

Die duale Rolle von p53 in der zellulären Immortalisierung und der SV40 LT- vermittelten Transformation

Dissertation

zur Erlangung des Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

am Department Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Dipl.-Biotechnologin (FH) Andrea Hermannstädter

geboren am 28.01.1978

in Bobingen

Hamburg, 2008

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

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht bzw. werden in Bälde veröffentlicht:

Krepulat, F., Löhler, J., Heinlein, C., Hermannstädter, A., Tolstonog, G.V. & Deppert, W. 2005. Epigenetic mechanisms affect mutant p53 transgene expression in WAP-mutp53 transgenic mice. *Oncogene* **24**(29): 4645-59.

Hermannstädter, A., Ziegler, C., & Deppert, W. Wtp53 complexed to SV40 large exerts a helper function in cellular transformation (Manuskript in Arbeit).

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

Tag der Disputation: 27. Juni 2008

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
ZUSAMMENFASSUNG	4
ABSTRACT	6
I EINLEITUNG	8
<hr/>	
1 „In vitro Tumorgenese“ - Immortalisierung und Transformation	8
2 Der Tumorsuppressor p53	11
2.1 Die Struktur von p53	11
2.2 Regulation von p53	12
2.3 Die biologischen Funktionen von p53	14
2.3.1 p53-abhängiger reversibler Zellzyklusarrest	15
2.3.2 p53 und zelluläre Seneszenz	16
2.3.3 Einfluss von p53 auf die Apoptose	16
2.3.4 Verlust der p53 Tumorsuppressor-Aktivität	17
3 Das Simian Virus 40 (SV40)	19
3.1 Das SV40 Genom	19
3.2 Die SV40-Infektion, Zelllyse und Transformation	20
3.3 LT und die zelluläre Immortalisierung und Transformation	21
3.4 Interaktion von LT mit p53	23
3.4.1 Eine strukturelle Betrachtung des p53-LT Komplexes	24
3.4.2 Funktionelle Inaktivierung von p53 durch LT?	25
II ZIELSETZUNG DER ARBEIT	27
III MATERIAL	29
<hr/>	
1 Eukaryotische Zellen	29
2 Prokaryotische Zellen	29
3 Viren	30
4 Mäuse	30
5 Oligonukleotide	30
6 Plasmide	31
6.1 Vektoren für Klonierungen	31
6.2 Helferplasmide für die Retrovirusproduktion	31
6.3 Rekombinante Plasmide	31
7 Antikörper	32
7.1 Primärantikörper	32
7.2 Sekundärantikörper	33

8	Größen- und Molekulargewichtsstandards	33
9	Enzyme	34
10	Kits	34
11	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	34
12	Allgemeine Puffer und Lösungen	36
13	Geräte	36
IV	METHODEN	38
<hr/>		
1	Arbeiten mit prokaryotischen Zellen	38
1.1	Bakterienkulturen auf Agarplatten	38
1.2	Flüssigkulturen von <i>E. coli</i>	38
1.3	Anlegen von Bakterien-Gefrierstocks	38
1.4	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	39
1.5	Transformation kompetenter Bakterienzellen mit Plasmid-DNA	39
1.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	39
1.6.1	Maxipräparation	39
1.6.2	Minipräparation	39
2	Zellbiologische Methoden	40
2.1	Kultivierung von adhärenenten Zellen	40
2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	41
2.3	Anlegen von Primärkulturen aus Mausembryofibroblasten	41
2.4	Erstellen einer Wachstumskurve	42
2.5	Beschreibung des Proliferationsverhaltens	42
2.6	Transiente Transfektion von Zellen	42
2.7	Stabile Transfektion und Selektion von resistenten Klonen	43
2.8	Substrat-unabhängiges Wachstum	43
2.8.1	Wachstum adhärenenter Zellen in Suspension	43
2.8.2	Softagar-Assay	43
2.9	Focus-Formation-Assay	44
2.10	Bestrahlung von Zellen	45
2.11	Herstellung von Zellsedimenten	45
2.12	Durchflusszytometrie (FACS Analyse)	45
2.12.1	Fixierung der Zellen für die Durchflusszytometrie	45
2.12.2	Erstellung des Zellzyklusprofils	46
2.12.3	GFP-Fluoreszenz-Messung	46
2.12.4	Zellsortierung	46
3	Virologische Methoden	47
3.1	Herstellung von SV40-Virus-Stocks	47
3.2	Bestimmung der <i>Efficiency of Infection</i> eines Virus-Stocks	48

3.3	SV40-Infektion von adhärennten Zellen	48
3.4	Retroviraler Gentransfer	48
3.4.1	Klonierung von SV40 <i>LT</i> cDNA in den retroviralen Vektor pMYsIG	49
3.4.2	Überprüfung der Funktionalität von pMYcLT	49
3.4.3	Herstellung infektiöser Viruspartikel	49
3.4.4	Transduktion von Zelllinien mit retroviralen Überständen	50
4	Immunzytochemie und Fluoreszenzmikroskopie	50
4.1	Fixierung der Zellen	50
4.2	Indirekte Immunfluoreszenz	51
4.3	Phalloidin-Färbung	52
5	Proteinanalytische Methoden	52
5.1	Radioaktive <i>in vivo</i> Markierung von p53	52
5.2	Zellyse	52
5.3	Proteinbestimmung nach Bradford	53
5.4	Immunpräzipitation	53
5.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	54
5.6	Western-Blot-Analyse	55
5.7	Immunologische Detektion und ECL-Reaktion	55
5.7.1	Coomassie-Färbung von Proteingelen	56
5.7.2	Fluorographie	56
6	Molekularbiologische Methoden	56
6.1	DNA-Isolierung	56
6.1.1	Aufreinigung genomischer DNA aus Mausembryonen	56
6.1.2	Schnelle Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen	57
6.2	Ethanol-fällung von DNA	57
6.3	Agarose-Gelelektrophorese	57
6.4	Agarose-Gelextraktion	58
6.5	Restriktionsspaltung von Nukleinsäuren	58
6.6	5' Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	58
6.7	Ligation	58
6.8	Polymerasekettenreaktion (PCR)	59
6.8.1	Genotypisierung primärer MEF	59
6.8.2	Amplifizierung des p53-Fragments aus MEF5 und MEF20 Zellen	60
6.9	Sequenzierung	60
6.10	Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen	61
6.11	Reverse Transkription	61
6.12	Quantitative RealTime-PCR (qRT-PCR)	62
6.12.1	Erstellung einer Standardkurve für die absolute Quantifizierung	63
6.12.2	Bestimmung der SV40-Kopienzahl nach abortiver Infektion	64
6.12.3	Relative Quantifizierung der LT-Transkription nach abortiver Infektion	64

V	ERGEBNISSE	66
1	p53 in der spontanen Immortalisierung primärer Balb/c MEF	66
1.1	Die spontane Immortalisierung primärer Balb/c MEF bei 5% und 21% Sauerstoff	66
1.2	Analyse der p53-Expression in MEF5 und MEF20 Zellen auf Proteinebene	69
1.3	Mutationsanalyse von <i>p53</i> in MEF5 und MEF20 Fibroblasten	72
1.4	Verlust bzw. Verringerung der wtp53-Transaktivatorfunktion in MEF5 und MEF20 Fibroblasten	74
1.5	MEF5 und MEF20 Fibroblasten sind nicht phänotypisch transformiert	76
2	Der LT-p53 Komplex in der LT-induzierten Balb/c Zelltransformation	77
2.1	Charakterisierung der immortalen Balb/c 3T3 und 10-1 Zelllinien	78
2.2	Zelluläre Transformation mit der gesamten SV40-frühen Region von Balb/c Fibroblasten	81
2.3	Etablierung stabil LT-exprimierender Balb/c Fibroblasten in einem wtp53 und p53-null Hintergrund zur Untersuchung des LT-p53-Komplexes	81
2.4	Die Expression von LT führt in Anwesenheit von wtp53 zu morphologischen Veränderungen	85
2.5	LT-exprimierende wtp53 Zellen zeigen im Vergleich zu p53-null Zellen eine erhöhte Proliferationskapazität	86
2.6	LT hat in wtp53 Zellen eine erhöhte Transformationskompetenz	87
2.7	Acetylierung von SV40 LT im C-Terminus ist p53-abhängig	91
2.8	Etablierung und Charakterisierung der Zelllinie 10-1ΔNtp53	93
2.9	Die Acetylierung von LT ist abhängig vom p53-Aminoterminus	97
2.10	Die morphologischen und proliferativen Eigenschaften LT transformierter ΔNp53 Zellen sind vergleichbar mit denen LT transformierter p53-null Zellen	100
2.11	Die wtp53-vermittelte Substrat-Unabhängigkeit LT transformierter Zellen kann im ΔNp53 Hintergrund nicht aufrechterhalten werden	103
2.12	Hinweise auf eine biologische Funktion des wtp53-LT Komplexes in der SV40-induzierten Zelltransformation	106
2.12.1	Spezifischer Effekt	106
2.12.2	Globaler Effekt	109
VI	DISKUSSION	111
1	p53 als Ziel von spontanen Mutationen in der Immortalisierung, dem ersten Schritt in Richtung Transformation	111
1.1	Einfluss von oxidativem Stress auf die spontane Immortalisierung von Balb/c MEF: Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und „Zellkulturschock“	111
1.2	Verminderte Schadensreparatur in Balb/c MEF	116
1.3	Charakterisierung der p53-Punktmutationen in MEF5 und MEF20 Zellen	118
2	p53 unterstützt die LT-vermittelte Transformation von Balb/c Zellen	119
3	Der Einfluss der HAT bei der „Helferfunktion“ von p53 in der LT-induzierten zellulären Transformation	121

INHALTSVERZEICHNIS

3.1	Der p53 N-Terminus als Mediator der „Helferfunktion“ von p53 in der LT-induzierten Zelltransformation	121
3.2	Acetylierung von Histonen, Transkriptionsfaktoren und viralen Proteinen	123
3.3	Die Rekrutierung der p300/CBP HAT-Aktivität durch SV40 LT führt zur epigenetischen Veränderung zellulärer Prozesse	125
VII	LITERATURVERZEICHNIS	130
VIII	ANHANG	149
1	Vektorkarte pMYcLT	149
2	Sicherheitstechnische Daten	149
2.1	Gefahrenstoffe	149
2.2	Verzeichnis der Gefahrensymbole	150
2.3	Verzeichnis der R- und S-Sätze	150
2.3.1	Gefahrenhinweise (R-Sätze)	150
2.3.2	Kombination der R-Sätze	151
2.3.3	Sicherheitsratschläge (S-Sätze)	151
2.3.4	Kombination der S-Sätze	151
	DANKSAGUNG	152

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

17kT	17k Tumor-Antigen
a	Anti
A	Adenin
Ac	Acetylierung
Ad5	Adenovirus Typ 5
AP	Antarktische Phosphatase
APC	<i>anaphase promoting complex</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	<i>alternative reading frame</i>
AS	Aminosäure(n)
ATM	<i>ataxia-telangiectasia, mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ATM and Rad3-related</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
Bub1	<i>budding uninhibited by benzimidazoles 1</i>
C	Cytosin
CAT	Katalase
CBP	<i>CREB (cAMP-response-element-binding-protein) -binding protein</i>
Cdc25C	<i>cell division cycle 25 homolog C</i>
Cdk	Zyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin dependent kinase</i>)
cDNA	komplementäre DNA
Chk2	<i>checkpoint kinase 2</i>
CMV	Cytomegalievirus
COP1	<i>constitutivley photomorphogenic 1</i>
CQ	Chloroquin
Ct	<i>Cycle treshold</i>
CtBP	<i>carboxyl-terminal binding protein</i>
Cu17	<i>Cullin7</i>
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylidol
DBD	DNA-bindende Domäne
dd	doppelt destilliert oder bidestilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DNA-PKcs	<i>DNA-dependent protein kinase (catalytic subunit)</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1α	<i>elongation factor 1α</i>
EOI	<i>efficiency of infection</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
Fbw7	<i>F-box and WD-40 domain protein 7, archipelago homolog, Drosophila</i>
FCS	Fötale Kälberserum (fetal calf serum)
FL	Volle-Länge
G	Guanin
G1	<i>gap1</i>
G2	<i>gap2</i>
GADD45	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible portein 45</i>
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GPx	Glutathionperoxidase

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Gy	Gray
H	Histidin
HA	Hämagglutinin
HAT	Histon-Acetyltransferase
HAUSP	<i>herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease</i>
HDAC	Histon-Deacetylase
HEPES	(N-2-hydroxyethyl)-piperazin-N'(2-ethansulfonsäure)
HIV-1 Tat	<i>human immunodeficiency virus trans-activator protein</i>
HPV-16	humanes Papillomavirus Typ 16
HRP	<i>Horse raddish peroxidase</i>
Hsc70	<i>heat shock protein 70</i>
IARC	<i>International agency for research on cancer</i>
IGF	<i>insulin-like growth factors</i>
IgG	Immunglobulin G
INK4	<i>Inhibitors of cdk4</i>
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
LB	Luria-Bertani
LCB	<i>Low Cell Binding Plates</i>
LT	großes Tumor-Antigen
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	Mitose
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
Mdm2	<i>mouse double minute 2</i>
MEF	Mausembryofibroblasten
mutp53	Mutanten p53
Neo	Neomycin
NES	<i>nuclear export signal</i>
NF-Y	<i>nuclear transcription factor Y</i>
NHEJ	<i>non-homologous end-joining</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
NP 40	Nonidet P-40
NRD	<i>N-terminale Repressionsdomäne</i>
OD	Optische Dichte
ori	<i>origin of replication</i>
P	Passage
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCAF	<i>p300/CBP associated factor</i>
PDL	<i>population doubling level</i>
PDT	<i>population doubling time</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PGS	Protein G Sepharose
PI	Propidiumiodid
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3 Kinase</i>
PIG3	<i>p53-induced gene 3</i>
PIIKs	<i>PI3K and related kinases</i>
Pin1	<i>peptidyl-prolyl cis/trans isomerase, NIMA-interacting prolyl isomerase</i>
Pirh2	<i>p53-induced, RING-H2 domain containing</i>
PP2a	<i>Protein phosphatase 2A</i>
pRb	Retinoblastomgen
PRD	Prolin-reiche Domäne
PRMT1	<i>protein arginine methyltransferase 1</i>
P-TEFb	<i>positive transcription elongation factor complex b</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Arginin
Ral-GEFs	<i>Ral guanine nucleotide exchange factors</i>
RE	<i>response element</i>
REG	regulatorische Domäne
RNA	Ribonukleinsäure
RNA polII	RNA PolymeraseII
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

RQ	Relativer Expressionsunterschied
RT	Raumtemperatur
S	Synthese
SCO2	<i>synthesis of cytochrome c oxidase 2</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH3	<i>Src homology 3 domain</i>
SIRT1	<i>silent information regulator 1</i>
S/MAR	<i>Scaffold oder Matrix Attachment Regions</i>
Smyd2	<i>SET and MYND domain containing 2</i>
SOD	Superoxiddismutase
SSCP	<i>single-strand-conformation-polymorphism analysis</i>
st	kleines Tumor-Antigen
SV40	<i>Simian vacuolating virus 40</i>
SWI/SNF	<i>switch/sucrose nonfermentable</i>
T	Thymidin
TAD	Transaktivierungs Domäne
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAR	<i>trans-activation responsive region</i>
TBE	tris-buffered saline
TBP	<i>TATA-box binding protein</i>
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TET	Tetramerisierungsdomäne
T _H	Hybridisierungstemperatur
T _m	Schmelztemperatur
TRITC	Tetramethyl Rhodamin-Isothiocyanat
TSA	Trichostatin A
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volumeneinheit pro Gesamtvolumen
W	Tryptophan
w/v	Gewichtseinheit pro Gesamtvolumen
WAP	<i>whey acidic protein</i>
WB	Western Blot
wtp53	Wildtyp p53

ZUSAMMENFASSUNG

Die Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 ist ein wesentliches Ereignis in der Immortalisierung von Zellen und ein entscheidender Schritt in Richtung Transformation bzw. Tumorgenese. In vielen humanen Tumoren liegt p53 mutiert und damit inaktiv vor, wobei im Fall von p53 hauptsächlich *missense*-Punktmutationen auftreten. Da diese zum Austausch von nur einer AS führen, kommt es zur Expression eines Volle-Länge mutiertem p53 (mutp53), welches hauptsächlich im Nukleus lokalisiert. mutp53 verliert auf der einen Seite die tumorsupprimierenden Funktionen von Wildtyp p53 (wtp53) (*loss of function*). Auf der anderen Seite weisen verschiedene Studien darauf hin, dass mutp53 neue, onkogene Aktivitäten hinzugewinnt (*gain of function*). Auch nach Infektion von Zellen mit DNA-Viren müssen negative Zellzyklusregulatoren der Wirtszelle wie p53 ausgeschaltet werden, damit eine von den Viren bevorzugte S-Phasenprogression stattfinden kann. Im Allgemeinen wird p53 durch virale Onkogene gebunden und anschließend degradiert. Auch bei einer Infektion mit SV40 geht man davon aus, dass p53 durch eine Komplexbildung mit SV40 LT transkriptionell inaktiviert wird. Auffällig dabei ist, dass LT im Gegensatz zu anderen viralen Onkogenen zu einer metabolischen Stabilisierung und nukleärer Lokalisation von p53 führt, die mit der Akkumulation von mutp53 im Nukleus vergleichbar ist.

