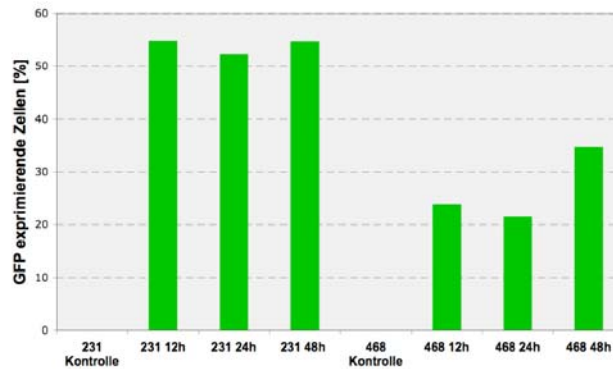


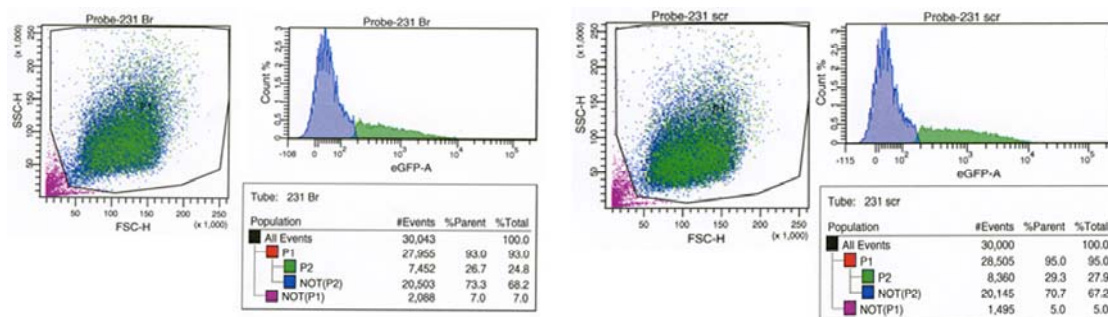
Abbildung 27 Exogene GFP-Expression in MDAMB231 und MDAMB468 Zellen

5x 10⁴ Zellen wurden mit dem Kontrollvektor pMaxGFP transfiziert. (A) GFP-exprimierende Zellen wurden über die Autofluoreszenz des Proteins bei 482 nm im Fluoreszenzmikroskop (400 fache Vergrößerung) 24 h und 48 h nach Transfektion detektiert und anschließend im *FACS Aria* quantifiziert. (B) Quantifizierung der GFP-Expression in der Zeitkintetik. Die FACS-Analyse erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Transfektion.

Nachdem sichergestellt wurde, dass in den beiden Zelllinien eine GFP-Expression möglich ist und auch über einen gewissen Zeitraum hinweg gewährleistet wird, sollten nun die Zellen mit dem shRNA exprimierenden Konstrukt transfiziert werden. Wie in Abbildung 28 gezeigt, konnte nur in MDAMB231 Zellen eine ausreichende GFP-Expression beobachtet werden. MDAMB468 Zellen zeigten kein Signal für GFP. Da sich, wie in Abbildung 27 dargestellt, MDAMB468 Zellen erfolgreich transfizieren ließen und eine GFP-Expression durchaus möglich ist, ließ sich das Ausbleiben des GFP-Signals nicht mit einer unzureichenden

Transfektionseffizienz erklären. Eine Erklärung könnte eine suboptimale Funktionalität des für die GFP-Expression verantwortlichen Promotors (Promotor des Phosphoglycerat Kinase Gens) in MDAMB468 Zellen sein. Bisher konnte keine andere Strategie für die RNAi in MDAMB468 Zellen entwickelt und angewandt werden. Weitere Untersuchungen konzentrierten sich folglich auf MDAMB231 Zellen.

MDAMB231



MDAMB468

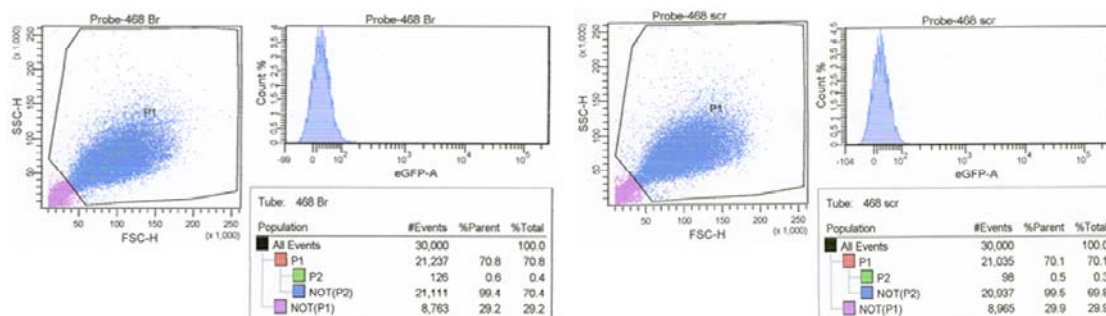


Abbildung 28 FACS Analyse von transfizierten MDAMB231 und MDAMB468 Zellen

24 h nach der Transfektion von 1×10^6 Zellen mit pSuperior.neo.GFP.Br bzw pSuperior.neo.GFP.scr wurden die Zellen trypsiniert und in $800 \mu\text{l}$ 4 % FCS in 1x PBS resuspendiert. Der Analyse der Zellen erfolgte im FACS Aria.

2.6.2.1 Zeitkinetik des mutp53 knock downs in MDAMB231 Zellen

Zur Untersuchung der mutp53-Expression während der frühen Phase des knock downs in MDAMB231 Zellen wurden diese mit dem Expressionsvektor pSuperior.neo.GFP.Br transfiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion wurden die Zellen anhand der GFP-Fluoreszenz mittels FACS isoliert und aus den GFP-positiven Zellen die Gesamt-RNA extrahiert. Die aufgereinigte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und mit p53-spezifischen Primern amplifiziert. Eine qualitative Darstellung der Zeitkinetik des mutp53

knock downs ist in Abbildung 29A illustriert. In MDAMB231 Zellen kommt es innerhalb der ersten 36 Stunden nach der Transfektion mit dem shRNA-exprimierenden Konstrukt zu einer Abnahme des mutp53-Transkripts. Dabei war der transiente *knock down* 36 Stunden nach Transfektion am effektivsten. Am nächsten Zeitpunkt (48 h) konnte keine abweichende Regulierung der mutp53-Transkripte festgestellt werden.

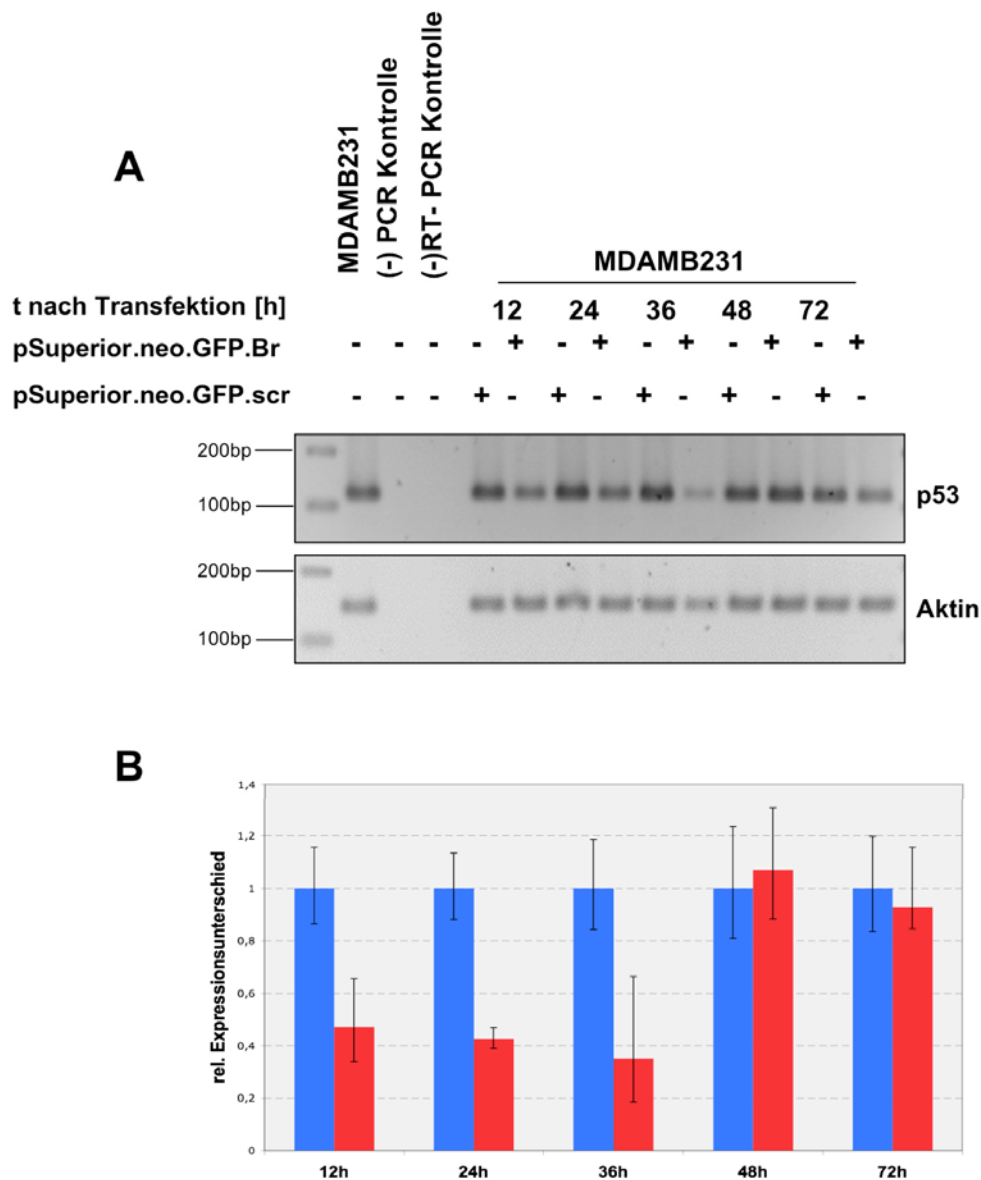


Abbildung 29 Zeitkinetik des transienten mutp53 knock downs in MDAMB231 Zellen

1×10^6 Zellen wurden mit $2 \mu\text{g}$ von pSuperior.neo.GFP.Br bzw. pSuperior.neo.GFP.scr transfiziert und wie vorher beschrieben an unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Transfektion sortiert. 100 ng extrahierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben (P1Cap-CDS/ poly T-CDS). (A) Spezifische Amplifikation von p53 (TP53_Q1/Q2) und Aktin (Hs-AKTB-A/B) und elektrophoretische Auftrennung im 2 % Agarosegel. (B) relative p53 Expression in der Q-RT-PCR, blau: MDAMB231 transfiziert mit *scrambled* Konstrukt; rot: shRNA exprimierende Zellen. Es wurde auf die Transkription von *HPRT1* normalisiert. Zellen, die mit dem *scrambled* Konstrukt transfiziert wurden, dienten als Referenz (Wert der relativen Expression =1)

Zur Validierung und Quantifizierung dieser Beobachtungen wurde mit der gleichen cDNA eine Q-RT-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse der Q-RT-PCR in Abbildung 29B bestätigten die bereits gemachten Beobachtungen zum funktionellen *knock down* von mutp53 während der ersten 36 Stunden nach Transfektion. Schon nach zwölf Stunden konnte eine deutliche Verringerung der mutp53-Transkripte um fast 50 % detektiert werden. Die größte Reduktion wurde, wie schon vorher gezeigt, am 36 Stunden-Zeitpunkt festgestellt. Hier betrug die mutp53-Expression nur noch etwas über 30 % des Wertes von Zellen, die mit dem *scrambled* Konstrukt (Referenzzellen) transfiziert wurden. 48 Stunden nach Transfektion der Zellen mit dem shRNA Konstrukt die mutp53-Expression in diesen Zellen leicht über den Wert der Referenzzellen. Am nächsten Zeitpunkt (72 h) fiel der Wert wieder auf den der Referenzzellen.

In MDAMB231 Zellen war es also möglich, transient die mutp53-Expression zu reprimieren. Der *knock down* des *TP53* Gens konnte schon zwölf Stunden nach Transfektion der shRNA deutlich detektiert werden und war nach ungefähr 48 Stunden nicht mehr vorhanden, obwohl die Anwesenheit des Expressionsvektors anhand der EGFP Expression zu jedem Zeitpunkt nachweisbar war. Jedoch ist hierbei zu beachten, dass die Halbwertszeit des EGFPs bis zu 26 Stunden betragen kann und somit die Fluoreszenz nicht unbedingt die aktive Transkription am Expressionsvektor nachweist.

In RIP Experimenten konnte die Bindung von RNA sowohl an wtp53 als auch an mutp53 *in vivo* nachgewiesen werden. Im Fall von wtp53 konnte die Assoziation mit der eigene mRNA und der Transkripte der Gene *Mdm2* und *p21^{Waf/Cip1}* dargestellt werden. Da wtp53 diese Gene über die spezifische DNA-Bindung transkriptionell reguliert, liegt es nahe, dass ebenso die wtp53/RNA Interaktion einen regulatorischen Effekt auf die Genexpression hat. Der stabile mutp53 *knock down* mit exogen exprimierter shRNA war in beiden Zelllinien nicht möglich, wobei selbst die unspezifische *scrambled* shRNA die Vitalität von MDAMB468 Zellen erheblich beeinflusste. Um einen möglichen Einfluss der *scrambled*-Transkripte auf die mutp53-Expression in MDAMB231 Zellen nachzuweisen, wurden die Daten aus der vorherigen Q-RT-PCR erneut analysiert. Hierbei wurde nun die Expression in nicht transfizierten Zellen als Referenzwert gesetzt. Das Balkendiagramm in Abbildung 30 zeigt die Ergebnisse der Auswertung. An den ersten beiden Punkten der Zeitkinetik konnte mit diesen Parametern ebenfalls eine deutliche Reduktion der mutp53-Transkription in shRNA-transfizierten Zellen detektiert werden. Zellen, die mit dem *scrambled* Konstrukt transfiziert

wurden, zeigten ebenfalls eine Erniedrigung der mutp53-Expression im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen. Überraschenderweise stieg die mutp53-Expression 36 Stunden nach Transfektion der *scrambled* Expressionsvektoren auf das 2 fache im Vergleich zu nicht transfizierten MDAMB231 Zellen an. Dieser Anstieg der mutp53-Transkription konnte ebenfalls für Zellen dargestellt werden, die mit dem p53-shRNA Konstrukt transfiziert wurden. Jedoch verlief dieser Anstieg, womöglich durch die funktionelle shRNA bedingt, etwas schwächer. 48 Stunden nach der Transfektion näherte sich der relative Expressionswert wieder dem Wert der Referenzzellen. Weitere 24 Stunden später wurde wiederum eine Reduktion in der p53-Expression durch beide Konstrukte festgestellt.

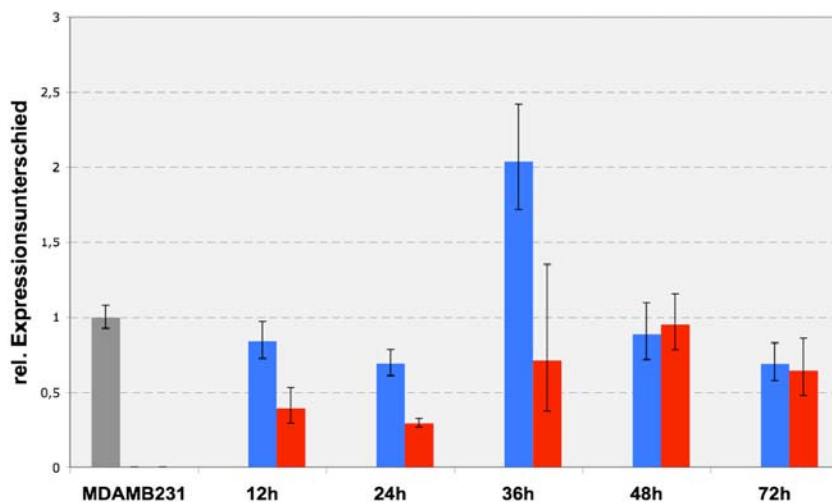


Abbildung 30 Erneute Analyse der Werte der Q-RT-PCR aus Abb.29

Relative mutp53 Expression in der Q-RT-PCR, blau: MDAMB231 transfiziert mit *scrambled* Konstrukt; rot: shRNA exprimierende Zellen. Es wurde auf die Transkription von *HPRT1* normiert. Die mutp53 Expression in nicht transfizierten MDAMB231 Zellen (grau) diente als Referenz (Wert der relativen Expression =1).

Das Ziel der mutp53 *knock down* Experimente war, den Effekt von mutp53 auf das Expressionsmuster von MDAMB231 und MDAMB468 Zellen zu entschlüsseln. Anhand der differentiell exprimierten Gene sollte unter Einbeziehung der Ergebnisse aus CHIP-Seq- und RIP-Experimenten mögliche biologische Funktionen von mutp53 in den Zellen evaluiert werden. Zwar konnte in den Zelllinien MDAMB231 (in Abschnitt 2.7.1 und 2.7.2) und MDAMB468 (in Abschnitt 2.7.1) eine transiente Erniedrigung der mutp53-Expression erreicht werden, ein stabiler *knock down* des *TP53* Gens war jedoch nicht möglich. Transfizierte MDAMB468 Zellen konnten nicht subkultiviert werden und selektionierte

MDAMB231 Zellen exprimierten, aufgrund des ausbleibenden Einbaus der Expressionskassette, keine shRNA.

In transienten Experimenten mit der Zelllinie MDAMB231 wurde eine Reduktion der mutp53-Transkripte durch die Expression der spezifischen shRNA erreicht. Allerdings führte die Expression der unspezifischen Kontroll-RNA ebenfalls zu einer Deregulierung der mutp53-Expression. Besonders auffällig war, dass unter dem Einfluss der *scrambled* Sequenz die mutp53-Expression 36 Stunden nach der Transfektion dramatisch anstieg. Daher ist diese Methode zur Analyse des mutp53-abhängigen Expressionsmusters in MDAMB231 und MDAMB468 Zellen eher ungeeignet. Jedoch ergeben sich dadurch neue Einblicke in die funktionelle RNA-Bindung von mutp53: Es scheint, als führte die exogene Expression von kurzen RNA-Molekülen in mutp53-exprimierenden Zellen zu einer Deregulierung der mutp53-Transkription.

3 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollte das DNA-Bindevverhalten von zwei endogen exprimierten p53-Mutanten der Zelllinien MDAMB231 und MDAMB468 untersucht werden. Anhand der identifizierten Bindestellen und aus den Erkenntnissen von Folgeexperimenten sollte die Protein/DNA Interaktion genauer charakterisiert werden und mögliche epigenetische Funktionen der mutp53-Proteine identifiziert werden.

Tatsächlich konnten einige potentielle mutp53-Bindestellen im Genom von MDAMB231 und MDAMB468 Zellen ermittelt werden. Es zeigte sich zudem, dass mutp53, aber auch wtp53, neben der Interaktion mit DNA ebenfalls RNA-Bindungskapazität besitzen. Darüber hinaus wurde in *knock down* Experimenten veranschaulicht, dass die Erniedrigung der mutp53-Proteinkonzentration mit erheblichen Komplikationen für die Zellen verbunden ist.

Im Folgenden werden die einzelnen Ergebnisse nun genauer diskutiert.

3.1 mutp53 aus MDAMB231 und MDAMB468 Zellen bindet an DNA-Bereiche mit struktureller Flexibilität

Zahlreiche Studien, die nach wtp53-abhängigen Genen suchen, orientieren sich an der publizierten Konsensus-Sequenz (Cawley et al., 2004; Hearnnes et al., 2005; Wei et al., 2006). Im Gegensatz zu wtp53 hat mutiertes p53 die Eigenschaft der SSDB verloren, obwohl für einige mutp53-Proteine gezeigt werden konnte, dass deren transkriptionelle Regulation durch bestimmte Sequenzmotive vermittelt wird (Frazier et al., 1998; Thomas and Reisman, 2006; Tsutsumi-Ishii et al., 1995; Zalcenstein et al., 2003). Jedoch verhindert die Sequenzen-Heterogenität die Formulierung einer für alle mutp53-Proteine allgemeingültigen Konsensus-Sequenz. Folglich scheiden Algorithmus-basierte *in silico* Ansätze zur Suche nach möglichen mutp53-Bindestellen und deren Charakterisierung aus. Eine adäquate Methode zur Identifizierung unbekannter Bindestellen ist die in der Arbeit angewandte Chromatin Immunpräzipitation mit anschließender Sequenzierung der DNA-Fragmente (ChIP-Seq).

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnten für endogen exprimierte mutp53-Proteine aus MDAMB231 Zellen 176 und für MDAMB468 Zellen 24 potentielle *in vivo* Bindestellen

mittels ChIP-Seq Methode identifiziert werden. In einer früheren Studie zur Identifizierung von wtp53-Bindestellen mittels ChIP-PET konnten ca. 540 potentielle Bindestellen identifiziert werden (Wei et al., 2006). Da die Autoren vereinzelt auftretende Bindestellen oder Bindestellen ohne wtp53-RE nicht berücksichtigen, sind es tatsächlich weit mehr als die 540 postulierten Bindestellen. Demnach ist die Anzahl der Bindestellen für mutp53 realistisch und reflektiert mit großer Wahrscheinlichkeit nur einen Teil der tatsächlich vorhandenen Interaktionsstellen.

Ein Sequenz-Vergleich der einzelnen Bindestellen zeigte, dass es in der Nukleotidabfolge keine signifikanten Übereinstimmungen gab. Folglich läuft die DNA-Bindung von mutp53 in den untersuchten Zelllinien eher unabhängig von einer Konsensus-Sequenz ab. Dies ist auch zu erwarten, da es sich bei den Mutationen im *TP53*-Gen beider Zelllinien um Kontaktmutanten handelt, welche die Fähigkeit zur SSDB verloren haben (vgl. Abschnitt 1.2.2 und Abschnitt 1.5).

Eine bioinformatische Analyse der Sequenzen ergab, dass statt einer allgemeingültigen Sequenz eher das Vorhandensein gewisser repetitiver DNA-Elemente ein gemeinsames Charakteristikum der mutp53-Bindestellen darstellt. Demnach enthielten ca. 70 % der Bindestellen von mutp53 aus MDAMB231 Zellen und ca. 80 % der Bindestellen in MDAMB468 Zellen mindestens eine Art von repetitiven DNA-Elementen. Im Vergleich zu der Verteilung der repetitive Sequenzen (Retrotransposons, zentromerische und telomerische DNA, Satelliten-DNA u.a.) im humanen Genom, die ungefähr 60 % beträgt, ist der Anteil in den potentiellen Bindestellen leicht erhöht. Wird der Anteil einzelner Klassen von repetitiven DNA-Elementen verglichen, so zeigt sich, dass SINEs, LINEs und LTRs in den Bindestellen deutlich angereichert vorliegen. Die Klassen der SINEs, LINEs, LTRs und DNA-Repeats haben zusammen einen Anteil von ca. 44 % am humanen Genom (Lander et al., 2001). In MDAMB231 haben diese Klassen einen Anteil von 66 %, in MDAMB468 einen Anteil von 79 %. Die meisten Bindestellen im Verhältnis zur Chromosomenlänge wurden sowohl in MDAMB231 Zellen als auch in MDAMB468 Zellen auf dem Chromosom 19 gefunden. Dieses Chromosom ist eines der Kürzesten, hat jedoch die höchste Dichte an repetitiven DNA-Elementen (57%) (Venter et al., 2001), was als ein Nachweis für die Spezifität der Methode angesehen werden kann.

Die Anreicherung von repetitiven DNA-Elementen resultiert hauptsächlich aus einer Konzentration von SINEs in den Bindestellen. Satelliten DNA dagegen, die mit 10-15 % in etwa den gleichen Anteil am humanen Genom hat wie SINEs, ist in den Bindestellen unterrepräsentiert. Dies unterstützt die Korrektheit der gemachten Beobachtungen und hebt

die Tatsache hervor, dass SINEs eine wichtige Komponente der mutp53-Bindestellen sind. Inwiefern repetitive DNA-Elemente ein direktes Ziel der mutp53/DNA Interaktion sind oder nur flankierende Bereiche der tatsächlichen DNA Interaktionsstellen darstellen, kann mit ChIP-Seq Experimenten nicht geklärt werden.

SINEs und LINEs gehören zu der Gruppe der Non-LTR-Retrotransposons. Aus dieser Gruppe kodieren nur LINEs für Proteine, die ihre eigene Mobilisierung ermöglichen. Die Transposition von SINEs wiederum ist von diesen Proteinen abhängig (Dewannieux et al., 2003; Esnault et al., 2000). Die Integration beider transposablen Elemente findet in AT-reiche Regionen statt, welche aus mehreren Wiederholungen der Zielsequenz 5' TTAAAA 3' bestehen kann (Jurka, 1997). Diese Sequenz-Charakteristika befähigen den DNA-Bereich unter helikalem Stress eine nicht-B DNA Struktur einzunehmen, was zu höheren Sekundärstrukturen in der DNA führt. Es liegt folglich nahe, dass die DNA Interaktion der endogen exprimierten mutp53-Proteine aus MDAMB231 und MDAMB468 Zellen durch strukturelle Eigenschaften der DNA bestimmt wird. Tatsächlich deuten Ergebnisse aus *in vitro* (Gohler et al., 2005; Walter et al., 2005) und *in vivo* (Koga and Deppert, 2000; Walter et al., 2005) Arbeiten darauf hin, dass die DNA-Bindung von mutp53 ein Struktur-abhängiger Prozess ist. Da diese selektive DNA-Struktur Bindung (DSSB, *DNA structure-selective binding*) auch schon bei der DNA Interaktion von wtp53 festgestellt wurde (Gohler et al., 2002), stellt sie mit aller Wahrscheinlichkeit eine intrinsische Eigenschaft des p53-Proteins dar.

Als mögliches strukturelles Ziel von mutp53 auf chromosomaler Ebene wurden SAR/MAR-Elemente (*scaffold/ matrix attachment regions*; S/MAR) identifiziert (Koga and Deppert, 2000; Muller et al., 1996; Will et al., 1998a; Will et al., 1998b). Durch S/MARs wird das Chromatin in funktionelle Bereiche organisiert in denen Replikation, DNA-Reparatur, Rekombination oder Transkription stattfinden kann. Unterschiedliche S/MARs weisen eine geringe Sequenz-Homologie auf, haben jedoch gewisse strukturelle Eigenschaften gemeinsam. Sie sind AT-reich und beherbergen repetitive Sequenzen, was S/MARs zur Ausbildung von nicht-B DNA und höheren Sekundärstrukturen prädestiniert (Benham et al., 1997; Bode et al., 1992).

In MDAMB231 Zellen wurden 64 % der Bindestellen in Bereichen zwischen zwei Genen oder in hypothetischen kodierenden Regionen identifiziert, wobei 36 % der Bindestellen in Genen lokalisiert wurden. Ein ähnliches Verhältnis von intergenischen zu intragenischen Sequenzen wurde in MDAMB468 gefunden, hier lagen 62,5 % der Bindestellen in nicht

kodierenden Bereichen. In Anbetracht der Größe des humanen Genoms mit 3,08 Gb und einer durchschnittlichen Verteilung von weniger als 10 Genen pro einer Millionen Basenpaare (IHGSC, 2004), ist es schwierig zu beurteilen, ob mutp53 bevorzugt an intergenischen Regionen bindet.

Es wurde beobachtet, dass die intragenischen Bindestellen in MDAMB231 und MDAMB468 Zellen fast ausnahmslos in Intronen lokalisiert waren, lediglich zwei der 64 intragenischen Sequenzen in MDAMB231 wurden Exonen zugeordnet. Im humanen Genom besteht ein ungleiches Mengenverhältnis zwischen Intronen und Exonen. Haben Introne mit 24 % einen relativ hohen Anteil am Genom, sind Exone mit 1,1-1,5 % deutlich unterrepräsentiert (Venter et al., 2001). Auffällig hierbei ist jedoch, dass die meisten intronischen Bindestellen im ersten Intron detektiert werden konnten. Das erste Intron ist meist länger als andere Introne und zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an Guaninen und Cytosinen (im Durchschnitt 65 %) aus, die in CpG Dinukleotidfolgen organisiert sind (Majewski and Ott, 2002). Methylierung der CpG Inseln (*CpG Islands*) verhindert die Transkription des betroffenen Gens und hat folglich einen direkten Einfluss auf die Genexpression. Darüber hinaus liegen meist im ersten Intron weitere regulatorische Einheiten, wie alternative Promotoren, gewebsspezifische Enhancer, LCRs (*locus control region*) und S/MARs. Unter Berücksichtigung der bisher genannten mutp53 Bindecharakteristika erhärtet dies den Verdacht, dass mutp53 gezielt durch die Wechselwirkung mit gewissen DNA-Strukturen im ersten Intron einen regulatorischen Effekt auf die Transkription des Gens ausübt.

Gene, in deren Regionen mutp53 Bindestellen identifiziert werden konnten, kodieren für Proteine, die an unterschiedlichen zellulären Mechanismen teilnehmen und folglich eine heterogene Funktionalität untereinander aufweisen (Tabelle 1). Demnach lässt sich auch keine klare, abgegrenzte biologische Funktion der mutp53/DNA Interaktion formulieren.

Eine bioinformatische Analyse aller identifizierten mutp53 Bindestellen in MDAMB231 ergab, dass nur 22 Bindeloci (entspricht 12,5 % der Bindestellen) in einem Abstand von weniger als 10 kb zur nächsten Transkriptions-Initiationsstelle (TSS) lagen. Dies deutet darauf hin, dass eine transkriptionelle Regulation der meisten Gene durch mutp53 eher indirekt und in einiger Entfernung geschieht, z.B. an Enhancern, Silencern, Insulatoren oder distalen LCRs (Übersicht in (West and Fraser, 2005)). Darüber hinaus könnte die Interaktion von mutp53 zur Umlagerung des Chromatins beitragen, was wiederum regulatorische Elemente am Promoter für andere Faktoren zugänglich machen würde. Dies würde mutp53 schließlich als einen epigenetischen Faktor klassifizieren.

3.1.1 Beurteilung der *in vivo* ChIP-Seq Methode

Obwohl ChIP-Seq eine exzellente Methode zur Identifizierung einzelner mutp53 Bindestellen *in vivo* darstellt, gewährt sie keine Einblicke in die Dynamik der Bindung, da mit der Formaldehyd-Kreuzvernetzung nur ein momentaner Zustand der Protein/DNA Wechselwirkung erfasst wird. Darüber hinaus werden durch die Behandlung der Zellen mit Formaldehyd nicht nur DNA-gebundene Proteine mit dem Chromatin kovalent verknüpft, sondern auch Proteine, die in einem Abstand von wenigen Ångström (1 Å entspricht 0,1 nm) zueinander liegen. Hierdurch besteht die Gefahr, dass Chromatinloci als potentielle mutp53 Bindestellen identifiziert werden, obwohl mutp53 lediglich indirekt im Komplex mit anderen DNA-bindenden Faktoren mit der Bindestelle assoziiert ist. Zur Validierung der direkten Assoziation von mutp53 mit den jeweiligen Sequenzen könnten Gelshift Analysen (*electrophoretic mobility shift assay, EMSA*) oder DNA-*footprint* Versuche durchgeführt werden. Jedoch reflektieren diese *in vitro* Methoden nicht die tatsächlichen zellulären Gegebenheiten und Ergebnisse aus solchen Versuchen sind vorsichtig zu beurteilen.

3.2 mutp53 aus MDAMB231 und MDAMB468 Zellen besitzt RNA-Bindekapazität

Die Extraktionsanalysen in Abschnitt 2.3 haben gezeigt, dass ein großer Anteil des überexprimierten mutp53-Proteins der Zelllinien MDAMB231 und MDAMB468 in der löslichen Fraktion der Zelle vorliegt. Unter milden Extraktionsbedingungen war es möglich, annähernd den gesamten mutp53-Proteinanteil aus den Zellen zu entfernen. Üblicherweise werden Nukleinsäure-assoziierte Proteine, wie beispielsweise Histone oder Transkriptionsfaktoren, mit einer Kombination aus hypotonischer Lyse und anschließender Inkubation in Hochsalzlösung oder durch Lyse bei niedrigem pH-Wert extrahiert.

Die Tatsache, dass wenig stringente Methoden ausreichen, um mutp53 aus der Zelle zu extrahieren, führt zu einigen Vermutungen über die Kinetik der mutp53/DNA Interaktion: (a) Die Protein/DNA Interaktion ist ein hoch dynamischer Prozess. Im Gegensatz zur stabilen DNA Bindung von wtp53 an das wtp53-RE reflektiert die Interaktion von mutp53 mit seiner Bindestelle einen äußerst kurzlebigen Zustand und ist durch ständig alternierendes Assoziieren und Dissoziieren gekennzeichnet. Dies würde erklären, warum sich die in ChIP-Seq Experimenten identifizierten mutp53-gebundenen Gene in eine Vielzahl von unterschiedlichen funktionellen Gruppen gliedern lassen. (b) Mutp53 assoziiert nicht

(spezifisch) mit DNA. Dies würde bedeuten, dass die in ChIP-Seq Analysen beobachtete DNA Interaktion ein experimentelles Artefakt darstellt. Dagegen spricht jedoch, dass nachweislich auch die mutp53/DNA Interaktion durch verschiedene Faktoren, wie repetitive DNA-Elemente und Chromatinstruktur bestimmt wird (siehe Abschnitt 3.1).

In einer aktuellen Arbeit wurde mit Hilfe von p53/GFP Fusionsproteinen und konfokaler FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) Analyse die nukleäre Diffusion von nicht aktivierten wtp53 sowie zwei Punktmutanten (Arg175His und Arg273His) untersucht (Hinow et al., 2006). Die Daten zeigten, dass p53/GFP Fusionsproteine zwar langsamer als freies GFP diffundieren, jedoch durchaus mobil sind. Während dieser Diffusion lag das Protein abwechselnd an stabile Strukturen gebunden und ungebunden vor, wobei die Werte der Reaktionsraten für Dissoziation und Assoziation in etwa gleich waren und auf eine unspezifische Bindung hinwiesen. Das gleiche galt für die mutp53-Proteine. Die Forscher postulierten, dass wtp53 im nicht induzierten Zustand permanent durch unspezifische Bindung und Dissoziation die DNA abtastet, um dann im Falle seiner Aktivierung, eine schnelle spezifische Bindung an Zielsequenzen aufbauen zu können.

Aufgrund dieser Erkenntnisse ist das in Punkt (a) beschriebene Modell eine plausible Erklärung zur Kinetik der mutp53/DNA Interaktion in MDAMB231 bzw. MDAMB468 Zellen. Die lockere Assoziation von mutp53 mit DNA würde nach diesem Modell gleichfalls die Interaktion mit RNA ermöglichen.

Mit der RNA Immunpräzipitation im zweiten Teil der Arbeit war es bisher möglich, 75 mutp53-gebundene Transkripte aus MDAMB468 und 68 mutp53-gebundene Transkripte aus MDAMB231 zu identifizieren. Lediglich ein geringer Anteil der Transkript-Sequenzen entsprach denen der Volllänge-Transkripte. Wie schon in Abschnitt 2.4.3 erwähnt, könnten methodische Gegebenheiten zur Isolation von verkürzten Transkripten geführt haben. Darüber hinaus besteht beim Arbeiten mit RNA immer die Gefahr der Degradation durch RNasen. Der Großteil der trunkierten Transkripte entspricht jedoch Bereichen aus den 3'UTRs von mRNAs, was darauf hinweist, dass eher alternative Promotoren oder Splicing die verkürzten RNAs verursachen, die von mutp53 gebunden werden.