Vor dem Hintergrund einer möglichen aktiven Funktion des LT-p53 Komplexes in der SV40-induzierten zellulären Transformation war es Ziel dieser Arbeit, die positive Rolle von p53 in der Transformation weiter zu charakterisieren. Der „helfenden“ Rolle von p53 in der SV40 LT-Transformation wurde die negative Rolle von p53 in der spontanen Immortalisierung gegenüber gestellt.

Primäre und etablierte murine Balb/c Mausembryofibroblasten (MEF) mit wtp53 und p53-null Hintergrund bildeten das experimentelle System zur Analyse dieser dualen Rolle von p53. Während der Kultivierung primärer Balb/c wtp53 MEF unter Standardbedingungen (21% O₂) kommt es nach einem Wachstumsarrest zur spontanen Immortalisierung, die mit einem Auftreten von *missense*-Punktmutationen im *p53*-Gen verbunden ist. Durch Kultivierung der MEF bei physiologischeren Sauerstoff-Bedingungen (5% O₂) kann das Auftreten einer *p53*-Punktmutation nicht verhindert werden. Das nukleäre, stabile Volle-Länge mutp53 scheint dabei den Zellen (MEF5 und MEF20) einen Proliferationsvorteil zu verschaffen, ein Hinweis auf einen Funktionsgewinn (*gain of function*). Die schützende Rolle von wtp53 in der Wachstumskontrolle durch Einleitung eines Wachstumsarrests muss demnach bei der Immortalisierung von Zellen überwunden werden. Bei der Untersuchung des Einflusses von wtp53 in der SV40 LT-induzierten Transformation von Balb/c Zelllinien konnte dagegen eine unterstützende Rolle von wtp53 gezeigt werden. So konnte in klassischen Transformationsversuchen bei der Untersuchung des Phänotyps stabil SV40 LT-exprimierender wtp53 (3T3), p53-null (10-1) und ΔNp53 Balb/c Fibroblasten eine positive Funktion von stabilisiertem, nukleärem wtp53 im LT-p53-Komplex gezeigt werden. Die mit der verminderten Transformationseffizienz von p53-null Zellen vergleichbaren Ergebnisse der N-terminal trunkierten p53-Mutante waren ein Hinweis auf eine p53-aminoterminal vermittelte Helferfunktion im Komplex mit LT. In der LT-vermittelten Transformation ist die Komplexbildung von wtp53 durch LT daher nicht mit einer p53-null Situation vergleichbar.

Die Histon-Acetyltransferasen und Co-Aktivatoren p300/CBP binden an den N-Terminus von p53

und bilden über p53 mit LT einen Multiproteinkomplex. In dem hier untersuchten Zellsystem konnte eine p300/CBP- und p53-abhängige Acetylierung von LT im C-terminalen Ende bestätigt werden. Diese Acetylierung wird über den p53-N-Terminus vermittelt, da in Zellen, die die Δ Np53-Mutante exprimieren, kein acetyliertes LT detektiert werden konnte. Die Acetylierung von LT scheint aber nur einen indirekten Beitrag zur Transformation zu leisten, da bereits gezeigt werden konnte, dass eine Deletion der Aminosäuren des C-terminalen Endes von LT die Transformationskapazität nicht vermindert. Weitere Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten eine durch LT induzierte Reaktivierung teilweise reprimierter Gene. Dies legt die Vermutung nahe, dass LT durch Rekrutierung von p53 und p300/CBP deren Funktionen im Chromatin *Remodeling* für die LT-induzierte Zelltransformation ausnutzt und zu einem erhöhten Ausmaß der Transformation führt.

Die hier vorgelegten Untersuchungen zeigen, dass p53 je nach zellulärem Kontext eine duale Rolle einnehmen kann. Zum einen agiert es als schützendes Tumorsuppressorprotein und negativer Zellzyklusregulator, der in der spontanen Immortalisierung eliminiert werden muss, zum anderen kann p53 Funktionen auf LT übertragen, die essentiell für dessen transformierende und onkogene Eigenschaften sind.

ABSTRACT

A major event in cellular immortalisation and a crucial step towards transformation and tumorigenesis respectively is the inactivation of the tumor suppressor protein p53. The *p53* gene is mutated and thus inactivated in many human cancers. A particularity of *p53* mutations is a preference for missense point mutations. Given the fact that this leads to a substitution of only one amino acid, a full length mutant p53 (mutp53) is expressed, which localises primarily to the nucleus. On the one hand mutp53 loses the tumor suppressive functions of wtp53 (loss of function). On the other hand different studies indicate an acquisition of new oncogenic activities (gain of function) of mutp53. Following infection of cells with DNA tumor viruses negative cell cycle regulators like p53 have to be eliminated to allow progression of the cells into S-phase, which is required for viral replication. In general, p53 is bound and degraded by viral oncogene products. Upon SV40 infection, p53 is transcriptionally inactivated by complex formation with SV40 LT. Strikingly, in contrast to p53's interaction with other viral oncogene products, this leads to metabolic stabilisation and nuclear accumulation of p53, comparable to the accumulation of mutp53 in the nucleus.

Based on the assumption that the LT-p53 complex potentially executes an active function in SV40-induced cellular transformation, the aim of this study was to further characterize the positive role of p53 in the transformation process.

As an experimental system for the analysis of the dual role of p53 primary and established murine Balb/c mouse embryonic fibroblasts (MEF) with a wtp53 and p53-null background were chosen. During cultivation of primary Balb/c wtp53 MEF under standard conditions a proliferation block occurs that was bypassed by spontaneous immortalization associated with the appearance of *p53* missense point mutations. *p53* point mutations occurred also in MEF cultured under conditions of low oxygen (5% O₂). Stabilised nuclear full-length mutp53 appeared to provide the cells (MEF5 and MEF20) with a proliferation advantage, providing a hint for a gain of function. Thus overcoming the protective role of wtp53 in growth control seems to be a prerequisite for cellular immortalisation. In contrast, analyzing the influence of wtp53 on SV40 LT-induced transformation of Balb/c cell lines revealed a supportive role of wtp53. Classical transformation assays with wtp53 (3T3), p53-null (10-1) and Δ Np53 Balb/c fibroblasts stably expressing SV40 LT demonstrated a positive function of stabilised nuclear wtp53 in the LT-p53 complex. The reduced transformation efficiency seen in p53-null cells, which is comparable to the results obtained with cells expressing an N-terminally truncated p53 variant, indicates a helper function of p53 in complex with LT which is mediated by the amino terminus of p53. During LT-induced transformation complex formation of LT with p53 is not equivalent to a p53-null situation.

The histone acetyltransferases and co-activators p300 and CBP bind to the N-terminus of p53 and form a multiprotein complex via p53 with SV40 LT. In the cell system analyzed here, the p300/CBP- and p53-dependent acetylation of LT in its C-terminal end could be confirmed. This acetylation requires the amino terminus of p53, as in cells expressing the Δ Np53 variant no acetylated LT could be detected. However, acetylation of LT seems to contribute only indirectly to the transformation process. It was shown that a deletion of the very last amino acids at the C-terminus of LT did not diminish its transformation capacity. Further analysis in the present study

ABSTRACT

revealed a LT-mediated reactivation of partially repressed genes. This is evidence to suggest that LT utilises the chromatin remodeling functions of p53 and p300/CBP for LT-induced cell transformation.

The presented studies showed that p53 exerts a dual role in SV40 transformation, depending on the cellular context. On the one hand p53 acts as a protective tumor suppressor protein and negative cell cycle regulator, which has to be eliminated during spontaneous immortalisation; on the other hand p53 can transmit functions to LT, which are essential for its transforming and oncogenic properties.

I EINLEITUNG

1 „*In vitro* Tumorgenese“ - Immortalisierung und Transformation

Die Tumorgenese ist ein komplexer Mehrstufen-Prozess, der meist nur von einer Zelle ausgeht (Nowell 1976). Dabei führen entweder Mutationen - ausgelöst durch endogene oder exogene Faktoren (z.B. reaktive Sauerstoffspezies, Toxine, Stress, Strahlen) - oder Infektionen mit Tumoviren (z.B. humanes Papillomavirus, Epstein-Barr-Virus) zur Veränderung zellulärer Funktionen. So werden in dieser Zelle in erster Regel die Regulation der Zellteilung und des Wachstums außer Kraft gesetzt. Beispielhaft hierfür treten in humanen Tumoren zum einen inaktivierende Mutationen in den wichtigsten negativen Zellzyklusregulatoren, den Tumorsuppressor-Genen *p53* und *pRb* (Retinoblastomgen) auf (Hickman *et al.*, 2002), und zum anderen aktivierende Mutationen in Proto-Onkogenen, wie z.B. *ras* und *c-myc* (Bos 1989; Eisenman & Cooper 1995). Die Zelle erhält durch die Inaktivierung dieser Gene einen Proliferationsvorteil, der die Akkumulation weiterer Mutationen erleichtert. Dadurch erfährt die Zelle zahlreiche molekulare und phänotypische Veränderungen und entwickelt sich zur Tumorzelle, die durch unkontrolliertes Wachstum, reduzierte Abhängigkeit von exogenen Wachstumsstimuli, und deshalb von der normalen Mikroumgebung des Gewebes (*tissue microenvironment*), Invasion ins umgebende Gewebe und Metastasierung sowie Stimulation der Angiogenese und Verlust der Differenzierungskontrolle charakterisiert ist (Hanahan & Weinberg 2000).

Dieser Prozess der Initiation, Promotion und Progression (Weinberg 1989) ist sehr langwierig, bis zum Auftreten von malignen Tumoren kann es Jahre dauern. Deshalb ist die Entwicklung von *in vitro* Systemen, die das *in vivo* Ereignis nachahmen, wichtig für die Aufklärung molekularer Mechanismen der Tumorentstehung. So konnten vor allem Zellen, die durch virale oder zelluläre Onkogene maligne verändert (transformiert) wurden zum Verständnis des entarteten Zellwachstums beitragen (Masters 2000). *In vitro* Transformation beschreibt die dauerhafte Änderung des Phänotyps einer Zelle durch beispielsweise chemische Substanzen, Strahlung oder onkogene Viren in Zellkultur. Eine spontane Transformation tritt sehr selten auf. Der Phänotyp, den eine Tumorzelle *in vivo* nach Anhäufung derselben Mutationen annimmt, entspricht diesem *in vitro* Phänotyp. Zu den *in vitro*-Charakteristika der Transformation zählen ein unbegrenztes Wachstum (Immortalisierung) auch unter Mangelbedingungen, Verlust der Kontaktinhibition (mehrschichtiges adhärentes Wachstum), Substrat-unabhängiges Wachstum, morphologische Veränderungen des Zytoskeletts und tumorigenes Potential in Tiermodellen (Reznikoff *et al.*, 1973; Risser & Pollack 1974; Pollack *et al.*, 1975; Verderame *et al.*, 1980; Day *et al.*, 1997).

Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich in Mauszellen durchgeführt. Da es Unterschiede in der Immortalisierung humaner und muriner Zellen gibt, wird im Folgenden vornehmlich auf die Ereignisse, die zur Immortalisierung und Transformation im murinen Zellsystem beitragen, eingegangen.

Immortalisierung

Die Immortalisierung von Zellen ist ein grundlegendes Ereignis im Rahmen der *in vitro* Transformation (Malumbres & Carnero 2003). Primäre Fibroblasten, die aus Mausembryonen isoliert wurden, haben ein begrenztes Teilungsvermögen. Nach ca. 10-15 Populationsverdopplungen (oder 15-20 Tage) folgt ein Wachstumsarrest, der vielfach mit Zelltod verbunden ist (Todaro & Green 1963; Meek *et al.*, 1977). Dieser Arrest (auch als replikative Seneszenz oder *Hayflick-Limit* bezeichnet) wird als evolutionär konservierter Schutzmechanismus der Zelle vor Weitergabe von irreparablen DNA-Schäden nach genotoxischem Stress angesehen (Hayflick 1961). Es wird vermutet, dass die nicht-physiologischen Kultivierungsbedingungen, wie z.B. Verlust der Zell-Zell-Kontakte, Kultivierung auf Plastik, nicht-physiologische Sauerstoff-Bedingungen (oxidativer Stress) und inadequate Medium-Zusammensetzung, einen Einfluss auf die Auslösung dieses Wachstumsarrests haben (Sanford *et al.*, 1979; Jones *et al.*, 1985). Die Kumulation dieser Ereignisse, die auch als „Zellkulturschock“ bezeichnet wird (Sherr & DePinho 2000), zeigt hierbei die gleichen molekularen Mechanismen wie ein durch DNA-Schaden aufgetretener Zellzyklusarrest, der sich z.B. in erhöhten Mengen der Zellzyklus kontrollproteine p21^{Waf1/Cip1}, p53, p19^{ARF} und p16^{INK4a} äußert. Durch Kultivierung der Zellen unter physiologischeren Bedingungen kann die zelluläre Seneszenz je nach Zelltyp verzögert bzw. verhindert werden (Loo *et al.*, 1987; Parrinello *et al.*, 2003). Das Verständnis der Adaption an die Kultivierungsbedingungen und der daraus folgenden Immortalisierung geben deshalb Einblicke in die Zellzyklusregulierung und, in weitem Sinn, in die Tumorentstehung.

Die Immortalisierung erfolgt, wenn einige wenige Zellen z. B. aufgrund von Mutationen dem Wachstumsarrest entkommen können. Im Gegensatz zu humanen Zellen erfolgt die spontane Immortalisierung von murinen Zellen häufiger ($1-10 \times 10^{-6}$ pro Zellgeneration) und tritt in unterschiedlichen Zelltypen, unter anderem in Mausembryofibroblasten (MEF) auf (Kraemer & Sedlacek 1986). Für die Kultivierung von MEF etablierten Todaro und Green (1963) das 3T3-Protokoll, mit dem sie die spontane Immortalisierung einer gesamten MEF-Population erreichen konnten, ohne dass diese einen transformierten Phänotyp annahm. Die Zellen zeigten noch Kontaktinhibition und waren in Tiermodellen nicht tumorigen. Diese „kontrollierte“ Etablierung von 3T3-MEF durch Kultivierung der Zellen in geringen Zelldichten führt zu unbegrenzt proliferierenden (immortalen) Zelllinien. Jedoch können bei der Immortalisierung phänotypische und genetische Veränderungen nicht vermieden werden, zu denen chromosomale Aberrationen und Mutationen in zellzyklusregulierenden Genen, wie z.B. p19^{ARF} und p53, zählen. Für die Immortalisierung von primären Mauszellen ist eine Inaktivierung des p19^{ARF}/p53-Signalweges ausreichend (Sharpless *et al.*, 2001). So haben Zellen aus p53-null bzw. p19^{ARF}-null ein unbegrenztes Wachstum ohne die Seneszenz durchlaufen zu müssen (Kamijo *et al.*, 1997; Serrano *et al.*, 1997). Immortale Zellen besitzen somit, durch Verlust wachstumskontrollierender Faktoren, die Fähigkeit sich unbegrenzt zu vermehren, jedoch wird die Proliferation wie auch bei „normalen“ Zellen noch durch mitogene und anti-mitogene Signale reguliert. Die Kontaktinhibition, die bei Erreichen der Konfluenz *in vitro* eintritt und durch anti-mitogene Signale ausgelöst wird, führt auch in immortalen Zellen zu einem Wachstumsarrest, der häufig von einem Absterben der Zellen begleitet wird (Stoker *et al.*, 1968; Frisch & Francis 1994).