Die 3'UTRs humaner mRNAs sind im Durchschnitt 500 bp lang und enthalten sowohl das Polyadenylierungssignal als auch regulatorische Signale, welche die subzelluläre Lokalisation der mRNA steuern. Darüber hinaus ist sie Ziel von micro RNAs (miRNA). Im Allgemeinen hat diese Region einen Einfluss auf die Stabilität des Transkripts und die Translation (Übersicht in (Mazumder et al., 2003)). Tatsächlich haben einige Arbeitsgruppen gezeigt,

dass 3'UTR RNA von bestimmten Genen transkribiert wird und diese sowohl einen anti-proliferativen, Tumor-supprimierenden Effekt hat (Manjeshwar et al., 2004; Rastinejad et al., 1993) als auch anti-apoptotisch wirken kann (Shchors et al., 2002).

Welchem Zweck die Interaktion von Volllängen- und trunkierten Transkripten, insbesondere der 3'UTR Transkripten, mit p53 dient, ist weitgehend ungeklärt. In der Literatur wurde beschrieben, dass wtp53 *in vitro* fähig ist, an die 5'UTR der *cdk4* mRNA und die 5'UTR seiner eigenen mRNA zu binden und die Translation der Transkripte zu inhibieren (Ewen et al., 1995; Miller et al., 2000; Mosner et al., 1995). Im humanen System hingegen wurde die gleiche funktionelle Interaktion *in vitro* und *in vivo* mit der 3'UTR beschrieben (Fu and Benchimol, 1997; Fu et al., 1996). Demnach ist eine 66 nt große Uracil-reiche Region, die interessanterweise stromaufwärts eines Alu-ähnlichen Elements liegt, essentiell bei der Inhibierung der Translation (Fu et al., 1999). Einerseits wurde vorgeschlagen, dass hier bestimmte Translations-reprimierende Faktoren binden, andererseits wurde nicht ausgeschlossen, dass der Poly(A)-Schwanz mit dieser Region hybridisiert und so die Translation sterisch gehindert wird. Die dadurch entstehende Sekundärstruktur könnte ein Ziel von p53 sein, welches daraufhin die RNA bindet und deren weiteres Schicksal im Transkriptom mitbestimmt.

Fast alle der mutp53-gebundenen Transkripte aus MDAMB468 und MDAMB231 Zellen konnten einer Gen-kodierenden Sequenz im Genom zugeordnet werden. Lediglich 11 Transkripte aus MDAMB468 und 13 Transkripte aus MDAMB231 entsprachen Sequenzen in nicht kodierenden Bereichen, repetitiven DNA-Elementen oder mitochondrialer DNA (mtDNA). Das humane mitochondriale Genom umfasst ungefähr 16,5 kb, beinhaltet 37 Gene, die für die Proteine der Atmungskette, zwei mitochondriale rRNAs und 22 mitochondriale tRNAs kodieren und kann in mehreren Kopien vorliegen (Chan, 2006; Montoya et al., 2006). Weitere 900 bis 1500 mitochondriale Proteine sind im Nukleus kodiert. Interessanterweise sind die in RIP Experimenten identifizierten mitochondrialen Transkripte exklusiv in der mtDNA kodiert oder lassen sich intergenischen Bereichen in der mtDNA zuordnen. Dies bedeutet, dass entweder eine Translokation von mutp53-Proteinen in das Mitochondrium stattgefunden hat und mutp53 mit diesen Transkripten im Mitochondrium spezifisch interagiert. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass wtp53 in Mitochondrien transloziert (Lee et al., 2007; Mahyar-Roemer et al., 2004; Moll et al., 2006) und dort möglicherweise sogar transkriptionell aktiv ist (Heyne et al., 2004). Andererseits besteht die Möglichkeit, dass zytoplasmatisches mutp53 infolge der Lyse der Mitochondrien in Kontakt mit den

Transkripten gekommen ist. Durch die Verwendung des nicht-ionischen Detergenz Triton-X 100 verläuft die Zell-Lyse unter nicht denaturierenden Bedingungen, was die native Faltung der p53-Proteine gewährleistet und die Interaktion mit RNA zulässt. In Folgeexperimenten müsste geklärt werden, was zu der Interaktion von mutp53 mit den mitochondrialen Transkripten führt.

Die mutp53-gebundenen Transkripte lassen sich, bis auf wenige Ausnahmen, anhand der biologischen Funktion in unterschiedliche Gruppen kategorisieren (siehe Tabelle 2), deren Regulation durch mutp53 möglicherweise zu der malignen Transformation und Tumorprogression beiträgt. Die Gruppe der ribosomalen Transkripte ist hierbei am zahlreichsten vertreten.

Die ribosomalen Proteine sind im humanen Genom auf 79 Genen kodiert, die auch ungefähr 2000 Pseudogene enthalten (Yoshihama et al., 2002; Zhang et al., 2002). Etwa 10 % der Pseudogene werden transkribiert, wobei der Nutzen dieser Transkripte noch ungeklärt ist. Ribosomale Proteine gehören zu den Haushaltsgenen (*housekeeping genes*) der Zelle und haben einen Anteil von 5-10 % an der Gesamtproteinmenge (Kenmochi et al., 1998). Ihre Expression ist essentiell, aber auch abhängig vom Proliferations-Status der Zelle. Demnach ist die Expression ribosomaler Proteine in Tumorzellen, die eine verstärkte Proliferation aufweisen, deutlich erhöht. Dies könnte eine Erklärung für die häufige Identifizierung ribosomaler Transkripte als Interaktionspartner von mutp53-Proteinen sein. Andererseits wurde für einige ribosomale Proteine beschrieben, dass ihre Expression deutliche Auswirkungen auf den p53-Metabolismus oder auf p53-spezifische Funktionen hat. Beispielsweise konnte für die ribosomalen Proteine L5, L11, L23 und S7 (RPS7 in Tabelle 2) in *in vitro* bzw. *in vivo* Experimenten dargestellt werden, dass sie mit der zentralen Domäne von Mdm2 interagieren und nachhaltig die Ubiquitinierung von wtp53 in einem ternären Komplex inhibieren (Chen et al., 2007; Dai and Lu, 2004; Dai et al., 2004; Lohrum et al., 2003; Zhang et al., 2003). Dies führt zur Stabilisierung und gegebenenfalls Aktivierung von wtp53. Die Ubiquitinierung von mutp53 hingegen scheint Mdm2-unabhängig zu verlaufen, wobei jedoch Mdm2 in dem anschließenden Degradationsprozeß eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Lukashchuk and Vousden, 2007). Folglich kann auch hier eine Deaktivierung von Mdm2 durch die Bindung ribosomaler Protein für die Stabilität von mutp53-Proteinen von Bedeutung sein. Für ein weiteres ribosomales Protein, das RPL22, konnte während der T-Zell Entwicklung gezeigt werden, dass es die p53-Biosynthese negativ beeinflusst (Anderson et al., 2007). Darüber hinaus ist für die ribosomalen Proteine L37, RPP1 und S2 (RPS2 in Tabelle 2) bekannt, dass ihre Expression durch mutp53 (hier Arg248Trp) aktiviert wird

(Loging and Reisman, 1999). Ob die Expression jedoch auf transkriptioneller Ebene oder auf posttranskriptioneller Ebene aktiviert wird, geht aus der Arbeit von Loging, *et al.* nicht hervor. Die eben genannten Beispiele aus der Literatur verdeutlichen, dass die Regulation der ribosomalen Proteinexpression durchaus das Ziel eines GOF von mutp53 sein kann und unterstützen die Theorie, dass mutp53-Proteine aus MDAMB231 und MDAMB468 Zellen zu diesem Zweck mit ribosomalen Transkripten assoziieren.

Neben der Vielzahl von Transkripten, die sich in funktionelle Gruppen einteilen lassen, wurden auch wenige funktionell eigenständige Transkripte identifiziert. Ein interessantes Transkript ist das des Tumor-assoziierten *SRAI* Gens. Wie schon im Ergebnisteil angesprochen, kodiert dieses Gen für zwei Produkte (eine Protein-kodierende RNA und eine ncRNA), deren Expression *in vivo* sowohl mit einer verstärkten Zellproliferation als auch mit Apoptose verbunden ist (Lanz et al., 2003). In Krebserkrankungen des Uterus, des Ovariums und der Brust ist das Gen *SRAI* signifikant hoch reguliert (L'Esperance et al., 2006). Das von der p53 Mutante (Arg280Lys) aus MDAMB231 gebundene Transkript entspricht dem in Datenbanken angegebenen Volllänge-Transkript (Referenznummer: AF092038), wobei mittlerweile 12 weitere unterschiedliche Transkripte identifiziert werden konnten (Übersicht in (Leygue, 2007)). Das Volllänge-Transkript wurde als funktionelle ncRNA beschrieben (Lanz et al., 1999), was darauf schließen lässt, dass auch mutp53 aus MDAMB231 mit der ncRNA interagiert. Als ncRNA wird jedes Transkript bezeichnet, das nicht translatiert wird und folglich auf der RNA-Ebene eine bestimmte Funktion ausübt (Übersicht in (Prasanth and Spector, 2007)). Generell werden den ncRNAs Funktionen bei der transkriptionellen/translationalen Regulation von Protein-kodierenden Genen, beim RNA Metabolismus, bei der Regulation der Proteinstabilität und Translokation, bei der DNA-Replikation und bei Erhalt oder Umlagerung der Chromatinarchitektur zugesprochen (Shabalina and Spiridonov, 2004). Es wird davon ausgegangen, dass ungefähr 98 % der Transkripte im menschlichen Genom nicht für Proteine kodieren (Mattick, 2005). Daher erscheint es logisch, dass mutp53-Proteine unter anderem durch die Interaktion mit ncRNA ihre unzähligen Funktionen in der Zelle vermitteln. In der Tat konnte in einer aktuellen Studie die funktionelle Interaktion von wtp53 mit der ncRNA MEG3 (*human maternally expressed gene 3*) beschrieben werden (Zhou et al., 2007). Die Autoren zeigen, dass MEG3 durch Inhibierung von Mdm2 wtp53-Proteine zur selektiven Transaktivierung von bestimmten Genen aktiviert. Ein grundlegender Faktor für diese Funktion ist die Sekundärstruktur von MEG3. Daraufhin postulierten Zhou *et al.*, dass MEG3 direkt mit wtp53 assoziiert und dadurch die Bindung an spezifische p53-abhängige Promotoren fördert.

Die vorhergesagte Sekundärstruktur von MEG3 enthält eine große Anzahl von doppelsträngigen Abschnitten und einzelsträngigen Schleifen. Ähnliche Strukturen wurden für den Kernbereich der *SRA1* RNA prognostiziert (Lanz et al., 2002). Auch die in der vorliegenden Arbeit identifizierten p53-gebundenen Transkripte weisen diese strukturellen Charakteristika auf (vgl. Abbildung 19). Darüber hinaus wurden für die in der Literatur beschriebenen wtp53/RNA Interaktionen ebenfalls *stem-loop* Strukturen der 5'UTRs verantwortlich gemacht (Miller et al., 2000; Mosner et al., 1995). Es liegt also nahe, dass bei der Interaktion von mutp53 mit RNA-Molekülen spezifische Strukturelemente der RNA eine fundamentale Rolle spielen. Ein Vergleich der Transkript-Sequenzen ergab hingegen keine signifikanten Übereinstimmungen in der Nukleotidfolge. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass mutp53-Proteine aus MDAMB231 sowie aus MDAMB468 Zellen Sequenz-unabhängig mit RNA-Molekülen assoziiert, welche die Fähigkeit besitzen, spezifische Sekundärstrukturen auszubilden.

3.2.1 Beurteilung der *in vivo* RIP Methode

Die in dieser Arbeit angewandte native RNA Immunpräzipitation stellt eine einfache, aber äußerst potente Methode zur Identifizierung Protein-gebundener RNA-Moleküle dar. Durch die Aussparung der Zell-Fixierung und der Kreuzvernetzung der Protein/RNA Komplexe wird verhindert, dass indirekt gebundene RNA-Moleküle zusammen mit p53 präzipitieren und falsch positive Ergebnisse liefern. Die Prägnanz dieser Überlegung wird anhand einer aktuellen Studie betont (Balakrishnan and Gross, 2007). Die Autoren beschreiben in dieser Arbeit die Assoziation von p53 mit dem Elongator-Komplex der RNA Polymerase II in Hefe während der Transkription. Eine Kreuzvernetzung würde p53 mit dem Proteinkomplex und der daran assoziierten RNA kovalent verknüpfen. Bei einer anschließenden Immunpräzipitation mit spezifischen p53 Antikörpern würde RNA präzipitiert, obwohl sich diese nicht im direkten Kontakt mit p53 befindet. Der native RIP birgt allerdings auch die Gefahr, RNA durch Degradation zu verlieren oder nur Fragmente der gebundenen Transkripte zu isolieren. Ferner ist es nicht ganz abwegig, dass unter diesen nicht-denaturierenden, nativen Bedingungen mutp53 mit Transkripten assoziiert, die vor der Extraktion ausschließlich in mutp53-unzugänglichen Zellkompartimenten vorhanden waren. Ein weiterer Nachteil liegt in der Verwendung des P1Cap-CDS Primers, der an Cytosin-Folgen hybridisiert, welche wiederum von der Reversen Transkriptase an die entstehende cDNA angehängt werden. Durch die Nutzung des Primers wird zwar die unspezifische cDNA

Synthese von allen gebundenen Transkripten überhaupt erst ermöglicht, das Vorhandensein von Transkript-internen Cytosin-Folgen könnte aber zu verkürzten Sequenzen führen.

Zur Vermeidung dieser internen Anlagerung könnte die Reaktionstemperatur der reversen Transkription erhöht und somit die Anlagerungsspezifität gesteigert werden. Dies ist durchaus möglich, da thermostabile Reverse Transkriptasen erhältlich sind, die noch bei 65°C aktiv sind (z.B. *ThermoScript reverse transcriptase*, Invitrogen). Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung der Methode ist die Verwendung eines *random Hexamer*-Oligonukleotids in Kombination mit P1Cap-CDS zur cDNA Synthese. Mit dieser Kombination ist es möglich auch p53-gebundene Transkripte ohne einen Poly(A)-Schwanz, wie beispielsweise rRNAs (ribosomale RNAs), tRNAs (Transfer-RNA) oder 3'-trunkierte RNAs, in den Probenumfang mit einzubeziehen.

3.3 Globale Korrelation der mutp53 Bindestellen und Transkriptkodierenden Regionen aus ChIP-Seq und RIP

Die lokale Verteilung der in ChIP-Seq Experimenten identifizierten mutp53 Bindestellen im Genom ist unter Berücksichtigung der jeweiligen Chromosomenlänge nahezu gleichmäßig. In der Zelllinie MDAMB231 wurde eine leichte Anreicherung der Bindestellen auf den Chromosomen 2, 10 und 19 festgestellt, wohingegen Bindestellen auf den Chromosomen 3, 7, 13 und 18 etwas unterrepräsentiert waren. Wenigstens für Chromosom 19 konnte die Anreicherung in MDAMB468 Zellen bestätigt werden (siehe Abschnitt 3.1). Inwiefern die relative Verteilung der Bindestellen dem tatsächlichen Zustand in der Zelle entspricht, kann letztendlich mit dem Probenumfang aus den Experimenten mit MDAMB231 Zellen und vor allem mit MDAMB468 Zellen nicht geklärt werden. Darüber hinaus ist bei dieser Darstellung der Verteilung zu beachten, dass MDAMB231 und MDAMB468 Zellen bedingt durch Translokationen, Deletionen und Duplikationen aberrante Chromosomensätze enthalten (Karyogramme der Zelllinien im Anhang A4).

Es ist ebenfalls schwierig, eine definitive Aussage über die Kategorisierung benachbarter Bindestellen in Cluster zu machen (vgl. Abbildung 12), obwohl 51 der 176 Sequenzen (ca. 29 %) aus ChIP-Seq Experimenten mit MDAMB231 Zellen in 21 verschiedene Cluster organisiert sind. Besonders in Anbetracht der oben gemachten Vorschläge zur Dynamik der mutp53/DNA Interaktion ist es fragwürdig, ob eine Vergrößerung des Probenumfanges zu weiteren Anreicherungen von verschiedenen Binde-Clustern führt oder es eher zur gleichförmigen Verteilung von mutp53 Bindestellen im Genom kommt. Auffällig ist jedoch

die Anhäufung der Bindestellen in den Zentromeren der Chromosome 10 und 4 aus ChIP-Seq Experimenten mit MDAMB231 Zellen. Im Gegensatz zu anderen *Clustern*, die allgemein nur von zwei Bindestellen gebildet werden, bestehen diese beiden *Cluster* aus drei (Chr.10) bzw. vier (Chr.4) Bindestellen. Insbesondere unter dem Aspekt, dass Satelliten-DNA in der Gesamtheit der Bindestellen unterrepräsentiert ist (vgl. Abbildung 13) kann hier von einer präferenziellen mutp53-Bindung gesprochen werden. Ob nun die korrespondierende mutp53-Bindestelle im Zentromer des Chromosoms 4 von MDAMB468 Zellen ein Hinweis auf ein allen mutp53-Proteinen gemeinsames Bindemuster darstellt, oder ob sie nur ein zufälliges Ereignis ist, kann mit den bisherigen Experimenten nicht geklärt werden. Außerdem stellt sich die Frage, ob sich mit steigender Anzahl identifizierter Bindestellen in MDAMB468 Zellen eine ähnliche Konzentration der Bindestellen in Cluster ergibt.

Ähnlich der Verteilung der mutp53 DNA-Bindestellen im Genom, ergab die chromosomale Lokalisation der kodierenden Regionen der mutp53-gebundenen Transkripte eine fast gleichförmige Verteilung über das gesamte Genom. Unter den gegebenen Umständen konnte jedoch keine deutliche lokale Konzentration der Transkript-kodierenden Regionen in *Cluster* festgestellt werden. Jedoch war es möglich, die Mehrheit der mutp53-gebundenen Transkripte in funktionelle Gruppen einzuteilen. Im Gegensatz zu den in ChIP-Seq Experimenten identifizierten mutp53 DNA-Bindestellen sind die mutp53-gebundenen Transkripte eher funktionell geclustert.

Mit Hilfe des Modells der Transkriptions-Fabriken (*transcription factories*) lässt sich die mögliche Wirkungsweise von mutp53-Proteinen ableiten. Das Konzept der *transcription factories* wurde von Dean Jackson und Peter Cook formuliert. Es besagt, dass verschiedene transkriptionell aktive Gene durch chromosomale Umlagerungen lokal an Orten konzentriert werden, an denen unterschiedliche Komponenten der Transkriptionsmaschinerie, wie beispielsweise RNA Polymerase II oder Transkriptionsfaktoren, kumuliert vorliegen (Cook, 2002; Grande et al., 1997; Iborra et al., 1996; Jackson et al., 1993). Hierbei bilden die Transkriptions-Fabriken einen statischen Komplex an dem simultan individuelle Gene angelagert, transkribiert und prozessiert werden (Übersicht in (Bartlett et al., 2006)).

Zusammengefasst kann für die Wirkungsweise der endogenen p53-Mutanten in MDAMB231 und MDAMB468 Zellen demnach folgende Mechanismen postuliert werden: (a) mutp53 assoziiert mit Bereichen der DNA, die bestimmte repetitive DNA-Elemente beinhalten und dadurch zur Ausbildung von höheren Sekundärstrukturen, wie beispielsweise

Chromatinschleifen, fähig sind. Folglich wäre es möglich, räumlich getrennte Gene in eine transkriptionelle Einheit (*transcription factory*) zu integrieren. Die Veränderung in der Chromatinarchitektur könnte einerseits durch mutp53 selbst hervorgerufen werden, andererseits könnte mutp53 als Plattform für weitere *chromatin remodeling* Faktoren dienen, (b) mutp53 trägt zur Feinabstimmung der Genexpression bei, indem es mit den Transkripten interagiert und deren Expression fördert bzw. inhibiert oder deren Degradation bestimmt. Dies impliziert, dass die Regulation spezifischer Gene durch die Wechselwirkung von mutp53-Proteinen mit den jeweiligen Promotoren eher, wenn überhaupt, eine untergeordnete Rolle für das Expressionsmuster in Tumorzellen spielt. Dafür scheint die mutp53-Interaktion mit Gen-Transkripten entscheidend zur Reglementierung des Transkriptoms in Tumorzellen beizutragen.

Um hierüber Klarheit zu erlangen, müsste in Folgeexperimenten ein möglicher Einfluss auf das Expressionsmuster durch die mutp53-Bindung an DNA und durch die Assoziation mit RNA validiert werden.

3.4 Die Expression exogener shRNA gegen mutp53 überlagert sich mit der RNA-Bindungseigenschaft von mutp53 und destabilisiert die Integrität der Zelle

Mit der Abschaltung der mutp53-Expression in MDAMB231 und MDAMB468 Zellen mittels RNAi wurden zwei Ziele verfolgt. Einerseits sollte anhand einer Analyse des zellulären Expressionsmusters der funktionelle Einfluss des mutierten Tumorsuppressors auf das Transkriptom der Zelle evaluiert werden. Andererseits ist es, in Anbetracht der beobachteten Funktion von mutp53 als RNA-bindendes Protein, von Interesse, welche globalen Effekte für die Zelle aus der Eliminierung von mutp53 resultieren.

Die Generierung eines stabilen mutp53 *knock downs* in MDAMB231 und MDAMB468 Zellen blieb jedoch ohne Erfolg. Vor allem in MDAMB468 hatte das Abschalten der mutp53-Expression drastische Folgen. Selektionierte Zellen adherierten nach dem Umsetzen nicht mehr und konnten folglich nicht subkultiviert werden. Schon in früheren Arbeiten wurde beschrieben, dass die Herunterregulierung des mutp53-Proteins durch RNAi die Inhibierung des Zellwachstums und verringerte Tumorigenität zur Folge hat (Bossi et al., 2006; Scian et

al., 2004; Shohat et al., 1987). Die Autoren schlussfolgerten, dass sich der GOF von mutp53-Proteinen auf transkriptioneller Ebene manifestiert.

Die Daten der hier vorliegenden Arbeit weisen jedoch auch auf eine essentielle Rolle von p53 am RNA-Metabolismus der Zelle hin. Die Interaktion von mutp53 mit funktionellen RNAs könnte zur Kontrolle ihrer Translation und Degradation durch mutp53 beitragen. Eine weitere Funktion der mutp53/RNA Interaktion lässt sich aus den Ergebnissen des transienten p53 *knock downs* in MDAMB231 ableiten. Hier zeigte sich überraschenderweise, dass 36 Stunden nach der Transfektion die mutp53-Transkriptmenge durch die Expression der *scrambled* shRNA deutlich ansteigt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass mutp53 durch die Interaktion mit RNA die zelluläre RNA-Konzentration auf einem konstanten Wert hält. Demnach muss bei einer zusätzlichen Expression von exogener RNA die mutp53-Proteinkonzentration in der Zelle erhöht werden. Die Expression einer shRNA gegen p53 wiederum führt zu der Degradation neu gebildeter p53 mRNAs und einer verminderten mutp53-Proteinkonzentration. Durch den Mangel an mutp53-Proteinen steigt möglicherweise die intrazelluläre RNA-Konzentration auf einen kritischen Wert an, was schließlich die Zelltod der Zelle auslösen könnte.

Ein möglicher apoptotischer Signalweg kann hier über Komponenten der Interferonantwort gegen dsRNA vermittelt werden. In zwei unabhängigen Arbeiten wurde gezeigt, dass sowohl einige *in vitro* transkribierte siRNAs als auch von einem Vektor exprimierte shRNAs zu einer Aktivierung der dsRNA-abhängigen Protein Kinase (PKR) führen (Bridge et al., 2003; Sledz et al., 2003). Bridge *et al.* postulierten, dass der Überschuss an shRNA die endogene siRNA Prozessierungsmaschinerie absättigt und längere unprozessierte dsRNA akkumulieren. Die aktivierte PKR phosphoryliert daraufhin die α -Untereinheit des eukaryotischen Translations-Initiationsfaktor-2 (eIF2 α), was die Unterbrechung des Zellwachstums und die Inhibierung der Proteinbiosynthese zur Folge hat (Williams, 1999). Tatsächlich wurde in MDAMB231, MDAMB468 und MCF7 Zellen eine erhöhte eIF2 α - und PKR-Expression im Vergleich zu nicht-tumorigenen Brustzelllinien festgestellt, wobei jedoch eIF2 α zumindest in MCF7 Zellen nicht phosphoryliert vorlag (Savinova et al., 1999). Dies könnte erklären, warum die exogene Überexpression von shRNA in den untersuchten Zelllinien (vor allem in MDAMB468) solch drastische Effekte hat. Einhergehend mit der Aktivierung von PKR würde eine Phosphorylierung der abnormal hohen Mengen von eIF2 α stattfinden, was schließlich zu einem Zusammenbruch der Proteinbiosynthese führt. Der PKR-inhibierende Faktor wiederum könnte mutp53 selbst sein. Zumindest wurde in einer *in vitro* Studie eine funktionelle Assoziation von PKR und wtp53 beschrieben (Cuddihy et al., 1999).

3.5 wtp53 aus MCF7 Zellen interagiert mit RNA *in vivo*

In Analogie zu mutp53 in MDAMB231 bzw. MDAMB468 Zellen, liegt auch in MCF7 Zellen, die mit γ -Strahlen behandelt wurden, ein großer Anteil des aktivierten wtp53 in der löslichen Fraktion vor. Dies verdeutlichen die Extraktionsanalysen in Abschnitt 2.3. Jedoch musste im Vergleich zu mutp53-exprimierenden Zellen die Stringenz für eine ausreichende Extraktion von wtp53 erhöht werden. Dies lässt darauf schließen, dass wtp53 mit einer höheren Affinität an DNA bindet als mutp53-Proteine und/oder ein Teil der gebildeten wtp53-Proteine durch die Behandlung mit γ -Strahlen kovalent mit dem Chromatin vernetzt wurde.

In RIP Experimenten führte die Stabilisierung und Aktivierung von wtp53 durch UV-C Bestrahlung zu einem erhöhten Hintergrundsignal. Ferner induzieren die meisten der in der Laborpraxis angewendeten Methoden zur Aktivierung von p53, wie beispielsweise γ -Strahlen, UV-C, Adriamycin und Mitomycin C, DNA Schäden und gegebenenfalls Kreuzvernetzungen, die wiederum die Transkription nachhaltig beeinflussen können. Folglich ist nicht sichergestellt, dass in RIP Experimenten mit behandelten Zellen ein natürlicher Zustand der wtp53/RNA Interaktion analysiert wird. Daher wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Für nicht induzierte MCF7 Zellen konnten in RIP Experimenten bisher 45 wtp53-gebundene Transkripte identifiziert werden. Die Verteilung der kodierenden Regionen der wtp53-gebundenen Transkripte im Genom und die Einteilung der Transkripte in funktionelle Gruppen (vgl. Tabelle 2) entsprechen denen der mutp53-gebundenen Transkripte aus MDAMB231 und MDAMB468 Zellen. Zusätzlich scheinen trunkierte und 3'UTR-Transkripte präferenzielle Interaktionspartner von wtp53 darzustellen, wobei die 3'UTR-Transkripte mit 46 % einen signifikanten Anteil an den Transkripten haben. Daneben konnten sechs Transkripte Intronen zugeordnet werden und vier weitere Transkripte intergenischen Bereichen. Zahlreiche ncRNAs werden in intergenischen Regionen und Intronen kodiert (Übersicht in (Prasanth and Spector, 2007)), wobei für einige intronische ncRNA, die als antisense RNAs funktionieren, eine Überexpression in Tumorzellen nachgewiesen werden konnte (Chan et al., 2005; Iorio et al., 2005; Lottin et al., 2002; Rangel et al., 2003; Reis et al., 2004; Tam and Dahlberg, 2006). Die Daten weisen darauf hin, dass wtp53 hauptsächlich mit regulatorischen RNAs interagiert und dadurch posttranskriptionell die Genexpression beeinflussen kann.

Neben den Gemeinsamkeiten der RIP Daten von Experimenten mit wtp53 und mutp53 konnten auch entscheidende Unterschiede festgestellt werden. So konnte die Bindung der

eigenen mRNA nur bei wtp53-Proteinen beobachtet werden. Dies ist im Einklang mit einer früheren Arbeit im murinen System unserer Arbeitsgruppe (Mosner et al., 1995) und unterstreicht die Annahme, dass die Interaktion mit der eigenen mRNA zur Autoregulation der wtp53-Expression beiträgt.

Weiterhin konnte im Gegensatz zu mutp53 keine wtp53-assoziierten Transkripte identifiziert werden, die sich der Gruppe der *mitochondrialen Atmungskette* in Tabelle 2 zuordnen lassen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Bindung der Transkripte durch mutp53 kein methodisches Artefakt, sondern eine mutp53-spezifische Interaktion darstellt. Sollte dies in folgenden RIP Experimenten weiterhin bestätigt werden, wäre dies ein Anzeichen für ein GOF.

3.5.1 wtp53 bindet an seine eigene mRNA und die mRNA spezifischer

Zielgene

In den Abschnitten 2.4.6 und 2.4.7 konnte durch RT-PCR gezeigt werden, dass wtp53 aus MCF7 Zellen im nicht aktivierten Zustand mit seiner eigenen mRNA und mit der mRNA von den p53-Zielgenen *p21^{Waf1/Cip1}* und *Mdm2* im Komplex vorliegt und wahrscheinlich dadurch die Expression dieser Gene posttranskriptionell reguliert. Die komplementäre Sequenz der verwendeten Primer lag jeweils in einem Exon des Gesamttranskripts, weshalb keine definitive Aussage darüber getroffen werden kann, ob die p53-gebundenen Transkripte für p21 und Mdm2 die vollständige mRNAs oder alternative, verkürzte Transkripte repräsentieren. Für die kodierende RNA des *GADD45* Gens konnte keine Assoziation mit wtp53 nachgewiesen werden. Da Transkripte aus intronischen Bereichen und der 3'UTR in diesem Ansatz nicht berücksichtigt werden, ist es aber nicht auszuschließen, dass regulatorische RNAs aus intronischen Regionen oder 3'UTR von wtp53 gebunden werden.

In Abschnitt 2.1.1 konnte die Transkription des vollständigen kodierenden Bereichs des *TP53* Gens in MCF7 Zellen verifiziert werden. Folglich ist anzunehmen, dass wtp53 tatsächlich mit dem Volllänge-Transkript assoziiert. Die Quantifizierung des Transkripts in nicht behandelten und bestrahlten MCF7 Zellen ergab, dass sich die Menge der p53 mRNA durch die Aktivierung von p53 nicht wesentlich ändert. Dies konnte schon in früheren Studien beobachtet werden (Kastan et al., 1991). Mosner *et al.* demonstrierten im murinen System, dass die erhöhte p53-Proteinkonzentration nicht aus einer gesteigerten Transkriptionseffizienz des *TP53* Gens resultiert, da auch bei einer Inhibierung der Transkription die p53-Proteinbiosynthese möglich war. Die Freisetzung der p53-gebundenen p53 mRNA aus dem

p53-Protein/p53 mRNA Komplex als Reaktion auf zellulären Stress könnte eine Erklärung für diese Beobachtung sein.

In diesem Zusammenhang sind auch die Daten aus einem Nebenprojekt von Bedeutung, das im Rahmen dieser Disseration in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Biochemie und Molekularbiologie von Professor Dr. Ulrich Hahn an der Universität Hamburg durchgeführt wird. Ziel dieses Projekts ist die Entwicklung eines funktionellen Aptamers gegen wtp53. Aptamere sind kurze, nicht kodierende RNA Moleküle, die spezifisch mit Proteinen interagieren und deren Funktion inhibieren können. In den bisher durchgeführten funktionellen Analysen wurde der Einfluß eines spezifischen Aptamers gegen wtp53 und einer randomisierten Kontrollsequenz auf die Expression des *TP53* Gens und der wtp53 Zielgene *p21^{waf/Cip1}*, *GADD45* und *Mdm2* mittels Q-RT-PCR analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Transkription aller untersuchten Gene in unbestrahlten MCF7 Zellen sowohl durch die Expression des Aptamers, als auch durch die der Kontrollsequenz dereguliert wurde und signifikant anstieg. Dass der Effekt sowohl bei dem spezifischen Aptamer, als auch bei der Kontrollsequenz zu beobachten war, könnte darauf hinweisen, dass die exogen exprimierte ncRNA in unstimulierten Zellen eine globale Deregulierung der Genexpression verursacht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Fähigkeit mit RNA zu interagieren keine neu erworbene Eigenschaft von mutp53-Proteinen ist, sondern eine intrinsische Funktion des wtp53-Proteins zur posttranskriptionellen Regulation des Transkriptom darstellt. Wie auch schon beim mutp53 *knock down* in MDAMB231 bzw. MDAMB468 Zellen beobachtet werden konnte, führt die exogene Expression von RNAs (hier eines Aptamers) in MCF7 Zellen zu einer Deregulierung der Interaktion von wtp53 mit zellulärer RNA. Dies unterstützt die Vermutung, dass p53 durch die RNA-Bindung unter anderem auch zum intrazellulären Gleichgewicht zwischen gebundener und ungebundener RNA beiträgt.

3.6 Epigenetisches Modell des *mutp53*-Interaktoms in MDAMB231 und MDAMB468 Zellen

Die in der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen unterstützen die Vorstellung, dass mutp53 ein Struktur-spezifisches Bindeprotein ist, das durch die Bindung an strukturell flexible DNA-Elemente (z.B. S/MARs) die globale Architektur des Chromatins beeinflussen kann. Veränderungen in der Chromatinkonformation (*chromatin remodeling*) könnten einerseits durch intrinsische Eigenschaften des mutp53-Proteins selbst vermittelt werden, und tatsächlich gibt es Hinweise in der Literatur, dass wtp53 nachhaltig die Chromatinarchitektur

verändern kann (Allison and Milner, 2003; Allison and Milner, 2004; Rubbi and Milner, 2003). Andererseits könnte das mutp53-Protein als Plattform für weitere Chromatin-modifizierende Faktoren fungieren. Einige solcher Faktoren, die mit wtp53 interagieren, wurden bereits beschrieben (Espinosa and Emerson, 2001; Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001).

Die biologische Funktion von mutp53 in der Tumorzelle lässt sich jedoch nicht allein durch die Struktur-spezifische Bindung und die daraus resultierende Chromatin-Umstrukturierung erklären. Die hier präsentierten Daten weisen auf eine zusätzliche Funktion von mutp53 und wtp53 als RNA-bindende Proteine hin. Demnach scheint mutp53 durch die Interaktion mit RNA eine zentrale Rolle im zellulären RNA Metabolismus zu übernehmen. Diese Interaktion könnte zur Konfiguration von funktionellen RNAs, der translationalen Kontrolle von mRNAs, sowie zur Regulation der globalen RNA-Konzentration beitragen. Hierbei stellt die regulatorische RNA-Interaktion keine von mutp53 neu erworbene Eigenschaft dar, sondern basiert auf einer intrinsischen Funktion von wtp53. Dies geht einerseits aus den RIP Experimenten mit MCF7 Zellen hervor. Andererseits wird dies durch publizierte Daten verdeutlicht, die eine funktionelle Assoziation von wtp53 mit dem Elongationskomplex der RNA Polymerase II beschreiben (Balakrishnan and Gross, 2007) und eine exonukleolytische Kapazität von wtp53 gegenüber RNA aufzeigen (Bakhanashvili et al., 2007).

Zusammenfassend lässt sich folgendes Modell für den Wirkmechanismus von mutp53 in der Tumorzelle postulieren: mutp53-Proteine akkumulieren an Bereiche der DNA, die durch repetitive Elemente die Fähigkeit zur strukturellen Dynamik besitzen. Durch mutp53 selbst oder durch mutp53-akquirierte Faktoren kommt es zu einer lokalen Umlagerung des Chromatins und zur Ausbildung von Chromatinschleifen. Die Spitzen dieser Chromatinschleifen werden in Transkriptions-Fabriken konzentriert, was zur simultanen Transkription von unterschiedlichen Genen führt. Die Expression der Gene wird durch die RNA Bindung von mutp53-Proteinen exakt reguliert, indem beispielsweise funktionelle ncRNAs oder die Translation von mRNAs inhibiert werden. Die Subtraktion von mutp53 aus diesem System oder die Überexpression von exogenen RNAs stört den fein abgestimmten RNA Metabolismus, was zu einer Induktion von zellulären Notfallprogrammen, z.B. dem PKR-vermittelten Stopp der Proteinbiosynthese, führt. Daher kann mutp53 als essentieller Faktor in den Tumorzellen angesehen werden, der neben der *chromatin remodeling* Kapazität auf DNA-Ebene hauptsächlich als posttranskriptioneller Regulator zur Kontrolle des Transkriptomts der Tumorzelle beiträgt. Die funktionelle Verknüpfung auf DNA und RNA Ebene klassifiziert mutp53 als epigenetischer Faktor.

4 MATERIAL

4.1 Chemikalien

Die handelsüblichen Chemikalien wurden in Analysequalität von den Firmen Biorad (München), Fluka (Neu-Ulm), Gibco BRL (Berlin), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Steinheim) und Roche (Basel) bezogen. Darüber hinaus wurden spezielle Chemikalien von folgenden Firmen bezogen:

30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37.5:1)	National Diagnostics, Atlanta, USA
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)	Serva, Heidelberg
Ampicillin	USB, Cleveland, USA
Aprotinin (Trasylol®)	Bayer, Leverkusen
APS	Sigma-Aldrich, Steinheim
ATP	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Protein Assay (Bradford)	BioRad, München
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA , Fraktion V	Roche, Basel, Schweiz
Cetavlon (<i>N</i> -cetyl- <i>N,N,N</i> -trimethylammonium bromide, CTAB)	Merck Biosciences GmbH, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Heidelberg
DAPI	Invitrogen, Karlsruhe
DEPC	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMEM-Pulver	Gibco BRL, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid, p.a.	Merck, Darmstadt
DTT	Serva, Heidelberg
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Roche, Basel, Schweiz
FCS	PAA, Pasching, Österreich
Geneticin-Sulfat (G418®)	Gibco BRL Life, Freiburg
Glyzerol	Serva, Heidelberg
Glykogen	Roche, Basel, Schweiz
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kanamycin	Serva, Heidelberg
Leupeptin	Biomol, Hamburg
L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
Magermilchpulver	Neuform, Lüneburg
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim

Mowiol [®] 4-88 Reagent	Calbiochem, Schwalbach
Natrium-Desoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Neomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
NEAA	PAA, Pasching, Österreich
Nonidet [®] P40 (NP-40)	Fluka, Neu-Ulm
dNTPs	MBI Fermentas, Heidelberg
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pefablock [®] SC	Biomol, Hamburg
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Biomol, Hamburg
Proteinase K, rec.	Roche, Basel, Schweiz
Roti [®] -Phenol/C/I (25:24:1)	Roth, Karlsruhe
Protein-G-Sepharose	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ribonukleosid Vanadyl Komplexe	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
SDS	Serva, Heidelberg
SeaKem [®] LE Agarose	Lonza, Wuppertal
SuperSignal West Dura	
Extended Duration Substrat	Pierce, Rockford, USA
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton [®] X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trizma [®] Base (Tris Base)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trizol [®] Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween [®] 20	Fluka, Neu-Ulm
Vectashield [®] H-100	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Zeocin [™]	Invitrogen, Karlsruhe

4.2 Verbrauchsmaterialien

Bakterienschalen	Nunc, Wiesbaden
Gewebekulturschalen	Nunc, Wiesbaden
Dynabeads-Protein G	Dynal, Oslo, Norwegen
Filterpapier Whatman 3MM	Schleicher und Schüll, Dassel
Immobilon [™] -P Membran	Millipore, Eschborn
Membranfilter (0.2µm)	Sartorius, Göttingen
Eppendorf Reaktionsgefäße (1.5ml und 2ml)	Eppendorf, Hamburg
PCR Reaktionsgefäß (200µl)	Biozym, Oldendorf
Zentrifugationsgefäße (15 und 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Slide-A-Lyzer Dialyse Kassette, 7K MWCO	Pierce, Rockford, USA
MicroSpin [™] S-400 HR Säulen	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Kodak X-OMAT [®] , Biomax [™] MR	Kodak, USA

4.3 Geräte

4.3.1 Waagen

Feinwaage H54AR	Mettler-Toledo, Giessen
Oberschalenwaage PE360	Mettler-Toledo, Giessen

4.3.2 Schüttler und Mischgeräte

Mixer 5432	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Rollenschüttler RollerMixer SRT1	Stuart Scientific, Watford, UK
Taumelschüttler Polymax 2040	Heidolph, Schwabach
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach
Vortex-Mixer Certomat MV	B.-Braun Biotech, Melsungen

4.3.3 Zentrifugen

Evaporationszentrifuge SpeedVac [®]	Savant, NY, USA
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5810R (Kühlung)	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Rotanta 96R	Hettich, Tuttlingen
Standzentrifuge RC 5C Plus	Sorvall, Bad Homburg

4.3.4 Mikroskope

Mikroskop IMT-2	Olympus, Hamburg
Mikroskop CK40	Olympus, Hamburg
Phasenkontrastmikroskop ULW CD0.30	Olympus, Hamburg

4.3.5 Gelsysteme

Horizon 58; 11-14; 20-25	Gibco BRL, Maryland, USA
SDS-Page Mighty Small II SE250	Hoefer, San Francisco, USA
Western-Blot Mini Trans Blot [™] Cell	BioRad, München
Geldokumentation BioDoc Analyze	Biometra, Göttingen

4.3.6 Geräte für Arbeiten im prokaryotischen System

Brutschrank T5042 E	Heraeus, Hanau
Inkubationsschüttler Multitron	Infors, Basel Schweiz

4.3.7 Geräte für Arbeiten im eukaryotischen System

Brutschrank (Begasung) Hera cell	Heraeus, Hanau
Sterilbank Hera safe	Heraeus, Hanau

4.3.8 Spannungsquellen

Power Pac 200	BioRad, München
Power Pac 3000	BioRad, München

4.3.9 Weitere Geräte

Nucleofactor I	Amaxa, Köln
Milli-Q Wasser	MilliPore, Eschborn
PCR Cycler PTC 200	MJ Reserach, Massachusetts, USA
Stratalinker [®] UV Crosslinker 1800	Stratagene, La Jolla, USA
Ultraschallgerät Bioruptor UCD-200	Diagenode, Brüssel, Belgien
Spektrophotometer ND100	Nano Drop
Spektrophotometer DU [®] 800	Beckmann-Coulter, Krefeld
pH-Meter SevenEasy	Mettler-Toledo, Giessen
Heizblock Dri-Block DB-2A	Techne, Cambridge, UK
Entwicklermaschine Classic E.O.S.	AGFA, Köln
BioStation IM	Nikon GmbH, Düsseldorf
FACS Aria	BD Biosciences, Heidelberg
Gefriertrockner Finn-Aqua [®]	
Lyovac GT 2E	Steris Corporation, Mentor, USA
Real-Time PCR 7500 Fast System	Applied Biosystems, Darmstadt

4.4 Kits

RNeasy [®] Mini	QIAGEN, Hilden
RNeasy [®] MiniElute	QIAGEN, Hilden
RNase-Free DNase Set	QIAGEN, Hilden
QIAshredder	QIAGEN, Hilden
RevertAid [™] H-Minus First Strand	
cDNA Synthesis	MBI, Fermentas, Heidelberg
Ready-To-Go T4 DNA Ligase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
NucleoSpin [®] Extract II	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin [®] Plasmid	Macherey Nagel, Düren
NucleoBond [®] PC500	Macherey-Nagel, Düren
Nucleofactor V	Amaxa, Köln
Power SYBR [®] Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt

4.5 Größenstandards

4.5.1 DNA-Größenstandard

Gene Ruler [™] Ultra Low Range DNA Ladder,	MBI Fermentas, Heidelberg
Gene Ruler [™] 100bp DNA Ladder,	MBI Fermentas, Heidelberg
Gene Ruler [™] 1kb DNA Ladder,	MBI Fermentas, Heidelberg

4.5.1 Protein-Größenstandards

Prestained SDS Molecular Weight Marker (SDS-7B)	Sigma-Aldrich, Steinheim
---	--------------------------

4.6 Enzyme

Alle Verwendeten Enzyme wurden, wenn nicht anders angegeben, mit dem dazugehörigen Puffer verwendet.

Restriktions Endonukleasen	New England Biolabs (NEB), Frankfurt a.M.
DNase I, PCR Grade	Invitrogen, Karlsruhe
RNase A	Sigma-Aldrich, Steinheim
RNase H	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	NEB, Frankfurt a.M.
T4 Polynukleotid Kinase	NEB, Frankfurt a.M.
Proteinase K, rec., PCR Grade	Roche, Basel
Calf Intestine Phosphatase (CIP)	NEB, Frankfurt a.M.
<i>Taq</i> -DNA Polymerase	Eppendorf, Hamburg
<i>Pfu</i> -DNA Polymerase	MBI Fermentas, Heidelberg

4.7 Stammlösungen

Alle Stammlösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Milli-Q Wasser angesetzt und autoklaviert. Hitzeempfindliche Substanzen wurden steril filtriert (Membranfilter, Porengröße 0,2µm).

Aprotinin 1000x	2mg/ml
Leupeptin 1000x	0,5mg/ml
Pefablock [®] SC 100x	100mg/ml
Pepstatin A 1000x	1mg/ml in Methanol
Ampicillin 2000x	100mg/ml
Kanamycin 1000x	30mg/ml
G418 [®]	50mg/ml in PBS
Puromycin	50mg/ml in PBS
Zeocin [™]	100mg/ml in PBS
DAPI 2000x	1mg/ml
Ethidiumbromidlösung	100 mg/100 ml
X-Gal 2% (w/v) in DMF	
IPTG 10mM	

4.8 Puffer und Lösungen

Alle Puffer wurden mit Milli-Q Wasser angesetzt und anschließend sterilisiert (vgl. Stammlösungen).

Antikörper

Bindepuffer 10x 3M NaCl; 1M Glycin; mit NaOH auf pH 9.0 einstellen

<i>Antikörper</i>	
<i>Elutionspuffer</i>	100mM Citrat mit KOH auf pH 3.0 einstellen
<i>Coomassie R250</i>	45% Methanol; 10% Essigsäure; 0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250
<i>Coomassie R250 Entfärbelösung</i>	10% (v/v) Isopropanol; 10% (v/v) Essigsäure
<i>CSK I</i>	10mM PIPES pH 6.8; 100mM KCl; 300mM sucrose; 3mM MgCl ₂ ; 1mM EGTA; 0.5% Triton X-100; 10mM 2-Mercaptoethanol
<i>CSK I/Glycin</i>	10mM PIPES pH 6.8; 100mM KCl; 300mM sucrose; 3mM MgCl ₂ ; 1mM EGTA; 0.5% Triton X-100; 10mM 2-Mercaptoethanol; 125mM Glycin
<i>CSK IV</i>	10mM PIPES pH 6.8; 50mM KCl; 300mM sucrose; 3mM MgCl ₂ ; 10mM EGTA
<i>Dialysepuffer</i>	10mM HEPES/NaOH pH 7.5
<i>E1A Puffer</i>	50mM HEPES-NaOH pH 7.5; 100mM NaCl; 0.25% Nonidet P-40
<i>E1A Puffer-250</i>	50mM HEPES-NaOH pH 7.5; 250mM NaCl; 0.25% Nonidet P-40
<i>Extraktionspuffer (Genomische DNA)</i>	10mM Tris-HCl pH8.0; 0,01mM EDTA; 0,5%SDS; 200µg/ml Proteinase K
<i>KCl-Puffer</i>	200mM KCl; 10mM Tris-HCl pH 7.5; 0.2mM EDTA
<i>Leammler Puffer (SDS-Page) 10x</i>	0,25M Tris-HCl pH 8.9; 0,2M Glycin, 0,1% (w/v) SDS
<i>LiCl-Puffer</i>	250mM LiCl; 10mM Tris-HCl pH 8.0; 1mM EDTA; 0.5%Na-deoxycholate; 0.5% Nonidet P-40
<i>Lysepuffer</i>	1% SDS; 50mM Tris-HCl pH 7.5; 10mM EDTA
<i>PBS</i>	137mM NaCl; 2.7mM KCl; 4.3mM Na ₂ HPO ₄ ; 1.5mM KH ₂ PO ₄ pH 7.4
<i>PBS/Glycin</i>	137mM NaCl; 2.7mM KCl; 4.3mM Na ₂ HPO ₄ ; 1.5mM KH ₂ PO ₄ pH 7.4; 125mM Glycin
<i>Proteinase K Puffer</i>	0,5%SDS; 20mM Tris-HCl pH 8.0; 2mM CaCl ₂

<i>Puffer A</i> <i>(Isolierung Nuklei)</i>	20mM HEPES pH 7.6; 100mM KCl; 5% (w/v) Sucrose; 0,25mM EGTA; 0,5mM DTT
<i>Puffer B</i> <i>(Isolierung Nuklei)</i>	20mM HEPES pH 7.6; 100mM KCl; 5% (w/v) Sucrose; 0,25mM EGTA; 0,5mM DTT; 0,8% (v/v) NP40
<i>RIPA</i>	10mM Tris-HCl pH 8.0; 140mM NaCl; 0.5% Triton X-100; 0.1% SDS; 0.1% Na-deoxycholate
<i>RIPA-500</i>	10mM Tris-HCl pH 8.0; 500mM NaCl; 0.5% Triton X-100; 0.1% SDS; 0.1% Na-deoxycholate
<i>RNase A</i>	10mg/ml in 10mM Tris-HCl pH 7.5; 15mM NaCl; 15' kochen auf RT abkühlen lassen; bei -20°C lagern
<i>SDS Probenpuffer</i> <i>2x</i>	100mM Tris HCl pH 6.8; 4% SDS; 0,05% (w/v) Bromphenolblau; 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol; 60% (v/v) Glycerol
<i>SDS Probenpuffer</i> <i>6x</i>	130mM Tris HCl pH 6.8; 4,6% SDS, 0,05% (w/v) Bromphenolblau; 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol; 60% (v/v) Glycerol
<i>SDS Sammelgel</i>	0,1% SDS; 0,125 M Tris-HCl pH 6.8
<i>SDS Trenngel</i>	0,1% SDS; 0,375 M Tris-HCl pH 8.8
<i>TAE 50x</i>	2M Tris-HCl pH 8.0; 1M Eisessig, 0,05M EDTA
<i>TB Puffer</i>	10mM PIPES; 15mM CaCl ₂ ; 250mM KCl; pH auf 6.7 einstellen (KOH); 55mM MnCl ₂ zugeben
<i>TBE 10x</i>	890mM Tris-HCl pH 8.0; 890mM Borsäure, 20mM EDTA
<i>TBS 10x</i>	1,37M NaCl; 1M Tris-HCl pH 7.3
<i>TBST</i>	1xTBS; 0,5% (v/v) Tween 20
<i>TE Puffer</i>	10mM Tris-HCl pH 7.5 oder 8.0; 1mM EDTA
<i>TE Puffer</i> <i>(DNA Storage)</i>	10mM Tris-HCl pH 7.5 oder 8.0; 0,1mM EDTA
<i>Transferpuffer 10x</i> <i>(Western Blot)</i>	0,5M Tris-HCl pH 8.3; 1,92M Glycin

4.9 Nährmedien für die Bakterienkultur

<i>LB (Luria Bertani)</i>	10g Bacto-Trypton; 5g Bacto-Yeast-Extrakt; 10g NaCl; ad 1000ml H ₂ O, pH 7.5 einstellen; autoklavieren
<i>SOB</i>	20g Bacto-Trypton; 5g Bacto-Yeast-Extrakt; 0,5g NaCl; ad 1000ml H ₂ O; autoklavieren; vor Gebrauch 10ml 1M MgCl ₂ und 10ml MgSO ₄ dazugeben
<i>SOC</i>	SOB Medium + 2ml sterilfiltrierte 20% (w/v) Glucose auf 100ml Medium
<i>TB (Terrific-Broth)</i>	12g Bacto-Trypton; 24g Bacto-Yeast-Extrakt; 4ml Glycerin; ad 900ml H ₂ O; autoklavieren; 100ml sterile 0,17M KH ₂ PO ₄ ; 0,72M K ₂ HPO ₄ zugeben

4.10 Bakterienstämme

<i>Sure2</i>	<u>Genotyp:</u> e14–(McrA–) Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)171 <i>endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5(Kanr) uvrC</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tetr) Amy Camr] Stratagene, La Jolla, USA
<i>X11 Blue</i>	<u>Genotyp:</u> <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tetr)] Stratagene, La Jolla, USA
<i>One Shot® TOP10</i>	<u>Genotyp:</u> F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX7recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i> Invitrogen, Karlsruhe (Casadaban and Cohen, 1980; Grant et al., 1990)

4.11 Plasmide

pBluescript II SK+ (2961 bp)	Stratagene, La Jolla, CA, USA
pENTR/H1/TO (3869 bp)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pSUPERIOR.neo+GFP (5430 bp)	OligoEngine, Seattle, WA, USA
pSuper.p53	OligoEngine, Seattle, WA, USA

4.12 Eukaryotische Zellen

MDAMB231 (ICLC, Genua, Italien)

p53-Mutation: AGA → AAA; Arg280Ly

Morphologie: Epithelial

Spezies: human, weiblich, 51 Jahre

Gewebe: Brust

Tumor: Adenokarzinoma; aus Pleuraerguss

Eigenschaften: Östrogenrezeptor negtaiv, karzinogen in Nacktmäusen; exprimiert WNT7B

Onkogen

(Cailleau et al., 1974)

MDAMB468 (ICLC, Genua, Italien)

p53-Mutation: CGT → CAT; Arg273His

Morphologie: Epithelial

Spezies: human, weiblich, 51 Jahre

Gewebe: Brust

Tumor: Adenokarzinoma; aus Pleuraerguss

Eigenschaften: Östrogenrezeptor alpha negtaiv, karzinogen in Nacktmäusen

(Brinkley et al., 1980; Cailleau et al., 1978)

MCF7 (CCS, Hamburg)

Wildtyp p53

Morphologie: Epithelial

Spezies: human, weiblich, 69 Jahre

Gewebe: Brust

Tumor: Adenokarzinoma; aus Pleuraerguss

Eigenschaften: Östrogenrezeptor positiv; exprimiert WNT7B und Tx-4 Onkogene, TNF α inhibiert Zellwachstum

(Brandes and Hermonat, 1983; Sugarman et al., 1985)

4.13 Nährmedien für eukaryotische Zellen

Medium für die Zelllinien *MDAMB231* und *MDAMB468*:

DMEN

+ 10% (v/v) FCS

+ 2mM L-Glutamin

+ 1% NEAA

Medium für die Zelllinie *MCF7*:

DMEM

+10% FCS

4.13 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden entweder von Invitrogen⁽¹⁾, Sigma Genosys⁽²⁾ oder von Eurogentec⁽³⁾ synthetisiert und HPLC aufgereinigt.

4.13.1 Primer für Klonierungen

Bezeichnung	Sequenz 5'→ 3'	Anwendung
CATCH A ⁽²⁾	AATTCGGTCAAGTGAACACGAGCAG	Adaptor ChIP-Seq
CATCH Bp ⁽²⁾	(p)CTGCTCGTGTTCACTTGACCGAATT	Adaptor ChIP-Seq
Linker2-A ⁽²⁾	CACCATGGGCAGGTGAATTCGGTCTCG	Zirkularisierung pENTR H1/TO
Linker2-B ⁽²⁾	AAAACGAGACCGAATTCACCTGCCCAT	Zirkularisierung pENTR H1/TO
scrA ⁽²⁾	CACCACGAACTTTTGGACGCGCACTGC- GAACAGTGC GCGTCCAAAAGTTCG	shRNA gegen humanes p53 (PENTR H1/TO)
scrB ⁽²⁾	AAAACGAACTTTTGGACGCGCACTGTTC- GCAGTGC GCGTCCAAAAGTTCGT	shRNA gegen humanes p53 (PENTR H1/TO)
hp53_BrA ⁽²⁾	CACCGACTCCAGTGGTAATCTACTTCAA- GAGTAGATTACCACTGGAGTC	shRNA gegen humanes p53 (PENTR H1/TO)
hp53_BrB ⁽²⁾	AAAAGACTCCAGTGGTAATCTACTCTCTT- GAAGTAGATTACCACTGGAGTC	shRNA gegen humanes p53 (PENTR H1/TO)
BRfwd_new ⁽²⁾	GATCCCCGACTCCAGTGGTAATCTACTT- CAAGAGAGTAGATTACCACTGGAGTCTT- TTTC	shRNA gegen humanes p53 (pSuperior-Vektoren) (Brummelkamp et al., 2002)
BRrev_new ⁽²⁾	TCGAGAAAAGACTCCAGTGGTAATCTA- CTCTCTTGAAGTAGATTACCACTGGAGTC- GGG	shRNA gegen humanes p53 (pSuperior-Vektoren) (Brummelkamp et al., 2002)
scr_s ⁽²⁾	GATCCCCGAACTTTTGGACGCGCACTT- CAAGAGAGTGC GCGTCCAAAAGTTCGTT- TTTC	<i>scrambled</i> Sequenz für shRNA (pSuperior-Vektoren)
scr_as ⁽²⁾	TCGAGAAAACGAACTTTTGGACGCGCA- CTCTCTTGAAGTGC GCGTCCAAAAGTTC- GGGG	<i>scrambled</i> Sequenz für shRNA (pSuperior-Vektoren)

(p) = phosphoryliert

4.13.2 Primer für PCR, cDNA-Synthese und Sequenzierungen

Bezeichnung	Sequenz 5'→ 3'	Tm [°C] ^[a]
CATCH A ⁽²⁾	AATTCGGTCAAGTGAACACGAGCAG	50
shp53Br-test ⁽¹⁾	AAGACTCCAGTGGTAATCT	50
H1_fwd ⁽²⁾	TGTTCTGGGAAATCACCATA	45
M13_Rev ⁽²⁾	CAGGAAACAGCTATGAC	45
superFWD ⁽²⁾	GCATGTCGCTATGTGTTCTG	55
superREV ⁽²⁾	TATGCTTCCGGCTCGTATGT	55
T7new ⁽¹⁾	TCACTATAGGGCGAATTGGGTACCG	55
Sknew ⁽¹⁾	CGGCCGCTCTAGAAGTAGTGGAT	55
hp53-A1 ⁽²⁾	AGCGTGCTTTCCACGACGGTGAC	55
hp53-B1 ⁽²⁾	AACACCAGTGCAGGCCAACTTGTTT	55
5L1R ⁽²⁾	CCTTCCACTCGGATAAGATG	55
P1Cap-CDS ⁽³⁾	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGC(r)G(r)G(r)G	cDNA-Synthese; 42
Poly T-CDS ⁽³⁾	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T) ₃₀ -N ₁ N	cDNA-Synthese; 42
PCR-CDS ⁽²⁾	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	55

^[a]Die Schmelztemperatur T_m gibt in diesem Fall die eigentliche Anlagerungstemperatur des Oligos wieder

N₁ = A/C/G N = A/C/G/T (r) = Ribonukleotide

4.13.3 Primer für die quantitative RT-PCR

Bezeichnung	Sequenz 5'→ 3'	Tm [°C] ^[a]
hs-ACTB-A ⁽¹⁾	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	60
Hs-ACTB-B ⁽¹⁾	AAGGGACTTCCTGTAACAATGCA	60
Hs-HPRT1-A	TGACACTGGCAAACAATGCA	60
Hs-HPRT1-B	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT	60
hMDM2_Q1 ⁽¹⁾	GGCCTGCTTTACATGTGCAA	60
hMDM2_Q2 ⁽¹⁾	GCACAATCATTTGAATTGGTTGTC	60
TP53_Q1 ⁽¹⁾	CCGCAGTCAGATCCTAGCG	55
TP53_Q2 ⁽¹⁾	AATCATCCATTGCTTGGGACG	55
hGADD45_Q1 ⁽¹⁾	TCAGCGCACGATCACTGTC	60
hGADD45_Q2 ⁽¹⁾	CCAGCAGGCACAACACCAC	60
hCDKNA1_Q1 ⁽¹⁾	CCTCATCCCGTGTTCCTTT	60
hCDKNA1_Q2 ⁽¹⁾	GTACCACCCAGCGGACAAGT	60

^[a]Die Schmelztemperatur Tm gibt in diesem Fall die eigentliche Anlagerungstemperatur des Oligos wieder

4.14 Antikörper

p53(FL-393) anti-p53, polyklonaler Antikörper (gesamtes humanes p53-Protein) aus Ziege (sc-6243-G; Santa Cruz, Heidelberg)

Actin (I-19) anti-Actin, polyklonaler Antikörper (humanes C-terminales Peptid) aus Ziege (sc-1616; Santa Cruz, Heidelberg)

Cytokeratin (C2562) anti-pan Cytokeratin; Mix aus verschiedenen monoklonalen Maus IgG gegen humanes Cytokeratin 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18 und 19 (Sigma, Steinheim)

HRP-konjugierte Sekundärantikörper für die Detektion im Western Blot, wurden von der Firma Dianova (Hamburg) bezogen:

Esel-anti-Ziege IgG-HRP (705-035-147)

Esel-anti-Maus IgG-HRP (715-035-151)

Fluorochrom-konjugierte Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen:

Esel-anti-Ziege IgG-Alexa 568 (A-11057)

Esel-anti-Maus IgG-Alexa 488 (A-21202)

4.15 Computer-Software

Adobe Photoshop 7.0.1

Endnote Version 9

Imaris 4.3.1 (Bitplane AG)

Leica Confocal Software LCS Lite Version 2.0

Microsoft Word, Excel, Power Point

Sci Ed Central Clone Manager 5

Online-Software: NCBI Blast <http://130.14.29.110/BLAST/>
 Human Blat [Search http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat](http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat)
 CLUSTALW <http://align.genome.jp/>
 MEME <http://meme.sdsc.edu/meme/>
 mFold <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>

5. METHODEN

5.1 Allgemeine Arbeiten im prokaryotischen System

5.1.1 Kompetente Bakterienzellen

Bakterien haben die Fähigkeit zirkuläre Fremd-DNA aufzunehmen, um so einen genetischen Vorteil, z.B. Resistenz gegenüber Antibiotika, zu erlangen. Jedoch internalisieren die meisten Bakterien unter normalen Bedingungen relativ wenig DNA. Um nun diese Bakterien wirksam zu transformieren, muss man die Zellen physikalisch oder chemisch behandeln. So wird ihre Fähigkeit verstärkt, DNA aufzunehmen. Zellen, die eine solche Behandlung durchlaufen haben, bezeichnet man als kompetent.

5.1.1.1 Chemisch kompetente Bakterien (Inoue et al., 1990)

Die hier beschriebene Methode basiert auf dem Protokoll zur Herstellung von kompetenten Bakterienzellen von Hanahan, 1983, welches von Inoue *et al.* weiter modifiziert wurde.

E. Coli Zellen wurden auf einer Petrischale mit LB-Selektionsmedium ausgestrichen. Am nächsten Tag wurden ein paar Kolonien in 250ml SOB Medium überführt und bei 18°C im Bakterienrührer inkubiert. Beim Erreichen einer $OD_{600}=0.6$ wurde die Bakterien suspension für 10min auf Eis inkubiert und anschließend bei 2500g (5500 rpm im Sorvall SS-34 Rotor) bei 4°C für 10min zentrifugiert. Die Bakterien wurden vorsichtig in 80ml eiskaltem „Transformations Puffer“ (TB Puffer) resuspendiert und auf Eis für 10min inkubiert und wieder pelletiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 20ml eiskaltem TB Puffer mit 7% (v/v) DMSO resuspendiert und für 10min auf Eis inkubiert. Die Bakterien suspension wurde zu 0,4ml in 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei einer Temperatur von -70°C.

5.1.2 Transformation

Die meisten Methoden zur Transformation von Bakterienzellen basieren auf den Beobachtungen von Cohen (Cohen et al., 1973), sowie den Entdeckungen von Mandel und Higa (Mandel and Higa, 1970). Letztere zeigten, dass Bakterien, welche mit eiskaltem $CaCl_2$ -Lösung behandelt wurden, nach einem kurzen Hitzeschock mit DNA der Bakteriophage λ transformiert werden konnten.

Auch die im Labor angewandte Methode nutzt die physiologische Wirkung eines Hitzeschocks aus, um Fremd-DNA in Bakterienzellen einzubringen.

Hierzu wurden 200µl kompetente Bakterien (siehe Abschnitt 5.1.1) auf Eis aufgetaut und 1-2µl des Ligationsansatzes (von 20µl Gesamtansatz; mit 0,1ng bis 50ng DNA) dazu gegeben. Nach 30min auf Eis, folgte für 45sec der Hitzeschock in einem 42°C warmen Wasserbad. Die Bakterien wurden auf Eis gekühlt und mit 800µl (4x Volumen) SOC-Medium verdünnt. Anschließend wurde die Suspension für eine Stunde bei 37°C geschüttelt (200rpm im Bakterienrührer Multitron). Danach wurden die Bakterien für ca. 30sec bei 800g (Tischzentrifuge 5415D) pelletiert und der Überstand bis auf 150µl verworfen. Die Bakterien wurden durch vorsichtiges vortexen (Certomat MV) resuspendiert und auf LB-Platten mit dem jeweiligen Selektions-Antibiotikum ausgestrichen.

5.1.2.1 Blau-Weiss-Selektion

Mit Hilfe der Blau-Weiss-Selektion, lässt sich der Einbau des Inserts in den Klonierungsvektor nach der Transformation anhand der Färbung der Kolonien nachweisen.

Hierzu muss der Vektor das *lacZ* Gen tragen, welches für die β -Galactosidase codiert. IPTG induziert die Expression der β -Galactosidase, die wiederum das Substrat X-Gal hydrolysiert, woraufhin sich die Kolonie blau färbt. Innerhalb des *lacZ* Gens liegt die MCS, in die das Insert kloniert wird und folglich die Sequenz für die β -Galactosidase unterbricht. Es kommt zu der Expression einer inaktiven β -Galactosidase und die Kolonie bleibt weiß.

Sollten die Klone über eine Blau-Weiss-Selektion analysiert werden, dann wurden vor dem Ausplattieren jeweils 100 μ l von einer 2% X-Gal Lösung und einer 10mM IPTG Lösung auf die Platten aufgetragen.

5.1.3 Präparation von Plasmid-DNA

5.1.3.1 Mini-Präparation (Plasmid Isolierung im kleinen Maßstab)

Die Mini-Präparation dient zur Gewinnung von plasmidärem Material in geringen Mengen (>60 μ g Vektor-DNA). Die Präparation wurde mit Hilfe des NucleoSpin[®] Plasmid Kits von Macherey-Nagel durchgeführt.

Hierfür wurden von einer mit transformierten Bakterien bewachsenen TB-Platte (s. Abschnitt 5.1.2) Einzelkolonien gepickt und in 2 ml TB-Medium, welches mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurde, überführt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C im Bakterenschüttler (200rpm, Multitron) über Nacht. Die Bakterien wurden am nächsten Tag in ein 2ml Eppendorfreaktions-Gefäß übertragen und sedimentiert (11000g; 30sec; Tischzentrifuge 5415D). Das Pellet wurde dann in 250 μ l Resuspensionspuffer A1 (+RNase A) resuspendiert und durch Zugabe von 250 μ l Lysepuffer A2, achtmaligem Invertieren der Probe und einer Inkubation für 3min bei Raumtemperatur lysiert. Die Lyseraktion wurde durch die Zugabe von 300 μ l Puffer A3 und achtmaligem Invertieren gestoppt. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (11000g; 10min; Tischzentrifuge 5415D) sedimentiert, so dass der Überstand mit der Vektor-DNA auf die NucleoSpin[®] Plus Säule gekippt werden konnte. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (11000g; 1min; Tischzentrifuge 5415D), wobei die Vektor-DNA an die Säulenmembran gebunden wurde. Diese wurde daraufhin mit 600 μ l Puffer A4 gewaschen (11000g; 1min; Tischzentrifuge 5415D) und durch 2min bei 11000g (Tischzentrifuge 5415D) getrocknet. Die Vektor-DNA wurde dann durch Zugabe von 50 μ l AE Puffer, einer darauf folgenden Inkubation (1min, RT) und einer Zentrifugation bei 11000g für 1min (Tischzentrifuge 5415D) in 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße eluiert. Es folgte die Konzentrationsbestimmung am Spektrophotometer ND110 (NanoDrop) (siehe Abschnitt 5.3.4).

5.1.3.2 Maxi-Präparation (Plasmid Isolierung im großen Maßstab)

Zur Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA (>500 μ g) wurde die Maxi-Präparation durchgeführt.

Ein paar Tropfen, ca. 300 μ l, von der Bakterienkultur aus der Mini-Prep wurden in 150ml LB-Medium, welches das jeweilige Selektionsantibiotika enthielt, überführt und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler (Multitron) inkubiert. Die Aufreinigung und Isolierung der DNA erfolgt unter Verwendung des NucleoBond[®] PC500 Kits von Macherey-Nagel. Die Kultur wurde für 15 Minuten bei 4°C und 5.200rpm (Standzentrifuge RC 5C Plus, Rotor: SLA-30)

zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dann in 12ml Puffer S1 (+RNase A) auf Eis resuspendiert, und durch Zugabe von 12ml Lyse Puffer S2 und achtmaligem Invertieren wurden die Zellen lysiert (RT 2-3min). Zwischenzeitlich wurde eine Anionenaustauscher-Säule (NucleoBond® AX500) mit Puffer N2 äquilibriert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 12ml Neutralisations Puffer S3 und erneut achtmaligem Invertieren gestoppt. Zur Trennung der Zellbestandteile und der in der Lösung vorhandenen DNA wurde die Suspension über einen Filter auf die Säule gegeben, wobei die Suspension allein durch die Schwerkraft durch die Säule lief. Nachdem die gesamte Lösung die Säule passiert hatte wurde sie mit 32ml Waschpuffer N3 gewaschen. Um die DNA zu eluieren, wurden 15ml Elutionspuffer N5 zugegeben und die aus der Säule tropfende Lösung in 50ml Zentrifugationsgefäße aufgefangen. Die DNA wurde dann mit 11ml Isopropanol gefällt und 30 Minuten bei 4°C und 15.000g (Tischzentrifuge 5810R) sedimentiert. Anschließend wurde das Pellet mit 5ml 70% Ethanol gewaschen (5min, 4°C, 15000g; Tischzentrifuge 5810R) und dann luftgetrocknet.

Je nach Menge wurde das Pellet vorerst in 100 bis 250µl autoklaviertem Milli-Q H₂O resuspendiert und auf eine Konzentration durch OD₂₆₀ (Spektrophotometer ND110) von 1,0 µg/µl eingestellt.

5.2 Allgemeine Arbeiten im eukaryotischen System

5.2.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle der hier beschriebenen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt (Sterilbank: Heraeus, HERA safe). Es wurde mit Zellen der adhärennten Zelllinien *MDAMB231*, *MDAMB468* sowie mit *MCF7* gearbeitet.