Transformation

Für eine erfolgreiche Transformation sind nach der Immortalisierung zusätzliche genetische und epigenetische Modifikationen notwendig (Pali & Robertson 2007), die je nach Organismus und Zelltyp zur Überwindung bestimmter zellulärer Schutzmechanismen beitragen. Humane Zellen sind dabei weitaus resistenter gegenüber transformierenden Veränderungen und müssen im Gegensatz zum murinen System, in dem eine Beeinträchtigung von zwei Signalwegen (p53 und Raf) ausreicht in vier weiteren Signalwegen (pRb, PP2A, Telomerase und Ral-GEFs) einen Schaden aufweisen (Rangarajan *et al.*, 2004). Aus diesem Grund tritt eine spontane *in vitro* Transformation humaner Zellen relativ selten auf (Hayflick 1961; Goldstein 1990; Smith & Pereira-Smith 1990). Dies spiegelt zusätzlich zur Komplexität der mehrstufigen Tumorgenese die Spezies-Spezifität wider, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss.

Ein phänotypisches Merkmal der Transformation ist eine strukturelle Umordnung des Zytoskeletts, die sich unter anderem im Rückgang der Anzahl der Aktin-Stress-Filamente zeigt (Rao *et al.*, 1997; Vasiliev 2004). Dadurch kommt es zum Verlust der fokalen Adhäsion und der Interaktion mit der extrazellulären Matrix sowie zu Veränderungen in der Zellmigration und –proliferation (Kuzumaki *et al.*, 1996). Transformierte Zellen können unabhängig von exogenen Wachstumsfaktoren und einer extrazellulären Matrix proliferieren und im Gegensatz zu immortalisierten Zellen in Weichagar Klone bilden (Macpherson & Montagnier 1964; Clark & Brugge 1995; Hanahan & Weinberg 2000). Transformierte Zellen werden durch Zell-Zell-Kontakte in ihrer Proliferation nicht gestört, sondern können ungeordnet zu hohen Sättigungsdichten heranwachsen und bilden durch mehrschichtiges Wachstum sogenannte Foci (Abercrombie 1970; Holley 1975). Das stringenteste Kriterium für den transformierten Phänotyp einer Zelle ist die Auslösung von Tumoren in Tiermodellen, wie z.B. Nacktmäusen.

Nicht jede immortale Zelle weist jedoch alle oben genannten Kriterien auf, so dass Baserga (1997) eine Unterteilung vornahm, die zwischen minimal, intermediär und vollständig transformierten Zellen unterscheiden lässt (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Ausmaß der Transformation (Baserga 1997)

Minimale Transformation	Intermediäre Transformation	Vollständige Transformation
unbegrenzt Wachstumspotential	Foci-Bildung in Monolayer	Fähigkeit der Tumorbildung in Tieren (tumorigenes Potential)
minimierter Bedarf an Wachstumsfaktoren	Koloniebildung in Softagar	
Hohe Sättigungsdichte		

2 Der Tumorsuppressor p53

Zellen sind ständig Umwelteinflüssen und intrinsischen Faktoren ausgesetzt, die ihre DNA schädigen können. Je nach Ausmaß des Schadens werden in der Zelle Programme initiiert, die zur Reparatur oder zur Selbst-Eliminierung (Apoptose) der Zelle führen, um die Gefahr der Transformation zu minimieren. In der Entscheidung zwischen Leben und Sterben der geschädigten Zelle spielt der Tumorsuppressor p53 als Bindeglied vieler zellulärer Signalwege eine wichtige Rolle und wird deshalb auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet. p53 kann auf exogene und endogene Faktoren, wie z.B. Strahlung, DNA-Schaden, oxidativer Stress oder Onkogen-Aktivierung, mit transientem Wachstumsarrest, Seneszenz oder Apoptose reagieren um die Weitergabe geschädigter DNA an die Tochterzellen zu verhindern. Die Mechanismen, die zur einen oder der anderen Antwort führen sind noch nicht genau bekannt und Gegenstand vieler Untersuchungen (Harris & Levine 2005). Ein Hinweis für die Signifikanz des Proteins in der Tumorsuppression ist die mit 50% vergleichsweise hohe Mutationsrate von p53 in humanen Tumoren. Diese Mutationen unterbinden hauptsächlich die wichtigste p53-Funktion, die sequenzspezifische Transaktivierung (Hainaut & Hollstein 2000).

2.1 Die Struktur von p53

Der Tumorsuppressor p53 wurde 1979 als nukleäres 53kDa-Protein im Komplex mit dem SV40 (*Simian vacuolating virus 40*) großen T-Antigen (LT) entdeckt (Lane & Crawford 1979; Linzer & Levine 1979). Das humane Gen (11 Exone, davon werden 10 translatiert) ist auf Chromosom 17 lokalisiert und kodiert für ein 393 Aminosäuren (AS) großes Protein. Das murine Äquivalent besteht aus 390 AS und die kodierende Region befindet sich auf Chromosom 11. Die Protein-Architektur ist hoch konserviert und beinhaltet drei funktionelle Domänen: N-Terminus, DNA-bindende Domäne (DBD) und C-Terminus (Abbildung 1).

Der N-Terminus von p53 enthält die Transaktivierungs-Domäne (TAD), die aus zwei Untereinheiten besteht (TAD1: AS 1-40 und TAD2: AS 41-94), und wichtig für Protein-Protein-Interaktionen ist. In TAD2 befindet sich zudem eine Prolin-reiche Domäne (PRD: AS 61-94), welche die Bindung von p53 an SH3-Bereiche von Proteinen (z.B. pro-apoptotische Proteine) der Signaltransduktion vermittelt (Baptiste *et al.*, 2002). Die vor kurzem beschriebene N-terminale Repressionsdomäne (NRD: AS 100-116), führt zur Unterdrückung der basalen p53-Aktivität in bestimmten Zelltypen, wie z.B. in humanen embryonalen Tumorzellen (Curtin & Spinella 2005). Die DNA-bindende Domäne (DBD, AS: 102-292), die den größten Anteil von p53 ausmacht und zugleich die höchste Homologie aufweist, vermittelt die sequenzspezifische DNA-Bindung. In dieser DBD sind auch >97% der gefundenen tumorassoziierten Mutationen lokalisiert (Olivier *et al.*, 2002) (siehe auch 2.3.4). In den C-terminalen AS liegt das zweigeteilte Kernlokalisierungssignal (NLS: AS 305-321) und die Tetramerisierungsdomäne (TET: AS 323-356), die ein Kernexportsignal beinhaltet (NES: AS 339-350). Das Ende des C-Terminus besteht aus der regulatorischen Domäne (REG: AS 363-393), die neben dem N-Terminus Ziel zahlreicher posttranslationaler Modifizierungen ist und unspezifisch an DNA binden kann. Die carboxyterminale Regulationsdomäne scheint auch eine

kontrollierende Funktion auf die spezifische DNA-Bindung der DBD und somit auf die Transkription von Zielgenen zu besitzen (Weinberg *et al.*, 2004).

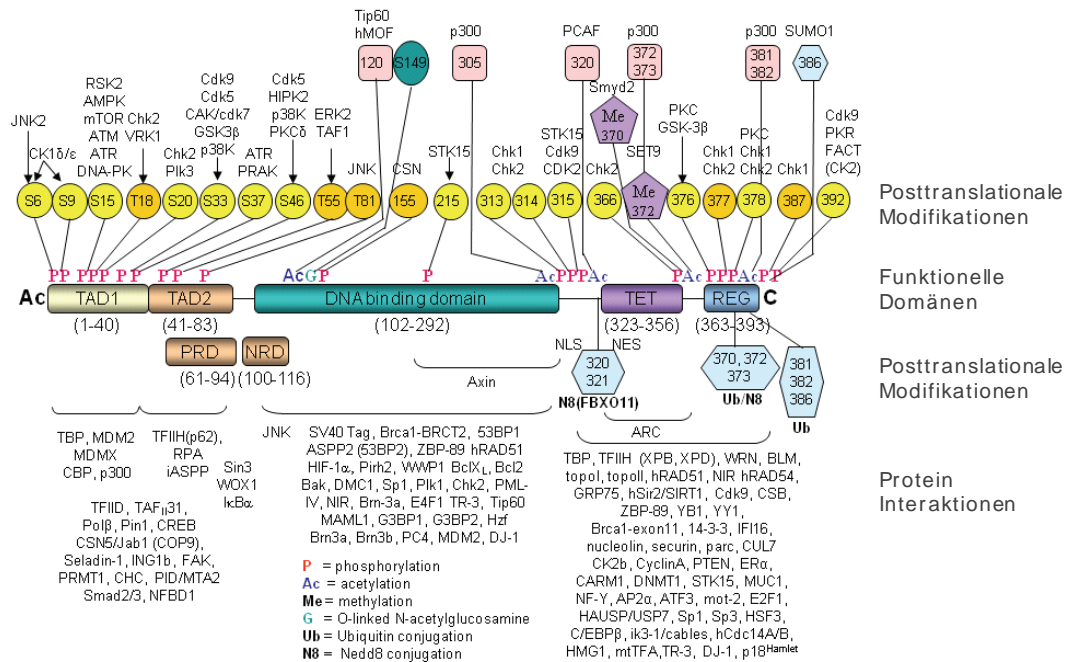


Abbildung 1 : Schematische Darstellung der funktionellen Domänen, der posttranslationalen Modifikationen und der Protein-Protein-Interaktionen von humanem p53. (Stand: 08.02.2008; nach C.W. Anderson; <http://www.biology.bnl.gov/cellbio/anderson/>).

2.2 Regulation von p53

Die Aktivität von p53 wird zum Schutz vor maligner Entartung jedoch nicht für die normale Proliferation und Entwicklung benötigt. p53 unterliegt hinsichtlich seiner Expression, Protein-Stabilität und Protein-Aktivität daher einer strengen Regulation. So hat p53 unter physiologischen Bedingungen nur eine kurze Halbwertszeit von ca. 5-20 min, während genotoxischer Stress, ausgelöst durch DNA-Schäden, Onkogen-Aktivierung, ribosomalen Stress oder Hypoxie, über unterschiedliche Wege zur Stabilisierung und Aktivierung von p53 und zur Akkumulation im Nukleus führt, wo es als Transkriptionsfaktor agieren kann (Sakaguchi *et al.*, 2000; Hammond & Giaccia 2005; Sherr 2006). Die Regulation der p53-Funktion erfolgt zum einen über posttranslationale Modifikationen und zum anderen über Protein-Protein-Interaktionen.

Die geringe Halbwertszeit des Tumorsuppressors beruht hauptsächlich auf der proteasomalen Degradation nach Ubiquitinierung durch verschiedene E3 Ubiquitin-Ligasen, wie z.B. Mdm2, COP1, Cul7 und Pirh2 (Zhang & Zhang 2005; Andrews *et al.*, 2006; Dornan *et al.*, 2006; Logan *et al.*, 2006). Mdm2, COP1 und Pirh2 sind transkriptionelle Zielgene von p53 und halten die p53-Menge unter stressfreien Bedingungen durch eine negative Rückkopplungsschleife niedrig (Brooks & Gu 2006). Mdm2 bindet im aminoterminalen Bereich von p53 und kann p53 im C-Terminus mono- und polyubiquitinieren, was zum Kernexport bzw. zum proteasomalen Abbau von p53 führt (Li *et al.*, 2003). Diese E3-Ubiquitin-Ligase fungiert daher als kritischster Regulator von p53. Als Gegenspieler von Mdm2 konnte kürzlich die Protease HAUSP identifiziert werden (Li *et al.*, 2002).

Diese kann p53 auch in Gegenwart von hohen Mdm2-Mengen durch De-Ubiquitinierung stabilisieren.

Im N- und C-Terminus von p53 befinden sich weitere AS, die posttranslational modifiziert werden und in einem komplexen Zusammenspiel zur Stabilität und Aktivität von p53 beitragen (Brooks & Gu 2003) (Abbildung 1). So besitzt p53 23 verschiedene Serin- und Threonin-Reste, die durch zahlreiche Kinasen als Antwort auf Stress phosphoryliert werden und zur p53-Aktivierung beitragen. Eine Phosphorylierung an Serin15 und 20 sowie Threonin18, die entweder direkt nach Stressinduktion durch die Proteinkinasen ATM, ATR und DNA-PK oder indirekt durch die nachfolgende Chk2-Kinase erfolgt, inhibiert dabei die Mdm2-Bindung und Ubiquitinierung von p53 (Shiloh 2003). Zusätzlich kann die Stress-induzierte Phosphorylierung von Threonin81 die Mdm2-Bindung vermindern, indem es eine Bindungsstelle für die Prolyl-Isomerase Pin1 schafft. Dies führt zur Isomerisierung von Prolin82 und zu einer Abschwächung der Mdm2-Bindung an p53 (Berger *et al.*, 2005). Es folgt eine Akkumulation von p53 und eine vermehrte Bildung von Tetrameren. Das NES wird durch die Tetramerisierung verdeckt, was der Grund für die Akkumulation von p53 im Kern ist (Stommel *et al.*, 1999).

Eine Phosphorylierung der TAD erhöht die Interaktion mit den Histon-Acetyltransferasen (HAT) p300 und CBP, welche in der TAD1 und TAD2 binden und die C-terminalen p53 Lysin-Reste (Lysin370, 372, 373, 381, 382) acetylieren. Aufgrund der großen Homologie und teilweise überlappenden Funktionen werden die Co-Aktivatoren p300 und CBP hauptsächlich als p300/CBP bezeichnet (Grossman 2001). Die Lysin-Reste der NLS von p53, Lysin320 und Lysin305, werden von PCAF bzw. p300 acetyliert (Liu *et al.*, 1999b; Wang *et al.*, 2003). Die Interaktion von p53 mit p300/CBP ebenso wie Mdm2 wird über den p53 N-Terminus vermittelt, da durch Mutation der konservierten AS L22Q und W23S die Wechselwirkung mit diesen Proteinen verloren geht (Chao *et al.*, 2000). Die Funktionen einer p53-Acetylierung werden immer noch diskutiert. Mögliche Erklärungen reichen von einer erhöhten sequenzspezifischen DNA-Bindung von acetyliertem p53 und einer dadurch gesteigerten transkriptionellen Aktivität, über eine erhöhte p53-Stabilität durch Verhinderung der Ubiquitinierung der bereits acetylierten Lysine bis hin zu einer indirekten Regulation der Transkriptionsrate von p53-Zielgenen, die über die Rekrutierung von p300/CBP, die anschließende Acetylierung der Histone und die folgende transiente epigenetische Veränderung am Promotor erfolgt (Lill *et al.*, 1997a; Barlev *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2001; Brooks & Gu 2003; Liu & Chen 2006). So wird z. B. p300/CBP durch Interaktion mit p53 an den *p21*-Promoter rekrutiert wodurch es zu einer Acetylierung der benachbarten Histone (und p53) kommt, welche die Genexpressionsrate von *p21^{waf1/Cip1}* bestimmt (Liu *et al.*, 2003). In dieser Kontrolle der Transkriptionsrate spielt auch die Argininmethyltransferase PRMT1 eine Rolle, welche im p53-N-Terminus bindet und in Kooperation mit p300/CBP die Histone an p53-spezifischen Promotoren modifizieren kann (An *et al.*, 2004). Die Acetylierung von p53 ist reversibel und kann durch Histon-Deacetylasen (HDAC) rückgängig gemacht werden. Ein Proteinkomplex, der HDAC1 enthält, kann ebenso wie die NAD-abhängige Histon-Deacetylase SIRT1 p53 deacetylieren und dadurch seine transkriptionelle Aktivität und damit seine apoptotische und proliferations-supprimierende Funktion verringern (Luo *et al.*, 2001; Vaziri *et al.*, 2001; Langley *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2003).

Die Methylierung von p53 durch Set9 oder durch Smyd2 kann zu seiner Stabilisierung bzw.

Destabilisierung beitragen (Chuikov *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2006). Sumoylierung scheint die transkriptionelle Aktivität von p53 positiv und negativ zu beeinflussen, wohingegen die Neddylierung die transkriptionellen Funktionen von p53 inhibiert (Bode & Dong 2004).