5.2.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Lagerung über einen längeren Zeitraum wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff eingefroren.

Adhärenente Zellen mussten hierfür zuerst von der Petrischale gelöst werden (siehe Abschnitt 5.2.1.2.) und in Lösung überführt werden. Diese Zellsuspension wurde abzentrifugiert (3min, 1000g; Tischzentrifuge Rotanta 96R), in Einfriermedium (60% FCS, 30% DMEM, 10% DMSO) resuspendiert und in Proben zu einem Volumen von je 1ml aliquotiert. Das DMSO verhindert zwar die Bildung von Eiskristallen, jedoch hat der Einfrierungsvorgang starke physiologische Auswirkungen auf die Zelle. Um diesen mechanischen Stress auf ein Minimum zu reduzieren, wurde die Temperatur in mehreren Schritten gesenkt. So wurden die Zellen erst für 30 Minuten auf 4°C abgekühlt. Danach folgte für eine Stunde die Lagerung bei -20°C und daraufhin die Lagerung bei -80°C für drei Tage. Erst dann wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff eingelagert (-196°C).

Im Gegensatz zu dem schrittweise vorsichtigen Einfrieren, sollte das Auftauen möglichst rasch erfolgen, um die schädigende Wirkung des DMSO zu umgehen. Hierzu wurden die Aliquots nach der Entnahme aus dem Stickstofftank bei 37°C erwärmt, bis die Suspension aufgetaut war, dann sofort in ein 15ml Zentrifugationsgefäß mit 9ml DMEM überführt und bei 1000g für 3min (Tischzentrifuge Rotanta 96R) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10ml DMEM resuspendiert und in eine Petrischale zur Kultivierung pipettiert.

5.2.1.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in dem in Abschnitt 4.12 angegebenen Medium in beschichteten Petrischalen (Nunc). Die Aufbewahrung und Vermehrung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank (Hera cell; Heraeus) bei 37°C und in einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre mit einem 5%igen CO₂-Gehalt.

Wuchsen die Zellen zu ca. 80% Konfluenz, so wurden sie subkultiviert oder bei Erreichen einer bestimmten Zellzahl eingefroren (siehe Punkt 5.2.1.1). Die adhärennten Zellen werden hierzu mit 10ml PBS gewaschen. Danach wurden zu den Zellen 1ml Trypsinlösung (0,05% Trypsin und 0,53mM EDTA) pipettiert und für eine Minute im Brutschrank inkubiert. Das Trypsin zersetzt Proteine der Extrazellulären Matrix und hebt so das Verankerungsgerüst der Zellen mit der Umgebung auf. Die proteolytische Wirkung des Enzyms wird durch Zugabe von 9ml FCS-haltigem Medium gestoppt. Nun wurden die Zellen für 3 Minuten bei 1000g pelletiert (Tischzentrifuge Rotanta 96R) und in 10ml frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt (siehe Abschnitt 5.2.1.3) und je nach weiterem Nutzen eingefroren, subkultiviert oder für eine Transfektion (siehe Abschnitt 5.2.2) ausgesät.

5.2.1.3 Zählen der Zellen

Die Zellen werden bei 10facher Vergrößerung unter dem Mikroskop gezählt. Hierzu wurde eine Neubauer-Zählkammer zu Hilfe genommen, die mit 10µl der Zellsuspension beladen wurde. Die eigentliche Zellzahl wird nach der Zählung anhand der folgenden Formel berechnet:

$$N = n \times F \times 10^4$$

N Zellzahl/ml

n gezählte Zellen in einem 16er Feld

F Verdünnungsfaktor

5.2.2 Transfektion

Bei einer Transfektion werden fremde Gene in eukaryotischen Zellen eingeführt. Da aber die Zellmembran in diesem Fall als Barriere dient und so die Aufnahme behindert, muß diese Schutzfunktion zum Beispiel durch physikalisch-chemische Methoden, umgangen werden.

Während der Doktorarbeit wurden Zellen über Elektroporation unter Zuhilfenahme des Nucleofaktor V Kits von Amaxa transfiziert.

Die Zellen wurden trypsiniert (siehe Abschnitt 5.2.1.2) und gezählt (siehe Abschnitt 5.2.1.3). Im Fall von MDAMB231 (Amaxa Programm X05) und MDAMB468 (Amaxa Programm X13) wurden 1×10^6 Zellen für die Transfektion benötigt, für die Zelllinie MCF7 (Amaxa Programm P20) waren es 2×10^6 Zellen. Die jeweilige Zellmenge wurde in ein 15ml Zentrifugationsgefäß überführt und bei 90g für 10min pelletiert (Tischzentrifuge Rotanta 96R). Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen anschließend in 100µl Nucleofaktor V Lösung resuspendiert. Danach wurde zu der Zellsuspension 2µg des jeweiligen Plasmids dazu pipettiert und in Elektroporationsküvetten, welche im Kit erhalten waren, überführt. Es folgte die Elektroporation im Nucleofaktor I-Gerät (Amaxa) nach dem jeweiligen Programm. Sofort nach der Transfektion wurde die Zellsuspension in 1ml vorgewärmtem Medium aufgenommen und in Zellkulturschalen pipettiert. Nachdem die Zellen sich abgesetzt hatten wurde das Medium gewechselt. Bei stabilen Transfektionen wurde nach 24h durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums mit der Selektion begonnen.

5.2.2.1 Stabile Transfektion

Bei der stabilen Transfektion wird der Expressionsvektor in das Zellgenom integriert. Es ist wichtig, den Vektor vorher an einer definierten Stelle zu linearisieren, da sonst bei der ungerichteten Integration die codierenden Sequenzen für den Selektionsmarker oder des Zielgens unterbrochen werden könnten. Die in der Doktorarbeit verwendeten Varianten des Expressionsvektors pENTR/H1/TO wurden vor der Transfektion mit der Restriktionsendonuklease *Afl III* (NEB) linearisiert (vgl. Abschnitt 5.3.7.1).

Je nach Selektionsmarker wurde dem Medium das entsprechende Antibiotikum 24h nach der Transfektion zugegeben. Die letale Konzentration wurde vorher anhand einer Verdünnungsreihe mit untransfizierten Zellen bestimmt. Es wurde so lange mit dem Antibiotikum selektioniert, bis sich sichtbare Zellklone bildeten. Diese Klone wurden dann in einem Klonierungszyylinder vom Rest der Platte räumlich separiert, mit 100µl Trypsin abgelöst und in eine neue Zellkulturschale (24 Well, Nunc) überführt. Es folgte die Subkultivierung bis zum Erreichen der nötigen Zellzahl für Folgeexperimente. Die sensitiven Antibiotikum-Konzentration und Selektionsdauer für jede Zelllinie ist in folgender Tabelle dargestellt:

	MDAMB231	MDAMB468	MCF7
<i>Zeozin</i> [µg/ml]	150, ca. 2 Wochen	100, ca 2Wochen	/
<i>G418</i> [µg/ml]	800, 1-2 Wochen	600, 1-2 Wochen	/

5.3 Allgemeine Molekularbiologische Methoden

5.3.1 Isolierung genomischer DNA

Zellen wurden so lange subkultiviert (siehe Abschnitt 5.2.1), bis sie in einer 15cm Zellkulturschale eine Konfluenz von ungefähr 80% und eine Anzahl von 1×10^7 Zellen erreichten.

Die Zellen wurden zweimal mit 1x PBS bei RT gewaschen und durch Trypsinisierung von der Kulturschale abgelöst. Daraufhin wurden die Zellen pelletiert (1000g, 3min, RT; Tischzentrifuge Rotanta 96R) und in 10ml 1x PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in 2ml Extraktionspuffer resuspendiert und für zwei Stunden bei 55°C inkubiert. Danach wurde die DNA von den Zellbestandteilen und der Proteinase K durch dreimalige Phenol-Chloroform Extraktion (5.3.5.2) getrennt. Die DNA wurde dann aus der wässrigen Phase durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH5.2) sowie 2 Volumen 100% EtOH und einer Zentrifugation bei 13000rpm für 10min bei 4°C (Tischzentrifuge 5415D) eluiert. Anschließend wurde das Pellet zweimal mit 70% EtOH gewaschen und luftgetrocknet. RNA-Kontaminationen des Pellets wurden durch Behandlung mit RNase A entfernt. Hierzu wurde das Pellet in 500µl TE-Puffer resuspendiert, mit 25µg/ml RNase A durchsetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde durch Phenol-Chloroform Extraktion inaktiviert und die DNA über EtOH-Extraktion (siehe oben) und zweimaligem waschen mit 70% EtOH aufgereinigt. Das luftgetrocknete DNA-Pellet wurde in 100µl TE-Puffer (DNA Storage) resuspendiert, photospektrometrisch (siehe Abschnitt 5.3.4) gemessen und auf eine Konzentration von 1mg/ml eingestellt. Die Lagerung der genomischen DNA erfolgte bei -20°C.

5.3.2 Isolierung von Nuklei

Die Methode zur Isolierung von Zellkernen basiert auf der beschriebenen Methode von (Spector et al., 1998). Hierfür wurden 1×10^7 Zellen, wie schon in Abschnitt 5.3.1 beschrieben, trypsinisiert und mit 1x PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1ml eiskaltem Nuklei-Isolierungspuffer A resuspendiert und mit gleichem Volumen an Nuklei-Isolierungspuffer B gemischt. Nach einer Inkubation für 10min auf Eis folgte eine Zentrifugation bei 5000g und 10min bei 4°C (Tischzentrifuge 5415D). Das Nuklei-Pellet wurde in 100µl Puffer A resuspendiert und auf 1,2ml Puffer A, der 0,8M Sucrose enthielt, pipettiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und der Überstand anschließend verworfen. Das Pellet wurde dann in 500µl Puffer A und 500µl 1x PBS gewaschen. Die Lyse der Nuklei erfolgte durch Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer, 100U Benzonase und einer Inkubation für 30min bei 37°C.

5.3.3 Isolierung von RNA

Die Isolierung von zellulärer RNA wurde nach zwei Methoden durchgeführt. Zum einen wurde das RNeasy[®] Mini Kit von QIAGEN zur Aufreinigung von mRNA nach Angaben des Herstellers benutzt, wobei geringe RNA-Mengen mit dem RNeasy[®] Mini Elute Kit konzentriert werden konnten. Zur Aufreinigung von niedermolekularen RNAs, wie beispielsweise die shRNA-Transkripte, wurde das Trizol[®] Reagenz benutzt.

Hierzu wurden 1×10^6 Zellen mit 1ml Trizol[®] überschichtet, was zum Ablösen der Zellen führte. Das Zellen-Trizol[®] Gemisch wurde dann in ein 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit 200µl Chloroform gemischt. Nach einer Inkubation bei RT für 2-3min folgte eine Zentrifugation bei 12000g und 4°C für 10min (Tischzentrifuge 5415D). Die wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 Reaktionsgefäß pipettiert, mit 500µl Isopropanol vermischt und bei RT für 10min inkubiert. Die Zentrifugation wurde dann wiederholt, der Überstand verworfen und das Pellet mit 1ml 70% EtOH (in DEPC-Wasser) gewaschen. Die RNA wurde durch eine Zentrifugation bei 5000g und 4°C für 5min sedimentiert, bei RT für 5-10min getrocknet und in 40µl DEPC-Wasser gelöst. Eventuelle Kontaminationen der RNA mit DNA wurden mit DNase I beseitigt. Hierzu wurde der RNA-Lösung 5µl 10x DNase I Puffer und 5U DNase I (Invitrogen) zugegeben. Nach einer Inkubation bei RT für 15min wurde die Reaktion durch Zugabe von 5µl 25mM EDTA bei 60°C gestoppt. Die RNA wurde über das RNeasy[®] Mini Elute Kit von QIAGEN aufgereinigt und photospektrometrisch gemessen. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -20°C.

5.3.4 Quantitative Erfassung der Nukleinsäure-Konzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch über die Messung der Adsorption bei 260nm und 280nm am Spektrophotometer ND110 (Nano Drop) ermittelt. Nach dem Kalibrieren wurden hierzu 2µl der Lösung in den Meß-Strahl pipettiert. Die Quantifizierung der Nukleinsäure erfolgte automatisch, lässt sich aber auch anhand der Adsorptionswerte nach folgender Formel berechnen:

$$c_{\text{DNA}} = A_{260} \times F \times Y$$

A_{260} Adsorption bei 260nm

F 50µg/µl für dsDNA; 33µg für ssDNA; 40µg für RNA

Y Verdünnungsfaktor

Zusätzlich wurde zur Bestimmung der Reinheit der DNA die Adsorption bei 280nm gemessen. Der Wert für den Quotienten der Adsorption A_{260}/A_{280} sollte bei 1,8 liegen, wenn man von reiner DNA ausgehen will. Wird RNA quantifiziert, sollte der Quotient 2,0 betragen.

5.3.5 Reverse Transkriptase Reaktion (cDNA Synthese)

Für die cDNA Synthese wurde das *RevertAid™ H-Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* von Fermentas entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Üblicherweise wurden 100ng isolierte RNA für die Synthese in einem Gesamtvolumen von 20µl eingesetzt. Zur einfachen Übersetzung von mRNA in cDNA und darauf folgende gezielte Amplifikation bestimmter Sequenzen wurde der im Kit enthaltene Oligo(dT)₁₈ Primer verwendet, der mit dem 3' Poly(A)-Schwanz der mRNA hybridisiert. Für die Detektion von niedermolekularer RNA, wie beispielsweise die shRNA-Transkripte, wurde der im Kit enthaltene *random hexamer* Primer und ein Primer bekannter Sequenz (P1Cap-CDS), der am 3'-Ende drei Guanin-Ribonukleotide aufweist, eingesetzt. Das P1Cap-CDS Oligonukleotid wurde auch zusammen mit dem poly T-CDS Oligonukleotid zur cDNA Synthese infolge des RNA Immunopräzipitation Protokoll (RIP) benutzt (siehe Abschnitt 5.7.1).

Die verwendete Reverse Transkriptase des MoMuL Virus lagert während der cDNA Synthese beim Erreichen der 5'-Cap-Struktur der mRNA mehrere Cytosine an das 3'-Ende der entstehenden cDNA. Dies wird durch eine intrinsische terminale Desoxynukleotidtransferase Aktivität der Reversen Transkriptase katalysiert. Ein Oligonukleotid (hier P1Cap-CDS) mit drei bis vier Guanine am 3'-Ende, kann daraufhin mit den Cytosinen Basenpaare eingehen. Die Reverse Transkriptase vollführt dann einen *template-switch* und inkorporiert das Oligonukleotid in der cDNA Synthese. Es resultiert eine cDNA mit der Oligonukleotidsequenz am 3'-Ende (Chen and Patton, 2001; Schmidt and Mueller, 1999).

Reaktionsschema einer allgemeinen RT-PCR (siehe auch Abschnitt 5.7):

RNA	100ng
Oligo(dT) ₁₈	1µl von 0,5µg/µl Stammlösung
(oder <i>random hexamer</i>)	1µl von 0,2µg/µl Stammlösung)
DEPC-Wasser	ad 12µl (11,6µl)
- 5min bei 70°C Anlagerung der Primer	
- auf Eis für 5min kühlen	
5x Reaktionspuffer	4µl
RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor	1µl
dNTPs	2µl von 1mM Stammlösung
(P1Cap-CDS	0,4µl von 50µM Stammlösung)
- 5min bei 37°C	
- 1h bei 42°C Reverse Transkription	
- RNase H Verdau 20min bei 37°C (1U RNase H, Invitrogen)	
- 10min bei 70°C zur Inaktivierung der Enzyme	

Die Proben wurden dann 1:5 mit DEPC-Wasser verdünnt ($V_{\text{ges}} = 100\mu\text{l}$), für die Synthese des Doppelstranges eingesetzt über eine PCR (siehe Abschnitt 5.3.5) oder bei -20°C gelagert.

5.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion wurde 1983 von Kary Banks Mullis etabliert (Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1985). Sie dient zur *in vitro* Amplifizierung kurzer DNA-Sequenzen, ausgehend von einer gegebenen DNA-Matrize, um von dieser eine ausreichende Konzentration für folgende Versuche herzustellen.

5.3.5.1 Methode und Durchführung der Reaktion

Bei der PCR binden zuerst spezifische komplementäre einzelsträngige DNA-Sequenzen (Primer, ca. 10 bis 50 N) an die DNA-Zielsequenz (Template). Zuvor wurde der Reaktionsansatz auf 94°C erhitzt, damit die doppelsträngige DNA denaturiert wird, und anschließend wieder auf die Anlagerungstemperatur (Annealing-Temperatur) der Primer abgekühlt, um die Bindung zu ermöglichen. Für jeden Einzelstrang werden spezifische Primer eingesetzt, deren Orientierung nach der Richtung der Template-DNA bestimmt wird.

Zur Berechnung der Annealingtemperatur wird von der Schmelztemperatur 5°C abgezogen. Die Konsensus-Sequenz der Primer bestimmt schließlich die Schmelztemperatur, welche sich, unter Berücksichtigung der Wasserstoffbrückenbindungen, nach folgender Formel errechnen lässt (Wu et al., 1991):

$$\Sigma (2 \times A + 2 \times T + 4 \times G + 4 \times C) \text{ } ^\circ\text{C} = T_m \text{ in } ^\circ\text{C}$$

A - Anzahl der Adenosine

T - Anzahl der Thymidine

G - Anzahl der Guanosine

C - Anzahl der Cytosine

Die Annealingtemperatur der verwendeten Primer lag zwischen 45°C und 60°C (siehe Abschnitt 4.13).

Auf den Schritt der Anlagerung des Primers (Annealing) folgte bei einer Temperatur von 72°C die Verlängerung des Primers (Elongation) entlang der einzelsträngigen Matrizen-DNA. Die eben beschriebene Reaktionsabfolge (Denaturation, Anlagerung, Elongation) wurde je nach Template und Primerpaar 17 bis 30mal wiederholt. Im Allgemeinen wurden 28 Zyklen durchlaufen.

Zusammenfassung eines PCR Programms-Schemas:

- | | |
|--|-----------------------|
| 1.Schritt: 94°C für 2min | } x Anzahl der Zyklen |
| 2.Schritt: 96°C für 20sec | |
| 3.Schritt: T _m Primer für 30sec | |
| 4.Schritt: 72°C für 2min | |
| 5.Schritt: 72°C für 8min | |
| 6.Schritt: auf 4°C abkühlen | |

Die PCR wurde meistens in einem Gesamtvolumen von 20µl durchgeführt. Die DNA-Template Mengen waren variabel, wohingegen die Primer gewöhnlicherweise in einer Endkonzentration von 0,2µM eingesetzt wurden und die dNTP-Stammlösung auf 0,2mM Endkonzentration verdünnt wurde. Als DNA Polymerasen wurden 1U der *Pfu* DNA Polymerase von MBI Fermentas oder *Taq* DNA Polymerase von Eppendorf dem PCR Ansatz zugesetzt. Zum Teil wurde dem Reaktionsansatzes auch DMSO hinzugefügt, um die Bildung

von hinderlichen Sekundärstrukturen der Oligonukleotide und der DNA zu umgehen, dies war aber nur nötig, wenn GC-reiche Oligonukleotide eingesetzt wurden.

5.3.5.2 Aufreinigung der PCR-Produkte (Phenol-Chloroform Extraktion)

Um die Nukleinsäure von Proteinen zu trennen wurde eine Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt. Hierfür wurde der PCR-Ansatz in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit 1:1 Volumen einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1; Biomol) versetzt und gut gemischt. Danach wurden durch eine Zentrifugation bei 13000rpm (Tischzentrifuge 5415D) und RT für 5 Minuten die Phasen getrennt.

Die obere wässrige Phase enthält die DNA und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 2 Volumen eiskaltem 100% Ethanol, 1/10 Volumen einer 3M Natriumacetat-Lösung (pH5.2) und 1µl Glycogen [10µg/µl] gefällt. Hierzu wurde sie zusätzlich für 30 Minuten bei -70°C oder 4h bei -20°C gelagert. Danach wurde für 10 Minuten bei 4°C und 13000rpm (Tischzentrifuge 5415D) zentrifugiert, um die Nukleinsäure zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen und die DNA mit 70% Ethanol gewaschen. Nachdem das Sediment getrocknet war, wurde die DNA in Milli-Q Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

Alternativ hierzu wurde die DNA aus dem PCR-Ansatz auch mit Hilfe des NucleoSpin® Extract II Kits von Macherey-Nagel nach Hersteller-Protokoll aufgereinigt.

5.3.5.3 Phosphorylierung der PCR-Produkte

Sollten die aus der PCR hervorgegangenen Produkte in einen Vektor ligiert werden, so mussten diese vorher phosphoryliert werden. Hierzu wurden 1-50pmol freie 5'-Termini in 50µl Gesamtvolumen mit 10U T4 Polynukleotidkinase (NEB) für 30min bei 37°C inkubiert. Als Reaktionspuffer wurde 1x T4 DNA Ligase Puffer (NEB) eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 65°C für 20min gestoppt.

5.3.6 Quantitative Real-Time PCR (Q-RT-PCR)

Die Q-RT-PCR ermöglicht eine kostengünstige und zeitsparende Methode zur quantitativen Darstellung der Genexpression. Bei dieser Methode wird die Fluoreszenz gemessen, die SYBR® Green I emittiert, wenn es in dsDNA interkaliert (Simpson et al., 2000). Für die quantitative Analyse ist essentiell, dass in jedem Syntheszyklus der PCR nur ein spezifisches Produkt gebildet wird, da nicht-spezifische Produkte die Quantifizierung verfälschen würden. Die Quantifizierung kann je nach Zielsetzung und Versuchsaufbau über zwei unterschiedliche Methoden durchgeführt werden. Mit der absoluten Quantifizierung ist es möglich, anhand einer Eichgerade die exakte Kopienzahl des Ausgangsproduktes in der Testprobe zu bestimmen. Wohingegen bei der relativen Quantifizierung ein Vergleich zwischen einer Kontrollprobe mit der Testprobe zur Bestimmung des relativen Expressionsunterschieds führt.

In der Doktorarbeit wurde die relative Quantifizierung mit dem 7500 Fast Real-Time PCR Gerät (Applied Biosystems) durchgeführt. Der Anstieg der Fluoreszenz wurde am Ende eines jeden PCR Zyklus gemessen. Die Basis für die quantitative Messung ist der Zyklus an dem die Fluoreszenz einen gewissen Hintergrundwert überschreitet. Dies wird als Ct-Wert (*cycle-threshold*) numerisch dargestellt. Beim Erreichen des Schwellenwertes, steigt die Fluoreszenz exponentiell an, bis ein Plateau erreicht wird, an dem die Produktsynthese stagniert.

Die Sequenz für die spezifischen Primer wurden aus Online-Datenbanken entnommen (<http://medgen.ugent.be/rtpimerdb/>; <http://pga.mgh.harvard.edu/cgi-bin/primerbank/>) und deren Produktspezifität gegebenenfalls über Gelelektrophorese verifiziert.

Die cDNA Synthese wurde mit dem Primer Oligo(dT)₁₈, wie in Abschnitt 5.3.5 beschrieben, durchgeführt. Die cDNA wurde am Ende der Reaktion jedoch 1/10 verdünnt, wobei aus der Verdünnung 1µl (ca. 0,5ng cDNA) für die Q-RT-PCR eingesetzt wurde. Die jeweiligen Primer wurden mit einer Endkonzentration von 300nM eingesetzt. Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug 10µl.

Pipettiertschema einer Q-RT-PCR:

2x Power SYBR [®] Green PCR Master Mix	5µl	
DEPC Wasser	3,4µl	
Primer A	0,3µl	von 10µM Stammlösung
Primer B	0,3µl	von 10µM Stammlösung
cDNA	1µl	entspricht ca. 0,5ng cDNA

Reaktionsschema:

Schritt 1:

95°C für 10min

Schritt 2:

95°C für 3sec

60°C für 30sec

Wiederholung des Schrittes 2: 40-55x,

bei 60°C erfolgte die Detektion der Fluoreszenz

Schritt 3 (Dissoziationskurve):

95°C 15sec

60°C 1min

95°C 15sec

60°C 15sec

5.3.6.1 Datenanalyse der relativen Genexpression

Die Auswertung der Daten eines Q-RT-PCR Laufs erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode die von Livak und Schmittgen beschrieben wurde (Livak and Schmittgen, 2001). Bei dieser Methode werden die jeweiligen Ct-Werte unterschiedlicher Genexpressionszustände auf den Ct-Wert einer endogenen Kontrolle kalibriert und anschließend miteinander verglichen. Endogene Kontrollen waren β Aktin und die Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1). Rein rechnerisch stellt sich die Analyse wie folgt dar:

$$\Delta C_{t_{\text{nicht induziert}}} = (C_{t_{\text{Zielgen}}} - C_{t_{\text{endogene Kontrolle}}})_{\text{nicht induziert}}$$

$$\Delta C_{t_{\text{induziert}}} = (C_{t_{\text{Zielgen}}} - C_{t_{\text{endogene Kontrolle}}})_{\text{induziert}}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{induziert}}} - \Delta C_{t_{\text{nicht induziert}}}$$

Theoretisch verdoppelt sich die Anzahl der Amplifikate mit jedem Zyklus exponentiell, was zur folgenden Formel zur Berechnung des relativen Expressionsunterschieds zwischen Kontrollprobe und Testprobe führt:

$$2^{-\Delta\Delta C_t}$$

5.3.7 Klonierung

5.3.7.1 DNA-Restriktionsverdau

Um DNA zu fragmentieren oder zu linearisieren benutzt man Restriktionsendonukleasen. Diese bakteriellen Enzyme erkennen spezifische Nukleotidsequenzen und hydrolysieren an diesen Stellen die DNA (Meselson and Yuan, 1968; Nathans and Smith, 1975).

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen stammen von der Firma New England Biolabs und wurden zusammen mit den vorgegebenen Puffern benutzt. Ferner wurde bei jedem Verdau die von dem Hersteller empfohlene spezifische Temperatur beachtet, die meistens bei 37°C lag. Grundsätzlich verdaut 1U einer Restriktionsendonuklease bei optimalen Reaktionsbedingungen 1µg DNA innerhalb einer Stunde.

Die Enzyme wurden in 5-fachem Überschuss eingesetzt, jedoch durfte diese Menge nie größer sein als 1/10 des Reaktionsansatzes, da sonst der zu hohe Glyceringehalt die Enzymaktivität beeinflusst hätte und bei der elektrophoretischen Auftrennung gestört hätte.

5.3.7.2 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Größe von Nukleinsäuren und zur Kontrolle von PCR Reaktionen (analytisches Gel) aber auch zur Aufreinigung von verdauter DNA (präperatives Gel, siehe 5.3.7.3) werden Agarosegele genutzt. Hierbei wird die Tatsache ausgenutzt, dass aufgrund der negativen Ladung von Nukleinsäuren die DNA in einem elektrischen Feld in Richtung Anode läuft. Kleinere Fragmente wandern schneller als große, da die Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl der Basenpaare ist (Helling et al., 1974; Meyers et al., 1976).

Während der Doktorarbeit wurden meist 1% Gele hergestellt, um jedoch sehr kleine Fragmente zu untersuchen wurde die Agarose-Konzentration bis auf 2% des Volumens erhöht. Die Agarose wurde entweder in 1x TAE-Puffer oder 0,5x TBE-Puffer gegeben und in der Mikrowelle erhitzt bis sie sich vollständig gelöst hatte. Dann wurde diese Lösung in eine Gelkammer gegossen und 1µl Ethidiumbromid (Endkonzentration 10µg/ml) hinzu pipettiert. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und ermöglicht, dass die DNA unter UV-Beleuchtung (366nm) sichtbar gemacht werden kann (Sharp et al., 1973). Vor der Polymerisation des Gels wurden Plastikämme eingesetzt, die Taschen für die DNA aussparen sollten. Das erstarrte Gel wurde schließlich mit 1x TAE, beziehungsweise mit 0,5x TBE überschichtet und mit der DNA beladen. Hierzu wurde den Proben 1/5 Volumen von 6x Ladepuffer beigemischt und zur Größenbestimmung 1 bis 1,5µl Marker- je nach Taschenvolumen- aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei 100 Volt und 40mA durchgeführt.

5.3.7.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Nach dem Restriktionsverdau folgte die elektrophoretische Auftrennung der zu klonierenden Fragmente über ein präperatives Agarosegel. Anschließend wurden die jeweiligen Banden in einem möglichst kleinen Volumen Agarose ausgeschnitten.

Da die Arbeitsfläche mögliche Kontaminationen tragen könnte und wegen der Tatsache, dass UV-Licht die DNA nachhaltig schädigt, wurden nur etwa 1/3 der Gelbahn zur Analyse der Lauflänge betrachtet und die Bande auf diesem Gelstück durch eingrenzende Schnitte oberhalb, sowie unterhalb markiert. Aus dem nicht exponierten anderen Teil des Gels wurde dann, durch Abgleichen mit dem analysiertem Stück, die gewünschte Bande ausgeschnitten und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt.

Die Extraktion der DNA aus der Agarose erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin Extract II der Firma Macherey-Nagel und folgte dem Protokoll des Herstellers. Nach der Elution der aufgereinigten DNA-Fragmente, konnte diese dann für nachfolgende Schritte verwendet werden oder bei -20°C gelagert werden.

5.3.7.4 Dephosphorylierung geschnittener DNA

Geschnittene Plasmid-DNA musste vor der Ligation mit kürzeren DNA-Fragmenten dephosphoryliert werden, damit ausgeschlossen werden konnte, dass der geschnittene Vektor religiert. Hierfür wurde linearisierte Plasmid-DNA mit *calf intestinal alkaline phosphatase* (CIP, New England Biolabs) behandelt, da CIP die hydrolytische Dephosphorylierung von 5'-Phosphoryltermini katalysiert. Je $0,5\mu\text{g}$ Plasmid-DNA wurde in 1x NEB Puffer 3 gelöst und nach Zugabe von $0,5\text{U}$ CIP/ μg Plasmid-DNA für 1h bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte über Phenol/Chloroform Extraktion und EtOH-Präzipitation (siehe Abschnitt 5.3.5.2). Der geschnittene und dephosphorylierte Vektor konnte bei -20°C gelagert werden.

5.3.7.5 Hybridisierung einzelsträngiger Oligonukleotide

Für die Herstellung von kurzen dsDNA-Fragmenten zur Klonierung, wie beispielsweise shRNA-Konstrukte oder Adaptormoleküle, wurden die zu hybridisierenden Oligonukleotide im äquimolaren Verhältnis gemischt und für 5min auf 95°C erhitzt. Dies geschah im Heizblock (Dri-Block DB-2A), bei dem sich der Block herausnehmen lässt. Dies wurde nach der Denaturierung der Oligonukleotide bei 95°C ausgenutzt, um die Lösung langsam auf RT abkühlen zu lassen und eine einwandfreie Anlagerung der beiden Oligonukleotide zu gewährleisten.

5.3.8 Ligation

Bei der Ligation verknüpft eine Ligase über Phosphodiesterbindungen die terminale Enden von DNA-Strängen (Ferretti and Sgaramella, 1981).

Soll nun ein kurzes DNA-Fragment mit einer geschnittenen plasmidären DNA verbunden werden, so muss dieses Fragment im Überschuss (im Verhältnis von 3:1 bis 5:1) eingesetzt werden, damit die Effizienz der Ligation ausreichend erhöht wird.

Die Ligation wurde mit Hilfe des Ready-To-Go T4 DNA Ligase Kits von Amersham durchgeführt. Hierbei wurden $20\mu\text{l}$ Ligationsansatz, der das Plasmid und das Insert enthielt, auf den getrockneten Ligasepuffer in einem $1,5\text{ml}$ Reaktionsgefäß gegeben und auf Eis für 30min stehen gelassen. Danach wurde die Lösung kräftig durch Pipettieren gemischt und kurz abzentrifugiert (Tischzentrifuge 5415D). Es folgte die Ligation bei 16°C über Nacht. Anschließend wurden $1-2\mu\text{l}$ des Ligationsansatzes in der Transformation eingesetzt (siehe Abschnitt 5.1.2).

5.3.9 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA-Abschnitten basiert auf dem Prinzip der Dideoxynukleotid-Kettenabbruch-Reaktion von Sanger (1976), jedoch mit dem Unterschied, dass hier Dideoxynukleotide eingesetzt wurden, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren. Die Sequenzierungs-Reaktion selbst wurde von der Firma MWG Biotech in Martinsried durchgeführt.

5.4 Biochemische Methoden

5.4.1 Präparation eines totalen Zellysats

Adhärente Zellen ($1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$) wurden durch Zugabe von Trypsin gelöst, die Reaktion mit FCS-haltigem Medium gestoppt und in ein 15ml Zentrifugationsgefäß überführt. Dann wurden die Zellen für 3 Minuten mit 1000g (Tischzentrifuge Rotanta 96R) bei 4°C sedimentiert und mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 1 Volumen 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert und für 20 Minuten bei 4°C im RollerMixer SRT1 inkubiert. Danach konnte das Lysat direkt auf ein Proteingel (siehe Abschnitt 5.4.3) geladen werden.

War es nötig den Proteingehalt des Lysats über einen Bradford Analyse zu bestimmen, wurde ein Lysepuffer verwendet, der SDS und Bromphenolblau aussparte. Dieser Lysepuffer setzte sich wie folgt zusammen:

NP 40	1%	ZnCl ₂	1mM
NaCl	150mM	Glycerin	10%
Tris-HCl (pH7,4)	20mM	Na ₃ VO ₄	1mM
NaF	10mM	MgCl ₂	1mM
EDTA	1mM		

5.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Proteinmenge in einem Zellysat zu bestimmen, wurde die Bradford Analyse (Bradford, 1976) durchgeführt.

Hierbei nutzt man die Eigenschaft von Coomassie Brilliant Blau G-250 aus, an aromatische Reste von Aminosäuren und Argininreste zu binden. Wobei die anionische gebundene Form ein Extinktionsmaximum von 595nm und die kationische ungebundene Form ein Exktinktionsmaximum von 470nm besitzt.

Zunächst mußte die Farblösung (Biorad) mit Milli-Q Wasser 1:5 verdünnt werden, wobei für jede Probe 1ml benötigt wurden. Danach wurde eine Eichgerade von einer BSA-Stammlösungen mit den Proteinmengen 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, bzw., 10µg erstellt und mit 1ml Farblösung in einer Einmalküvette verdünnt. So wurden auch 2µl der Proben verdünnt und dann durchmischt. Nach einer Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proben, nach Erstellen der Eichgeraden, photometrisch gemessen Spektrophotometer DU[®] 800 (Beckmann-Coulter).

5.4.3 Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine nach Laemmli (Laemmli, 1970) modifizierte Methode, bei der Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem denaturierendem Gel aufgetrennt werden. Hierbei wirkt Natriumdodecylsulfat nicht nur als denaturierendes Reagenz, sondern gibt den Proteinen eine einheitlich negative Ladung. Die Denaturierung wurde durch Zugabe einer reduzierenden Thiolverbindung (z.B. β-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol) verstärkt, da sie Schwefelbrücken zwischen Cysteinen zerstört. Die denaturierten Proteine wandern in einem elektrischen Feld durch ein Polyacrylamid-Netzwerk mit konstanter Porengröße. Die Polymerisation dieses Netzwerkes unter der Kontrolle des Quervernetzlers N,N'-Methylenbisacrylamid erfolgt durch Zugabe von Ammoniumperoxidsulfat (APS, Radikalbilder) und N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED, Radikalestabilisator).

Pipettierschema für A) 10ml Sammelgel und B) 20ml Trenngel:

A) Acrylamid (40%)	1ml
Bisacrylamid (2%)	0,5ml
Tris-HCl (1M, pH6,8)	1,25ml
SDS (10%)	0,1ml
H ₂ O	7,15ml
B) Acrylamid (40%)	7,5ml
Bisacrylamid (2%)	0,88ml
Tris-HCl (1M, pH8,8)	5ml
SDS (10%)	0,2ml
H ₂ O	6,42ml

zu A) und B): 1% APS, 0,1% TEMED

Nach der Zugabe von APS und TEMED (Einleiten der Polymerisation) wurde die Lösung kurz gemischt und dann möglichst schnell zwischen zwei Glasplatten, welche voneinander durch zwei seitliche Platzhalter getrennt wurden, gegossen. Zuerst wurde das Trenngel (hier 15% Acrylamid) bis etwa 4cm unterhalb des Glasplattenrandes gegossen und anschließend mit Isopropanol überschichtet. Der Alkohol erhält die glatte Oberfläche des Gels und versiegelt diese. Nach der Auspolymerisation wurde dieser abgeschüttet und der Kamm für die Aussparungen der Geltaschen eingesetzt. Anschließend wurde das Sammelgel (hier 4% Acrylamid) gegossen und der Kamm nach dem Erstarren des Gels vorsichtig entfernt.

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben entweder 1:1 mit 2x SDS-Probenpuffer oder 1:5 mit 6x SDS-Probenpuffer gemischt und zur Beseitigung der Tertiär- und Sekundärstrukturen für 2 Minuten bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese wurde in einer SDS-Page Mighty Small II SE250-Kammer für 20min bei 80V (400mA), dann für 20min bei 100V (400mA) und schließlich bei 45min bei 180V (400mA) durchgeführt.

5.4.3.1 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Die einzelnen Proteinbanden im Gel werden durch Inkubation für 20 bis 30min bei RT in der Coomassie-Färbelösung visualisiert. Der Hintergrund wird anschließend durch Schwänken des Gels in Coomassie-Entfärbelösung entfärbt, wobei die Proteinbanden blau eingefärbt bleiben. Gefärbte Gele werden in Zeluphan-Folie getrocknet. Folgte jedoch nach der SDS-Page ein Western-Blot, wurde die Coomassie-Färbung ausgelassen.

5.4.4 Western-Blot Analyse

Der Western-Blot folgt der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine in einer SDS-PAGE. Hierbei werden die Proteine von dem Gel auf eine Filtermembran übertragen (Towbin et al., 1979). Bei der in der Doktorarbeit verwendeten Membran handelte es sich um eine PVDF-Membran, die in Methanol oder Isopropanol für 1min bei RT vor Gebrauch noch aktiviert werden musste.

Danach wurde die Membran in Transferpuffer äquilibriert und auf das Proteingel platziert. Auf die freien Seiten der Membran und des Gels wurden zwei Schichten in Transferpuffer getränktes Whatman-Papier gelegt, woraufhin der Komplex in ein Blotkassette arretiert wurde. Der Proteintransfer erfolgte in einer Transferpuffer gefüllten Blotting-Kammer (Western-Blot Mini Trans Blot™ Cell, BioRad) für 90min bei 60V.

Zur Fixierung der Proteine und zur Verifizierung des Proteintransfers wurde die Membran nach dem Transfer in Ponceau-Rot (Sigma) für eine Minute geschwenkt und dann mit destilliertem Wasser und TBS gewaschen. Daraufhin folgte eine Inkubation in der Blockierlösung (5% w/v Trockenmilch in TBST), entweder für 30min bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht, um alle freien Proteinbindestellen abzusättigen. Nach der Blockierung folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Verdünnung 1:5000 bis 1:10000 in 5% w/v Trockenmilchpulver in TBST) für 1 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde dreimal mit TBST für je 10 Minuten gewaschen und dann mit dem zweiten Antikörper (in 5% w/v Trockenmilchpulver in TBST) inkubiert. Dieser isotypspezifische Sekundärantikörper war zur späteren Visualisierung der Proteinlage mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert. Nachdem der Überschuss an nicht gebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen mit TBST und einmal mit TBS abgespült wurde, wurde durch Zugabe der SuperSignal West Dura Extended Duration Substrat -Lösung (Pierce) eine lichterzeugende Redoxreaktion gestartet und konnte durch Auflegen eines Films (Kodak X-OMAT[®], Biomax[™] MR; Kodak) detektiert werden.

Zur Analyse von weiteren Proteinen konnte der gebundene Antikörper *strippen* von den Zielproteinen gelöst werden. Hierzu wurde der Blot 5min bei RT in destilliertem Wasser gewaschen und daraufhin in 0,2M NaOH-Lösung geschwenkt (5min, RT). Die NaOH-Lösung wurde dann abgekippt und der Waschschrift wiederholt. So war es möglich, eine Membran ohne merklichen Signalverlust zweimal wieder zu verwenden.

5.5 Zellbiologische Methoden

5.5.1 Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Mit der Durchflußzytometrie kann man einzelne Zellen anhand von Fluoreszenz- und Streulichtsignalen charakterisieren. Relative Größe, Granularität, sowie verschiedene Fluoreszenzintensitäten können für mehrere tausend Zellen in wenigen Minuten ermittelt werden. Zur Analyse müssen die Zellen in Suspension vorliegen, da sie einzeln in einem Flüssigkeitsstrom einen Analysepunkt passieren müssen. Hier wird der Flüssigkeitsstrom von einem Lichtstrahl (Laserstrahl) durchkreuzt. Das Aufeinandertreffen von Lichtstrahl und Zellen hat eine Streuung des Lichts zur Folge, die Aufschluss über die Größe und Granularität der Zelle gibt. Der Grad der Streuung ist ein Maß für die Größe der Zellen (*forward scatter*, FSC; Adsorption durch die Zelle). Der Winkel, mit dem der Lichtstrahl gebogen wird, zeigt die Granularität, bzw. Dichte der Zelle an (*side scatter*, SSC; Beugung). Apoptotische Zellen werden mit dem SSC detektiert. Trifft der Laserstrahl auf Fluoreszenzfarbstoffe, wird dieser angeregt und emittiert Licht einer höheren Wellenlänge. Das emittierte Licht wird durch Photozellen detektiert (Herzenberg et al., 1976).

In der Doktorarbeit wurden Zellen mit dem FACS Aria Gerät von BD Biosciences sortiert. Die Zellen wurden hierfür mit Expressionsvektoren transfiziert, die *Grün Fluoreszierendes Protein* (GFP) exprimierten. Erfolgreich transfizierte Zellen konnten durch die Autofluoreszenz von GFP, welches bei einer Wellenlänge von 475nm Licht mit einer Wellenlänge von 509nm emittiert, von nicht-transfizierten Zellen unterschieden werden.

5.5.1.1 Präparation der Zellen für den FACS-Sort

Die Zellen wurden einen bis drei Tage vor dem FACS-Sort mit dem jeweiligen Expressionsvektor transfiziert (siehe Abschnitt 5.2.2). Vor dem Sortieren wurden auf die adherenten Zellen Trypsin pipettiert (für eine 10cm Schale ca. 500µl), wobei das Enzym sofort wieder abgesaugt wurde. Die Zellen wurden daraufhin im Inkubator platziert, bis sie sich abzulösen begannen. Dann wurden sie in 800µl PBS mit 4% (v/v) FCS aufgenommen und im FACS Aria aufgrund ihrer GFP-Fluoreszenz sortiert. Danach wurde entweder die RNA (siehe Abschnitt 5.3.3) oder der Proteingehalt (siehe Abschnitt 5.4.1) der Zellen isoliert.

5.5.2 Induktion der P53 Expression in MCF7

MCF7-Zellen (siehe Abschnitt 4.12) exprimieren im nicht induzierten Zustand nur basale Mengen des Tumorsuppressors p53. Zur Stimulation einer erhöhten Expression und der Aktivierung der p53-Antwort auf DNA-Schäden wurden die Zellen mit 25J/m² UV-C Strahlung (254nm; Stratalinker® UV Crosslinker 1800) induziert. UV-Strahlen verursachen die Dimerisierung benachbarter Pyrimidine (*cyclobutan pyrimidin dimer*; CPD).

Hierfür wurden die Zellen bis zur gewünschten Zellzahl subkultiviert (siehe Abschnitt 5.2.1.2). Das Medium wurde abgenommen und bei RT gelagert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und das PBS gründlich abgesaugt. Zur Bestrahlung wurde der Deckel der Zellkulturschale entfernt. Nach der Bestrahlung wurde das Medium wieder auf die Zellen gegeben und anschließend die Zellen im Inkubator bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Alternativ wurden die Zellen mit ionisierender Strahlung einer Cäsium-Quelle (¹³⁷Cs) behandelt.

5.5.3 Immunfluoreszenz

Mit der Immunfluoreszenz lassen sich Aussagen über die Expression und Lokalisation von bestimmten Zielgenen *in situ* machen.

Zwei Tage vor der Präparation wurden 1 bis 4x10⁵ Zellen auf runde Deckgläschen (Ø 12mm) ausplattiert und im Brutschrank inkubiert. Das Protokoll ist in folgender Tabelle dargestellt:

	Schritt	Zeit, Temperatur
1.	3 mal mit PBS (pH 7.4) waschen	5min, RT
<i>Optional 1</i>	<i>Extraktion der Zellen mit CSK I Puffer + Proteinase Inhibitoren</i>	<i>8min, 4°C</i>
<i>Optional 2</i>	<i>mit CSK IV Puffer waschen + Proteinase Inhibitoren</i>	<i>2min, 4°C</i>
<i>Optional 3</i>	<i>vorherigen Waschschrift wiederholen</i>	<i>2min, 4°C</i>
2.	fixieren in 4 % Paraformaldehyd in PBS-Puffer	10min, RT
3.	permeabilisieren mit 1% Triton X-100 in PBS (pH 7,4). !!Dieser Schritt entfällt in Falle der CSK-Extraktion!!	10min, RT, vorsichtig schütteln
4.	3 mal mit PBS (pH 7.4) waschen	je 3min, RT
5.	abblocken mit PBS (pH 7.4)/0,5% BSA	30 min, RT
6.	erste Antikörper-Inkubation in PBS (pH 7.4)/0,5% BSA	20-30min, RT
7.	3 mal mit PBS/0,1% Tween 20 (pH 7.4) waschen	je 5min, RT
8.	zweite, Farbstoff-gekoppelte Antikörper-Inkubation in PBS (pH 7.4)/0,5% BSA	20min, RT
9.	3 mal mit PBS/0,1% Tween 20 (pH 7.4) waschen	je 5min, RT

10.	nachfixieren mit 4 % Paraformaldehyd in PBS (pH 7.4)	10min, RT
11.	2 mal mit PBS (pH 7.4) waschen	je 3min, RT
12.	DNA-Färbung: DAPI 1:2000 einsetzen	10min, RT
13.	1 mal mit PBS/0,1% Tween 20 (pH 7.4) waschen	kurz, RT
14.	einbetten in Mowiol	

Die Präparate wurden lichtgeschützt bei 4°C gelagert und in Fluoreszenzmikroskop (IMT-2 oder CK40, Olympus) analysiert.

5.5.3.1 Herstellung des 4% Paraformaldehyd (PFA) Fixative

Unter dem Abzug wurde 450ml autoklaviertes Milli-Q Wasser auf 60°C erhitzt. Unter Rühren (Magnetrührer MR 3001; Heidolph) wurde 20g Paraformaldehyd-Pulver dazugegeben und zur endgültigen Lösung des Pulvers ca. 5 Tropfen 2N NaOH pipettiert. Danach wurde die Lösung abgekühlt und durch Zugabe von 50ml 10xPBS auf 500ml aufgefüllt. Nachdem der pH-Wert mit 37% HCl auf pH7.2 eingestellt wurde, wurde die Lösung über Filterpapier filtriert und in 40ml Aliquots bei -20°C gelagert.

5.5.3.2 Herstellung des Einbettmediums Mowiol

2,4g Mowiol® 4-88 Reagent wurde in 4,8ml 99% Glycerin und 1,2ml Milli-Q Wasser durch Rühren (Magnetrührer MR 3001; Heidolph) für mindestens 4h (oder über Nacht) bei RT gelöst. Danach wurde 12ml Milli-Q Wasser hinzupipettiert und das Medium unter vorsichtigem Rühren (Magnetrührer MR 3001; Heidolph) auf 50°C für 10min erhitzt. Luftblasen im Medium wurden durch Zentrifugation (5min, 5000g, RT in Tischzentrifuge 5810R, Eppendorf) entfernt.

5.5.4 RNA-Interferenz (RNAi)

RNAi ist ein natürlich vorkommender Mechanismus eukaryotischer Zellen der die Genexpression einzelner Gene hemmt. Zentrale Elemente des Mechanismus sind kurze RNA-Moleküle, die Sequenz-spezifisch mRNAs binden und zu ihrer Degradation beitragen. Neben der Regulation der Genexpression, hat RNAi auch eine Funktion in der angeborenen Immunantwort gegenüber viralen Infektionen und in der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität. RNAi wurde schon Anfang der 90iger in Pflanzen und Pilze als Post Transcriptional Gene Silencing (PTGS) beschrieben, jedoch 1998 als RNAi definiert (Fire et al., 1998).

Die RNAi wird durch die Typ-III Ribonuklease Dicer, die spezifisch lange dsRNA-Moleküle prozessiert, eingeleitet. Die kurzen 21nt bis 23nt langen dsRNAs (siRNAs) werden dann in einem *RISC Loading Complex* (RLC) durch Argonaute-2-Protein (Arg2) entwunden und in einzelsträngige Moleküle gespalten. Die Endonuklease Arg2 ist auch die katalytische Einheit des RISC (*RNA-Induced Silencing Complex*), in dem die einzelsträngige RNA an die Ziel-mRNA bindet und sie für die Prozessierung markiert.

Während der Doktorarbeit wurden in die Vektoren pENTR/H1/TO (Invitrogen) und pSuperior.neo.GFP (OligoEngine) Sequenzen für die RNA-Interferenz (shRNA Sequenzen, siehe Abschnitt 4.13.1) kloniert (siehe Abschnitt 5.3.7). Jeweils 2µg des Plasmids wurden in Zellen der Linien MDAMB231 oder MDAMB468 transfiziert und je nach Art des Plasmids, entweder im FACS Aria gesortet (pSuperior.neo.GFP) oder auf stabile Klone Selektioniert (pENTR/H1/TO) (vgl. Abschnitte 5.2.2 bzw. 5.5.1).

5.6 Chromatin Immunpräzipitation (ChIP-Seq)

Die ChIP-Seq Methode ermöglicht den Nachweis von Chromatin-bindenden Proteinen *in vivo*, wobei grundsätzlich zwei klassische Arten von ChIP-Methoden unterschieden werden. Der native ChIP spart die Kreuzvernetzung von Protein und DNA aus und eignet sich folglich nur für Proteine, die fest an Chromatin assoziiert sind (Histone). Üblicherweise werden jedoch die Proteine mit dem Chromatin kreuzvernetzt (*Crosslinking ChIP*). Dies geschieht beispielsweise durch Zugabe von Formaldehyd, Cisplatin (cis-Diammindichloroplatin(II)) oder durch Bestrahlung der Zellen mit UV-Licht. Das in der Doktorarbeit verwendete Formaldehyd vernetzt kovalent exozyklische Aminogruppen und endozyklische Iminogruppen der DNA mit den α -Aminogruppen der Aminosäuren und den Stickstoffgruppen der Seitenketten von Lysinen, Argininen und Histidinen (McGhee and von Hippel, 1975a; McGhee and von Hippel, 1975b).

Das Protokoll gliedert sich in mehrere grundlegende Schritte:

- 1) Kreuzvernetzung von Protein und DNA
- 2) Lyse der Zellen und Zerkleinerung des Chromatins
- 3) Aufreinigung der Protein/DNA Komplexe
- 4) Immunpräzipitation der Protein/DNA Komplexe
- 5) Elution der präzipitierten DNA und Auflösung der Vernetzung
- 6) Analytische Sequenzierung der DNA Fragmente

5.6.1 Kreuzvernetzung DNA-gebundener Proteine und Aufreinigung der Protein/DNA Komplexe

Für ein ChIP-Seq-Experiment wurden die Zellen alle 2-3 Tage umgesetzt bis eine Zelldichte von 5×10^7 Zellen erreicht wurde (siehe Abschnitt 5.2.1.2). Die Zellen wurden dann 2x mit PBS gewaschen und für 8min mit 0,25% (v/v) Formaldehyd in DMEM im Brutschrank inkubiert. Die Kreuzvernetzung wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS/Glycin auf Eis gestoppt. Die Zellen wurden dann auf Eis in 3ml CSK I Puffer (+ Proteinase Inhibitoren) von der Zellkulturschale abgekratzt und in 15ml Zentrifugationsgefäße überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 1000g (Tischzentrifuge Rotanta 96R) und 4°C für 5min. Das Pellet wurde in 1ml CSK IV Puffer (+ Proteinase Inhibitoren) resuspendiert, in 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und sedimentiert (3300rpm, 4°C, 3min, Tischzentrifuge 5415D). Der Waschschrift wurde noch einmal wiederholt, das Zellpellet anschließend in 900 μ l Lysepuffer resuspendiert und im Ultraschallgerät (Bioruptor UCD-200; Einstellungen: höchste Stufe, 30“ sonifizieren und 30“ Pause) in 300 μ l Aliquots sonifiziert. Zelltrümmer wurde dann durch eine Zentrifugation (Tischzentrifuge 5810R) bei 20000g und 4°C für 30min sedimentiert und von den Protein/DNA Komplexen (Überstand) getrennt. Es folgte die Extraktion freier Nukleinsäuren. Hierfür wurde zu dem Überstand 100 μ l 2,5M KCl pipettiert und für fünf Minuten auf Eis inkubiert, wobei sich die Lösung verfestigte und Protein-gebundene DNA präzipitiert wurde. Dann wurden die Protein/DNA Komplexe von den freien Nukleinsäuren durch Zentrifugation (Tischzentrifuge 5415D; 12000g, 4°C, 5min) getrennt. Der Überstand (freie Nukleinsäure) wurde verworfen und das Pellet durch Zugabe von 1ml KCl Puffer und dreiminütigem Schütteln bei 60°C (Thermomixer comfort; 1000rpm) in Lösung gebracht. Die Inkubation auf Eis und die Zentrifugation wurden wiederholt und das Pellet in 1ml KCl Puffer resuspendiert. Die letzten drei Schritte wurden noch dreimal wiederholt, wobei das Pellet schließlich in 250 μ l Dialysepuffer (+ 1M NaCl) resuspendiert

wurde. Die Lösung wurde in eine Slide-A-Lyzer Dialyse Kassette (Pierce) überführt und über Nacht bei 4°C gegen Dialysepuffer dialysiert. Am nächsten Tag wurde die Proteinkonzentration photospektrometrisch bestimmt (Spektrophotometer DU[®] 800) und die Anwesenheit von p53 in der Lösung über Western Blot Analyse (siehe Abschnitt 5.4.4) nachgewiesen.

5.6.2 Immunpräzipitation der Protein/DNA Komplexe

Die Protein/DNA Komplexe waren nach der Dialyse in 10mM HEPES/NaOH pH 7.5 gelöst. Etwa 250µg Gesamtproteinmenge wurde für die Immunpräzipitation eingesetzt. Hierfür wurde die Lösung durch Zugabe von NP-40, NaCl und HEPES/NaOH pH 7.5 auf E1A Pufferbedingungen eingestellt. Um unspezifische Bindungen an die Matrix zu verhindern, wurde der Lösung 40µl Protein G-Sepharose (50% w/v) von Pierce (in E1A Puffer äquilibriert) zugesetzt und für eine Stunde bei 4°C inkubiert (Rollenschüttler RollerMixer SRT1). Die Matrix wurde dann sedimentiert (20000g, 4°C, 10min; Tischzentrifuge 5810R) und der Überstand in ein neues 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Immunpräzipitation der Protein/DNA Komplexe erfolgte durch Zugabe von 5µg p53 (FL-393) Antikörper (Santa Cruz) und Rotieren (Rollenschüttler RollerMixer SRT1) bei 4°C über Nacht. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle ohne Antikörper nach der gleichen Methode behandelt. Am nächsten Tag wurde die Antikörper-gebundenen Protein/DNA komplexe durch Zugabe von 40µl PGS und einer Inkubation für 4h bei 4°C aus der Lösung präzipitiert. Die Matrix-Antikörper-Protein/DNA Komplexe wurden dann bei 1500g und 4°C für 2min pelletiert (Tischzentrifuge 5415D) und mehrmals mit unterschiedlichen Puffern für 5min bei 4°C auf dem Rollermixer gewaschen. Im Einzelnen wurden folgende Puffer benutzt:

- 1) 2x E1A Puffer
- 2) 2x RIPA Puffer
- 3) 2x RIPA-500 Puffer
- 4) 1x LiCl Puffer

Das Pellet wurde schließlich einmal in 1ml TE Puffer für 3min gewaschen und in 500µl TE Puffer resuspendiert. Danach wurde 100µg/ml RNase A zugegeben und für 30min bei 37°C inkubiert (Thermomixer comfort, 800rpm). Die Matrix-Antikörper-Protein/DNA Komplexe wurden pelletiert (1500g, 4°C, für 2min; Tischzentrifuge 5415D) und in 100µl 2% SDS, 20mM Tris-HCl pH 8 resuspendiert.

5.6.3 Elution und Auflösen der Vernetzung

Die Lösung wurde für 10min bei 60°C geschüttelt (Thermomixer comfort, 1000rpm), die Matrix pelletiert und mit 300µl 20mM Tris-HCl pH 8 gewaschen. Überstand und Waschfraktion wurden daraufhin vereint mit 0,5mg/ml Proteinase K und 2mM CaCl₂ gemischt und für eine Stunde bei 50°C inkubiert (Heizblock Dri-Block DB-2A). Um die Kreuzvernetzung aufzuheben, wurde die Temperatur auf 65°C für 4h erhöht. Die DNA-Fragmente wurden anschließend durch Phenol-Chloroform Extraktion und folgender EtOH-Präzipitation (siehe Abschnitt 5.3.5.2) aufgereinigt. Das DNA Pellet wurde in 20µl autoklavierten Milli-Q Wasser resuspendiert.

5.6.4 Analyse der DNA-Fragmente

Zunächst wurden die überstehenden Enden der DNA „poliert“. Hierfür wurde den 20µl DNA-Fragmenten 1,5µl Milli-Q Wasser, 2,5µl 10x *pfu* DNA Polymerase Puffer, 0,5µl 10mM dNTPs und 0,5µl *pfu* DNA Polymerase zugegeben und für 30min bei 72°C inkubiert (PCR Cycler PTC 200). Die Fragmente wurden dann über Phenol-Chloroform Extraktion und EtOH-Präzipitation aufgereinigt und mit 30pmol des doppelsträngigen Adaptors Catch A/B_p ligiert (vgl. Abschnitt 5.3.8). Die Aufreinigung des Ligationsansatzes erfolgte nach Herstellerangaben über MicroSpin™ S-400 HR Säulen. Daraufhin wurden die DNA-Fragmente amplifiziert.

Pipettierschema für die PCR:	38,5µl Milli-Q Wasser	
	5µl 10x Taq Polymerase Puffer	
	0,5µl Catch A Primer	von 100pmol/µl Stock
	1µl 10mM dNTPs	
	5µl Template	
	0,2µl Taq Polymerase	von 5U/µl Stock
Reaktionsschema der PCR	96°C	1min
	96°C	30sec
	50°C	30sec
	72°C	2min
	72°C	8min
	4°C	forever

Nach der Überprüfung der Proben auf einem analytischen Agarosegel (vgl. Abschnitt 5.3.7.2) wurden die Fragmente über Phenol-Chloroform Extraktion und EtOH-Präzipitation aufgereinigt, phosphoryliert und in pBluescript II sk (+) kloniert (vgl. Abschnitt 5.3.7 und 5.3.8). Positive Klone wurden sequenziert (vgl. Abschnitt 5.3.9).

5.7 RNA Immunpräzipitation (RIP)

Zur Untersuchung von Ribonukleoprotein-RNA-Interaktionen wurde, in Analogie zum ChIP-Seq Protokoll, ein Protokoll für die RNA Immunpräzipitation entwickelt (Niranjanakumari et al., 2002). In der Doktorarbeit wurde mit einem stark modifizierten RIP-Protokoll gearbeitet, um die potentiellen p53-RNA Wechselwirkungen in MDAMB231/468 bzw. MCF7 Zellen zu untersuchen.

Zunächst wurden die Zellen bis zu einer Dichte von 5×10^6 Zellen in einer 15cm Zellkulturschale passagiert (siehe Abschnitt 5.2.1.2). Die Zellen werden dann zweimal mit 1x PBS bei RT gewaschen und durch Zugabe von 800µl E1A Puffer (+ 5mM Ribonukleosid Vanadyl Komplexe und Proteaseinhibitoren) in der Schale für 5min bei RT lysiert. Daraufhin wurden die Zellen abgekratzt und zusammen mit dem Überstand in ein 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation (16000g, 10min, 4°C; Zentrifuge 5415D), bei welcher der unlösliche Bestandteile sedimentiert wurde. Der Überstand wurde mit 20µl einer Dynabeads-Protein G Lösung versetzt und für 30min bei RT auf einem Rollerschüttler (RollerMixer SRT1) inkubiert (*Preclearing*). Pro Probe werden insgesamt 50µl Dynabeads-Protein G (Dyna) in E1A Puffer (+ 5mM Ribonukleosid Vanadyl Komplexe und Proteaseinhibitoren) äquilibriert. Hierfür wurde die nötige Gesamtmenge

Dynabeads in ein 1,5ml Eppendorfreaktionsgefäß pipettiert und in einem magnetischen Feld sedimentiert. Der Überstand konnte abgenommen werden und die Dynabeads mit 1ml E1A Puffer (+ 5mM Ribonukleosid Vanadyl Komplexe und Proteaseinhibitoren) gewaschen werden. Dies wurde dreimal wiederholt. Schließlich wurden die Beads im gleichen Ausgangsvolumen in E1A Puffer resuspendiert und bei 4°C gelagert.

Nach dem *preclearing* wurden die Dynabeads aus der Probe im magnetischen Feld entfernt und 5µg polyklonales Ziegen-IgG gegen p53 (FL-393; Santa Cruz) zu der Probe hinzupipettiert. Es folgte eine Inkubation bei RT auf dem Rollerschüttler für 40min. Durch Zugabe von 30µl äquilibrierten Dynabeads-Protein G und einer weiteren vierzigminütigen Inkubation auf dem Rollerschüttler wurden die Antikörper-gebundenen p53/RNA Komplexe aus der Lösung präzipitert. Die Matrix-gebundenen Komplexe wurden dann viermal mit 500µl E1A-250 Puffer (+ 5mM Ribonucleosid Vanadyl Komplexe) und einmal mit 20mM Tris-HCl pH 8.4 (+ 5mM Ribonucleosid Vanadyl Komplexe) gewaschen. Darauf folgte der DNA-Verdau für 15min bei RT. Hierfür wurden die Beads in 50µl 1x DNase I Reaktionspuffer, dem 1U DNase I (*amp grade*, Invitrogen) zugesetzt wurde, resuspendiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5µl von 25mM EDTA pH 8 und einer Inkubation für 10min bei 60°C gestoppt. Der Überstand wurde im magnetischen Feld abgenommen und verworfen. Die Beads wurden dann in 390µl Proteinase K Puffer resuspendiert und mit 10µl Proteinase K ([20mg/ml]; Roche) versetzt. Die Lösung wurde 1h bei 50°C inkubiert, die freie RNA über Phenol-Chloroform Extraktion aufgereinigt und durch EtOH Präzipitation gefällt (siehe Abschnitt 5.3.5.2). Die RNA wird schließlich in DEPC-Wasser resuspendiert und bei -20°C gelagert.

5.7.1 Analyse der präzipitierten RNA

Die RNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch (ND 100) bestimmt (siehe Abschnitt 5.3.4) und 50 bis 100ng Gesamt-RNA für die cDNA Synthese eingesetzt (siehe Abschnitt 5.3.5). Die Synthese des zweiten DNA-Strangs und die Amplifikation der DNA wurde im PCR Cyclyer PTC 200 (MJ Research) mit dem Primer PCR-CDS (siehe Abschnitt 4.13.2) durchgeführt und die amplifizierten Produkte über ein analytisches Agarosegel (1,0%) sichtbar gemacht. Fragmente aus erfolgreichen RIP Versuchen wurden phosphoryliert, in pBluescript II sk (+) kloniert und sequenziert (Abschnitt 5.3.7 bis 5.3.9). Eine Analyse der Sequenzen erfolgte über gängige Algorithmen (BLAT).

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Ahn, J. and Prives, C. (2001) The C-terminus of p53: the more you learn the less you know. *Nat Struct Biol*, **8**, 730-732.
- Ahn, J.Y., Schwarz, J.K., Piwnicka-Worms, H. and Canman, C.E. (2000) Threonine 68 phosphorylation by ataxia telangiectasia mutated is required for efficient activation of Chk2 in response to ionizing radiation. *Cancer Res*, **60**, 5934-5936.
- Allison, S.J. and Milner, J. (2003) Loss of p53 has site-specific effects on histone H3 modification, including serine 10 phosphorylation important for maintenance of ploidy. *Cancer Res*, **63**, 6674-6679.
- Allison, S.J. and Milner, J. (2004) Remodelling chromatin on a global scale: a novel protective function of p53. *Carcinogenesis*, **25**, 1551-1557.
- Anderson, M.E., Woelker, B., Reed, M., Wang, P. and Tegtmeyer, P. (1997) Reciprocal interference between the sequence-specific core and nonspecific C-terminal DNA binding domains of p53: implications for regulation. *Mol Cell Biol*, **17**, 6255-6264.
- Anderson, S.J., Lauritsen, J.P., Hartman, M.G., Foushee, A.M., Lefebvre, J.M., Shinton, S.A., Gerhardt, B., Hardy, R.R., Oravec, T. and Wiest, D.L. (2007) Ablation of ribosomal protein L22 selectively impairs alphabeta T cell development by activation of a p53-dependent checkpoint. *Immunity*, **26**, 759-772.
- Ayed, A., Mulder, F.A., Yi, G.S., Lu, Y., Kay, L.E. and Arrowsmith, C.H. (2001) Latent and active p53 are identical in conformation. *Nat Struct Biol*, **8**, 756-760.
- Bakalkin, G., Selivanova, G., Yakovleva, T., Kiseleva, E., Kashuba, E., Magnusson, K.P., Szekely, L., Klein, G., Terenius, L. and Wiman, K.G. (1995) p53 binds single-stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the middle domain. *Nucleic Acids Res*, **23**, 362-369.
- Baker, S.J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., vanTuinen, P., Ledbetter, D.H., Barker, D.F., Nakamura, Y., et al. (1989) Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, **244**, 217-221.
- Bakhanashvili, M. (2001) Exonucleolytic proofreading by p53 protein. *Eur J Biochem*, **268**, 2047-2054.
- Bakhanashvili, M., Gedelovich, R., Grinberg, S. and Rahav, G. (2007) Exonucleolytic degradation of RNA by p53 protein in cytoplasm. *J Mol Med*.
- Balakrishnan, S.K. and Gross, D.S. (2007) The tumor suppressor p53 associates with gene coding regions and co-traverses with elongating RNA polymerase II in an in vivo model. *Oncogene*.
- Bargonetti, J., Manfredi, J.J., Chen, X., Marshak, D.R. and Prives, C. (1993) A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein. *Genes Dev*, **7**, 2565-2574.
- Barlev, N.A., Liu, L., Chehab, N.H., Mansfield, K., Harris, K.G., Halazonetis, T.D. and Berger, S.L. (2001) Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell*, **8**, 1243-1254.
- Bartlett, J., Blagojevic, J., Carter, D., Eskiw, C., Fromaget, M., Job, C., Shamsher, M., Trindade, I.F., Xu, M. and Cook, P.R. (2006) Specialized transcription factories. *Biochem Soc Symp*, 67-75.
- Bech-Otschir, D., Kraft, R., Huang, X., Henklein, P., Kapelari, B., Pollmann, C. and Dubiel, W. (2001) COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *Embo J*, **20**, 1630-1639.
- Bell, S., Klein, C., Muller, L., Hansen, S. and Buchner, J. (2002) p53 contains large unstructured regions in its native state. *J Mol Biol*, **322**, 917-927.
- Benham, C., Kohwi-Shigematsu, T. and Bode, J. (1997) Stress-induced duplex DNA destabilization in scaffold/matrix attachment regions. *J Mol Biol*, **274**, 181-196.
- Blandino, G., Levine, A.J. and Oren, M. (1999) Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. *Oncogene*, **18**, 477-485.