2.3 Die biologischen Funktionen von p53

p53 besitzt die Fähigkeit, nach Schädigung der Zelle durch genotoxischen Stress das Ausmaß des DNA-Schadens zu erkennen und demzufolge eine Entscheidung zwischen transientem Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur, Seneszenz oder Apoptose zu treffen. Dabei kommt es zu einer p53-abhängigen Transaktivierung bzw. Repression von Zielgenen oder auch zu Interaktionen mit anderen Proteinen, die zur Einleitung eines Zellzyklusarrests oder DNA-Reparatur notwendig sind (z.B. *p21^{Waf1/Cip1}*, *14-3-3 σ* , *GADD45*), oder das Apoptose-Programm auslösen (z.B. *Bax*, *PUMA*, *Bcl-2*, *Fas/Apo-1/CD95*) (Abbildung 2).

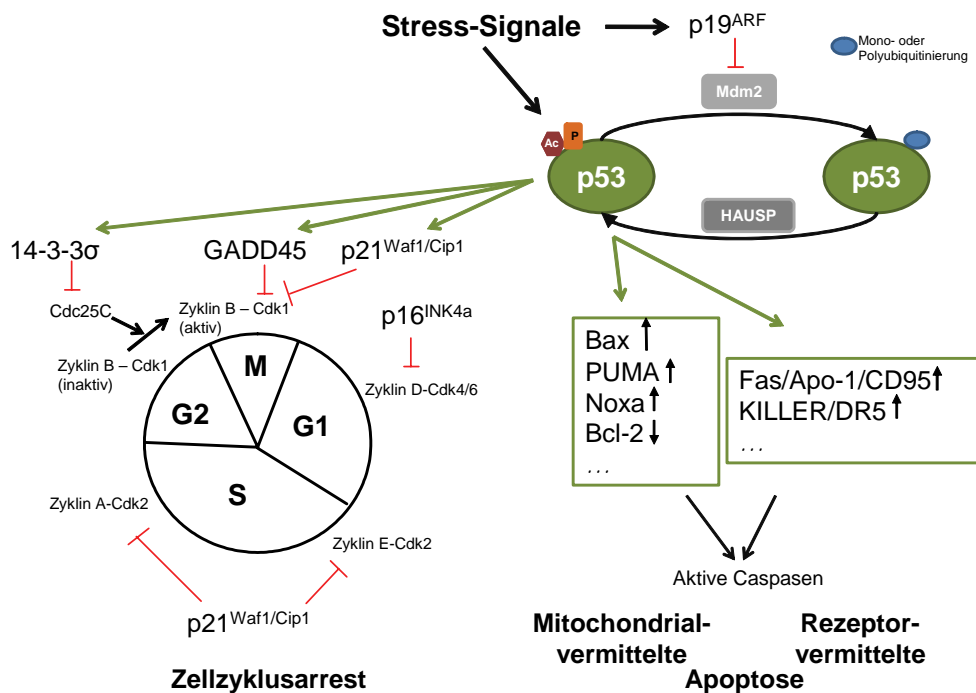


Abbildung 2: p53-Signalwege. Die Aktivierung von p53 durch verschiedene Stress-Signale führt entweder zur Einleitung eines Zellzyklusarrests und DNA-Reparatur oder zur Apoptose. Die Progression durch den Zellzyklus wird durch Komplexe aus Zyklin-abhängigen Kinasen (Cdk) und Zyklinen reguliert. p53 kann direkt oder indirekt über Transaktivierung von Zielgenen zu einer Blockierung bzw. Verzögerung der Progression beitragen. Die Apoptose wird von p53 über zwei unterschiedliche Signalwege eingeleitet, die Rezeptor-vermittelte und die Mitochondrial-vermittelte Apoptose. In beiden Fällen kommt es zur Aktivierung von so genannten Effektor-Caspasen, die zur Zerstörung der Zelle führt. Ac: Acetylierung; P: Phosphorylierung.

Hauptfunktion von p53 ist die eines Transkriptionsfaktors, für die eine sequenzspezifische DNA-Bindung Voraussetzung ist. Die typische Erkennungssequenz (RE, *response element*) des Zielgens besteht aus einer palindromen Konsensus-Sequenz, die bis zu 13 Basenpaaren von einer zweiten RE entfernt liegen kann (el-Deiry *et al.*, 1992). p53 übt seine Transaktivatorfunktion als Tetramer aus und bindet mit der DBD an die RE, die meist einige Tausend Nukleotide vom Transkriptionsstart entfernt lokalisiert sind. Nach der stabilen Komplexbildung von p53 mit der DNA erfährt diese eine Konformationsänderung, so dass p53 über seine TAD mit der basalen

Transkriptionsmaschinerie sowie Co-Aktivatoren wechselwirken und dadurch die Zielgen-Expression regulieren kann (Nagaich *et al.*, 1999). Bisher konnten p53-REs in ca. 1600 Genen detektiert werden, wobei p53 mit unterschiedlichen Affinitäten an sie bindet (Cawley *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2006). Hoch affine p53 Bindungsstellen scheinen in Genen zu liegen, die mit Wachstumsarrest assoziiert werden, wohingegen p53 zu REs in pro-apoptotischen Genen eine eher geringe Affinität aufweist (Inga *et al.*, 2002). Die differentielle Aktivierung der Zielgene durch p53 ist komplex, auch die DNA-Topologie der REs (Braastad *et al.*, 2003; Kim & Deppert 2003), die Menge an aktiviertem p53 (Laptenko & Prives 2006) und die Interaktion mit anderen Proteinen haben einen regulierenden Einfluss (Schumm *et al.*, 2006; Sullivan & Lu 2007).

2.3.1 p53-abhängiger reversibler Zellzyklusarrest

Der Zellzyklus ist in vier unterschiedliche Phasen eingeteilt: G1 (*gap1*), S (DNA-Synthese), G2 (*gap2*) und M (Mitose). Diese muss eine proliferierende Zelle durchlaufen, um sich letztendlich zu teilen und zwei Tochterzellen zu erzeugen. Das Durchlaufen des Zellzyklus ist ein sehr komplexer Vorgang und wird an bestimmten Kontrollpunkten, vor allem am Übergang zwischen den unterschiedlichen Phasen, streng kontrolliert. p53 hat definierte Rollen in G1/S- und G2/M-Kontrollpunkten als Antwort auf unterschiedlichen zellulären Stress, wie z.B. DNA-Schaden, Onkogen-Expression, Hypoxie oder virale Infektion. Gleichfalls kann p53 aktiviert werden, wenn der mitotische Spindelapparat geschädigt wird. p53 verhindert so die Weitergabe von aufgetretenen DNA-Schäden an die Tochterzelle und bewahrt somit die genomische Integrität der Zelle (Iliakis *et al.*, 2003; Giono & Manfredi 2006).

p21^{Waf1/Cip1}, ein p53-Zielgenprodukt, spielt eine wichtige Rolle in der Einleitung eines Zellzyklusarrests. Der Inhibitor der Zyklin-abhängigen Kinasen (Cdk) ist hauptsächlich an der Induktion des G1-Arrests beteiligt indem er die zellzyklusregulierende Cdk2 im Komplex mit Zyklin E bindet und dadurch deren enzymatische Aktivität inhibiert (el-Deiry *et al.*, 1994; Gartel *et al.*, 1996; Bartek & Lukas 2001). Zyklin E-Cdk2 phosphoryliert normalerweise pRb, wodurch der Transkriptionsfaktor E2F1 freigesetzt wird, der wiederum die Transkription der am Übergang der G1- in die S-Phase beteiligten Gene aktiviert. Daneben kann p21^{Waf1/Cip1} den Replikationsfaktor PCNA und Zyklin A-Cdk2 binden und so eine hemmende Wirkung auf die Progression der S-Phase ausüben (Li *et al.*, 1994; Waga *et al.*, 1994; Ogryzko *et al.*, 1997). Zusätzlich inaktiviert p21^{Waf1/Cip1} den Zyklin B-Cdk1 Komplex und hat dadurch einen Einfluß auf den G2/M-Arrest (Boulaire *et al.*, 2000; Taylor & Stark 2001).

Der p53-induzierte G2-Arrest wird außerdem durch die Expression von 14-3-3 σ vermittelt. Das Protein bindet an Cdc25C und sequestriert es im Zytoplasma. Cdc25C ist eine Phosphatase, die die Kinase Cdk1 durch Dephosphorylierung aktiviert. Cdk1 ist im Komplex mit Zyklin B entscheidend für den Übergang der G2- in die M-Phase. Durch die 14-3-3 σ -vermittelte zytoplasmatische Sequestrierung von Cdc25C wird die Aktivierung von Zyklin B-Cdk1 verhindert und die Zelle arretiert in der G2-Phase (Chan *et al.*, 1999b; Laronga *et al.*, 2000). Kürzlich konnte zudem noch die direkte Repression von Cdc25C durch p53 gezeigt werden (St Clair *et al.*, 2004). *GADD45*, ein weiteres p53-Zielgen, ist ebenfalls am G2-Arrest beteiligt, indem es die Kinase-Funktion von Cdk1 inhibiert. Dies führt wahrscheinlich zu einer Dissoziation des Zyklin B-Cdk1 Komplexes (Zhan *et*

al., 1999) und zur zytoplasmatischen Lokalisation von Zyklin B (Jin *et al.*, 2002).

Neuste Erkenntnisse sprechen auch für eine Rolle von p53 im Schutz vor Aneuploidie. Aneuploidie ist eine Konsequenz der Fehlverteilung der Chromosomen während der Mitose oder von Mutationen in Genen des Spindel-Kontrollpunkts (Vogel *et al.*, 2004). p53 kann einen postmitotischen, G1-ähnlichen Arrest einleiten, der durch tetraploide (4N) Zellen ausgelöst wird (Fujiwara *et al.*, 2005). Notwendig dafür ist aber zusätzlich ein intakter Spindel-Kontrollpunkt, der die korrekte Anordnung der Chromosomen an der mitotischen Spindel überwacht, bevor diese segregiert werden (Gorbsky 2001). p53 verhindert somit durch Auslösen eines postmitotischen Arrests die Endoreduplikation tetraploider Zellen, wobei die genauen Mechanismen aber noch nicht bekannt sind.

2.3.2 p53 und zelluläre Seneszenz

Seneszenz bezeichnet einen irreversiblen Wachstumsarrest und ist ein weiterer p53-abhängiger Mechanismus, der die Proliferation von Zellen mit einem erhöhten malignen Potential verhindert (Campisi 2001; Braig & Schmitt 2006). Seneszenz führt im Gegensatz zur Apoptose nicht zur Eliminierung der Zellen aus ihrem Zellverbund bzw. Gewebe. Durch ein komplexes genetisches Programm verliert die seneszente Zelle ihre Proliferationsfähigkeit, verändert ihre Morphologie und spezifische Funktionen, bleibt jedoch noch metabolisch aktiv (Goldstein 1990; Dimri *et al.*, 1995; Shelton *et al.*, 1999). Man unterscheidet zwischen Telomer-unabhängiger (vorzeitiger) und Telomer-abhängiger (replikativer) Seneszenz. Telomer-unabhängige Seneszenz wird durch zellulären Stress (z.B. aktivierte Onkogene, reaktive Sauerstoffspezies oder DNA-Schädigung) akut induziert, wohingegen die Telomer-abhängige Seneszenz auf einer Dysfunktion der Telomere, die auch das DNA-Schadensprogramm der Zelle auslösen, beruht (Serrano *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 1999; Lansdorp 2000; Karlseder *et al.*, 2002). Das Eintreten der Seneszenz als Antwort auf DNA-Schaden ist dabei stark vom Zelltyp und Ausmaß des Schadens abhängig (Gudkov & Komarova 2003). p53 und das transkriptionelle Zielgen $p21^{Waf1/Cip1}$ sind dabei entweder in Zusammenarbeit mit oder unabhängig vom $p16^{INK4a}/pRb$ -Signalweg maßgeblich an der Beseitigung von geschädigten Zellen über Seneszenz beteiligt (Beausejour *et al.*, 2003). In der Induktion der Seneszenz durch p53 hat auch der Tumorsuppressor $p19^{ARF}$ eine wichtige Rolle (Sherr 1998). Als Antwort auf erhöhte mitogene Signale, die aus einer Überexpression von c-myc, E2F1, Ras oder anderen Onkogenen resultiert, wird $p19^{ARF}$ aktiviert. Das Protein bindet und inaktiviert Mdm2, den negativen Regulator von p53 wodurch die p53-Aktivität gesteigert wird und je nach biologischem Kontext p53-abhängige Seneszenz oder Apoptose ausgelöst werden kann (Bates *et al.*, 1998; Palmero *et al.*, 1998; Pomerantz *et al.*, 1998).

2.3.3 Einfluss von p53 auf die Apoptose

Tritt massiver irreparabler DNA-Schaden in Zellen auf, wird das Selbsteliminierungs-Programm, die Apoptose, eingeleitet. p53 ist daran beteiligt, indem es pro-apoptotische Proteine der *BH3-only* Familie (Bax, PUMA, Noxa) transkriptionell aktiviert und Repressoren der Apoptose wie Bcl-2 und Survivin herunterreguliert (Miyashita *et al.*, 1994; Miyashita & Reed 1995; Oda *et al.*, 2000; Nakano & Vousden 2001; Oren 2003). Die pro-apoptotischen Proteine lagern sich an die

mitochondriale Membran (Danial & Korsmeyer 2004) und starten die apoptotische Kaskade, die zur Freisetzung von Cytochrom c und Zerstörung der Mitochondrien führt und mit einer Caspase-Aktivierung endet (Li *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2001). Darüber hinaus erfolgt auch eine Translokation des Tumorsuppressors selbst in die Mitochondrien, die eine Aktivierung des Apoptose-Signalwegs durch direkte Interaktion mit anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie auslöst (Murphy *et al.*, 2004). Neben der mitochondrial-vermittelten Apoptose hat p53 gleichfalls einen Einfluss auf die Rezeptor-vermittelte Apoptose, die über die transkriptionelle Aktivierung der Todesrezeptoren wie *Fas/Apo-1/CD95* und *KILLER/DR5* (Owen-Schaub *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1997) eingeleitet wird.

2.3.4 Verlust der p53 Tumorsuppressor-Aktivität

Mutationen im p53-Gen

Für eine Tumorprogression ist der Verlust der Tumorsuppressor-Aktivität von p53 notwendig. Daher ist es nicht erstaunlich, dass in ungefähr der Hälfte aller humanen Tumore eine somatische Mutation im *p53*-Gen auftritt (<http://iarc.fr/p53>). In den restlichen 50% der Tumore erfolgt eine indirekte p53-Inaktivierung durch genetische oder epigenetische Veränderungen der Signalwege, die zur p53-Aktivierung notwendig sind (*upstream*), oder p53-vermittelte Signalwege blockieren (*downstream*).

Im Gegensatz zu Mutationen in anderen Tumorsuppressor-Genen ist die Häufigkeit von *missense*-Punktmutationen (80%) im *p53*-Gen auffällig, die zu einer Expression von Volle-Länge mutiertem p53 (mutp53) führen (Hussain & Harris 1998). Diese mutp53-Proteine enthalten nur eine veränderte AS, besitzen eine verlängerte Halbwertszeit im Vergleich zu wtp53 (1-24 Stunden) und akkumulieren im Zellkern (Soussi 2005). Die Analyse zahlreicher humaner Tumore zeigte, dass >97% dieser *missense*-Punktmutationen in der DBD von *p53* auftreten. Darunter finden sich sechs *hotspot* Mutationen, die zusammen 40% aller *p53 missense*-Mutationen ausmachen (Hollstein *et al.*, 1991; Soussi & Lozano 2005). Diese Mutationen lassen sich in zwei Klassen aufteilen: sind AS betroffen, die für den sequenzspezifischen Kontakt mit der DNA notwendig sind, spricht man von DNA-Kontaktmutanten, wohingegen bei Konformationsmutanten die globale p53-Struktur durch Mutation einer spezifischen AS betroffen ist (Bullock & Fersht 2001; Joerger *et al.*, 2005).