- Bode, A.M. and Dong, Z. (2004) Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, **4**, 793-805.
- Bode, J., Kohwi, Y., Dickinson, L., Joh, T., Klehr, D., Mielke, C. and Kohwi-Shigematsu, T. (1992) Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs. *Science*, **255**, 195-197.
- Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G. and Thompson, C.B. (1993) bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*, **74**, 597-608.
- Bossi, G., Lapi, E., Strano, S., Rinaldo, C., Blandino, G. and Sacchi, A. (2006) Mutant p53 gain of function: reduction of tumor malignancy of human cancer cell lines through abrogation of mutant p53 expression. *Oncogene*, **25**, 304-309.
- Bottger, A., Bottger, V., Garcia-Echeverria, C., Chene, P., Hochkeppel, H.K., Sampson, W., Ang, K., Howard, S.F., Picksley, S.M. and Lane, D.P. (1997) Molecular characterization of the hdm2-p53 interaction. *J Mol Biol*, **269**, 744-756.
- Bouck, J., McLeod, M.P., Worley, K. and Gibbs, R.A. (2000) The human transcript database: a catalogue of full length cDNA inserts. *Bioinformatics*, **16**, 176-177.
- Bourdon, J.C. (2007) p53 and its isoforms in cancer. *Br J Cancer*, **97**, 277-282.
- Bourdon, J.C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D.P., Saville, M.K. and Lane, D.P. (2005) p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev*, **19**, 2122-2137.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Brandes, L.J. and Hermonat, M.W. (1983) Receptor status and subsequent sensitivity of subclones of MCF-7 human breast cancer cells surviving exposure to diethylstilbestrol. *Cancer Res*, **43**, 2831-2835.
- Bridge, A.J., Pebernard, S., Ducraux, A., Nicoulaz, A.L. and Iggo, R. (2003) Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet*, **34**, 263-264.
- Brinkley, B.R., Beall, P.T., Wible, L.J., Mace, M.L., Turner, D.S. and Cailleau, R.M. (1980) Variations in cell form and cytoskeleton in human breast carcinoma cells in vitro. *Cancer Res*, **40**, 3118-3129.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R. and Agami, R. (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*, **296**, 550-553.
- Bulavin, D.V., Saito, S., Hollander, M.C., Sakaguchi, K., Anderson, C.W., Appella, E. and Fornace, A.J., Jr. (1999) Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *Embo J*, **18**, 6845-6854.
- Bullock, A.N., Henckel, J., DeDecker, B.S., Johnson, C.M., Nikolova, P.V., Proctor, M.R., Lane, D.P. and Fersht, A.R. (1997) Thermodynamic stability of wild-type and mutant p53 core domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14338-14342.
- Cailleau, R., Olive, M. and Cruciger, Q.V. (1978) Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro*, **14**, 911-915.
- Cailleau, R., Young, R., Olive, M. and Reeves, W.J., Jr. (1974) Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst*, **53**, 661-674.
- Canadillas, J.M., Tidow, H., Freund, S.M., Rutherford, T.J., Ang, H.C. and Fersht, A.R. (2006) Solution structure of p53 core domain: structural basis for its instability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 2109-2114.
- Candau, R., Scolnick, D.M., Darpino, P., Ying, C.Y., Halazonetis, T.D. and Berger, S.L. (1997) Two tandem and independent sub-activation domains in the amino terminus of p53 require the adaptor complex for activity. *Oncogene*, **15**, 807-816.
- Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B. and Siliciano, J.D. (1998) Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science*, **281**, 1677-1679.
- Casadaban, M.J. and Cohen, S.N. (1980) Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, **138**, 179-207.
- Cawley, S., Bekiranov, S., Ng, H.H., Kapranov, P., Sekinger, E.A., Kampa, D., Piccolboni, A., Sementchenko, V., Cheng, J., Williams, A.J., et al. (2004) Unbiased mapping of transcription

- factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell*, **116**, 499-509.
- Chan, D.C. (2006) Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell*, **125**, 1241-1252.
- Chan, J.A., Krichevsky, A.M. and Kosik, K.S. (2005) MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*, **65**, 6029-6033.
- Chan, T.A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1999) 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature*, **401**, 616-620.
- Chan, W.M. and Poon, R.Y. (2007) The p53 Isoform Deltap53 lacks intrinsic transcriptional activity and reveals the critical role of nuclear import in dominant-negative activity. *Cancer Res*, **67**, 1959-1969.
- Chan, W.M., Siu, W.Y., Lau, A. and Poon, R.Y. (2004) How many mutant p53 molecules are needed to inactivate a tetramer? *Mol Cell Biol*, **24**, 3536-3551.
- Chehab, N.H., Malikzay, A., Appel, M. and Halazonetis, T.D. (2000) Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev*, **14**, 278-288.
- Chen, D. and Patton, J.T. (2001) Reverse transcriptase adds nontemplated nucleotides to cDNAs during 5'-RACE and primer extension. *Biotechniques*, **30**, 574-580, 582.
- Chen, D., Zhang, Z., Li, M., Wang, W., Li, Y., Rayburn, E.R., Hill, D.L., Wang, H. and Zhang, R. (2007) Ribosomal protein S7 as a novel modulator of p53-MDM2 interaction: binding to MDM2, stabilization of p53 protein, and activation of p53 function. *Oncogene*, **26**, 5029-5037.
- Chen, P.L., Chen, Y.M., Bookstein, R. and Lee, W.H. (1990) Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science*, **250**, 1576-1580.
- Chicas, A., Molina, P. and Bargonetti, J. (2000) Mutant p53 forms a complex with Sp1 on HIV-LTR DNA. *Biochem Biophys Res Commun*, **279**, 383-390.
- Chin, K.V., Ueda, K., Pastan, I. and Gottesman, M.M. (1992) Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science*, **255**, 459-462.
- Chin, P.L., Momand, J. and Pfeifer, G.P. (1997) In vivo evidence for binding of p53 to consensus binding sites in the p21 and GADD45 genes in response to ionizing radiation. *Oncogene*, **15**, 87-99.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D. and Pavletich, N.P. (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*, **265**, 346-355.
- Chooniedass-Kothari, S., Emberley, E., Hamedani, M.K., Troup, S., Wang, X., Czosnek, A., Hube, F., Mutawe, M., Watson, P.H. and Leygue, E. (2004) The steroid receptor RNA activator is the first functional RNA encoding a protein. *FEBS Lett*, **566**, 43-47.
- Clamp, M., Cuff, J., Searle, S.M. and Barton, G.J. (2004) The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics*, **20**, 426-427.
- Clore, G.M., Ernst, J., Clubb, R., Omichinski, J.G., Kennedy, W.M., Sakaguchi, K., Appella, E. and Gronenborn, A.M. (1995) Refined solution structure of the oligomerization domain of the tumour suppressor p53. *Nat Struct Biol*, **2**, 321-333.
- Cohen, S.N., Chang, A.C., Boyer, H.W. and Helling, R.B. (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci US A*, **70**, 3240-3244.
- Cook, P.R. (2002) Predicting three-dimensional genome structure from transcriptional activity. *Nat Genet*, **32**, 347-352.
- Cuddihy, A.R., Wong, A.H., Tam, N.W., Li, S. and Koromilas, A.E. (1999) The double-stranded RNA activated protein kinase PKR physically associates with the tumor suppressor p53 protein and phosphorylates human p53 on serine 392 in vitro. *Oncogene*, **18**, 2690-2702.
- D'Orazi, G., Cecchinelli, B., Bruno, T., Manni, I., Higashimoto, Y., Saito, S., Gostissa, M., Coen, S., Marchetti, A., Del Sal, G., et al. (2002) Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol*, **4**, 11-19.
- Dai, M.S. and Lu, H. (2004) Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *J Biol Chem*, **279**, 44475-44482.
- Dai, M.S., Zeng, S.X., Jin, Y., Sun, X.X., David, L. and Lu, H. (2004) Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition. *Mol Cell Biol*, **24**, 7654-7668.
- Danial, N.N. and Korsmeyer, S.J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell*, **116**, 205-219.

- Davis, P., Bazar, K., Huper, G., Lozano, G., Marks, J. and Iglehart, J.D. (1996) Dominance of wild-type p53-mediated transcriptional activation in breast epithelial cells. *Oncogene*, **13**, 1315-1322.
- Davison, T.S., Vagner, C., Kaghad, M., Ayed, A., Caput, D. and Arrowsmith, C.H. (1999) p73 and p63 are homotetramers capable of weak heterotypic interactions with each other but not with p53. *J Biol Chem*, **274**, 18709-18714.
- Dawson, R., Muller, L., Dehner, A., Klein, C., Kessler, H. and Buchner, J. (2003) The N-terminal domain of p53 is natively unfolded. *J Mol Biol*, **332**, 1131-1141.
- Dearth, L.R., Qian, H., Wang, T., Baroni, T.E., Zeng, J., Chen, S.W., Yi, S.Y. and Brachmann, R.K. (2007) Inactive full-length p53 mutants lacking dominant wild-type p53 inhibition highlight loss of heterozygosity as an important aspect of p53 status in human cancers. *Carcinogenesis*, **28**, 289-298.
- Deb, S., Jackson, C.T., Subler, M.A. and Martin, D.W. (1992) Modulation of cellular and viral promoters by mutant human p53 proteins found in tumor cells. *J Virol*, **66**, 6164-6170.
- DeLeo, A.B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G.C., Law, L.W. and Old, L.J. (1979) Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 2420-2424.
- Deppert, W. (1996) Binding of MAR-DNA elements by mutant p53: possible implications for its oncogenic functions. *J Cell Biochem*, **62**, 172-180.
- Dewannieux, M., Esnault, C. and Heidmann, T. (2003) LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat Genet*, **35**, 41-48.
- Di Agostino, S., Strano, S., Emiliozzi, V., Zerbini, V., Mottolose, M., Sacchi, A., Blandino, G. and Piaggio, G. (2006) Gain of function of mutant p53: the mutant p53/NF-Y protein complex reveals an aberrant transcriptional mechanism of cell cycle regulation. *Cancer Cell*, **10**, 191-202.
- Dittmer, D., Pati, S., Zambetti, G., Chu, S., Teresky, A.K., Moore, M., Finlay, C. and Levine, A.J. (1993) Gain of function mutations in p53. *Nat Genet*, **4**, 42-46.
- Dornan, D., Wertz, I., Shimizu, H., Arnott, D., Frantz, G.D., Dowd, P., O'Rourke, K., Koeppen, H. and Dixit, V.M. (2004) The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature*, **429**, 86-92.
- Dubnau, J. and Struhl, G. (1996) RNA recognition and translational regulation by a homeodomain protein. *Nature*, **379**, 694-699.
- Dumaz, N. and Meek, D.W. (1999) Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *Embo J*, **18**, 7002-7010.
- Dumont, P., Leu, J.I., Della Pietra, A.C., 3rd, George, D.L. and Murphy, M. (2003) The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet*, **33**, 357-365.
- el-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1992) Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet*, **1**, 45-49.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, **75**, 817-825.
- Eliyahu, D., Michalovitz, D., Eliyahu, S., Pinhasi-Kimhi, O. and Oren, M. (1989) Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 8763-8767.
- Esnault, C., Maestre, J. and Heidmann, T. (2000) Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nat Genet*, **24**, 363-367.
- Espinosa, J.M. and Emerson, B.M. (2001) Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell*, **8**, 57-69.
- Ewen, M.E. and Miller, S.J. (1996) p53 and translational control. *Biochim Biophys Acta*, **1242**, 181-184.
- Ewen, M.E., Oliver, C.J., Sluss, H.K., Miller, S.J. and Peeper, D.S. (1995) p53-dependent repression of CDK4 translation in TGF-beta-induced G1 cell-cycle arrest. *Genes Dev*, **9**, 204-217.
- Ewen, M.E., Sluss, H.K., Sherr, C.J., Matsushime, H., Kato, J. and Livingston, D.M. (1993) Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins. *Cell*, **73**, 487-497.

- Fang, S., Jensen, J.P., Ludwig, R.L., Vousden, K.H. and Weissman, A.M. (2000) Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem*, **275**, 8945-8951.
- Ferretti, L. and Sgaramella, V. (1981) Temperature dependence of the joining by T4 DNA ligase of termini produced by type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res*, **9**, 85-93.
- Fields, S. and Jang, S.K. (1990) Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science*, **249**, 1046-1049.
- Finlay, C.A., Hinds, P.W. and Levine, A.J. (1989) The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*, **57**, 1083-1093.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Fontoura, B.M., Sorokina, E.A., David, E. and Carroll, R.B. (1992) p53 is covalently linked to 5.8S rRNA. *Mol Cell Biol*, **12**, 5145-5151.
- Frazier, M.W., He, X., Wang, J., Gu, Z., Cleveland, J.L. and Zambetti, G.P. (1998) Activation of c-myc gene expression by tumor-derived p53 mutants requires a discrete C-terminal domain. *Mol Cell Biol*, **18**, 3735-3743.
- Friedman, P.N., Chen, X., Bargonetti, J. and Prives, C. (1993) The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 3319-3323.
- Fu, L. and Benchimol, S. (1997) Participation of the human p53 3'UTR in translational repression and activation following gamma-irradiation. *Embo J*, **16**, 4117-4125.
- Fu, L., Ma, W. and Benchimol, S. (1999) A translation repressor element resides in the 3' untranslated region of human p53 mRNA. *Oncogene*, **18**, 6419-6424.
- Fu, L., Minden, M.D. and Benchimol, S. (1996) Translational regulation of human p53 gene expression. *Embo J*, **15**, 4392-4401.
- Gaiddon, C., Lokshin, M., Ahn, J., Zhang, T. and Prives, C. (2001) A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol Cell Biol*, **21**, 1874-1887.
- Gilbert, C., Kristjuhan, A., Winkler, G.S. and Svejstrup, J.Q. (2004) Elongator interactions with nascent mRNA revealed by RNA immunoprecipitation. *Mol Cell*, **14**, 457-464.
- Gohler, T., Jager, S., Warnecke, G., Yasuda, H., Kim, E. and Deppert, W. (2005) Mutant p53 proteins bind DNA in a DNA structure-selective mode. *Nucleic Acids Res*, **33**, 1087-1100.
- Gohler, T., Reimann, M., Cherny, D., Walter, K., Warnecke, G., Kim, E. and Deppert, W. (2002) Specific interaction of p53 with target binding sites is determined by DNA conformation and is regulated by the C-terminal domain. *J Biol Chem*, **277**, 41192-41203.
- Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S.E., Scheffner, M. and Del Sal, G. (1999) Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo J*, **18**, 6462-6471.
- Grande, M.A., van der Kraan, I., de Jong, L. and van Driel, R. (1997) Nuclear distribution of transcription factors in relation to sites of transcription and RNA polymerase II. *J Cell Sci*, **110 (Pt 15)**, 1781-1791.
- Grant, S.G., Jessee, J., Bloom, F.R. and Hanahan, D. (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 4645-4649.
- Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M. and Harris, C.C. (1994) Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, **54**, 4855-4878.
- Gu, J., Kawai, H., Nie, L., Kitao, H., Wiederschain, D., Jochemsen, A.G., Parant, J., Lozano, G. and Yuan, Z.M. (2002) Mutual dependence of MDM2 and MDMX in their functional inactivation of p53. *J Biol Chem*, **277**, 19251-19254.
- Gu, W. and Roeder, R.G. (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, **90**, 595-606.
- Gu, W., Shi, X.L. and Roeder, R.G. (1997) Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature*, **387**, 819-823.
- Hainaut, P., Hall, A. and Milner, J. (1994) Analysis of p53 quaternary structure in relation to sequence-specific DNA binding. *Oncogene*, **9**, 299-303.

- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S.J. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, **75**, 805-816.
- Hearnese, J.M., Mays, D.J., Schavolt, K.L., Tang, L., Jiang, X. and Pietenpol, J.A. (2005) Chromatin immunoprecipitation-based screen to identify functional genomic binding sites for sequence-specific transactivators. *Mol Cell Biol*, **25**, 10148-10158.
- Helling, R.B., Goodman, H.M. and Boyer, H.W. (1974) Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J Virol*, **14**, 1235-1244.
- Helton, E.S. and Chen, X. (2007) p53 modulation of the DNA damage response. *J Cell Biochem*, **100**, 883-896.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1997) 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell*, **1**, 3-11.
- Herzenberg, L.A., Sweet, R.G. and Herzenberg, L.A. (1976) Fluorescence-activated cell sorting. *Sci Am*, **234**, 108-117.
- Heyne, K., Mannebach, S., Wuertz, E., Knaup, K.X., Mahyar-Roemer, M. and Roemer, K. (2004) Identification of a putative p53 binding sequence within the human mitochondrial genome. *FEBS Lett*, **578**, 198-202.
- Hinds, P.W., Finlay, C.A., Quartin, R.S., Baker, S.J., Fearon, E.R., Vogelstein, B. and Levine, A.J. (1990) Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes. *Cell Growth Differ*, **1**, 571-580.
- Hinds, P.W., Mittnacht, S., Dulic, V., Arnold, A., Reed, S.I. and Weinberg, R.A. (1992) Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins. *Cell*, **70**, 993-1006.
- Hinow, P., Rogers, C.E., Barbieri, C.E., Pietenpol, J.A., Kenworthy, A.K. and DiBenedetto, E. (2006) The DNA binding activity of p53 displays reaction-diffusion kinetics. *Biophys J*, **91**, 330-342.
- Hirao, A., Kong, Y.Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S.J. and Mak, T.W. (2000) DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science*, **287**, 1824-1827.
- Hofmann, T.G., Moller, A., Sirma, H., Zentgraf, H., Taya, Y., Droge, W., Will, H. and Schmitz, M.L. (2002) Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat Cell Biol*, **4**, 1-10.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C.C. (1991) p53 mutations in human cancers. *Science*, **253**, 49-53.
- Honda, B.M. and Roeder, R.G. (1980) Association of a 5S gene transcription factor with 5S RNA and altered levels of the factor during cell differentiation. *Cell*, **22**, 119-126.
- Hsiao, M., Low, J., Dorn, E., Ku, D., Pattengale, P., Yeargin, J. and Haas, M. (1994) Gain-of-function mutations of the p53 gene induce lymphohematopoietic metastatic potential and tissue invasiveness. *Am J Pathol*, **145**, 702-714.
- Hupp, T.R. and Lane, D.P. (1994) Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Curr Biol*, **4**, 865-875.
- Hupp, T.R., Meek, D.W., Midgley, C.A. and Lane, D.P. (1992) Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell*, **71**, 875-886.
- Iborra, F.J., Pombo, A., Jackson, D.A. and Cook, P.R. (1996) Active RNA polymerases are localized within discrete transcription "factories" in human nuclei. *J Cell Sci*, **109 (Pt 6)**, 1427-1436.
- IHGSC, I.H.G.S.C. (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, **431**, 931-945.
- Imbriano, C., Gurtner, A., Cocchiarella, F., Di Agostino, S., Basile, V., Gostissa, M., Dobbstein, M., Del Sal, G., Piaggio, G. and Mantovani, R. (2005) Direct p53 transcriptional repression: in vivo analysis of CCAAT-containing G2/M promoters. *Mol Cell Biol*, **25**, 3737-3751.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23-28.
- Iorio, M.V., Ferracin, M., Liu, C.G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., et al. (2005) MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, **65**, 7065-7070.
- Irwin, M.S., Kondo, K., Marin, M.C., Cheng, L.S., Hahn, W.C. and Kaelin, W.G., Jr. (2003) Chemosensitivity linked to p73 function. *Cancer Cell*, **3**, 403-410.

- Isobe, M., Emanuel, B.S., Givol, D., Oren, M. and Croce, C.M. (1986) Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*, **320**, 84-85.
- Iwanaga, Y. and Jeang, K.T. (2002) Expression of mitotic spindle checkpoint protein hsMAD1 correlates with cellular proliferation and is activated by a gain-of-function p53 mutant. *Cancer Res*, **62**, 2618-2624.
- Jackson, D.A., Hassan, A.B., Errington, R.J. and Cook, P.R. (1993) Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *Embo J*, **12**, 1059-1065.
- Janicek, M.F., Angioli, R., Unal, A.D., Sevin, B.U., Madrigal, M., Estape, R. and Averette, H.E. (1997) p53 interference and growth inhibition in p53-mutant and overexpressing endometrial cancer cell lines. *Gynecol Oncol*, **66**, 94-102.
- Janus, F., Albrechtsen, N., Knippschild, U., Wiesmuller, L., Grosse, F. and Deppert, W. (1999) Different regulation of the p53 core domain activities 3'-to-5' exonuclease and sequence-specific DNA binding. *Mol Cell Biol*, **19**, 2155-2168.
- Jeffrey, P.D., Gorina, S. and Pavletich, N.P. (1995) Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science*, **267**, 1498-1502.
- Jiang, M., Axe, T., Holgate, R., Rubbi, C.P., Okorokov, A.L., Mee, T. and Milner, J. (2001) p53 binds the nuclear matrix in normal cells: binding involves the proline-rich domain of p53 and increases following genotoxic stress. *Oncogene*, **20**, 5449-5458.
- Jiang, P., Du, W., Heese, K. and Wu, M. (2006) The Bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis. *Mol Cell Biol*, **26**, 9071-9082.
- Joerger, A.C., Ang, H.C. and Fersht, A.R. (2006) Structural basis for understanding oncogenic p53 mutations and designing rescue drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 15056-15061.
- Jurka, J. (1997) Sequence patterns indicate an enzymatic involvement in integration of mammalian retroposons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1872-1877.
- Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Craig, R.W. (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*, **51**, 6304-6311.
- Katsumoto, T., Higaki, K., Ohno, K. and Onodera, K. (1995) Cell-cycle dependent biosynthesis and localization of p53 protein in untransformed human cells. *Biol Cell*, **84**, 167-173.
- Kenmochi, N., Kawaguchi, T., Rozen, S., Davis, E., Goodman, N., Hudson, T.J., Tanaka, T. and Page, D.C. (1998) A map of 75 human ribosomal protein genes. *Genome Res*, **8**, 509-523.
- Kent, W.J., Sugnet, C.W., Furey, T.S., Roskin, K.M., Pringle, T.H., Zahler, A.M. and Haussler, D. (2002) The human genome browser at UCSC. *Genome Res*, **12**, 996-1006.
- Kern, S.E., Kinzler, K.W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C. and Vogelstein, B. (1991) Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science*, **252**, 1708-1711.
- Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Thiagalingam, S., Seymour, A., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1992) Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science*, **256**, 827-830.
- Khosravi, R., Maya, R., Gottlieb, T., Oren, M., Shiloh, Y. and Shkedy, D. (1999) Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14973-14977.
- Kim, E., Albrechtsen, N. and Deppert, W. (1997) DNA-conformation is an important determinant of sequence-specific DNA binding by tumor suppressor p53. *Oncogene*, **15**, 857-869.
- Kim, E., Gunther, W., Yoshizato, K., Meissner, H., Zapf, S., Nusing, R.M., Yamamoto, H., Van Meir, E.G., Deppert, W. and Giese, A. (2003) Tumor suppressor p53 inhibits transcriptional activation of invasion gene thromboxane synthase mediated by the proto-oncogenic factor ets-1. *Oncogene*, **22**, 7716-7727.
- Kim, E., Rohaly, G., Heinrichs, S., Gimnopoulos, D., Meissner, H. and Deppert, W. (1999) Influence of promoter DNA topology on sequence-specific DNA binding and transactivation by tumor suppressor p53. *Oncogene*, **18**, 7310-7318.
- Kim, Y.Y., Park, B.J., Kim, D.J., Kim, W.H., Kim, S., Oh, K.S., Lim, J.Y., Kim, J., Park, C. and Park, S.I. (2004) Modification of serine 392 is a critical event in the regulation of p53 nuclear export and stability. *FEBS Lett*, **572**, 92-98.
- Kitayner, M., Rozenberg, H., Kessler, N., Rabinovich, D., Shaulov, L., Haran, T.E. and Shakked, Z. (2006) Structural basis of DNA recognition by p53 tetramers. *Mol Cell*, **22**, 741-753.
- Koga, H. and Deppert, W. (2000) Identification of genomic DNA sequences bound by mutant p53 protein (Gly245-->Ser) in vivo. *Oncogene*, **19**, 4178-4183.

- Kress, M., May, E., Cassingena, R. and May, P. (1979) Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol*, **31**, 472-483.
- Kubbutat, M.H., Jones, S.N. and Vousden, K.H. (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, **387**, 299-303.
- Kussie, P.H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A.J. and Pavletich, N.P. (1996) Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*, **274**, 948-953.
- L'Esperance, S., Popa, I., Bachvarova, M., Plante, M., Patten, N., Wu, L., Tetu, B. and Bachvarov, D. (2006) Gene expression profiling of paired ovarian tumors obtained prior to and following adjuvant chemotherapy: molecular signatures of chemoresistant tumors. *Int J Oncol*, **29**, 5-24.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, **409**, 860-921.
- Lane, D.P. (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, **358**, 15-16.
- Lane, D.P. and Benchimol, S. (1990) p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev*, **4**, 1-8.
- Lane, D.P. and Crawford, L.V. (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, **278**, 261-263.
- Lang, G.A., Iwakuma, T., Suh, Y.A., Liu, G., Rao, V.A., Parant, J.M., Valentin-Vega, Y.A., Terzian, T., Caldwell, L.C., Strong, L.C., et al. (2004) Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell*, **119**, 861-872.
- Lanz, R.B., Chua, S.S., Barron, N., Soder, B.M., DeMayo, F. and O'Malley, B.W. (2003) Steroid receptor RNA activator stimulates proliferation as well as apoptosis in vivo. *Mol Cell Biol*, **23**, 7163-7176.
- Lanz, R.B., McKenna, N.J., Onate, S.A., Albrecht, U., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1999) A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell*, **97**, 17-27.
- Lanz, R.B., Razani, B., Goldberg, A.D. and O'Malley, B.W. (2002) Distinct RNA motifs are important for coactivation of steroid hormone receptors by steroid receptor RNA activator (SRA). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16081-16086.
- Lee, J., Sharma, S., Kim, J., Ferrante, R.J. and Ryu, H. (2007) Mitochondrial nuclear receptors and transcription factors: Who's minding the cell? *J Neurosci Res*.
- Lee, S., Elenbaas, B., Levine, A. and Griffith, J. (1995) p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell*, **81**, 1013-1020.
- Lee, Y.I., Lee, S., Das, G.C., Park, U.S., Park, S.M. and Lee, Y.I. (2000) Activation of the insulin-like growth factor II transcription by aflatoxin B1 induced p53 mutant 249 is caused by activation of transcription complexes; implications for a gain-of-function during the formation of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, **19**, 3717-3726.
- Leng, P., Brown, D.R., Shivakumar, C.V., Deb, S. and Deb, S.P. (1995) N-terminal 130 amino acids of MDM2 are sufficient to inhibit p53-mediated transcriptional activation. *Oncogene*, **10**, 1275-1282.
- Leng, R.P., Lin, Y., Ma, W., Wu, H., Lemmers, B., Chung, S., Parant, J.M., Lozano, G., Hakem, R. and Benchimol, S. (2003) Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell*, **112**, 779-791.
- Leygue, E. (2007) Steroid receptor RNA activator (SRA1): unusual bifaceted gene products with suspected relevance to breast cancer. *Nucl Recept Signal*, **5**, e006.
- Li, H.H., Cai, X., Shouse, G.P., Piluso, L.G. and Liu, X. (2007) A specific PP2A regulatory subunit, B56gamma, mediates DNA damage-induced dephosphorylation of p53 at Thr55. *Embo J*, **26**, 402-411.
- Li, H.H., Li, A.G., Sheppard, H.M. and Liu, X. (2004) Phosphorylation on Thr-55 by TAF1 mediates degradation of p53: a role for TAF1 in cell G1 progression. *Mol Cell*, **13**, 867-878.
- Li, M., Brooks, C.L., Wu-Baer, F., Chen, D., Baer, R. and Gu, W. (2003) Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science*, **302**, 1972-1975.

- Li, R., Sutphin, P.D., Schwartz, D., Matas, D., Almog, N., Wolkowicz, R., Goldfinger, N., Pei, H., Prokocimer, M. and Rotter, V. (1998) Mutant p53 protein expression interferes with p53-independent apoptotic pathways. *Oncogene*, **16**, 3269-3277.
- Lin, J., Chen, J., Elenbaas, B. and Levine, A.J. (1994) Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein. *Genes Dev*, **8**, 1235-1246.
- Lin, J., Teresky, A.K. and Levine, A.J. (1995) Two critical hydrophobic amino acids in the N-terminal domain of the p53 protein are required for the gain of function phenotypes of human p53 mutants. *Oncogene*, **10**, 2387-2390.
- Linzer, D.I. and Levine, A.J. (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, **17**, 43-52.
- Liu, M., Dhanwada, K.R., Birt, D.F., Hecht, S. and Pelling, J.C. (1994) Increase in p53 protein half-life in mouse keratinocytes following UV-B irradiation. *Carcinogenesis*, **15**, 1089-1092.
- Liu, Y. and Kulesz-Martin, M. (2001) p53 protein at the hub of cellular DNA damage response pathways through sequence-specific and non-sequence-specific DNA binding. *Carcinogenesis*, **22**, 851-860.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-408.
- Loging, W.T. and Reisman, D. (1999) Elevated expression of ribosomal protein genes L37, RPP-1, and S2 in the presence of mutant p53. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **8**, 1011-1016.
- Lohrum, M.A., Ludwig, R.L., Kubbutat, M.H., Hanlon, M. and Vousden, K.H. (2003) Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell*, **3**, 577-587.
- Lottin, S., Adriaenssens, E., Dupressoir, T., Berteaux, N., Montpellier, C., Coll, J., Dugimont, T. and Cury, J.J. (2002) Overexpression of an ectopic H19 gene enhances the tumorigenic properties of breast cancer cells. *Carcinogenesis*, **23**, 1885-1895.
- Lu, H. and Levine, A.J. (1995) Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5154-5158.
- Lu, X., Burbidge, S.A., Griffin, S. and Smith, H.M. (1996) Discordance between accumulated p53 protein level and its transcriptional activity in response to u.v. radiation. *Oncogene*, **13**, 413-418.
- Ludes-Meyers, J.H., Subler, M.A., Shivakumar, C.V., Munoz, R.M., Jiang, P., Bigger, J.E., Brown, D.R., Deb, S.P. and Deb, S. (1996) Transcriptional activation of the human epidermal growth factor receptor promoter by human p53. *Mol Cell Biol*, **16**, 6009-6019.
- Luhrmann, R., Kastner, B. and Bach, M. (1990) Structure of spliceosomal snRNPs and their role in pre-mRNA splicing. *Biochim Biophys Acta*, **1087**, 265-292.
- Lukashchuk, N. and Vousden, K.H. (2007) Ubiquitination and degradation of mutant p53. *Mol Cell Biol*, **27**, 8284-8295.
- Luo, J., Nikolaev, A.Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L. and Gu, W. (2001) Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*, **107**, 137-148.
- Ma, J., Martin, J.D., Zhang, H., Auger, K.R., Ho, T.F., Kirkpatrick, R.B., Grooms, M.H., Johanson, K.O., Tummino, P.J., Copeland, R.A., et al. (2006a) A second p53 binding site in the central domain of Mdm2 is essential for p53 ubiquitination. *Biochemistry*, **45**, 9238-9245.
- Ma, L.L., Sun, W.J., Wang, Z., Zh, G.Y., Li, P. and Fu, S.B. (2006b) Effects of silencing of mutant p53 gene in human lung adenocarcinoma cell line Anip973. *J Exp Clin Cancer Res*, **25**, 585-592.
- Mahyar-Roemer, M., Fritzsche, C., Wagner, S., Laue, M. and Roemer, K. (2004) Mitochondrial p53 levels parallel total p53 levels independent of stress response in human colorectal carcinoma and glioblastoma cells. *Oncogene*, **23**, 6226-6236.
- Majewski, J. and Ott, J. (2002) Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome. *Genome Res*, **12**, 1827-1836.
- Mandel, M. and Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*, **53**, 159-162.
- Manjeshwar, S., Lerner, M.R., Zang, X.P., Branam, D.E., Pento, J.T., Lane, M.M., Lightfoot, S.A., Brackett, D.J. and Jupe, E.R. (2004) Expression of prohibitin 3' untranslated region suppressor RNA alters morphology and inhibits motility of breast cancer cells. *J Mol Histol*, **35**, 639-646.

- Marchenko, N.D., Zaika, A. and Moll, U.M. (2000) Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem*, **275**, 16202-16212.
- Margulies, L. and Sehgal, P.B. (1993) Modulation of the human interleukin-6 promoter (IL-6) and transcription factor C/EBP beta (NF-IL6) activity by p53 species. *J Biol Chem*, **268**, 15096-15100.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R. and Tuschl, T. (2002) Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, **110**, 563-574.
- Mattick, J.S. (2005) The functional genomics of noncoding RNA. *Science*, **309**, 1527-1528.
- Maya, R., Balass, M., Kim, S.T., Shkedy, D., Leal, J.F., Shifman, O., Moas, M., Buschmann, T., Ronai, Z., Shiloh, Y., et al. (2001) ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev*, **15**, 1067-1077.
- Mazumder, B., Seshadri, V. and Fox, P.L. (2003) Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci*, **28**, 91-98.
- McGhee, J.D. and von Hippel, P.H. (1975a) Formaldehyde as a probe of DNA structure. I. Reaction with exocyclic amino groups of DNA bases. *Biochemistry*, **14**, 1281-1296.
- McGhee, J.D. and von Hippel, P.H. (1975b) Formaldehyde as a probe of DNA structure. II. Reaction with endocyclic imino groups of DNA bases. *Biochemistry*, **14**, 1297-1303.
- McKinney, K. and Prives, C. (2002) Efficient specific DNA binding by p53 requires both its central and C-terminal domains as revealed by studies with high-mobility group 1 protein. *Mol Cell Biol*, **22**, 6797-6808.
- McLure, K.G. and Lee, P.W. (1998) How p53 binds DNA as a tetramer. *Embo J*, **17**, 3342-3350.
- Mee, L.K. and Adelstein, S.J. (1981) Predominance of core histones in formation of DNA--protein crosslinks in gamma-irradiated chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 2194-2198.
- Meselson, M. and Yuan, R. (1968) DNA restriction enzyme from E. coli. *Nature*, **217**, 1110-1114.
- Meyers, J.A., Sanchez, D., Elwell, L.P. and Falkow, S. (1976) Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol*, **127**, 1529-1537.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P. and Moll, U.M. (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*, **11**, 577-590.
- Miller, S.J., Suthiphongchai, T., Zambetti, G.P. and Ewen, M.E. (2000) p53 binds selectively to the 5' untranslated region of cdk4, an RNA element necessary and sufficient for transforming growth factor beta- and p53-mediated translational inhibition of cdk4. *Mol Cell Biol*, **20**, 8420-8431.
- Milner, J. (1984) Different forms of p53 detected by monoclonal antibodies in non-dividing and dividing lymphocytes. *Nature*, **310**, 143-145.
- Milner, J. and Medcalf, E.A. (1991) Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell*, **65**, 765-774.
- Milner, J., Medcalf, E.A. and Cook, A.C. (1991) Tumor suppressor p53: analysis of wild-type and mutant p53 complexes. *Mol Cell Biol*, **11**, 12-19.
- Mittl, P.R., Chene, P. and Grutter, M.G. (1998) Crystallization and structure solution of p53 (residues 326-356) by molecular replacement using an NMR model as template. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **54**, 86-89.
- Miyashita, T. and Reed, J.C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, **80**, 293-299.
- Mizuarai, S., Yamanaka, K. and Kotani, H. (2006) Mutant p53 induces the GEF-H1 oncogene, a guanine nucleotide exchange factor-H1 for RhoA, resulting in accelerated cell proliferation in tumor cells. *Cancer Res*, **66**, 6319-6326.
- Moll, U.M., Marchenko, N. and Zhang, X.K. (2006) p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene*, **25**, 4725-4743.
- Momand, J., Wu, H.H. and Dasgupta, G. (2000) MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene*, **242**, 15-29.
- Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D. and Levine, A.J. (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, **69**, 1237-1245.
- Montoya, J., Lopez-Perez, M.J. and Ruiz-Pesini, E. (2006) Mitochondrial DNA transcription and diseases: past, present and future. *Biochim Biophys Acta*, **1757**, 1179-1189.

- Moore, P.B. (1998) The three-dimensional structure of the ribosome and its components. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **27**, 35-58.
- Mosner, J., Mummenbrauer, T., Bauer, C., Sczakiel, G., Grosse, F. and Deppert, W. (1995) Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *Embo J*, **14**, 4442-4449.
- Muller, B.F., Paulsen, D. and Deppert, W. (1996) Specific binding of MAR/SAR DNA-elements by mutant p53. *Oncogene*, **12**, 1941-1952.
- Muller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S.L., Galle, P.R., Stremmel, W., Oren, M., et al. (1998) p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med*, **188**, 2033-2045.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, **155**, 335-350.
- Mummenbrauer, T., Janus, F., Muller, B., Wiesmuller, L., Deppert, W. and Grosse, F. (1996) p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell*, **85**, 1089-1099.
- Muralidhar, S., Doniger, J., Mendelson, E., Araujo, J.C., Kashanchi, F., Azumi, N., Brady, J.N. and Rosenthal, L.J. (1996) Human cytomegalovirus mtrII oncoprotein binds to p53 and down-regulates p53-activated transcription. *J Virol*, **70**, 8691-8700.
- Murphy, K.L., Dennis, A.P. and Rosen, J.M. (2000) A gain of function p53 mutant promotes both genomic instability and cell survival in a novel p53-null mammary epithelial cell model. *Faseb J*, **14**, 2291-2302.
- Murray-Zmijewski, F., Lane, D.P. and Bourdon, J.C. (2006) p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ*, **13**, 962-972.
- Nagai, K. (1996) RNA-protein complexes. *Curr Opin Struct Biol*, **6**, 53-61.
- Nakamura, S., Gomyo, Y., Roth, J.A. and Mukhopadhyay, T. (2002) C-terminus of p53 is required for G(2) arrest. *Oncogene*, **21**, 2102-2107.
- Nakano, K. and Vousden, K.H. (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, **7**, 683-694.
- Nathans, D. and Smith, H.O. (1975) Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of dna molecules. *Annu Rev Biochem*, **44**, 273-293.
- Nedbal, W., Frey, M., Willemann, B., Zentgraf, H. and Sczakiel, G. (1997) Mechanistic insights into p53-promoted RNA-RNA annealing. *J Mol Biol*, **266**, 677-687.
- Nicholls, C.D., McLure, K.G., Shields, M.A. and Lee, P.W. (2002) Biogenesis of p53 involves cotranslational dimerization of monomers and posttranslational dimerization of dimers. Implications on the dominant negative effect. *J Biol Chem*, **277**, 12937-12945.
- Niranjankumari, S., Lasda, E., Brazas, R. and Garcia-Blanco, M.A. (2002) Reversible cross-linking combined with immunoprecipitation to study RNA-protein interactions in vivo. *Methods*, **26**, 182-190.
- Nowell, P.C. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, **194**, 23-28.
- O'Gorman, W., Thomas, B., Kwek, K.Y., Furger, A. and Akoulitchev, A. (2005) Analysis of U1 small nuclear RNA interaction with cyclin H. *J Biol Chem*, **280**, 36920-36925.
- Oberosler, P., Hloch, P., Ramsperger, U. and Stahl, H. (1993) p53-catalyzed annealing of complementary single-stranded nucleic acids. *Embo J*, **12**, 2389-2396.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. and Tanaka, N. (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, **288**, 1053-1058.
- Offer, H., Wolkowicz, R., Matas, D., Blumenstein, S., Livneh, Z. and Rotter, V. (1999) Direct involvement of p53 in the base excision repair pathway of the DNA repair machinery. *FEBS Lett*, **450**, 197-204.
- Okorokov, A.L., Rubbi, C.P., Metcalfe, S. and Milner, J. (2002) The interaction of p53 with the nuclear matrix is mediated by F-actin and modulated by DNA damage. *Oncogene*, **21**, 356-367.
- Okorokov, A.L., Sherman, M.B., Plisson, C., Grinkevich, V., Sigmundsson, K., Selivanova, G., Milner, J. and Orlova, E.V. (2006) The structure of p53 tumour suppressor protein reveals the basis for its functional plasticity. *Embo J*, **25**, 5191-5200.