Funktionell resultiert aus *p53*-Mutationen der Verlust der wtp53 Tumorsuppressor-Aktivitäten (*loss of function*). Ist nur ein Allel von der Mutation betroffen, kann dies zu einem dominant-negativen Effekt des mutp53 über das wtp53 führen. Zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien geben aber auch Hinweise auf einen zusätzlichen Gewinn von wtp53-unabhängigen, onkogenen Funktionen einiger mutp53-Proteine (*gain of function*), die z.B. die Tumorgenese oder eine Arzneimittelresistenz fördern (Dittmer *et al.*, 1993; Gualberto *et al.*, 1998; Sigal & Rotter 2000; Geisler *et al.*, 2003; Lang *et al.*, 2004; Olive *et al.*, 2004). Die molekularen Mechanismen konnten noch nicht geklärt werden. Vermutet wird, dass ein *gain of function* von mutp53 zum einen über Protein-Protein-Interaktionen, z.B. mit den p53-Homologen p63 und p73 oder dem Transkriptionsfaktor NF-Y (Di Como *et al.*, 1999; Di Agostino *et al.*, 2006), und zum anderen durch transkriptionelle Aktivierung bzw. Repression spezifischer Gene, z.B. *MDR-1*, *c-myc*, *Fas/Apo-1/CD95*, vermittelt wird (Lin *et al.*, 1995; Frazier *et al.*, 1998; Zalcenstein *et al.*, 2003). Zusätzlich konnte eine Assoziation von

mutp53 *in vivo* mit der nukleären Matrix und *in vitro* mit sogenannten S/MAR-Regionen der DNA gezeigt werden, die eine *gain of function*-Aktivität der mutp53-Proteine durch Veränderung der Kernstruktur und -funktionen impliziert (Will *et al.*, 1998; Koga & Deppert 2000; Gohler *et al.*, 2005).

p53-Inaktivierung durch virale Proteine

Der Tumorsuppressor p53 ist neben pRb eines der Hauptziele viraler Onkoproteine. Durch diese Interaktion erlangen DNA-Viren die Kontrolle über den Zellzyklus und können die für die virale Replikation notwendige S-Phase induzieren. In manchen Fällen führt die Bindung von p53 auch zu einer malignen Zelltransformation (Sherr & McCormick 2002; Harris & Levine 2005) (Abbildung 3). Das virale Protein E6 des humanen Papillomavirus Typ 16 (HPV-16) kann durch Rekrutierung der E6AP-Ligase an p53 dieses für den proteasomalen Abbau markieren (Ubiquitinierung). Die Ubiquitin-Ligase E6AP kann nur in Anwesenheit von HPV-16 E6 mit p53 interagieren (Huibregtse *et al.*, 1995; Talis *et al.*, 1998). Somit vermittelt HPV-16 E6 die Ubiquitinierung und anschließende Degradation von p53.

Nach Infektion mit dem Adenovirus Typ 5 (Ad5) kommt es ebenfalls zum Abbau von p53. Der Komplex der frühen adenoviralen Proteine E1B-55K/E4orf6, der an p53 binden kann (Dobner *et al.*, 1996), bildet mit Elongin BC-Cullin5-Rbx einen Ubiquitin-Ligase Komplex, dessen Substrat p53 ist (Querido *et al.*, 2001; Harada *et al.*, 2002). Ohne Interaktion mit E4orf6 ist E1B-55K in der Lage, an den N-Terminus von p53 zu binden und es zytoplasmatisch zu sequestrieren und dadurch zu inaktivieren (Blair Zajdel & Blair 1988). p53 verliert somit seine transkriptionelle Aktivität und auch die Fähigkeit aminoterminaler Protein-Protein-Interaktionen auszuüben (Shen *et al.*, 2001). Adenovirus Typ 5 hat nur ein geringes onkogenes Potential in Nagetierzellen. Ein Zusammenhang zwischen der Tumorentstehung im Menschen und Adenoviren konnte bisher nicht hergestellt werden (Chauvin *et al.*, 1990).

SV40 LT bindet in der DBD von p53 und führt dadurch zur Inaktivierung der transkriptionellen Funktionen von p53 (Bargonetti *et al.*, 1992). Im Gegensatz zu anderen DNA-Viren liegt p53 hier in einem stabilen Komplex mit LT im Nukleus vor und wird nicht degradiert. Die genauen Vorgänge und Auswirkungen dieser p53-LT Interaktion werden in Abschnitt 3.4 näher erläutert.

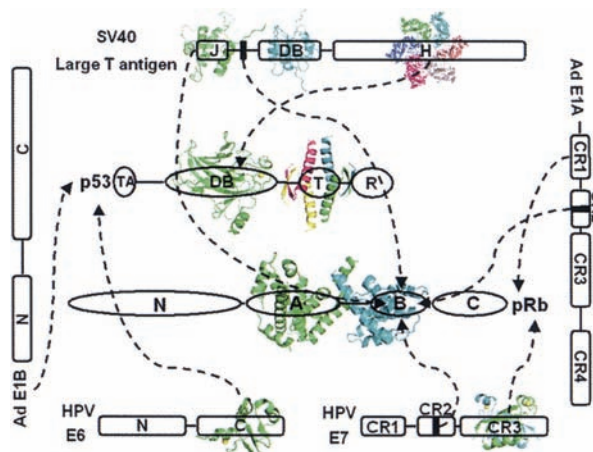


Abbildung 3: Darstellung der Interaktionen zwischen viralen Onkogenen und den Tumorsuppressor-Proteinen p53 und pRb. Gestrichelte Pfeile, die auf die Protein-Domänen deuten, indizieren den Ort der strukturell bestätigten Interaktionen; gestrichelte Pfeile, die auf die Protein-Namen zeigen, indizieren biochemisch bestätigte Interaktionen. p53-TA: *Transactivation domain*; p53-DB: *DNA-binding domain*; p53-T: *tetramerization domain*; p53-R: *regulatory domain*; pRb-N/C: *N/C terminal domain*; pRb-A: *A-box of the pocket domain*; pRb-B: *B-box of the pocket domain*; SV40 Large T-antigen-J: *DnaJ-like domain*; SV40-DB: *DNA-binding domain*; SV40-H: *Helicase domain*; E7/E1A-CR: *conserved region*; E6/E1B-N/C: *N/C-terminal domain* (Liu & Marmorstein 2006).

3 Das Simian Virus 40 (SV40)

Das kleine DNA-Tumorvirus SV40 gehört den *Polyomaviridae* an, die eine Subfamilie der *Papovaviridae* darstellen. Von den bislang 12 identifizierten Mitgliedern der Polyomaviren ist SV40 das bekannteste, vor allem durch seine Verwendung als Modellsystem für die Aufklärung molekularer Mechanismen, z.B. der eukaryotischen DNA-Replikation (Butel & Lednicky 1999). SV40 besteht aus einem ikosaedrischen Kapsid, das ein kovalent geschlossenes, doppelsträngiges DNA-Genom enthält. Es wurde als erstes aus Rhesusaffen (Nierenzellen) isoliert, die zur Herstellung des Polio-Impfstoffes verwendet wurden. In diesem Zusammenhang zeigte sich auch, dass SV40 in der Lage ist, in neugeborenen Hamstern Tumore zu induzieren (Hilleman 1998). Trotz einiger Hinweise ist bis heute jedoch keine eindeutige Korrelation zwischen SV40 und der Entstehung humaner Tumore zu erkennen (Shah 2007).

3.1 Das SV40 Genom

Das SV40 Kapsid, das aus den drei viralen Proteinen VP1, VP2 und VP3 aufgebaut ist, verpackt das 5243 bp große Genom in eine ikosaedrisch-symmetrische Struktur. Dabei liegt es als Minichromosom in einer nukleosomalen Struktur mit eukaryotischen Histonen (H2A, H2B, H3, H4) vor. Die regulatorischen Sequenzen im SV40 Genom beinhalten den Replikationsursprung (*ori*, *origin of replication*), ein Verpackungssignal und einen frühen und späten Promotor bzw. *Enhancer* (Oppenheim *et al.*, 1994). Die Transkription verläuft bidirektional, da sich der frühe und späte Promotor auf gegengesetzten Strängen befinden (Li & Kelly 1985) (Abbildung 4).

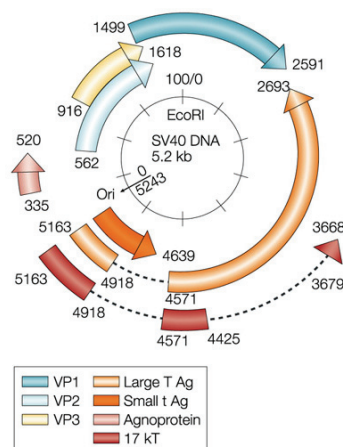


Abbildung 4: Das SV40 Genom (Gazdar *et al.*, 2002).

Die SV40 Transkription beginnt mit der Expression drei alternativ gespleißter mRNAs, die für drei Proteine kodieren, denen die ersten aminoterminalen 82 Aminosäuren gemeinsam sind: das LT, das kleine t-Antigen (st) und 17kT (Zerrahn *et al.*, 1993; Sullivan & Pipas 2002). Diese frühen Gen-Produkte sind wichtig für die weitere kontrollierte Transkription der frühen und der späten Gene, die Rekrutierung der zellulären Transkriptionsmaschinerie, der viralen Replikation und der Bildung neuer Virionen. Der späte SV40 Promotor führt zur Expression zweier alternativ

gespleißter mRNAs, die durch alternative Startcodons zur Bildung der drei Struktur-Proteine, VP1, VP2, VP3 und des Agnoproteins führen. Kürzlich konnte außerdem eine SV40 microRNA detektiert werden, die die zeitliche Abfolge der viralen Protein-Expression mitreguliert (Sullivan *et al.*, 2005). Ein neues Struktur-Protein (VP4) wurde von Daniels *et al.* beschrieben. VP4, dessen Startcodon auf dem VP2-VP3 Transkript liegt, wird spät nach den Struktur-Proteinen VP1-3 exprimiert und ist wichtig für die Membran-Lyse zur Freisetzung und Verteilung neuer Virionen (Daniels *et al.*, 2007).

3.2 Die SV40-Infektion, Zelllyse und Transformation

Die SV40-Infektion verläuft im Gegensatz zur klassischen Internalisierung viraler Partikel über die Clathrin-vermittelten Endozytose über eine *Caveolae*-vermittelte Endozytose (Anderson *et al.*, 1996). Die mit Virus beladenen *Caveolae* aggregieren in einem intrazellulären Kompartiment, dem Caveosom, von wo aus die Virionen entlang von Mikrotubuli zum glatten endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert werden (Pelkmans *et al.*, 2001). Im ER kommt es zur Dissoziation der Virionen und zum Transport in den Nukleus (Norikin *et al.*, 2002). Dort liegt das SV40 Genom als Minichromosom vor und benutzt die zelluläre Transkriptionsmaschinerie für die Transkription der frühen und späten Gene.

Je nach Art des Organismus bzw. des Zelltyps kann eine SV40-Infektion in einer Zelllyse oder malignen Transformation enden. Affenzellen sowie die meisten humanen Fibroblasten und Epithelialzellen sind permissiv für die SV40-Infektion, d.h. das Virus-Genom kann in diesen Zellen repliziert werden. Bei dieser lytischen Infektion kommt es zur Expression der frühen und der späten Gene, wobei ausschließlich das LT für die nach ca. 12 Stunden eintretende zelluläre und virale DNA-Replikation notwendig ist. Neu-synthetisierte SV40-DNA bindet dann an Wirts-Histone, deren Synthese durch die virale Infektion induziert wird (Polisky & McCarthy 1975). Nach Expression der Strukturproteine folgt der Zusammenbau neuer Virione mit SV40-Minichromosomen, die dann durch eine zeitlich koordinierte Lyse der Zelle freigelassen werden.

Nagetierzellen sind nicht-permissiv für SV40, da die p48-Untereinheit der murinen DNA-Polymerase α -Primase nicht mit LT komplexieren kann und so die SV40-Replikation verhindert wird (Kautz *et al.*, 2001). In diesen Zellen kommt es nach SV40-Infektion zur transienten Expression der frühen Gene, LT, st und 17kT, die einen transformierten Phänotyp hervorrufen. LT ist das entscheidende Protein für die virale Transformation und wird in Abschnitt 3.3 genauer erläutert. st interagiert mit der Serin-Threonin Proteinphosphatase PP2A und inhibiert deren Funktion, wodurch es zu einer dauerhaften Stimulation der Zellproliferation kommt (Sablina & Hahn 2008). Deshalb zeigen viele Kinasen, z.B. MAPK, eine erhöhte Phosphorylierung und Aktivität, die wachstumsfördernd auf die Zelle wirkt (Sontag *et al.*, 1993). st ist ebenfalls in der Lage, den Zyklin A-Promotor zu transaktivieren und p27 direkt oder indirekt zu inhibieren (Porrás *et al.*, 1996; Porrás *et al.*, 1999). Zyklin A bindet an Cdk2 und ist notwendig für die Progression durch die S-Phase des Zellzyklus. p27 gehört der Familie der Inhibitoren der Zyklin-abhängigen Kinasen an und bindet bzw. inaktiviert Zyklin-Cdk Komplexe und ist dadurch in den G1-Arrest involviert (Toyoshima & Hunter 1994). Das 17kT Protein, das die gleiche J Domäne wie LT besitzt,

wurde erst 1993 entdeckt (Zerrahn *et al.*, 1993). 17kT hat ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Stimulierung der Zellzyklus-Progression, z.B. durch Senkung der p130-Proteinmenge, einem Mitglied der pRb-Familie, und Transaktivierung des Zyklin A-Promotors. Die exakten Funktionen während der Infektion und Transformation sind jedoch noch nicht geklärt (Boyapati *et al.*, 2003; Skoczylas *et al.*, 2005). st oder 17kT alleine können keine Transformation hervorrufen, sondern haben nur einen fördernden Einfluss auf diese (Rundell & Parakati 2001). SV40 liegt nach Infektion in nicht-permissiven Zellen episomal vor und kann deshalb nach Zellteilung wieder verloren gehen. Die Zelle erlangt dann ihren normalen Zustand zurück, man spricht von abortiver Infektion. Mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit von 10^{-7} integriert hauptsächlich die frühe Genregion von SV40 in die Wirtszelle und wird bei der Zellteilung zusammen mit dem zellulären Genom repliziert. Die daraus entstehenden Zellen werden als transformiert bezeichnet, da sie onkogenes Potential nach Injektion in syngene Tiere aufweisen. Die exakte Abstufung der Transformation ist in Abschnitt 1 beschrieben worden.

Zusätzlich zum Phänomen der Permissivität und Nicht-Permissivität existiert noch die Semi-Permissivität, die einigen humanen Zellen zu eigen ist. SV40 infizierte humane mesotheliale Zellen zeigen eine vergleichsweise hohe Transformationsrate (10^{-3}), die auf episomale und nicht integrierte SV40 DNA zurückzuführen ist, und weisen einen immortalen Charakter auf (Bocchetta *et al.*, 2000; Cacciotti *et al.*, 2002; Foddis *et al.*, 2002).

3.3 LT und die zelluläre Immortalisierung und Transformation

Die Besonderheit von SV40 LT liegt in der Fähigkeit Nagetierzellen, ohne zusätzliche Onkogene zu immortalisieren und gleichzeitig zu transformieren (Tiemann & Deppert 1994a). Grundlage hierfür ist die Bindung und Manipulation der Funktionen zellzyklusregulatorischer Proteine durch LT für die Progression durch die S-Phase, die je nach Zelltyp unterschiedliche Ergebnisse bewirkt (Ahuja *et al.*, 2005). In transgenen Mausmodellen, auf die hier nicht gesondert eingegangen wird, zeigt sich der Zelltyp-spezifische Effekt besonders deutlich. So kann LT zu Hyperplasien und Karzinomen führen und ist in manchen Fällen auch für die Metastasierung verantwortlich (Christofori *et al.*, 1995; Ramel *et al.*, 1995; Masumori *et al.*, 2001). Die besondere Eigenschaft von LT in der zellulären Transformation wird deshalb für die Aufklärung grundlegender molekularer Mechanismen, die zur Tumorgenese beitragen, ausgenutzt.