- Olinski, R., Briggs, R.C. and Hnilica, L.S. (1981) Gamma-radiation-induced crosslinking of cell-specific chromosomal nonhistone protein-DNA complexes in HeLa chromatin. *Radiat Res*, **86**, 102-114.
- Olsson, A., Manzl, C., Strasser, A. and Villunger, A. (2007) How important are post-translational modifications in p53 for selectivity in target-gene transcription and tumour suppression? *Cell Death Differ*, **14**, 1561-1575.
- Oren, M. (1985) The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochim Biophys Acta*, **823**, 67-78.
- Palecek, E., Brazda, V., Jagelska, E., Pecinka, P., Karlovska, L. and Brazdova, M. (2004) Enhancement of p53 sequence-specific binding by DNA supercoiling. *Oncogene*, **23**, 2119-2127.
- Palecek, E., Brazdova, M., Brazda, V., Palecek, J., Billova, S., Subramaniam, V. and Jovin, T.M. (2001) Binding of p53 and its core domain to supercoiled DNA. *Eur J Biochem*, **268**, 573-581.
- Pavletich, N.P., Chambers, K.A. and Pabo, C.O. (1993) The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev*, **7**, 2556-2564.
- Pavlov, A.R. and Karam, J.D. (1994) Binding specificity of T4 DNA polymerase to RNA. *J Biol Chem*, **269**, 12968-12972.
- Pavlov, A.R. and Karam, J.D. (2000) Nucleotide-sequence-specific and non-specific interactions of T4 DNA polymerase with its own mRNA. *Nucleic Acids Res*, **28**, 4657-4664.
- Peterson, S.E., Stellwagen, A.E., Diede, S.J., Singer, M.S., Haimberger, Z.W., Johnson, C.O., Tzoneva, M. and Gottschling, D.E. (2001) The function of a stem-loop in telomerase RNA is linked to the DNA repair protein Ku. *Nat Genet*, **27**, 64-67.
- Pines, J. (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem J*, **308** (Pt 3), 697-711.
- Prasanth, K.V. and Spector, D.L. (2007) Eukaryotic regulatory RNAs: an answer to the 'genome complexity' conundrum. *Genes Dev*, **21**, 11-42.
- Rangel, L.B., Sherman-Baust, C.A., Wernyj, R.P., Schwartz, D.R., Cho, K.R. and Morin, P.J. (2003) Characterization of novel human ovarian cancer-specific transcripts (HOSTs) identified by serial analysis of gene expression. *Oncogene*, **22**, 7225-7232.
- Rastinejad, F., Conboy, M.J., Rando, T.A. and Blau, H.M. (1993) Tumor suppression by RNA from the 3' untranslated region of alpha-tropomyosin. *Cell*, **75**, 1107-1117.
- Reed, M., Woelker, B., Wang, P., Wang, Y., Anderson, M.E. and Tegtmeyer, P. (1995) The C-terminal domain of p53 recognizes DNA damaged by ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 9455-9459.
- Reich, N.C. and Levine, A.J. (1984) Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells. *Nature*, **308**, 199-201.
- Reis, E.M., Nakaya, H.I., Louro, R., Canavez, F.C., Flatschart, A.V., Almeida, G.T., Egidio, C.M., Paquola, A.C., Machado, A.A., Festa, F., et al. (2004) Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer. *Oncogene*, **23**, 6684-6692.
- Riley, K.J., Cassidy, L.A., Kumar, A. and Maher, L.J., 3rd. (2006) Recognition of RNA by the p53 tumor suppressor protein in the yeast three-hybrid system. *Rna*, **12**, 620-630.
- Riley, K.J., Ramirez-Alvarado, M. and Maher, L.J., 3rd. (2007) RNA-p53 interactions in vitro. *Biochemistry*, **46**, 2480-2487.
- Rodriguez, M.S., Desterro, J.M., Lain, S., Midgley, C.A., Lane, D.P. and Hay, R.T. (1999) SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *Embo J*, **18**, 6455-6461.
- Rohaly, G., Chemnitz, J., Dehde, S., Nunez, A.M., Heukeshoven, J., Deppert, W. and Dornreiter, I. (2005) A novel human p53 isoform is an essential element of the ATR-intra-S phase checkpoint. *Cell*, **122**, 21-32.
- Rolley, N., Butcher, S. and Milner, J. (1995) Specific DNA binding by different classes of human p53 mutants. *Oncogene*, **11**, 763-770.
- Rowley, J.D. (1982) Identification of the constant chromosome regions involved in human hematologic malignant disease. *Science*, **216**, 749-751.
- Rubbi, C.P. and Milner, J. (2003) p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *Embo J*, **22**, 975-986.

- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Saito, S., Goodarzi, A.A., Higashimoto, Y., Noda, Y., Lees-Miller, S.P., Appella, E. and Anderson, C.W. (2002) ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation. *J Biol Chem*, **277**, 12491-12494.
- Sakaguchi, K., Herrera, J.E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C.W. and Appella, E. (1998) DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev*, **12**, 2831-2841.
- Sakaguchi, K., Sakamoto, H., Lewis, M.S., Anderson, C.W., Erickson, J.W., Appella, E. and Xie, D. (1997) Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry*, **36**, 10117-10124.
- Samad, A. and Carroll, R.B. (1991) The tumor suppressor p53 is bound to RNA by a stable covalent linkage. *Mol Cell Biol*, **11**, 1598-1606.
- Sampath, J., Sun, D., Kidd, V.J., Grenet, J., Gandhi, A., Shapiro, L.H., Wang, Q., Zambetti, G.P. and Schuetz, J.D. (2001) Mutant p53 cooperates with ETS and selectively up-regulates human MDR1 not MRP1. *J Biol Chem*, **276**, 39359-39367.
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R.S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H. and Elledge, S.J. (1997) Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science*, **277**, 1497-1501.
- Savinova, O., Joshi, B. and Jagus, R. (1999) Abnormal levels and minimal activity of the dsRNA-activated protein kinase, PKR, in breast carcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol*, **31**, 175-189.
- Sax, J.K., Fei, P., Murphy, M.E., Bernhard, E., Korsmeyer, S.J. and El-Deiry, W.S. (2002) BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol*, **4**, 842-849.
- Schmidt, W.M. and Mueller, M.W. (1999) CapSelect: a highly sensitive method for 5' CAP-dependent enrichment of full-length cDNA in PCR-mediated analysis of mRNAs. *Nucleic Acids Res*, **27**, e31.
- Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R. and Barkan, A. (2005) RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast Pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates. *Plant Cell*, **17**, 2791-2804.
- Scian, M.J., Stagliano, K.E., Anderson, M.A., Hassan, S., Bowman, M., Miles, M.F., Deb, S.P. and Deb, S. (2005) Tumor-derived p53 mutants induce NF-kappaB2 gene expression. *Mol Cell Biol*, **25**, 10097-10110.
- Scian, M.J., Stagliano, K.E., Ellis, M.A., Hassan, S., Bowman, M., Miles, M.F., Deb, S.P. and Deb, S. (2004) Modulation of gene expression by tumor-derived p53 mutants. *Cancer Res*, **64**, 7447-7454.
- Shabalina, S.A. and Spiridonov, N.A. (2004) The mammalian transcriptome and the function of non-coding DNA sequences. *Genome Biol*, **5**, 105.
- Sharp, P.A., Sugden, B. and Sambrook, J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*, **12**, 3055-3063.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben-Ze'ev, A. and Rotter, V. (1990) Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol Cell Biol*, **10**, 6565-6577.
- Shchors, K., Yehiely, F., Kular, R.K., Kotlo, K.U., Brewer, G. and Deiss, L.P. (2002) Cell death inhibiting RNA (CDIR) derived from a 3'-untranslated region binds AUF1 and heat shock protein 27. *J Biol Chem*, **277**, 47061-47072.
- Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y. and Prives, C. (2000) The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev*, **14**, 289-300.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y. and Prives, C. (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, **91**, 325-334.
- Shimizu, H., Burch, L.R., Smith, A.J., Dornan, D., Wallace, M., Ball, K.L. and Hupp, T.R. (2002) The conformationally flexible S9-S10 linker region in the core domain of p53 contains a novel MDM2 binding site whose mutation increases ubiquitination of p53 in vivo. *J Biol Chem*, **277**, 28446-28458.

- Shivakumar, C.V., Brown, D.R., Deb, S. and Deb, S.P. (1995) Wild-type human p53 transactivates the human proliferating cell nuclear antigen promoter. *Mol Cell Biol*, **15**, 6785-6793.
- Shmueli, A. and Oren, M. (2005) Life, death, and ubiquitin: taming the mule. *Cell*, **121**, 963-965.
- Shohat, O., Greenberg, M., Reisman, D., Oren, M. and Rotter, V. (1987) Inhibition of cell growth mediated by plasmids encoding p53 anti-sense. *Oncogene*, **1**, 277-283.
- Shvarts, A., Bazuine, M., Dekker, P., Ramos, Y.F., Steegenga, W.T., Merckx, G., van Ham, R.C., van der Houven van Oordt, W., van der Eb, A.J. and Jochemsen, A.G. (1997) Isolation and identification of the human homolog of a new p53-binding protein, Mdmx. *Genomics*, **43**, 34-42.
- Simpson, D.A., Feeney, S., Boyle, C. and Stitt, A.W. (2000) Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR. *Mol Vis*, **6**, 178-183.
- Skalski, V., Lin, Z.Y., Choi, B.Y. and Brown, K.R. (2000) Substrate specificity of the p53-associated 3'-5' exonuclease. *Oncogene*, **19**, 3321-3329.
- Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H. and Williams, B.R. (2003) Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*, **5**, 834-839.
- Smits, V.A., Klompaker, R., Vallenius, T., Rijksen, G., Makela, T.P. and Medema, R.H. (2000) p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. *J Biol Chem*, **275**, 30638-30643.
- Soussi, T., Ishioka, C., Claustres, M. and Beroud, C. (2006) Locus-specific mutation databases: pitfalls and good practice based on the p53 experience. *Nat Rev Cancer*, **6**, 83-90.
- Soussi, T. and Lozano, G. (2005) p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, **331**, 834-842.
- Spector, D., Goldman, R. and Leinwand, L. (1998) Cells: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Speidel, D., Helmbold, H. and Deppert, W. (2006) Dissection of transcriptional and non-transcriptional p53 activities in the response to genotoxic stress. *Oncogene*, **25**, 940-953.
- Srivastava, S., Wang, S., Tong, Y.A., Hao, Z.M. and Chang, E.H. (1993) Dominant negative effect of a germ-line mutant p53: a step fostering tumorigenesis. *Cancer Res*, **53**, 4452-4455.
- Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J. and Wahl, G.M. (1999) A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *Embo J*, **18**, 1660-1672.
- Strano, S., Fontemaggi, G., Costanzo, A., Rizzo, M.G., Monti, O., Baccarini, A., Del Sal, G., Levrero, M., Sacchi, A., Oren, M., et al. (2002) Physical interaction with human tumor-derived p53 mutants inhibits p63 activities. *J Biol Chem*, **277**, 18817-18826.
- Sturzbecher, H.W., Brain, R., Addison, C., Rudge, K., Remm, M., Grimaldi, M., Keenan, E. and Jenkins, J.R. (1992) A C-terminal alpha-helix plus basic region motif is the major structural determinant of p53 tetramerization. *Oncogene*, **7**, 1513-1523.
- Subramanian, D. and Griffith, J.D. (2002) Interactions between p53, hMSH2-hMSH6 and HMG I(Y) on Holliday junctions and bulged bases. *Nucleic Acids Res*, **30**, 2427-2434.
- Sugarman, B.J., Aggarwal, B.B., Hass, P.E., Figari, I.S., Palladino, M.A., Jr. and Shepard, H.M. (1985) Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. *Science*, **230**, 943-945.
- Taira, N., Nihira, K., Yamaguchi, T., Miki, Y. and Yoshida, K. (2007) DYRK2 is targeted to the nucleus and controls p53 via Ser46 phosphorylation in the apoptotic response to DNA damage. *Mol Cell*, **25**, 725-738.
- Takenaka, I., Morin, F., Seizinger, B.R. and Kley, N. (1995) Regulation of the sequence-specific DNA binding function of p53 by protein kinase C and protein phosphatases. *J Biol Chem*, **270**, 5405-5411.
- Tam, W. and Dahlberg, J.E. (2006) miR-155/BIC as an oncogenic microRNA. *Genes Chromosomes Cancer*, **45**, 211-212.
- Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y. and Nakamura, Y. (2000) A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature*, **404**, 42-49.
- Tang, Y., Luo, J., Zhang, W. and Gu, W. (2006) Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell*, **24**, 827-839.

- Thomas, M., Kalita, A., Labrecque, S., Pim, D., Banks, L. and Matlashewski, G. (1999) Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol*, **19**, 1092-1100.
- Thomas, S. and Reisman, D. (2006) Localization of a mutant p53 response element on the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 promoter: mutant p53 activities are distinct from wild-type. *Cancer Lett*, **240**, 48-59.
- Thut, C.J., Chen, J.L., Klemm, R. and Tjian, R. (1995) p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science*, **267**, 100-104.
- Tibbetts, R.S., Brumbaugh, K.M., Williams, J.M., Sarkaria, J.N., Cliby, W.A., Shieh, S.Y., Taya, Y., Prives, C. and Abraham, R.T. (1999) A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev*, **13**, 152-157.
- Tokino, T., Thiagalingam, S., el-Deiry, W.S., Waldman, T., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1994) p53 tagged sites from human genomic DNA. *Hum Mol Genet*, **3**, 1537-1542.
- Tomita, Y., Marchenko, N., Erster, S., Nemajero, A., Dehner, A., Klein, C., Pan, H., Kessler, H., Pancoska, P. and Moll, U.M. (2006) WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem*, **281**, 8600-8606.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- Truant, R., Antunovic, J., Greenblatt, J., Prives, C. and Cromlish, J.A. (1995) Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 leads to inhibition by HBx of p53 response element-directed transactivation. *J Virol*, **69**, 1851-1859.
- Tsutsumi-Ishii, Y., Tadokoro, K., Hanaoka, F. and Tsuchida, N. (1995) Response of heat shock element within the human HSP70 promoter to mutated p53 genes. *Cell Growth Differ*, **6**, 1-8.
- Tuck, S.P. and Crawford, L. (1989) Characterization of the human p53 gene promoter. *Mol Cell Biol*, **9**, 2163-2172.
- Unger, T., Mietz, J.A., Scheffner, M., Yee, C.L. and Howley, P.M. (1993) Functional domains of wild-type and mutant p53 proteins involved in transcriptional regulation, transdominant inhibition, and transformation suppression. *Mol Cell Biol*, **13**, 5186-5194.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, **3**, RESEARCH0034.
- Varani, G. and Nagai, K. (1998) RNA recognition by RNP proteins during RNA processing. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **27**, 407-445.
- Vaziri, H., Dessain, S.K., Ng Eaton, E., Imai, S.I., Frye, R.A., Pandita, T.K., Guarente, L. and Weinberg, R.A. (2001) hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*, **107**, 149-159.
- Venot, C., Maratrat, M., Dureau, C., Conseiller, E., Bracco, L. and Debussche, L. (1998) The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *Embo J*, **17**, 4668-4679.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science*, **291**, 1304-1351.
- Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A.J. (2000) Surfing the p53 network. *Nature*, **408**, 307-310.
- Walker, K.K. and Levine, A.J. (1996) Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 15335-15340.
- Walter, K., Warnecke, G., Bowater, R., Deppert, W. and Kim, E. (2005) tumor suppressor p53 binds with high affinity to CTG.CAG trinucleotide repeats and induces topological alterations in mismatched duplexes. *J Biol Chem*, **280**, 42497-42507.
- Wang, Y. and Prives, C. (1995) Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. *Nature*, **376**, 88-91.
- Wang, Y.H., Tsay, Y.G., Tan, B.C., Lo, W.Y. and Lee, S.C. (2003) Identification and characterization of a novel p300-mediated p53 acetylation site, lysine 305. *J Biol Chem*, **278**, 25568-25576.

- Warnick, C.T., Dabbas, B., Ford, C.D. and Strait, K.A. (2001) Identification of a p53 response element in the promoter region of the hMSH2 gene required for expression in A2780 ovarian cancer cells. *J Biol Chem*, **276**, 27363-27370.
- Waterman, M.J., Stavridi, E.S., Waterman, J.L. and Halazonetis, T.D. (1998) ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet*, **19**, 175-178.
- Weber, J.D., Taylor, L.J., Roussel, M.F., Sherr, C.J. and Bar-Sagi, D. (1999) Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol*, **1**, 20-26.
- Wei, C.L., Wu, Q., Vega, V.B., Chiu, K.P., Ng, P., Zhang, T., Shahab, A., Yong, H.C., Fu, Y., Weng, Z., et al. (2006) A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell*, **124**, 207-219.
- Weinberg, R.L., Freund, S.M., Veprintsev, D.B., Bycroft, M. and Fersht, A.R. (2004) Regulation of DNA binding of p53 by its C-terminal domain. *J Mol Biol*, **342**, 801-811.
- Weinberg, R.L., Veprintsev, D.B., Bycroft, M. and Fersht, A.R. (2005) Comparative binding of p53 to its promoter and DNA recognition elements. *J Mol Biol*, **348**, 589-596.
- West, A.G. and Fraser, P. (2005) Remote control of gene transcription. *Hum Mol Genet*, **14 Spec No 1**, R101-111.
- Will, K., Warnecke, G., Albrechtsen, N., Boulikas, T. and Deppert, W. (1998a) High affinity MAR-DNA binding is a common property of murine and human mutant p53. *J Cell Biochem*, **69**, 260-270.
- Will, K., Warnecke, G., Wiesmuller, L. and Deppert, W. (1998b) Specific interaction of mutant p53 with regions of matrix attachment region DNA elements (MARs) with a high potential for base-unpairing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13681-13686.
- Williams, A.C., Miller, J.C., Collard, T.J., Bracey, T.S., Cosulich, S. and Paraskeva, C. (1995) Mutant p53 is not fully dominant over endogenous wild type p53 in a colorectal adenoma cell line as demonstrated by induction of MDM2 protein and retention of a p53 dependent G1 arrest after gamma irradiation. *Oncogene*, **11**, 141-149.
- Williams, B.R. (1999) PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene*, **18**, 6112-6120.
- Willis, A., Jung, E.J., Wakefield, T. and Chen, X. (2004) Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. *Oncogene*, **23**, 2330-2338.
- Wu, D.Y., Ugozzoli, L., Pal, B.K., Qian, J. and Wallace, R.B. (1991) The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol*, **10**, 233-238.
- Wu, G.S., Burns, T.F., McDonald, E.R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I.D., Kao, G., Gan, D.D., Zhou, J.Y., Muschel, R., et al. (1997) KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet*, **17**, 141-143.
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D. and Levine, A.J. (1993) The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*, **7**, 1126-1132.
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. and Beach, D. (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, **366**, 701-704.
- Xirodimas, D.P., Saville, M.K., Bourdon, J.C., Hay, R.T. and Lane, D.P. (2004) Mdm2-mediated NEDD8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell*, **118**, 83-97.
- Yakovleva, T., Pramanik, A., Kawasaki, T., Tan-No, K., Gileva, I., Lindegren, H., Langel, U., Ekstrom, T.J., Rigler, R., Terenius, L., et al. (2001) p53 Latency. C-terminal domain prevents binding of p53 core to target but not to nonspecific DNA sequences. *J Biol Chem*, **276**, 15650-15658.
- Yoshihama, M., Uechi, T., Asakawa, S., Kawasaki, K., Kato, S., Higa, S., Maeda, N., Minoshima, S., Tanaka, T., Shimizu, N., et al. (2002) The human ribosomal protein genes: sequencing and comparative analysis of 73 genes. *Genome Res*, **12**, 379-390.
- Zalcenstein, A., Stambolsky, P., Weisz, L., Muller, M., Wallach, D., Goncharov, T.M., Krammer, P.H., Rotter, V. and Oren, M. (2003) Mutant p53 gain of function: repression of CD95(Fas/APO-1) gene expression by tumor-associated p53 mutants. *Oncogene*, **22**, 5667-5676.

- Zalcenstein, A., Weisz, L., Stambolsky, P., Bar, J., Rotter, V. and Oren, M. (2006) Repression of the MSP/MST-1 gene contributes to the antiapoptotic gain of function of mutant p53. *Oncogene*, **25**, 359-369.
- Zauberman, A., Barak, Y., Ragimov, N., Levy, N. and Oren, M. (1993) Sequence-specific DNA binding by p53: identification of target sites and lack of binding to p53 - MDM2 complexes. *Embo J*, **12**, 2799-2808.
- Zhan, Q., Antinore, M.J., Wang, X.W., Carrier, F., Smith, M.L., Harris, C.C. and Fornace, A.J., Jr. (1999) Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene*, **18**, 2892-2900.
- Zhang, Y., Wolf, G.W., Bhat, K., Jin, A., Allio, T., Burkhardt, W.A. and Xiong, Y. (2003) Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Mol Cell Biol*, **23**, 8902-8912.
- Zhang, Y. and Xiong, Y. (2001) A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science*, **292**, 1910-1915.
- Zhang, Y., Xiong, Y. and Yarbrough, W.G. (1998) ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell*, **92**, 725-734.
- Zhang, Z., Harrison, P. and Gerstein, M. (2002) Identification and analysis of over 2000 ribosomal protein pseudogenes in the human genome. *Genome Res*, **12**, 1466-1482.
- Zhou, J., Ahn, J., Wilson, S.H. and Prives, C. (2001) A role for p53 in base excision repair. *Embo J*, **20**, 914-923.
- Zhou, Y., Zhong, Y., Wang, Y., Zhang, X., Batista, D.L., Gejman, R., Ansell, P.J., Zhao, J., Weng, C. and Klibanski, A. (2007) Activation of p53 by MEG3 non-coding RNA. *J Biol Chem*, **282**, 24731-24742.
- Zhu, J., Zhang, S., Jiang, J. and Chen, X. (2000) Definition of the p53 functional domains necessary for inducing apoptosis. *J Biol Chem*, **275**, 39927-39934.
- Zhu, J., Zhou, W., Jiang, J. and Chen, X. (1998) Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for mediating apoptosis. *J Biol Chem*, **273**, 13030-13036.
- Zink, D., Mayr, C., Janz, C. and Wiesmuller, L. (2002) Association of p53 and MSH2 with recombinative repair complexes during S phase. *Oncogene*, **21**, 4788-4800.
- Zurer, I., Hofseth, L.J., Cohen, Y., Xu-Welliver, M., Hussain, S.P., Harris, C.C. and Rotter, V. (2004) The role of p53 in base excision repair following genotoxic stress. *Carcinogenesis*, **25**, 11-19.

ANHANG

A1 mutp53-Bindestellen aus ChIP Experimente

A1.1 MDAMB468

<i>Lokalisation im Genom</i>	<i>In Gen (Gen Referenznummer)</i>	<i>Intron/ Exon</i>	<i>Repeat</i>
chr3:138,715,901-138,716,688			MSTB (LTR) und MIRb (SINE)
chr3:143,519,245-143,519,545	5'-3' exoribonuclease 1 (NM_019001)	Intron 31	HAL1 (LINE)
chr3:26,178,273-26,178,475			HERVH (LTR)
chr3:27,857,747-27,858,435			L2 (LINE) und LTR16C (LTR)
chr4:49,475,418-49,491,395			Satellit (GAATG) _n
chr5:175,202,705-175,203,071	complexin 2 (NM_006650)	Intron 2	
chr6:32,905,001-32,905,416	TAP2 (NM_018833)	Intron10 bis Intron11	
chr7:16,196,671-16,196,838			L1PA3 (LINE)
chr7:43,842,731-43,843,247			AluSx (SINE); L2 (LINE); MER5B (LTR)
chr8:25,592,198-25,592,579			
chr9:83,599,197-83,599,550	G kinase anchoring protein 1 (NM_025211)	Intron 8	L2 (LINE)
chr9_random:473,579474,289			AluJb (SINE)
chr10:4,456,694-4,456,906			L1LCM4 (LINE)
chr10:71,918,844-71,919,033	KIAA1274 (NM_014431)	Intron 1	
chr11:66,097,132-66,097,359			AluSq (SINE) und MER4D1 (LTR)
chr17:35,048,869-35,049,442	STARD3 (NM_006804)	Intron 1	AluJo (SINE)
chr17:75,800,830-75,801,527	Sulfamidase (NM_000199)	Intron 6	MLT1C (LTR) und AluSg (SINE)
chr18:39,569,465-39,569,612			MLT1B (LTR)
chr19:14,376,691-14,376,932	CD97 Antigenisoform 1 (NM_078481)	Intron 13	AluSx (SINE)
chr19:56,547,179-56,547,961	Elektronen Transfer Flavoprotein (NM_001014763)	Intron2	L2 (LINE) und AluSx (SINE)
chr19:58,900,760-58,901,411			AluSx (SINE)
chr20:4,118,838-4,119,312			AluSx (SINE); L1MC4a (LINE); AluSq (SINE)
chr21:10,148,711-10,149,633			Alusq/p (SINE); L1PA13 (LINE); (TTTG) _n
chr22:18,725,371-18,725,650			

A1.2 MDAMB231

<i>Lokalisation im Genom</i>	<i>In Gen (Gen Referenznummer)</i>	<i>Intron/ Exon</i>	<i>Repeat</i>
chr1:105,739,814-105,739,842			(LTR)48-int (LTR)
chr1:110,031,873-110,032,213			
chr1:144,140,839-144,140,946			L1Pa5 (LINE)
chr1:144,986,831-144,987,035			(LTR)71B (LTR)
chr1:146,705,642-146,706,003			L2 (LINE) und MER2 ((DNA))
chr1:147,755,086-147,755,586	LAG1 longevity assurance homolog 2 (NM_181746)	Intron 1	AluSg und AluJb (SINE)
chr1:2,927,092-2,927,261			
chr1:202,508,685-202,508,884	solute carrier family 41 member 1 (NM_173854)	Intron 2	AluJo und AluSx (SINE)
chr1:24,159,209-24,159,363	MYOM3 protein (BC067101)	Intron 14	L2 (LINE)
chr1:241,971,108-241,971,325			
chr1:27,882,039-27,882,339			FIAM_C und AluSq (SINE)
chr1:59,954,995-59,955,322			(LTR)33A (LTR)
chr1:64,860,039-64,860,088			
chr1:65,287,855-65,287,921			AluY (SINE)

chr1:7,080,415-7,080,563 chr1:70,905,280-70,905,779	calmodulin-binding transcription activator (NM_015215)	Intron 3	L1PA11 (LINE)
chr1:85,713,678-85,714,168			AluSx und AluSc (SINE); L1MA6 (LINE)
chr2:105,368,421-105,368,451 chr2:11,082,717-11,082,920	TGF beta receptor associated protein -1 (NM_004257)	Intron 4	
chr2:113,546,150-113,546,273	interleukin 1 family, member 10 (NM_032556)	Exon 1	
chr2:137,084,856-137,085,429 chr2:164,340,865-164,340,924	FIGN (BX649105)	Intron 2	L1MC4 (LINE) und AluSx (SINE)
chr2:192,527,252-192,527,946	serum deprivation response protein (NM_004657)	Intron 1	
chr2:233,234,079-233,234,233	cholinergic receptor (NM_005199)	Intron 9	MIR (SINE)
chr2:25,377,379-25,377,784	DNA -methyltransferase 3 alpha (BC043617)	Intron 15	L1ME4a (LINE) und AluSg (SINE)
chr2:27,268,146-27,268,814 chr2:30,424,313-30,424,339 chr2:37,548,147-37,548,201	prolactin regulatory element binding pro	Exon 1- Intron1- Exon 2	MIRb (SINE)
chr2:4,990,240-4,990,658 chr2:42,020,033-42,020,083 chr2:42,022,964-42,023,470	tetratricopeptide repeat domain 15 (NM_013388)	Intron 6	MIRb (SINE) MIRb (SINE)
chr2:47,115,324-47,115,884	tetratricopeptide repeat domain 7A (NM_020458)	Intron 4	MIR20 (DNA)
chr2:47,477,404-47,477,679 chr2:73,848,688-73,848,712 chr2:82,548,073-82,548,611 chr3:15,667,628-15,667,739 chr3:16,258,679-16,258,794 chr3:181,034,961-181,035,084			L1MEc (LINE) und MLT1C (LTR) L2 (LINE) MIRb (SINE) und (TA)n MLT1K (LTR) MLT1H1 (LTR)
chr3:25,570,173-25,570,484	PXR2b protein (NM_016559)	Intron 8	
chr3:49,574,381-49,574,688	retinoic acid receptor, beta isoform 1 or 2 (NM_000965)	Intron 3	L2 (LINE)
chr3:60,030,718-60,031,039 chr4:1,478,191-1,478,765	bassoon (presynaptic cytomatrix protein) (NM_003458)	Intron 1	L1MA8 (LINE) und AluSx (SINE)
chr4:148,762,642-148,762,672 chr4:185,491,884-185,491,935	fragile histidine triad gene (NM_002012)	Intron 8	L2 (LINE) und MER5A (LTR) L1ME1 (LINE)
chr4:191,363,694-191,363,989 chr4:387,698-387,776 chr4:48,937,790-48,949,169 chr4:48,957,664-48,965,785 chr4:48,975,550-48,997,987 chr4:49,157,841-49,158,090 chr4:49,482,205-49,487,801 chr4:57,533,583-57,533,675 chr5:108,601,427-108,602,098 chr5:114,712,220-114,712,272	endothelin receptor type A (NM_001957)	Intron 1	AluJo (SINE)
	ENPP6 (NM_153343)	Intron 1	L1MB3 (LINE)
	Dux4 NM_033178.2	Exon 2- Intron 2	
			LTR12C (LTR)
			SATELLIT II (im Zentromer)
			SATELLIT II (im Zentromer)
			SATELLIT II (im Zentromer)
			SATELLIT II (im Zentromer)
			AluSq (SINE)
chr5:131,897,281-131,897,741 chr5:132,131,021-132,131,276			L1ME3b (LINE) und AluSq (SINE)
chr5:170,340,197-170,340,751 chr5:174,287,632-174,287,787	septin 8 (AF440762)	Intron 1	
	RAN binding protein 17(RANBP17) (NM_022897)	Intron 11	THE1B-int (LTR)
chr5:180,150,957-180,151,016 chr5:34,680,342-34,680,378 chr5:6,087,732-6,088,051 chr5:77,634,625-77,635,091 chr5:83,053,095-83,053,391	mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein (NM_002406)	Exon 1	L1ME (LINE) und AluY (SINE)
			L1PA6 (LINE)
chr5:97,540,053-97,540,622			L1M4 (LINE) und MLT1D (LTR) (CA)n
			THE1P-int (LTR) und L1PA13 (LINE)
chr6:107,069,830-107,070,183 chr6:160,050,851-160,050,898 chr6:167,189,073-167,189,110	absent in melanoma 1 (NM_001624)	Intron 1	AluSg (SINE)
	ribosomal protein S6 kinase	Intron 2	L1MC4B (LINE)

chr6:169,057,772-169,057,889	(NM_001006932)		(ATG)n
chr6:170,289,249-170,289,696			
chr6:39,103,023-39,103,466	dynein, axonemal, heavy polypeptide 8 (NM_001371)	Last	MIRm und AluSx (SINE)
chr6:51,490,062-51,490,366			
chr6:52,868,690-52,869,017			L2 (LINE)
chr6:55,883,726-55,883,796			SVA
chr6:56,240,360-56,240,738	Alpha 1 chain-like collagen COLA1L pr. (AF330693)	Intron 1	AluSx (SINE) und L1PA12 (LINE)
chr6:7,483,549-7,483,896			MIRb (SINE) und (TG)n
chr7:137,157,884-137,158,081			LTR36-int (LTR)
chr7:148,926,716-148,933,475			
chr7:27,266,574-27,267,032			
chr7:3,635,808-3,635,828	sidekick homolog 1 (NM_152744)	Intron 5	
chr7:51,556,196-51,556,435			MER96B (DNA)
chr7:7,342,729-7,343,157			MIR (SINE)
chr8:102,139,657-102,140,286			L2 (LINE)
chr8:126,579,500-126,579,750			AluSx (SINE)
chr8:142,498,112-142,498,419			
chr8:142,523,511-142,523,590			L1MB3 (LINE)
chr8:145,141,864-145,142,086			MER90a (LTR)
chr8:85,226,104-85,226,173			AluY (SINE)
chr8:95,441,731-95,441,955			
chr8_random:219,366-223,085			SATELLIT (alpha)
chr8_random:795,874-796,184	Beta-glucuronidase-like protein SMA3 (AK097091)	Intron 3	L1PA16 (LINE)
chr9:100,310,697-100,310,981			L2 (LINE)
chr9:121,738,412-121,739,033			
chr9:4,601,046-4,601,230	AK000920 (AK000920)	Intron 11	L1PA3 (LINE)
chr9:73,978,376-73,978,422			LTR1D (LTR)
chr9:81,617,242-81,617,559			AluSp (SINE) und LTR33 (LINE)
chr9:90,681,822-90,681,856	spleen tyrosine kinase (NM_003177)	Intron 1	
chr9:90,915,874-90,916,093			
chr9:96,779,080-96,779,109	FKSG60 (AF336887)	Intron 2	
chr10:100,254,850-100,255,502	heparanase 2 u.3 (NM_021828)	Intron 7	L1ME3B (LINE) und MER5A (DNA)
chr10:119,435,152-119,435,234			
chr10:119,435,152-119,435,234			
chr10:124,816,704-124,816,952			MIR (SINE)
chr10:15,940,730-15,941,269	BC067799 (Novel Protein) (BC067799)	Intron 1	MIR (SINE)
chr10:26,400,937-26,401,004	myosin IIIA (NM_017433)	Intron 14	THE1D (LTR)
chr10:41,674,956-41,675,228			SATELLITE II (im Zentromere)
chr10:41,680,604-41,688,160			SATELLITE II (im Zentromere)
chr10:41,709,896-41,917,006			SATELLITE II (im Zentromere)
chr10:45,383,399-45,383,916	cellular modulator of immune recognition (NM_001002265)	Intron 1	L1MA1 (LINE) und MER30 (DNA) und AluSc (SINE)
chr10:49,395,411-49,395,646	Rho GTPase activating protein 2 (NM_021226)	Intron 6	
chr10:49,560,442-49,560,845			L1MEc (LINE)
chr10:76,279,477-76,279,781	MYST histone acetyltransferase (NM_012330)	Intron 2	MIR und AluY (SINE)
chr10:77,222,644-77,222,673	C10orf11	Intron 1	MIR (SINE)
chr10:79,600,355-79,600,722			MIR (SINE) und LOW COMPLEXITY
chr10:88,259,007-88,259,274	Mammalian homolog of wings ap. (AF479418)	Intron 3	L2 (LINE)
chr11:38,483,398-38,483,678			AluY und MIRm (SINE)
chr11:45,194,486-45,194,729	PR domain containing 11 (NM_020229)	Intron 4	
chr11:45,856,898-45,857,075	cryptochrome 2 (CRY2) (NM_021117)	Intron 10	AluSx (SINE)
chr11:466,027-466,059	phosphatidylserine synthase 2 (NM_030783)	Intron 3	
chr11:57,315,640-57,315,873	catenin (CR749275)	Exon 3- Intron 3	
chr11:66,827,607-66,827,916	slingshot homolog 3 (NM_017857)	Exon 1- Intron 1	
chr11:67,287,911-67,288,219			HERVH (LTR)
chr11:68,782,543-68,782,752			MER5A (DNA)
chr12:118,784,267-118,784,602			AluJo (SINE) und (GGAA)n
chr12:119,124,823-119,125,355	paxillin (NM_002859)	Intron 1	
chr12:121,141,214-121,141,486	MONDOA protein (BC028309)	Intron 5	AluJb und AluSc (SINE)