SV40 LT ist ein nukleäres Phosphoprotein aus 708 Aminosäuren (ca. 90kDa), das zahlreiche Funktionen enthält. Die für die zelluläre Immortalisierung und Transformation notwendigen drei funktionellen Domänen konnten in Mutationsanalysen bestimmt werden (Peden *et al.*, 1989; Zhu *et al.*, 1992; Kierstead & Tevethia 1993). Zu diesen Regionen zählt die J Domäne (1-82), an die das Hitzeschockprotein Hsc70 bindet, das LxCxE Motiv (103-107), verantwortlich für die Bindung der pRb-Familienmitglieder, und die zweigeteilte Region (351-450 und 533-626), welche die Bindung an p53 sowie p300/CBP vermittelt (Abbildung 5). Die letzten C-terminalen AS, in denen der so genannte *host range* (682-708) liegt, sind nicht notwendig für die Immortalisierung oder Transformation von Zellen (Tevethia *et al.*, 1988). Sie sind vielmehr wichtig für die Bestimmung

des Wirtsbereichs und dem Zusammenbau neuer Viruspartikel (Peden & Pipas 1985; Spence & Pipas 1994).

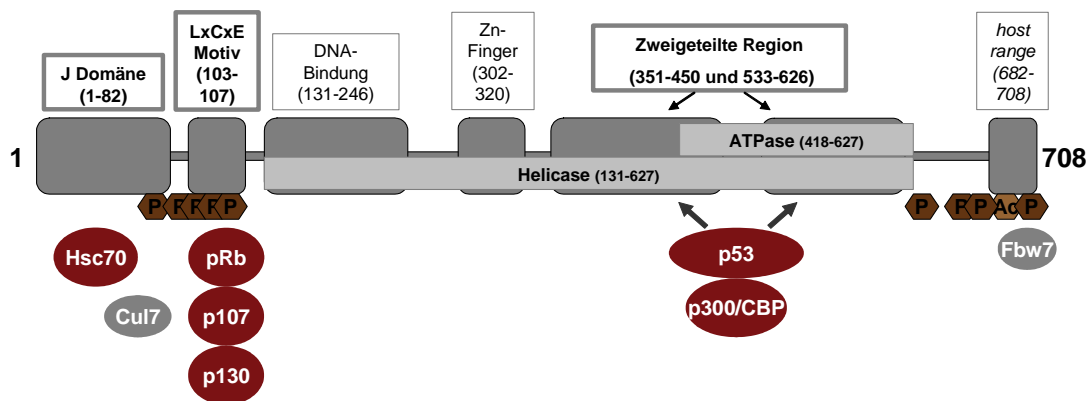


Abbildung 5: Struktur von LT (verändert nach Butel und Lednicky, 1999)

Die N-terminalen 82 AS haben große Ähnlichkeit mit den J Domänen der DnaJ Chaperon-Moleküle (Kelley & Landry 1994) und weisen auch die gleiche Funktion auf. So wird über die SV40 J Domäne die Bindung mit Hsc70, einem DnaK Chaperon, vermittelt, und dessen ATPase-Aktivität und Bindung an Substrate stimuliert (Sawai & Butel 1989; Sullivan *et al.*, 2000). Chaperone sind wichtig für die ATP-abhängigen Prozesse der Bindungsstabilisierung bei der Proteinfaltung, Vermeidung der Protein-Aggregation bei zellulärem Stress (Hartl 1996) und der Translokation neu-synthetisierter Proteine (Stuart *et al.*, 1994; Ungermann *et al.*, 1994). Es wird vermutet, dass die J Domäne die ATPase-Aktivität von Hsc70 auf pRb/E2F-Komplexe überträgt und zu deren Zerstörung führt (Srinivasan *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2001). Daraus würde sich ein Zusammenspiel zwischen Chaperon-Aktivität und Zellzykluskontrolle ergeben, indem LT die Aktivität von pRb durch einen J Domänen-abhängigen und –unabhängigen Mechanismus stört (Sullivan & Pipas 2002).

Die pRb-Proteine, p130, p107 und pRb, werden über ihre konservierte *pocket*-Domäne an das LxCxE-Motiv von LT gebunden, welches zwischen der J Domäne und dem Kernlokalisierungssignal liegt (DeCaprio *et al.*, 1988). Die pRb-Proteinfamilie spielt eine wichtige Rolle in der negativen Regulation der Zellzyklusprogression und besitzt deshalb eine entscheidende Funktion in der Proliferation, Differenzierung und Apoptose (Du & Pogoriler 2006). LT interagiert mit aktiven, hypophosphorylierten pRb-Proteinen, die normalerweise die E2F-Transkriptionsaktivatoren inaktivieren (Ludlow *et al.*, 1990). Die Bildung des LT-pRb-Komplexes hat demnach die gleichen Auswirkungen wie die inaktivierende Phosphorylierung von pRb durch Zyklin-abhängige Kinasen (Adams 2001): die Freisetzung von E2F und S-Phase Eintritt durch Aktivierung der E2F-vermittelten Transkription.

Die direkte Bindung von LT an die gesamte DBD von p53 über die C-terminalen AS 351-450 und 533-626 von LT führt zur transkriptionellen Inaktivierung von p53. Darüber hinaus wird die Induktion von p53-Zielgenen verhindert, so dass die Zelle ungehindert proliferieren kann (siehe auch Abschnitt 2.3).

Die Co-Aktivatoren p300 und CBP sind an vielen zellulären Prozessen wie Zellwachstum und

Differenzierung beteiligt, und Fehlfunktionen werden mit unterschiedlichen Krankheiten, wie z.B. das Rubinstein-Taybi-Syndrom (Miller & Rubinstein 1995) und Krebs (Iyer *et al.*, 2004) in Verbindung gebracht. Sie besitzen eine intrinsische HAT-Aktivität, mit der sie Transkriptionsfaktoren und Histone modifizieren können, und vermitteln die Rekrutierung von Proteinen der basalen Transkriptionsmaschinerie, z.B. TBP oder RNA Polymerase II (RNA polII), an DNA-gebundene Transkriptionsfaktoren (Goodman & Smolik 2000). Die Rolle der transkriptionellen Adaptor-Proteine p300/CBP in der LT-induzierten Transformation ist jedoch noch nicht geklärt. p300/CBP interagieren mit LT in der zweigeteilten Bindungsstelle von LT. p300, das zellzyklusabhängig phosphoryliert wird, wird dabei in der nicht-phosphorylierten Form von LT gebunden (Avantaggiati *et al.*, 1996; Eckner *et al.*, 1996; Lill *et al.*, 1997b). Dies impliziert einen Einfluss von LT auf den Zellzyklus über p300, wahrscheinlich durch E2F-vermittelte Transkription (Trouche *et al.*, 1996). Vor kurzem konnte von Borger und DeCaprio (2006) gezeigt werden, dass p53 die Interaktion von p300/CBP im LT-Komplex vermittelt bzw. begünstigt. p53 selbst interagiert mit der C-terminalen Region von p300/CBP (Avantaggiati *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 1997; Lill *et al.*, 1997b). Eine Wachstums-reprimierende Funktion von p300/CBP beruht wahrscheinlich auf der Interaktion von p300/CBP mit p53 und der Mitwirkung in der transkriptionellen Aktivierung von p53-Zielgenen, wie z.B. *p21^{Waf1/Cip1}*, *Mdm2* und *Bax* (siehe auch 2.2). Eine weitere wichtige Funktion von p300/CBP, die Einfluss auf die LT-induzierte Transformation haben könnte, ist die HAT-Aktivität, die durch Chromatin- und/oder Proteinmodifizierung das zelluläre Genexpressions-Programm reguliert (Ogryzko *et al.*, 1996) (siehe auch 2.2). LT ist in der Lage die globale Histon-Acetylierung sowie die HAT-Aktivität von CBP zu erhöhen (Valls *et al.*, 2003) und die transkriptionelle Aktivität von CBP an dem TK-(Thymidin Kinase) Promotor zu reprimieren (Valls *et al.*, 2007). CBP führt zur p53-abhängigen Acetylierung von LT im C-Terminus (Liu *et al.*, 1999b; Poulin *et al.*, 2004). Eine Relevanz der LT-Acetylierung für die Transformationsaktivität von LT konnte bisher nicht gezeigt werden.

Zusätzlich interagiert LT mit weiteren Proteinen, die helfende Funktionen auf die Transformation ausüben können, jedoch sind die genauen Mechanismen noch nicht bekannt. Dazu zählen z.B. zwei Proteine der Ubiquitinierungs-Maschinerie, Cul7 (AS 69-83) und Fbw7 (~AS 699-703) (Kohrman & Imperiale 1992; Welcker & Clurman 2005). Es wird angenommen, dass LT die Aktivität von Cul7 und Fbw7 inaktiviert und so den proteasomalen Abbau von an LT-gebundenen Proteinen verhindert (Ali *et al.*, 2004). Eine Übertragung der Ubiquitinierungsaktivität durch den Cul7-LT bzw. Fbw7-LT Komplex auf andere Substrate kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Immer weitere neue Funktionen und Bindungspartner von LT treten in Erscheinung. Eine genaue Analyse der Interaktionen wird nicht nur zur Aufklärung der LT-Transformation beitragen, sondern auch zum besseren Verständnis des Zellzyklus und seinen Veränderungen, die zur Tumorgenese führen.

3.4 Interaktion von LT mit p53

Die Bindung von LT an p53 erfolgt, wie oben schon erwähnt, über eine zweigeteilte Bindungsstelle im C-Terminus von LT. Mutationen innerhalb dieser Region, die einen Verlust der p53-Komplexierung mit sich bringen, führen zum Verlust der Transformationskompetenz (Peden *et al.*,

1998), welche jedoch Zelltyp-spezifisch ist. Für Mauszellen ist die p53-Bindung von LT für die Immortalisierung notwendig. LT ist dabei in der Lage, primäre MEF zu immortalisieren und gleichzeitig zu transformieren (Conzen & Cole 1995). Diese C-terminale Domäne von LT, über die p53 komplexiert wird, ist aber nicht in allen Zelltypen für die Transformation *in vitro* bzw. Tumorentstehung in transgenen Mäusen notwendig (Srinivasan *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1992; Saenz Robles *et al.*, 1994). So können Rattenzellen mit einem N-terminalen Fragment von LT transformiert werden (Sompayrac & Danna 1991; Sompayrac & Danna 1992). Transgene Mäuse, die die p53-Bindungs-inkompetente LT-Mutante dl1137 exprimieren, zeigen jedoch ein verlangsamtes Tumorwachstum im Vergleich zu Mäusen mit Wildtyp LT, das mit einer erhöhten p53-abhängigen Apoptose, ausgelöst durch onkogenen Stress, korreliert (Saenz Robles *et al.*, 1994; Symonds *et al.*, 1994). Der Verlust von p53 scheint demnach in unterschiedlichen Zellsystemen eher mit einer Tumorprogression als mit einer Tumorentstehung zu korrelieren.

3.4.1 Eine strukturelle Betrachtung des p53-LT Komplexes

Lilyestrom *et al.* (2006) konnten zum ersten Mal die Bindung des Tumorsuppressors p53 an ein virales Protein, das LT, strukturell darstellen. Sie zeigten die Kristallstruktur der Helikase-Domäne von LT, gebunden an die DBD von humanem p53 (Abbildung 6).

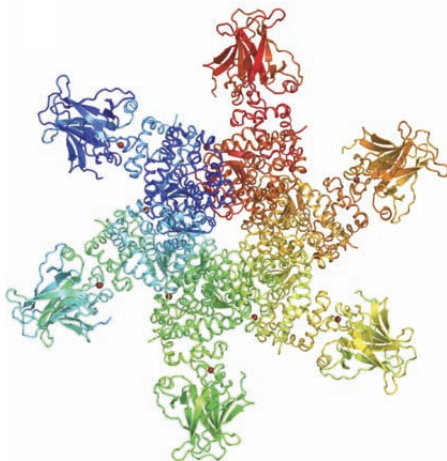


Abbildung 6: Struktur des LT-p53 Komplexes. Jede der sechs Untereinheiten des LT-Hexamers (innen) bindet ein p53-Monomer (außen). Dargestellt sind die DBD von p53 und die Helikase-Domäne von LT (Lilyestrom *et al.*, 2006).

Sechs LT Helikase-Domänen bilden ein Hexamer aus, an dessen sechs Untereinheiten je eine p53-DBD nach Außen gebunden vorliegt. Die Regionen, mit denen p53 an LT bindet, vermitteln auch die Bindung von p53 an DNA (Cho *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 2001). Diese Assoziationen führen zu Konformationsänderungen der p53-DBD, die jedoch nicht vergleichbar sind mit den Veränderungen der Konformation der p53-DBD gebunden an DNA. Die von LT gebundenen p53 AS-Reste sind hoch konserviert. So vermitteln auch die mit am häufigsten mutierten AS von p53, Glycin245, Arginin248 und Arginin273, die Interaktion mit LT. Durch die p53-Bindung an LT sind sechs der acht p53 AS-Reste, die den Kontakt zur DNA herstellen, verborgen und damit die gesamte DBD von p53. Interessanterweise weist die p53-Kontaktstelle von LT ähnliche Ladung und Form auf wie doppelsträngige DNA. Man kann daher vermuten, dass LT p53 über eine „DNA-Mimikry“ inaktiviert. Zusätzlich verdeckt LT eine postulierte Dimerisierungsregion von p53 in der

DBD, welche vermutlich eine Funktion in der p53-Tetramerisierung und der Stabilisierung der DNA-p53 Assoziation hat (Ma *et al.*, 2005). LT kann daher durch direkte Bindung an p53 dessen transkriptionelle Aktivität inhibieren, indem es die dafür entscheidende Tetramerisierung verhindert.

3.4.2 Funktionelle Inaktivierung von p53 durch LT?

Die Inaktivierung von p53 durch Komplexierung mit viralen Onkoproteinen von DNA-Tumoviren ist grundlegender Konsens (Pipas 1992). Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass SV40 LT sein onkogenes Potential ausübt, indem es durch Bindung der DBD von p53 die p53-DNA-Bindung und damit die p53-abhängige Transkription von Zielgenen verhindert (Bargonetti *et al.*, 1992; Jiang *et al.*, 1993; Segawa *et al.*, 1993). Diese Inaktivierung hat unterschiedliche Auswirkungen auf die Immortalisierung und Transformation verschiedener Zelltypen aus unterschiedlichen Organismen. Eine LT-Expression ist ausreichend für die anhaltende Transformation von Nagetierzellen (Manfredi & Prives 1994), wohingegen LT in humanen Zellen nur zu einer Verlängerung der Lebensspanne führt (Lin & Simmons 1991). SV40 LT besitzt zudem die Fähigkeit, die p53-abhängige transkriptionelle Aktivierung unabhängig von einer p53-Bindung zu inhibieren (Quartin *et al.*, 1994; Rushton *et al.*, 1997). Entscheidend hierfür sind die ersten 121 AS, welche die J Domäne und das pRb-Bindemotiv enthalten. Ausserdem kann das bei der SV40-Infektion gleichzeitig exprimierte st indirekt zur Inaktivierung der p53-Funktionen beitragen (Quartin *et al.*, 1994; Gjoerup *et al.*, 2000).

Die Komplexierung von LT mit p53 führt zu einer verlängerten Halbwertszeit und zu einer nukleären Akkumulation des Tumorsuppressors (Oren *et al.*, 1981; Deppert *et al.*, 1987), die im Gegensatz zur Degradation von p53 durch andere virale Onkogene steht (siehe auch 2.3.4). Es gibt Hinweise darauf, dass st in einigen Zelltypen ebenfalls einen Einfluss auf die p53-Menge hat (Bikel *et al.*, 1987; Tiemann *et al.*, 1995), LT ist jedoch auch unabhängig von st in der Lage, p53 zu stabilisieren (Sladek *et al.*, 2000). Dabei ist die Bindung von p53 an LT für eine metabolische Stabilisierung nicht notwendig, da das in SV40-transformierten Zellen „frei“ vorliegende p53 ebenfalls eine verlängerte Halbwertszeit aufweist (Deppert & Haug 1986). Einige Studien zeigen, dass die metabolische Stabilisierung von p53 einen positiven Einfluss auf die SV40-Transformation hat und die Komplexierung über LT nicht nur zur funktionellen Inaktivierung von p53 führt (Tiemann *et al.*, 1995; Zerrahn *et al.*, 1996). Manche p53-Aktivitäten werden somit inhibiert, während andere biologische p53-Funktionen von LT verwendet, und für seine Zwecke eingesetzt werden können. Hinweis dafür ist z.B. die Korrelation zwischen Transformationseffizienz und metabolisch stabilem p53. Deppert *et al.* konnten in unterschiedlichen Studien zeigen, dass für die phänotypische (intermediäre) SV40 Transformation funktionelles LT und stabilisiertes p53 vorliegen müssen (Deppert & Steinmayer 1989; Deppert *et al.*, 1989; Tiemann & Deppert 1994b). In einem transgenen Mausmodell konnte eine erhöhte Proliferationskapazität von Tumorzellen gezeigt werden, die durch LT stabilisiertes p53 exprimierten (Herzig *et al.*, 1999). Sie konnten auch eine LT-Stabilisierung durch p53 feststellen, was eine aktive Rolle von p53 impliziert. Des Weiteren konnten Studien von Michalovitz *et al.* den direkten Zusammenhang zwischen viraler Transformationskapazität und Akkumulation großer Mengen von p53 darlegen (Michalovitz *et al.*, 1986). Kontrovers zu den Ergebnissen der Kristallstrukturanalyse des LT-p53 Komplexes konnte

eine DNA-Bindung von p53 im Komplex mit LT dargestellt werden, jedoch kommt es aufgrund fehlender Bildung des Transkriptionsinitiations-Komplexes an der TATA-Box zu keiner transkriptionellen Aktivierung von p53-Zielgenen (Technau *et al.*, 2001). Bislang konnte jedoch noch nicht aufgeklärt werden, inwieweit p53 die SV40-Transformation unterstützt. Die vor kurzem dargestellte Funktion von p53 in der Vermittlung der Bindung von p300/CBP an LT deutet auf einen Einfluss von p53 in der SV40-vermittelten Zelltransformation hin (Borger & DeCaprio 2006). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine LT-Mutante, der die pRb-Binderegion fehlt und somit transformationsinkompetent ist, die verlorene Transformations-Aktivität einer E1A-Mutante, die p300 nicht mehr komplexiert, wiederherstellen kann (Yaciuk *et al.*, 1991). Daher wird eine positive Rolle des ternären p53-p300/CBP-LT Komplexes auf die SV40-Transformationseffizienz vermutet. Es konnte außerdem eine LT-Acetylierung in Lysin697 durch gebundenes p300/CBP über p53 detektiert werden, dessen Rolle in der Transformation jedoch noch diskutiert wird (Poulin *et al.*, 2004). p53 liegt in dem LT-p53-p300/CBP Komplex ebenfalls acetyliert (Lysin373) und phosphoryliert (Serin15, 20, 37) vor (Borger & DeCaprio 2006), was vermuten lässt, dass der ternäre Komplex stabil ist (eine p53-Phosphorylierung an Serin15 verstärkt die Bindung von p300/CBP) (Lambert *et al.*, 1998).

II ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Der Tumorsuppressor p53 reguliert nach DNA-Schädigung wichtige Signalwege der zellulären Schadensantwort wie Zellzyklusarrest, Seneszenz und Apoptose. In etwa jedem zweiten humanen Tumor ist das *p53*-Gen mutiert, wobei hauptsächlich Punktmutationen auftreten, die zur Expression eines mutierten Volle-Länge p53-Proteins (mutp53) führen. mutp53 werden neben dem Verlust der Wildtyp-Eigenschaften (*loss of function*) auch neue, onkogene Funktionen zugeschrieben (*gain of function*), die zur Umwandlung normaler Zellen in Tumorzellen (Transformation) beitragen (Kim & Deppert 2004; Olive *et al.*, 2004).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von p53 in der zellulären Transformation durch das DNA-Virus Simian Virus 40 (SV40) näher zu charakterisieren und zusätzlich die schützende Rolle von p53 in der spontanen Immortalisierung, der Vorstufe zur Transformation, zu untersuchen.

Nach einer Langzeitkultur primärer Zellen wird eine erhöhte p53-Mutationsrate detektiert. Ob die Mutation im *p53*-Gen ein *in vitro* Artefakt oder eine Grundvoraussetzung für die Immortalisierung der Zellen ist, wird jedoch kontrovers diskutiert (Drexler *et al.*, 2000; Muntoni *et al.*, 2003). Dabei wird auch diskutiert, inwieweit oxidativer Stress, der durch die Kulturbedingungen entsteht, zu möglichen Mutationen in *p53* oder anderen Genen beiträgt (Parrinello *et al.*, 2003). In einem ersten Schritt sollte anhand der spontanen Immortalisierung von Mausembryofibroblasten gezeigt werden, dass Mutationen im *p53*-Gen nicht zwangsläufig zu einer phänotypischen Transformation führen. Dafür wurden primäre Balb/c Mausembryofibroblasten bis zum Eintreten der Immortalisierung kultiviert und die p53-Expression sowie mögliche *p53*-Mutationen analysiert. Um einen möglichen Einfluss äußerer Stressfaktoren, wie z.B. oxidativen Stress, bei der Kultivierung der Zellen zu berücksichtigen, erfolgte die Inkubation der Zellen neben den Standardbedingungen (21%) auch bei physiologischen Sauerstoffkonzentrationen (5%).

Im Prozess der SV40-induzierten Zelltransformation ist das große T-Antigen (LT) das entscheidende Protein, da es zelluläre Mechanismen der Wachstumskontrolle außer Kraft setzt. Die Transformations-Eigenschaft von LT korreliert mit seiner Fähigkeit zur Komplexbildung mit p53 (Lane & Crawford 1979) und Proteinen der pRB-Familie (DeCaprio *et al.*, 1988), sowie anderen wichtigen zellulären Proteinen, wie u.a. p300/CBP (Eckner *et al.*, 1996). Die Bindung von LT an p53 inhibiert die transkriptionelle Funktion des Tumorsuppressors und supprimiert dadurch die p53-abhängige negative Wachstumsregulation (Oren *et al.*, 1981). Im Gegensatz zu anderen DNA-Tumoviren (Ad5, HPV-16), deren virale Onkogene zur Ubiquitin-vermittelten Degradation von p53 führen, wird p53 durch LT, in einem für SV40 spezifischen Prozess im Nukleus, metabolisch stabilisiert (Linzer & Levine 1979).

Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass der p53-LT Komplex möglicherweise eine wichtige Funktion innerhalb der SV40 LT-induzierten Zelltransformation besitzt (Deppert *et al.*, 1989). Die Bindung von p53 durch LT wäre somit nicht mit einer p53-null Situation vergleichbar. Um die Rolle von p53 in der SV40-induzierten Transformation zu untersuchen, wurden die Transformationsanalysen in Zelllinien sowohl mit Wildtyp p53 (wtp53) wie auch p53-null Genotyp durchgeführt. Als zelluläres System wurden dafür die Balb/c Zelllinien 3T3 (wtp53) und 10-1 (p53-

null) verwendet (Aaronson & Todaro 1968; Harvey & Levine 1991). Beide Zelllinien sind immortal und zeigen einen „normalen“ bzw. minimal transformierten Phänotyp. Daher ist anzunehmen, dass sie sehr ähnlich auf onkogene Stimuli, wie z.B. eine Expression von LT, reagieren. Die konstitutive LT-Expression, die mit Hilfe eines retroviralen Systems erfolgte, sollte Aufschluss darüber geben, inwieweit wtp53 und somit der Komplex p53-LT einen Einfluss auf die zelluläre Transformation hat. Im Falle eines positiven Effekts von p53 auf die SV40 LT-Transformation sollte mit Hilfe einer N-terminalen p53-Deletionsmutante Anhaltspunkte dafür gefunden werden, welche p53-Funktionen für diesen „Helfer-Effekt“ verantwortlich sind. Der N-Terminus von p53 ist von besonderem Interesse, da an diesen Bereich Proteine, wie z.B. p300/CBP und Mdm2 binden, die auch in der SV40-induzierten Transformation von großer Bedeutung sind.

Insgesamt sollte im Rahmen dieser Arbeit geklärt, ob p53 einen wichtigen Bestandteil in der SV40-induzierten zellulären Transformation darstellt. Dies würde im Gegensatz zu der schützenden Rolle von p53 während der spontanen Immortalisierung stehen.

III MATERIAL

1 Eukaryotische Zellen

Bezeichnung	Eigenschaften
3T3	Aus Balb/c Mausembryofibroblasten gewonnene, spontan immortalisierte Zelllinie mit intaktem Wildtyp p53 (Aaronson & Todaro 1968) ATCC: #CCL163. Kultivierung in <i>DMEM</i> mit 10% FCS.
10-1	Aus Balb/c Mausembryofibroblasten gewonnene Zelllinie, in der das p53-Gen auf beiden Allelen deletiert ist und auf Proteinebene somit p53-null ist (Harvey & Levine 1991). Kultivierung in <i>DMEM</i> mit 10% FCS.
10-1cG9	Aus stabiler Transfektion von 10-1 Zellen mit der temperatur-sensitiven p53 Mutante (tsp53, Codon 135; Ala (GCG) → Val (GTG)) erhaltene Zelllinie (Ziegler, 1998). Kultivierung in <i>DMEM</i> mit 10% FCS.
10-1ΔNtsp53	Aus stabiler Transfektion von 10-1 Zellen mit der N-terminal deletierten, temperatur-sensitiven p53 Mutante (ΔNtsp53, Codon 135; Ala (GCG) → Val (GTG)) erhaltene Zelllinie (diese Arbeit). Kultivierung in <i>DMEM</i> mit 10% FCS.
FTE3	Aus Balb/c Mausembryofibroblasten gewonnene, spontan immortalisierte Zelllinie mit intaktem Wildtyp p53 (Tiemann & Deppert 1994a). Kultivierung in <i>DMEM</i> mit 10% FCS.
primäre MEF	Primäre Balb/c Mausembryofibroblasten (diese Arbeit, Methoden 2.3). Kultivierung in <i>DMEM</i> mit 10% FCS.
3T3 LT S/W, 3T3 IG	Aus stabiler Transduktion von 3T3 Zellen mit entweder dem retroviralen Konstrukt pMYcLT oder pMYsIG erhaltene Zelllinien (diese Arbeit). Kultivierung in <i>DMEM</i> mit 10% FCS.
10-1 LT S/W, 10-1 IG	Aus stabiler Transduktion von 10-1 Zellen mit entweder dem retroviralen Konstrukt pMYcLT oder pMYsIG erhaltene Zelllinien (diese Arbeit). Kultivierung in <i>DMEM</i> mit 10% FCS.
ΔNp53 LT S/W, ΔNp53 IG	Aus stabiler Transduktion von 10-1ΔNtsp53 Zellen mit entweder dem retroviralen Konstrukt pMYcLT oder pMYsIG erhaltene Zelllinien (diese Arbeit). Kultivierung in <i>DMEM</i> mit 10% FCS.
SV3T3	SV40 transformierte Balb/c 3T3 Zellen (Deppert <i>et al.</i> , 1987). Kultivierung in <i>DMEM</i> mit 5% FCS.
SV3T3 3E3	Aus stabiler Transfektion von SV3T3 Zellen mit der p53-Mutante R270H erhaltene Zelllinie (Krepulat <i>et al.</i> , 2005). Kultivierung in <i>DMEM</i> mit 5% FCS.
E1SV2	SV40 transformierte Balb/c Mausembryofibroblasten (wtp53) (Ziegler, 1998). Kultivierung in <i>DMEM</i> mit 10% FCS.
3T3mutp53 C2 und C6	Aus stabiler Transfektion von Balb/c 3T3 Zellen mit der p53-Mutante R270H erhaltene Zelllinien (Krepulat <i>et al.</i> , 2005). Kultivierung in <i>DMEM</i> mit 10% FCS.
EcoPack™ 2-293	Ecotrope Adenovirus-5 DNA transformierte Verpackungszelllinie, die sich von der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK-293 ableiten lässt. Die Zellen exprimieren die <i>Moloney murine leukemia virus</i> (MMLV) Proteine gag, pol und env; semi-adhären wachsend; für die transiente Produktion von ecotropem Retrovirus. Kultivierung in <i>DMEM</i> mit 10% FCS (Clontech, # 631507).
COS-1	CV-1 Affennierenzelllinie, die mit einer Mutante von SV40-transformiert wurde, deren SV40-Replikationsursprung (<i>origin</i>) eine 6 bp Deletion besitzt (Gluzman 1981) (ATCC #CRL1650) Kultivierung in <i>DMEM</i> mit 10% FCS.

2 Prokaryotische Zellen

Bezeichnung	Genotyp
<i>E.coli</i> DH5α	F' Phi80dlacZ DeltaM15 Delta(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+)phoA supE44 lambda- thi-1 (Woodcock <i>et al.</i> , 1989).

3 Viren

SV40 Stamm 776; erstes kloniertes SV40-Virus, mit kleiner Plaque-Bildung („Small Plaque Strain“). GenBank-Accession-Nummer JO2400, ATTC: #45019 (Fiers *et al.*, 1978).

4 Mäuse

Tiere der Stämme Balb/c (ursprünglich von The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) aus institutseigener Züchtung.

5 Oligonukleotide

Primer	Bp	Or	Tm	Org	Beschreibung	Einsatz in	Sequenz 5´-3´
p53E1b	22	⇒	70	Maus	murines <i>p53</i> Exon I; Pos.: 436-457	Sequenzierung MEF	cat cct ggc tgt agg tag cga c
1270	21	⇐	72	Maus	murines <i>p53</i> 3´ Bereich; Pos.: 1270-1250	Sequenzierung MEF	ggc agc aga agg gac cgg gag
A2	18	⇒	56	Maus	murines <i>p53</i> Exon V; Pos.: 416-433	Sequenzierung MEF (v. A. Otto)	tgt gca gtt gtg ggt cag
A4	19	⇒	60	Maus	murines <i>p53</i> Exon VIII; Pos.: 788-806	Sequenzierung MEF (v. A. Otto)	gac ggg aca gct ttg agg t
mp531-Seq	20	⇐	66	Maus	murines <i>p53</i> Exon IV; Pos.: 334-315	Sequenzierung MEF und pEF1adNtsp53 (v. G.Boehden)	gca gga agc cca ggg gga ag
mp53-VIII	23	⇐	72	Maus	murines <i>p53</i> Exon VIII; Pos.: 889-867	Sequenzierung MEF	gca gtt cag ggc aaa gga ctt cc
NEOI	22	⇒	70	Maus	<i>Neo</i> -Kassette	Identifizierung p53+/+, +/-, -/-	cgc ttg ggt gga gag gct att c
NEOII	21	⇐	70	Maus	<i>Neo</i> -Kassette	Identifizierung p53+/+, +/-, -/-	cag ccg ccg cat tgc atc agc
p53-I1F	21	⇒	68	Maus	murines <i>p53</i> Intron 1; Pos.: -943--923, (vom ATG Exon II zurückgezählt)	Identifizierung p53+/+, +/-, -/-	ctg gct gtg act gtc tcc gag
p53-I2R	21	⇐	68	Maus	murines <i>p53</i> Intron 2; Pos.: 118-138, (vom ATG Exon II in das Intron 2 weitergezählt)	Identifizierung p53+/+, +/-, -/-	gga gga tac agg tat ggc ggg
actin-N	21	⇒	70	Maus	Im Exon	Kontrolle in Standard-PCR	cga gca gga gat ggc cac tgc
actin-H	21	⇐	70	Maus	Im Intron	Kontrolle in Standard-PCR	gtg agc tct ctg ggt gct ggg
FKR 2	20	⇒	68	Maus	murines <i>p53</i> Exon XI; Pos.: 987-1006	Sequenzierung pEF1adNtsp53	c cgc ggg cgt aaa cgc ttc g
FKR 17	22	⇒	70	Maus	murines <i>p53</i> Exon VII; Pos.: 724-745; inkl. p53R245W <i>hotspot</i> Mut.	Sequenzierung pEF1adNtsp53	ggc atg aac TgG cga cct atc c
p53-I2	20	⇐	57	Maus	murines <i>p53</i> Intron 2;	Sequenzierung pEF1adNtsp53	gaa tct cac tta tcc cag gc
p53EVII	22	⇐	70	Maus	murines <i>p53</i> Exon VII; Pos.: 750-729	Sequenzierung pEF1adNtsp53	ggg aag gat agg tcg gcg gtt c
A1		+		Maus	murines <i>p53</i> Exon IV; Pos.: 204 –220	Sequenzierung pEF1adNtsp53 (von A. Otto)	agc aca gga ccc tgt ca

MATERIAL

T7	23	⇒	70	SV40	Pos.: 4409-4431 im SV40 Genom	Sequenzierung pMYcLT	cct tgg ggt ctt cta cct ttc tc
T3	24	⇐	74	SV40	Pos.: 3053 – 3076 im SV40 Genom	Sequenzierung pMYcLT	ggt aca gac ctg tgg ctg agt ttg
DC	22	⇐	66	SV40	Pos.: 4431 – 4410 im SV40 Genom	Sequenzierung pMYcLT	gag aaa ggt aga aga ccc caa g
T5	24	⇐	74	SV40	Pos. 4936–4959 im SV40 Genom	RealTime PCR	gct cat caa cct gac ttt gga ggc
T12	24	⇒	72	SV40	Pos. 4678-4701 im SV40 Genom	RealTime PCR	gtc aca cca cag aag taa ggt tcc
T20	23	⇒	70	SV40	Pos. 4402 – 4424 im SV40 Genom	RealTime PCR	gga aag tcc ttg ggg tct tct ac
gadh1	20	⇐	60	Maus	murines <i>gadh</i> NM_001001303.1	RealTime PCR	ggt gta aag tcg gtg tga ac
gadh2	18	⇒	60	Maus	murines <i>gadh</i> NM_001001303.1	RealTime PCR	ggg gtc tcg ctc ctg gaa

Bp: Anzahl der Basenpaare; **Or**: Orientierung des Primers: vorwärtsgerichtet (⇒) oder rückwärtsgerichtet (⇐); **Tm**: Schmelztemperatur des Primers (°C); **Org**: Organismus; **Pos.**: Nukleotidposition im murinen p53-Gen (Eliyahu *et al.*, 1985), bzw. im SV40 Genom, Mut.: Mutation.