chr12:129,141,199-129,141,232			LTR33A (LTR)
chr12:3,649,605-3,649,865			
chr12:40,226,128-40,226,257	PDZ domain containing RING finger 4 (NM_013377)	Intron 3	L2 (LINE)
chr12:41,487,530-41,487,586			
chr12:5,458,866-5,458,953			
chr12:58,961,666-58,961,770			MER52A (LTR)
chr13:108,004,945-108,005,082			AluY (SINE)
chr13:25,048,166-25,048,499	ATPase, aminophospholipid (AK127263)	Intron 21	MIRb (SINE)
chr13:63,773,771-63,773,906			AluY (SINE)
chr14:100,113,903-100,114,139			
chr14:103,130,144-103,130,378			AluSg (SINE)
chr14:103,143,133-103,143,238			MLT1C (LTR)
chr14:18,569,891-18,570,252			
chr14:87,576,758-87,577,245			L2 (LINE) und AluJb (SINE)
chr15:22,127,703-22,128,309			L1MC3 (LINE) und AluY (SINE)
chr15:63,415,000-63,415,043	putative neuronal cell adhesion molecule (NM_004884)	Intron 3	
chr15:68,306,204-68,306,499			MIRb (SINE)
chr15:68,653,665-68,653,904			THE1B (LTR)
chr15:86,612,300-86,612,763			
chr15:86,897,990-86,898,405			SVA
chr15:97,507,757-97,508,082	Proto-oncogene 8 (AF411456)	Intron 9	L2 (LINE)
chr16:3,439,720-3,440,065			THE1B (LTR)
chr16:34,451,202-34,451,308			AluSg (SINE)
chr16:68,674,195-68,674,440	Secretory protein LOC348174 (BC078143)	Intron 4	AluSx (SINE)
chr16:69,471,234-69,471,358			
chr16:86,893,204-86,893,554			
chr17:24,042,851-24,043,086	Suppressor of Ty 6 homolog protein (NM_003170)	Intron 27	AluY und FLAM_A (SINE)
chr17:32,094,869-32,095,230			L2 (LINE) und AluY (SINE)
chr17:35,327,859-35,327,890			
chr17:62,360,059-62,360,159			MIRb (SINE)
chr17:7,513,475-7,514,673	tumor protein p53 (NM_000546)	Exon 10- Intron10- Exon 11	AluSp und MIRb (SINE)
chr18:42,246,759-42,247,115	arkadia-like 2 (NM_152470)	Intron 1	MIR (SINE)
chr18:98,417-98,984			SATELLIT (beta)
chr19:13,386,797-13,387,000	calcium channel, alpha 1A SU isoform 2 (NM_023035)	Intron 3	AluJb (SINE)
chr19:19,240,428-19,240,547	transmembrane 6 superfamily (NM_203510)	Intron 3	
chr19:62,385,846-62,386,464			MIRb und AluY (SINE)
chr19:7,680,176-7,680,493			AluSc und AluJo (SINE)
chr19:8,291,383-8,291,841	NADH dehydrogenase (BC003102)	Intron 1 - Exon 2 - Intron 2	MIRb (SINE)
chr20:50,881,147-50,881,170			
chr20:724,201-724,747			
chr21:37,123,005-37,123,179	holocarboxylase synthetase (NM_000411)	Intron 7	
chr21:40,475,716-40,475,746	Down syndrome cell adhesion molecule (NM_001389)	Intron 14	
chr21:41,326,187-41,326,588			
chr22:19,040,870-19,041,303			
chr22:23,697,423-23,697,772			
chrX:153,162,842-153,163,081	tafazzin isoform 1 (NM_000116)	Intron 4	
chrX:30,781,699-30,782,071			
chrX:40,205,730-40,206,026	ATPase, H ⁺ transporting, (NM_005765)	Intron 2	
chrX:65,163,324-65,163,538			
chrX:70,241,942-70,242,050			
chrX:71,618,838-71,619,229	phosphorylase kinase, alpha 1 (NM_002637)	Intron 22	

A2 p53-gebundene Transkripte aus RIP Experimente

A2.1 MCF7

Genom. Lokalisation der codierenden Sequenz	Gen	Art des Transkripts
chr1:143,609,354-143,609,417	PDE4DIP	intronisch
chr1:26,671,593-26,675,043	HMG2	vollständig
chr1:9,711,671-9,711,776	CLSTN1	3'UTR
chr2:161,800,761-161,800,929	TANK	3'UTR
chr2:61,949,148-61,956,878	CCT4	partiell
chr3:44,425,897-44,425,944	C3orf23	3'UTR
chr3:9,823,308-9,823,789	ARPC4	3'UTR
chr4:119,174,744-119,174,770	NDST3	intronisch
chr4:119,855,904-119,856,033		kein Gen
chr4:141,522,916-141,523,155	SCOC	3'UTR
chr4:75,245,148-75,245,209	MTHFD2L	intronisch
chr5:138,298,109-138,298,300	CTNNA1	interne rGrGrG
chr5:179,936,100-179,936,431	CNOT6	3'UTR
chr7:100,591,208-100,591,277	AP1S1	interne rGrGrG
chr7:36,330,357-36,331,025	KIAA0895	3'UTR
chr7:44,120,814-44,122,587	POLD2	partiell
chr8:124,896,267-124,896,856	FAM91A1	3'UTR
chr8:133,880,947-133,881,165	PHF20L1	intronisch
chr8:37,671,136-37,671,459		kein Gen
chr9:138,807,405-138,807,530	TMEM141	3'UTR
chr10:70,414,466-70,414,830	CR620487	3'UTR
chr11:116,546,825-116,546,971	PAFAH1B2	intronisch
chr11:553,921-554,019	RASSF7	3'UTR
chr12:103,089,519-103,095,822		kein Gen
chr12:109,357,094-109,372,522	ARPC3	vollständig
chr12:48,238,352-48,238,392	MCRS1	3'UTR
chr12:48,439,342-48,443,055	TEGT	partiell
chr13:26,728,389-26,728,705	RPL21	letzte 2 Exons
chr13:44,809,312-44,809,382	TPT1	3'UTR
chr14:54,378,485-54,378,605	GCH1	interne rGrGrG
chr15:66,286,384-66,286,418	CLN6	interne rGrGrG
chr16:1,952,063-1,952,184	OK/KNS-cl.6	3'UTR
chr16:638,447-638,475	C16orf14	3'UTR
chr16:88,156,962-88,156,982	RPL13	3'UTR
chr17:3,564,671-3,564,726	ITGAE	3'UTR
chr17:44,361,283-44,361,417	UBE2Z	3'UTR
chr17:45,800,227-45,805,544	MRPL27	vollständig
chr17:7,213,096-7,213,118		SINE
chr17:71,215,441-71,215,686	SAP30BP	3'UTR
chr18:17,463,132-17,463,194	SNRPD1	3'UTR
chr19:44,206,501-44,206,541	FBXO27	3'UTR
chr19:55,101,894-55,102,129	IL411	intronisch
chr20:33,751,031-33,752,316	C20orf52	SINE
chr20:42,528,560-42,528,630		kein Gen
chrX:23,595,595-23,614,433	PRDX4	vollständig

A2.2 MDAMB231

Genom. Lokalisation der codierenden Sequenz	Gen	Art des Transkripts
chr1:110,745,398-110,751,824	HBXIP	vollständig
chr1:209,983,425-209,983,560		kein Gen
chr1:24,677,465-24,677,491		SINE (kein Gen)
chr1:36,173,426-36,173,454	EIF2C3	intronisch
chr1:6,169,262-6,169,590	RPL22	partiell
chr1:91,625,366-91,625,505	HFM1	interne rGrGrG
chr1:95,135,103-95,135,166	CNN3	3'UTR
chr2:15,688,382-15,688,673	DDX1	3'UTR
chr2:230,885,808-230,886,174	SP140	LTR
chr2:3,606,274-3,606,384	RPS7	3'UTR
chr2:70,362,140-70,374,353	SNRPG	partiell
chr3:114,920,526-114,920,590	NAT13	3'UTR
chr3:121,595,816-121,596,154	FSTL1	3'UTR
chr3:132,551,941-132,551,993	NEK11	3'UTR
chr3:14,960,759-14,961,107	CR623576	SINE
chr3:169,567,611-169,567,632		SINE/ interne rGrGrG
chr3:185,508,371-185,509,532	PSMD2	partiell
chr3:50,974,471-50,974,497	DOCK3	LINE/ intronisch
chr3:63,794,586-63,794,674	THOC7	3'UTR
chr4:57,591,922-57,592,081	POLR2B	3'UTR
chr4:80,058,120-80,058,263	PAQR3	3'UTR
chr5:133,560,687-133,561,053	PPP2CA	3'UTR
chr5:139,910,275-139,917,224	SRA1	vollständig
chr5:68,449,293-68,449,775	SLC30A5	SINE
chr5:72,830,034-72,837,076	BTF3	vollständig
chr6:24,811,438-24,811,852		LINE
chr6:34,493,209-34,493,242	RPS10	3'UTR
chr6:44,074,578-44,075,267	AK024736	LTR/ SINE
chr7:10,939,608-10,939,631	NDUFA4	3'UTR
chr7:26,197,989-26,198,161	HNRPA2B1	3'UTR
chr7:26,197,989-26,198,699	HNRPA2B1	partiell
chr8:55,034,072-55,034,416	RGS20	3'UTR
chr9:36,667,577-36,667,679	MELK	3'UTR
chr10:4,683,282-4,710,308	CR749391	partiell
chr10:51,256,863-51,257,194	PARG (intrinsic)	DNA repeat
chr10:59,825,210-59,825,902	TFAM	DNA repeat
chr11:17,052,512-17,055,749	RPS13	interne rGrGrG
chr11:2,922,243-2,922,329	NAP1L4	3'UTR
chr11:65,378,870-65,379,053	CFL1	interne rGrGrG
chr11:65,415,639-65,415,682	CCDC85B	3'UTR
chr11:66,596,034-66,596,060	RHOD	interne rGrGrG
chr12:122,718,071-122,718,339		LINE
chr12:13,127,396-13,127,650	KIAA1467	3'UTR
chr12:36,151,879-36,151,907		LINE zentromerisch
chr12:47,608,094-47,608,753		SINE
chr12:52,159,454-52,159,668	PCBP2	3'UTR
chr12:68,281,361-68,281,610	CCT2	3'UTR
chr14:54,602,535-54,602,687	C14orf32	3'UTR
chr14:68,324,132-68,324,231	ZFP36L1	3'UTR
chr14:73,248,239-73,248,754	PNMA1	3'UTR
chr15:64,570,676-64,570,924	MAP2K1	interne rGrGrG
chr16:3,011,968-3,012,385	TNFRSF12A	3'UTR
chr16:88,154,591-88,155,661	RPL13	lost 3'end
chr17:26,250,181-26,250,235	C17orf42	3'UTR
chr17:27,351,981-27,352,166	SUZ12	3'UTR
chr17:53,777,551-53,777,746	SUPT4H1	3'UTR
chr17:54,542,147-54,542,418	FAM33A	LINE
chr17:55,609,374-55,609,434		kein Gen/ interne rGrGrG
chr17:7,103,881-7,103,980	C17orf81	low complexity repeat
chr17:70,675,651-70,690,639	SUMO2	partiell
chr19:47,056,148-47,064,980	RPS19	interne rGrGrG
chr21:27,131,054-27,131,124	ADAMTS1	3'UTR
chr22:31,588,774-31,589,027	TIMP3	interne rGrGrG
chrX:118,592,554-118,601,356	UBE2A	vollständig
chrX:151,892,448-151,892,674	ZNF185	3'UTR
chrM:1,261-1,603		kein Gen
chrM:12,577-12,908	MTND5	partiell
chrM:7,005-7,489	BC018860	partiell
chrM:7,587-8,295	X15759	vollständig

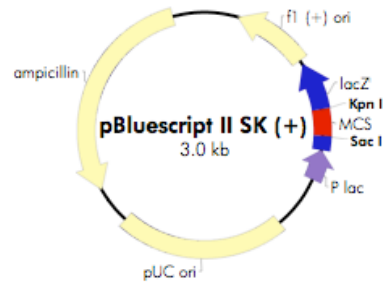
A2.3 MDAMB468

Genom. Lokalisation der codierenden Sequenz	Gen	Art des Transkripts
chr1:113,924,722-113,934,735	MAGI3	partiell
chr1:142,730,841-142,731,158		SINE/ kein Gen
chr1:144,222,430-144,222,798	RBM8A	3'UTR
chr1:152,229,862-152,231,246	RPS27	vollständig
chr1:153,492,403-153,493,205	SCAMP3	partiell
chr1:159,407,527-159,407,629	PPOX	3'UTR
chr1:233,361,587-233,361,643	RBM34	3'UTR
chr1:28,696,505-28,696,650	PHACTR4	SINE/ 3'UTR
chr1:40,310,974-40,311,026	PPT1	interne rGrGrG/ 3'UTR
chr2:161,955,873-161,976,172	PSMD14	partiell
chr2:3,601,950-3,606,380	RPS7	partiell
chr2:55,314,805-55,316,247	RPS27A	partiell
chr2:61,949,064-61,949,154	CCT4	3'UTR
chr3:12,852,548-12,856,742	RPL32	vollständig
chr3:120,871,071-120,878,921	COX17	vollständig
chr4:101,089,452-101,090,455	H2AFZ	partiell
chr4:39,502,812-39,503,022	SCC-112	3'UTR
chr5:132,230,251-132,231,278	UQCGRQ	partiell
chr5:149,803,998-149,809,488	RPS14	vollständig
chr5:180,596,543-180,597,725	GNB2L1	interne rGrGrG
chr6:38,146,068-38,146,183	ZFAND3	intronisch
chr6_qbl_hap2:4,347,536-4,347,594	RXR8	3'UTR
chr7:140,042,977-140,052,909	NDUFB2	vollständig
chr7:56,097,903-56,098,587	CCT6A	partiell
chr7:98,893,756-98,901,727	ATP5J2	vollständig
chr8:100,959,543-100,959,612	COX6C	3'UTR
chr8:125,624,605-125,631,399	NDUFB9	partiell
chr8:145,555,524-145,555,751	GPR172A	partiell
chr8:145,985,959-145,986,146	RPL8	3'UTR
chr9:111,868,352-111,868,815	PALM2-AKAP2	SINE
chr9:19,190,289-19,366,531		alternatives Transkript
chr11:104,416,679-104,417,017	CASP1	SINE
chr11:11,879,630-11,880,099	USP47	interne rGrGrG/ intronisch
chr11:61,488,614-61,488,774	FTH1	3'UTR
chr11:65,527,932-65,528,189	BANF1	3'UTR
chr12:119,368,656-119,382,212	15E1.2	partiell
chr12:119,420,492-119,420,681	DYNLL1	3'UTR
chr12:48,800,423-48,800,504	C12orf62	3'UTR
chr12:54,797,550-54,797,876	RPL41	3'UTR
chr12:54,797,599-54,797,870	RPL41	3'UTR
chr12:54,992,458-54,994,764	TMEM4	partiell
chr12:6,516,809-6,517,792	GAPDH	partiell
chr13:74,998,573-74,998,668	COMMD6	3'UTR
chr14:103,448,609-103,457,630	C14orf2	vollständig
chr14:23,677,572-23,678,011	PSME1	interne rGrGrG
chr14:93,587,005-93,587,323	DDX24	alternatives Transkript
chr15:41,871,817-41,873,538	SERF2	vollständig
chr16:1,952,066-1,952,894	RPS2	interne rGrGrG
chr16:2,761,943-2,767,292	TCEB2	partiell
chr16:84,396,910-84,398,109	COX411	interne rGrGrG
chr16:87,403,520-87,404,028	APRT	interne rGrGrG
chr16:88,238,348-88,238,675	PCOLN3	3'UTR
chr17:16,285,678-16,286,085	C17orf45	SINE/ 3'UTR
chr17:39,752,533-39,752,616	CGI-69	3'UTR
chr17:59,039,290-59,039,455	CCDC44	partial 3'UTR
chr17:59,262,890-59,263,107	PSMC5	partiell
chr17:72,241,805-72,241,922	SFRS2	3'UTR
chr17:77,943,391-77,949,415	FLJ22222	interne rGrGrG
chr19:10,615,802-10,616,091	CTL2 protein	interne rGrGrG/ 3'UTR
chr19:17,831,730-17,835,123	ribosomal protein L18a	vollständig
chr19:19,499,814-19,500,005	NDUFA13	3'UTR
chr19:44,361,721-44,361,878	PAK4	3'UTR
chr19:54,692,985-54,694,757	RPS11	partiell
chr19:8,292,571-8,293,277	RPS28	partiell
chr19:9,799,594-9,801,788	UBL5	vollständig
chr20:10,627,152-10,627,302		LTR/ kein Gen
chr20:33,750,759-33,752,316	C20orf52	vollständig
chr21:34,197,630-34,197,659	ATP5O	3'UTR
chr22:16,600,782-16,600,997	BID	second 3'UTR
chrM:15,558-15,828	cytochrome b	3'UTR
chrM:2,827-3,234	HN1	partiell
chrM:5,902-6,250	BC018860	partiell
chrM:9,787-9,990	OK/SW-cl.16	alternatives Transkript

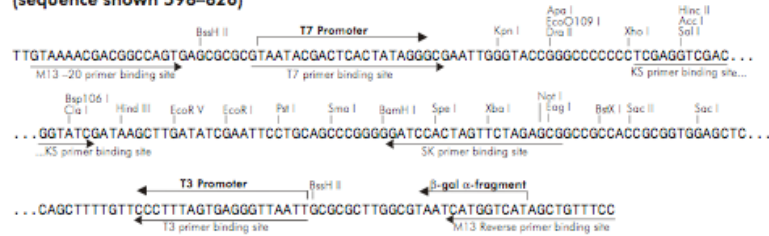
A3 Vektorkarten

A3.1 pBluescript II sk (+)

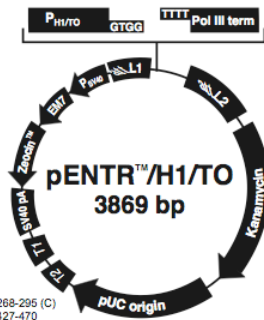
f1 (+) origin 135-441
 β -galactosidase α -fragment 460-816
multiple cloning site 653-760
lac promoter 817-938
pUC origin 1158-1825
ampicillin resistance (bla) ORF 1976-2833



pBluescript II SK (+/-) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598-826)



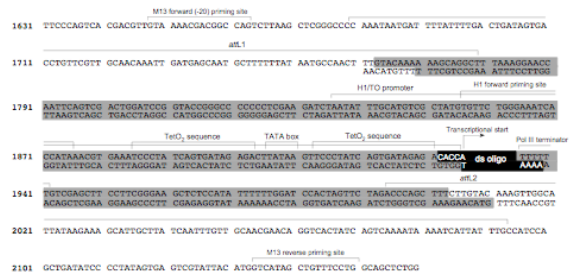
A3.2 pENTR/H1/TO



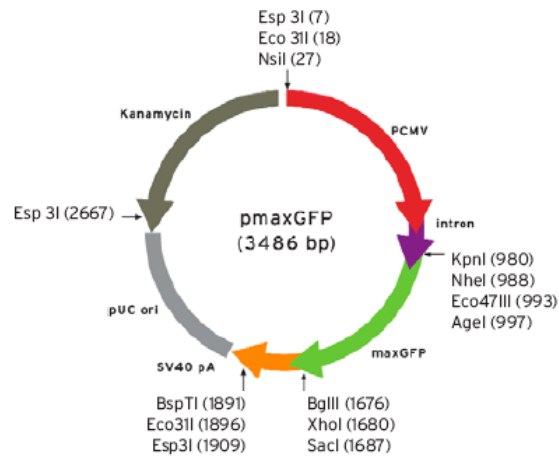
Comments for pENTRTM/H1/TO
3869 nucleotides

rrnB T2 transcription terminator: bases 268-295 (C)
rrnB T1 transcription terminator: bases 427-470 (C)
 SV40 polyadenylation signal: bases 513-642 (C)
 ZeocinTM resistance gene: bases 772-1146 (C)
 EM7 promoter: bases 1147-1213 (C)
 SV40 early promoter and origin: bases 1268-1576 (C)
 M13 forward (-20) priming site: bases 1648-1663
 attL1: bases 1680-1779 (C)
 H1/TO promoter: bases 1836-1935
 tetO₂ site: bases 1885-1903
 TATA box: bases 1906-1910
 tetO₁ site: bases 1913-1931
 H1 forward priming site: bases 1856-1875
 5' overhang: bases 1932-1935 (C)
 5' overhang: bases 1936-1939
 Pol III transcription terminator: bases 1936-1941
 attL2: bases 1994-2093
 M13 reverse priming site: bases 2134-2160
 Kanamycin resistance gene: bases 2263-3072
 pUC origin: bases 3193-3866

(C) = complementary strand



A3.3 pMaxGFP

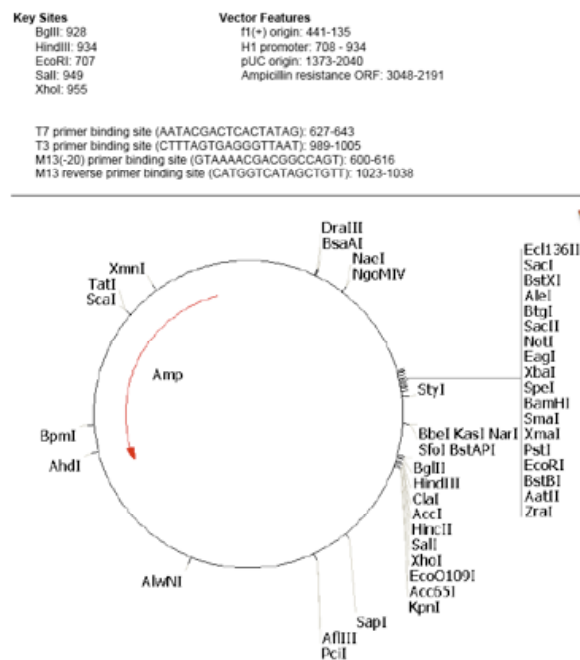


A3.4 pSuper.p53

shRNA gegen p53 über *Bgl I* und *Hind III*:

5' CGA CTC CAG TGG TAA TCT ACT TCA AGA GAG TAG ATT ACC ACT GGA GTC 3'

(Brummelkamp et al., 2002)



A3.5 pSuperior.neo.GFP

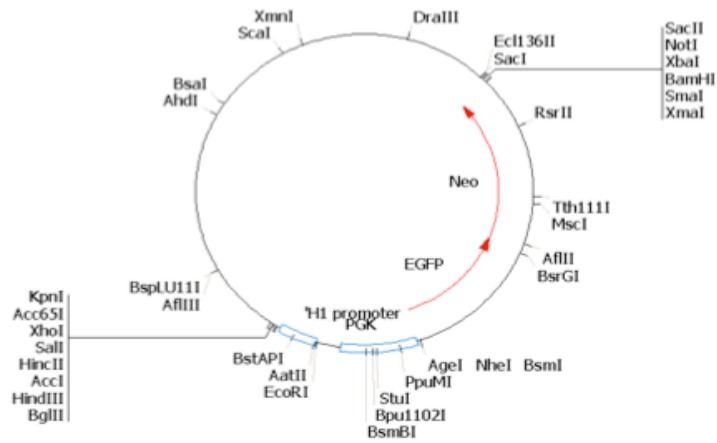
Key Sites

BglI: 3182
HindIII: 3188
EcoRI: 2960
SalI: 3203
XhoI: 3209

Vector Features

f1(+) origin: 135-441
PGK promoter: 2840-2442
Neo ORF: 1684-715
EGFP ORF: 2424-1691
H1 promoter: 2965-3167
Ampicillin resistance ORF: 5302-4445

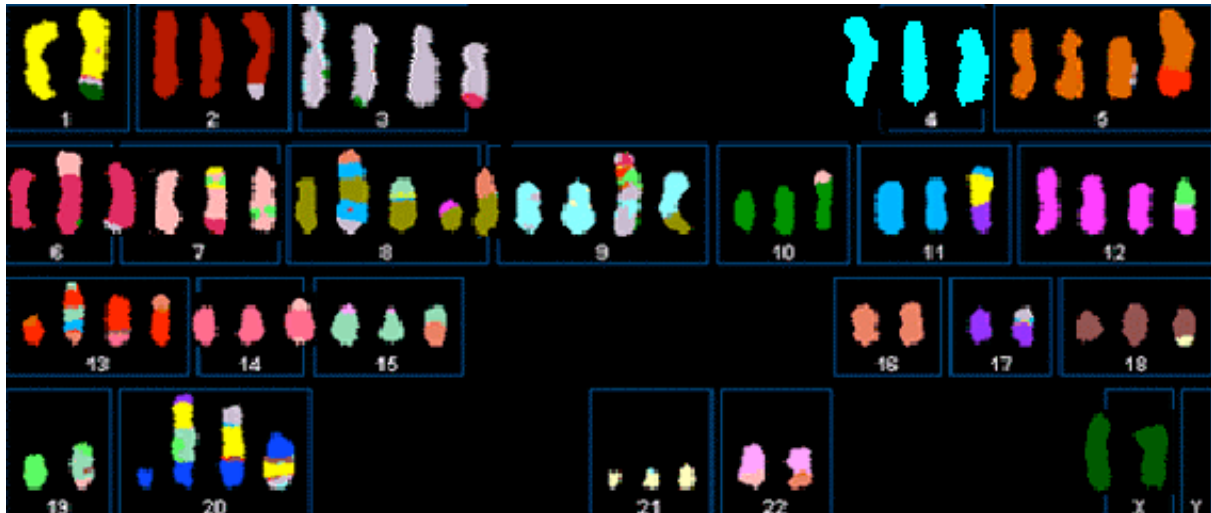
T7 primer binding site (AATACGACTCACTATAG): 627-643
T3 primer binding site (CTTTAGTGAGGGTTAAT): 3243-3259
M13(-20) primer binding site (GTAAAACGACGGCCAGT): 600-616
M13 reverse primer binding site (CATGGTCATAGCTGT): 3277-3292



A4 Karyogramme der Zelllinien

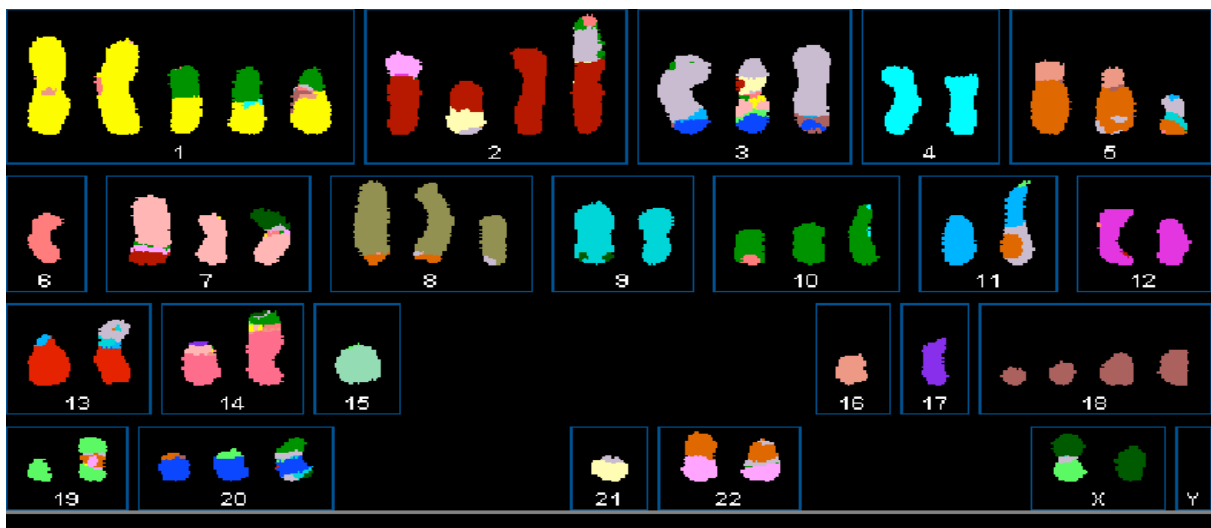
MCF7

<http://www.path.cam.ac.uk/~pawefish/BreastCellLineDescriptions/mcf7.htm>



MDAMB468

<http://www.path.cam.ac.uk/~pawefish/BreastCellLineDescriptions/mda-mb-468.html>

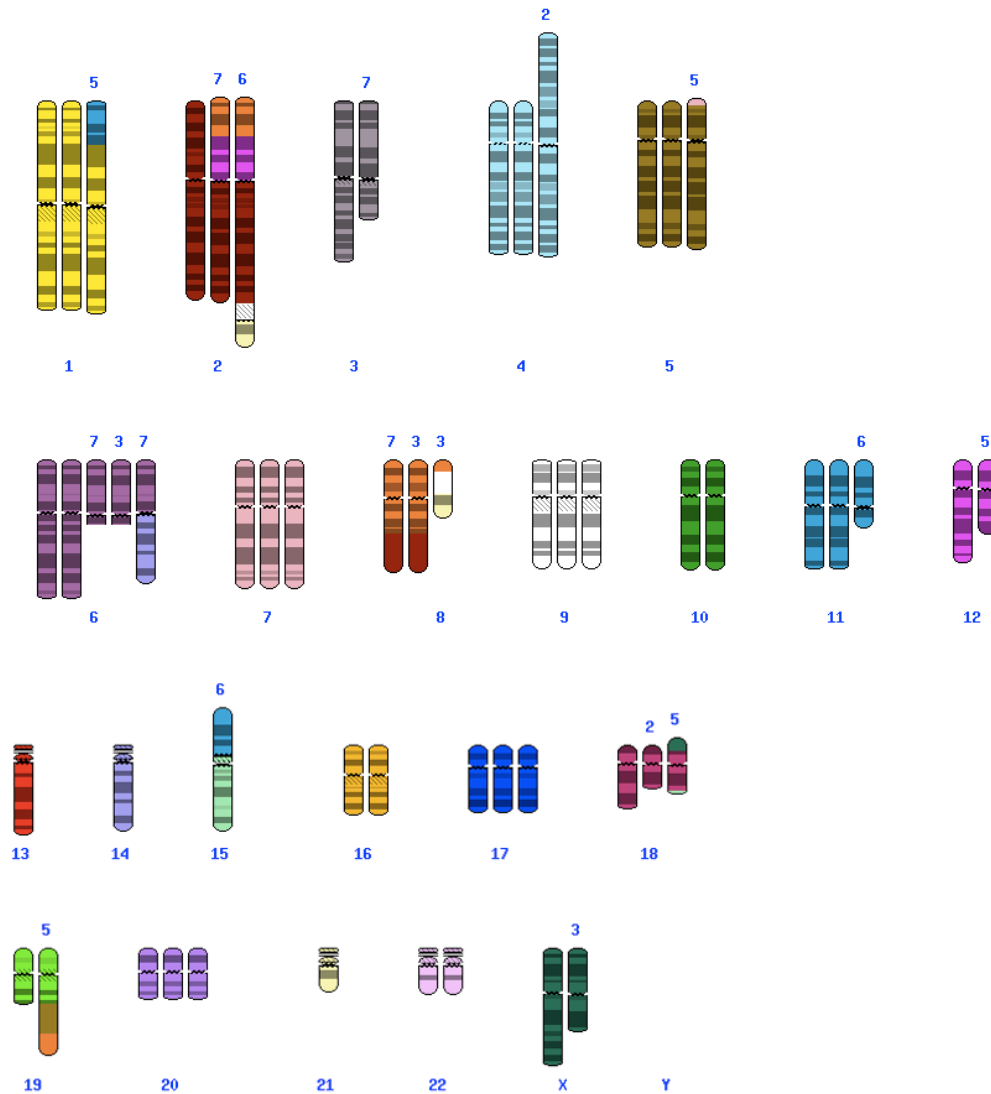


MDAMB231

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/sky/skyquery.cgi>

Cell count: 7

'X' denotes the number of cells in which the abnormal chromosome was found.



DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich bei der Durchführung und Vollendung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Wolfgang Deppert, nicht nur für die Möglichkeit, dieses interessante und anspruchsvolle Thema in seiner Arbeitsgruppe bearbeiten zu können, sondern auch für seine stete Diskussionsbereitschaft.

Prof. Dr. Wilhelm Schäfer für die Übernahme der Begutachtung meiner Dissertation am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.

Weiterhin möchte ich mich bei Genrich Tolstonog für die direkte und intensive Betreuung und die interessanten Diskussionen, die mir nicht nur die unglaubliche Vielfalt des p53-Interaktoms darlegten, bedanken.

Ein besonderer Dank geht auch an alle Mitarbeiter aus der Abteilung 3. Vor allem meinen Laborkollegen Gabi Warnecke, Annette März, und Sathish Babu Hunsur Nayaran möchte ich für die überaus nette Atmosphäre und die immerwährende Hilfsbereitschaft in allen Laborlebenslagen danken. Danke an alle „kurz vor zwölf“ Korrekturleser.

Arne Düsedau möchte ich für die unzähligen FACS-Termine danken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Christ(N)ina, Andrea, Heike, Peter, Ilka, Jörg, Erwin, Maike, Flo, Wibke, Martin und Kathrin für die tolle Zeit hoch im Norden bedanken. „Dies ist Hamburg- und die Sonne scheint nicht“ heißt es in einem Lied. Wegen Euch fällt es mir leicht zu sagen: Na und?

Meinen „alten“ Freunden- vor allem Marcus, Thomas und Edi- möchte ich für das danken, was sie sind: meine Freunde.

Ein ganz besonderes Dankeschön möchte ich meiner Familie aussprechen. Meinen Eltern danke ich für ihren Glauben an mich und all die Freiheiten, die sie mir gewähr(t)en, damit ich meinen eigenen Weg verfolgen kann. Nicole und Sven danke ich für die Gewissheit, dass sie immer für mich da sein werden. Ohne Euch wäre diese Arbeit wohl nie zu Stande gekommen.

Von ganzem Herzen möchte ich Michaela Petter danken, für ihre unendliche Geduld und Nachsicht mit mir die letzten Monate und vor allem dafür, dass sie einem ewigen Träumer gezeigt hat, wie man seine Träume lebt.