6 Plasmide

6.1 Vektoren für Klonierungen

Folgende Vektoren wurden für Subklonierungen oder zur Transfektion als Vektorkontrolle verwendet:

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
pEF1alpha-neo	Expressionsvektor für Säugerzellen, EF1alpha-Promotor (human elongation factor 1), basiert auf pCI neo	Zur Verfügung gestellt von Ch. Bauer, CCS Cell Culture Service GmbH
pMYsIG	retroviraler Vektor mit interner Ribosomeneintrittsstelle und <i>GFP</i> als Reportergen; trägt als 3'-LTR den U3 von MPSV und U5 von MMLV	Zur Verfügung gestellt von C. Stocking (HPI); (Kitamura <i>et al.</i> , 2003)

MPSV: myeloproliferativen Sarkom-Virus; MMLV: Moloney-Maus-Leukämie-Virus

6.2 Helferplasmide für die Retrovirusproduktion

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
pSV40-gag/pol	trägt die MoMLV <i>gag</i> - und <i>pol</i> -Gene unter Kontrolle des SV40 Promotors	Zur Verfügung gestellt von C. Stocking (HPI)
pEcoenv1-puro	trägt das ökotrope <i>env</i> -Gen unter Kontrolle des EF1a Promotors	Zur Verfügung gestellt von C. Stocking (HPI); (Morita <i>et al.</i> , 2000)

6.3 Rekombinante Plasmide

Folgende rekombinante Plasmide wurden im Rahmen der Arbeit verwendet bzw. hergestellt:

Bezeichnung	Vektor	Fremdgen-Expression	Referenz
pBABE-zeo largeTcDNA	pBABE-zeo	großes SV40 T-Antigen (cDNA)	addgene
pMYcLT	pMYsIG	großes SV40 T-Antigen (cDNA)	diese Arbeit

MATERIAL

pCI dNtsp53	pCIneo	N-terminal deletierte, temperatursensitive, murine p53-Mutante tsp53 ^{Val135}	Dissertation Thorsten Eismann, 2005 (HPI)
pEF1alpha dNtsp53	pEF1alpha- neo	N-terminal deletierte, temperatursensitive, murine p53-Mutante tsp53 ^{Val135} aus pCIdNtsp53	diese Arbeit
pSV	pAT153	SV40 Genom mit Deletion von 270 bp in Pos.: 4635-4905	Zur Verfügung gestellt von A. v. d. Weth (HPI); (Fanning <i>et al.</i> , 1982)
pCIneomutp53 (R270H)	pCIneo	Murines p53-Minigen mit Punktmutation an Position 270 (AS-Austausch von Arginin zu Histidin) mit HA-Tag am 3' Ende.	Diplomarbeit A. Hermannstädter, 2003

7 Antikörper

7.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Spezifikation	Anwendung Verdünnung
Acetyl-p53	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen acetyliertes murines p53 an Lysin 379 (Epitop 374–386). (Trevigen, # 2370-PC-050)	WB 1:500
Anti-Aktin	Polyklonaler Ziege-Antikörper gegen den C-Terminus von humanem Aktin (I-19) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., #sc-161)	WB 1:2000
Anti-Ac-Lys	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper, erkennt acetylierte Lysinreste (Cell Signaling, #9441)	WB 1:500
Anti-GFP	Mischung aus zwei monoklonalen Maus-Antikörpern (Klone 7.1 und 13.1) gegen GFP (Roche Applied Science, #11 814 460 001)	WB 1:1000
Anti-HA	Monoklonaler Ratte-Antikörper gegen den HA(Hämagglutinin)-Tag (3F10) (Roche, #1867423)	WB 1:500
Anti-Mdm2	Meerschweinchen-Serum (Arbeitsgruppe Prof. Deppert, HPI, Hamburg)	WB 1:2000
Anti-p16	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen murines p16 (AS 1-167) (M-156) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., #sc-1207)	WB 1:1000
Anti-p21	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen murines p21 (F-5) (AS 1-159) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., #sc-6246)	WB 1:500
Anti-p53	Polyklonaler Ziege-Antikörper gegen Volllänge p53 (FL-393) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. #sc-6243-G)	WB 1:500 IF 1:50
Anti-Tubulin	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen α -Tubulin (Ab-1) (Oncogene, #CP06)	WB 1:5000
PAb240	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen p53 (Epitop 213-217) (Gannon <i>et al.</i> , 1990). Erkennt unter nativen Bedingungen konformations-spezifisches Mutanten p53, konzentrierter Überstand von Hybridomzelllinien (Arbeitsgruppe Prof. Deppert, HPI, Hamburg)	IP 500 μ l
PAb 242	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen p53 (Epitop 18-27) (Yewdell <i>et al.</i> , 1986), konzentrierter Überstand von Hybridomzelllinien (Arbeitsgruppe Prof. Deppert, HPI, Hamburg)	IF 1:10
PAb 248	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen den N-Terminus von p53 (Epitop 43-52) (Yewdell <i>et al.</i> , 1986), konzentrierter Überstand von Hybridomzelllinien (Arbeitsgruppe Prof. Deppert, HPI, Hamburg)	WB 1:200
PAb246	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen p53 (Epitop 88-93), erkennt nur Wildtyp-Konformation (Yewdell <i>et al.</i> , 1986), Überstand von Hybridomzelllinien (Arbeitsgruppe Prof. Deppert, HPI, Hamburg)	IP 500 μ l
PAb416	Monoklonaler Maus-Antikörper, erkennt SV40 T-Ag-Epitop zwischen AS 83-128 (Harlow <i>et al.</i> , 1981), konzentrierter Überstand von Hybridomzelllinien (Arbeitsgruppe Prof. Deppert, HPI, Hamburg)	IP 50 μ l IF 1:20
PAb108	Monoklonaler Maus-Antikörper, erkennt SV40 großes T-Ag, kleines t-Ag und SV40 17kT. Epitop in den ersten 82 AS (Gurney <i>et al.</i> , 1980), konzentrierter Überstand von Hybridomzelllinien (Arbeitsgruppe Prof. Deppert, HPI, Hamburg)	WB 1:1000
Phospho-p53	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen phosphoryliertes humanes p53. Spezifisch für Serin 15-Phosphorylierung (Ser15) (Murin: Ser18) (Cell Signaling, #9284)	WB 1:1000

MATERIAL

R15	Polyklonales Kaninchen-Serum, das SDS denaturiertes SV40 T-Antigen erkennt (Deppert & Pates 1979). (Arbeitsgruppe Prof. Deppert, HPI, Hamburg).	WB 1:5000
------------	---	-----------

7.2 Sekundärantikörper

Folgende Sekundärantikörper wurden für Western Blot-Analysen (siehe Methoden 5.6) verwendet:

Bezeichnung	Konjugat	Herkunft	Verdünnung
Schaf anti-Maus IgG (H+L)	HRP	Biomol, Hamburg	1:10000
Ziege anti-Ratte IgG (H+L)	HRP	Biomol, Hamburg	1:5000
Esel anti-Kaninchen IgG (H+L)	HRP	Biomol, Hamburg	1:10000
Esel Anti-Meerschweinchen IgG (H+L)	HRP	Biomol, Hamburg	1:10000
Schaf anti-Maus IgG (H+L)	HRP	Biomol, Hamburg	1:10000

Folgende Sekundärantikörper wurden für die indirekte Immunfluoreszenz (siehe Methoden 4.2) verwendet:

Bezeichnung	Konjugat	Herkunft	Verdünnung
Esel anti-Kaninchen IgG (H+L)	Alexa555	Molecular Probes, Invitrogen, UK	1:500
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	Alexa488	Molecular Probes, Invitrogen, UK	1:500
Esel anti-Maus IgG (H+L)	Alexa555	Molecular Probes, Invitrogen, UK	1:500
Esel anti-Maus IgG (H+L)	Alexa488	Molecular Probes, Invitrogen, UK	1:500
Ziege anti-Maus IgG (H+L)	Alexa568	Molecular Probes, Invitrogen, UK	1:500
Esel anti-Ziege IgG (H+L)	Alexa488	Molecular Probes, Invitrogen, UK	1:500
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	Alexa488	Molecular Probes, Invitrogen, UK	1:500
Esel anti-Ziege IgG (H+L)	Alexa568	Molecular Probes, Invitrogen, UK	1:500

Für die Markierung des Zytoskeletts wurde TRITC-gekoppeltes Phalloidin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verwendet (Verdünnung: 1:500, siehe Methoden 4.3). Die DNA wurde mit DAPI (4,6 Diamidino-2-phenylidol, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) (Verdünnung: 1:2000, siehe Methoden 4.2) und Propidiumiodid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) (siehe Methoden 2.12.2) angefärbt.

8 Größen- und Molekulargewichtsstandards

Protein-Molekulargewichtsmarker	Prestained SDS-7B, Sigma, Taufkirchen Precision Plus Prestained Dual Color #161-0374, Bio-Rad, USA
1 kb DNA-Längenstandard	Gene Ruler™, MBI Fermentas, St. Leon-Rot

9 Enzyme

Aprotinin (Traysol®)	Bayer, Leverkusen
Antarktische Phosphatase (AP)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
BSA (Fraktion V)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Klenow Fragment	MBI Fermentas, Heidelberg
Leupeptin	Biomol, Hamburg
Pefabloc® SC	Biomol, Hamburg
Pepstatin A	Biomol, Hamburg
Phusion™ High-Fidelity Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
RNaseA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Taq DNA-Polymerase	Eppendorf, Hamburg
T4-Ligase (mit T4-Ligationspuffer)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Trypsin (1:250)	Biochrom, Berlin

10 Kits

ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing	Applied Biosystems, Darmstadt
JETSORB Gel Extraction Kit	Genomed, Löhne
Lipofectamine™2000 Reagent	Gibco/BRL, Invitrogen, Paisley, UK
NucleoBond® PC 500	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Tissue	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel, Düren
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
RNeasy® MiniElute	QIAGEN, Hilden
RNase-Free DNase Set	QIAGEN, Hilden
QIAshredder	QIAGEN, Hilden
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate	Pierce, Perbio Science, Bonn
ThermoScript™ RT-PCR System	Invitrogen, Paisley, UK
Turbo DNA-free™	Ambion, Huntington

11 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

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

30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	National Diagnostics, USA
Aceton	Merck, Darmstadt
Agar (A9915)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agarose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

MATERIAL

Ampicillin	USB, Cleveland, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Amphotericin B (Fungizone®)	Gibco/BRL, Invitrogen, Paisley, UK
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bakterienschalen	Nunc, Wiesbaden
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroquin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
4-Cumarsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kryogefäße	Nunc, Wiesbaden
DAPI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Deckgläschen Ø12, 18x18	Marienfeld, Lauda-Königshofen
DMSO	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DTT	Serva, Heidelberg
<i>DMEM</i> Pulver	Gibco/BRL, Invitrogen, Paisley, UK
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Esel-Normalserum	Dianova, Hamburg (#0170-000-121)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Filterpapier Whatman 3 MM	Schleicher und Schüll, Dassel
FCS	PAA, Pasching, Österreich
Formaldehyd, mind. 37%	Merck, Darmstadt
Geneticin-Sulphat (G418®)	Gibco/BRL, Invitrogen, Paisley, UK
Gewebekulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
Gewebekulturschalen	Nunc, Wiesbaden
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin	Serva, Heidelberg
Handschuhe Safeskin (Nitril und Latex)	Kimberly Clark, Zaventum, Belgien
HEPES	Serva, Heidelberg
Immobilion™ -P Membran	Millipore, Eschborn
L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
Low Cell Binding Plates (LCB)	Nunc, Wiesbaden
Luminol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magermilchpulver	Neuform, Lüneburg
Markierungsmedium	MP Biochemicals, Heidelberg (#51006)
Membranfilter (0,2 µm)	Renner GmbH, Dannstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Nonidet® P40 (NP-40)	Fluka, Neu-Ulm
Objektträger 76x26 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Oligonukleotide	Sigma ARK, Darmstadt
OPTI-MEM® I Reduced Serum Medium	Gibco/BRL, Invitrogen, Paisley, UK
Parafilm "M"	American National Can, Greenwich
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Biomol, Hamburg
PPO (2,5-Diphenyloxazol)	Roth, Basel
PP- Zentrifugenröhrchen (15 ml und 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
2-Propanol	Merck, Darmstadt

MATERIAL

Polyvinylalkohol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protein Assay Farbstoff Konzentrat	Biorad, München
Protein G Sepharose	Amersham Pharmacia, Freiburg
Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biozym, Hess, Oldendorf
Reaktionsgefäße (0,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm CEA	PMA, Bode, Hamburg
SDS	Serva, Heidelberg
SV40 Viral DNA (Form I)	Invitrogen, Paisley, UK (#15251-010)
TEMED	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trans ³⁵ S-Label TM (1200 Ci/mmol, 10,5 mCi/ml)	MP Biomedicals, Heidelberg
Trichostatin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trizma [®] Base (Tris Base)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trizol Reagent	Invitrogen, Paisley, UK
Tween [®] 20	Fluka, Neu-Ulm
Wasserstoffperoxid	Fluka, Neu-Ulm
Xylencyanol FF	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ziege-Normalserum (#005-000-121)	Dianova, Hamburg

12 Allgemeine Puffer und Lösungen

DEPC-H₂O

0,1 % (v/v) DEPC in ddH₂O; über Nacht RT, autoklavieren

Ethidiumbromid Stammlösung

10 mg Ethidiumbromid in 1 ml Wasser

PBS

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

TAE (50x)

2 M Tris
0,5 M Essigsäure (100%)
0,05 M EDTA

TE-Puffer

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

TBE (10x)

0,89 M Tris
0,89 M Borsäure
0,02 M EDTA pH 8,0

13 Geräte

Analysenwaagen	PE 360, PM 460, P 1210, H 54 AR, Mettler-Toledo, Gießen
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer	BD FACSAria TM Flow Cytometer mit Sortierfunktion mit der FACS Diva Software Version 4.1.1, Becton Dickinson, Heidelberg COULTER [®] EPICS [®] XL-MCL TM mit der Betriebssoftware System II, Beckman Coulter, Krefeld
Entwicklermaschine	Classic E.O.S., AGFA, Köln

MATERIAL

Fluoreszenzmikroskop	DMRA, Leica, Bensheim DMI 6000B, Leica, Bensheim
Gelelektrophorese-System	Horizon 11.14, Gibco/BRL, Invitrogen, Paisley, UK
Geldokumentations-System	BioDoc Analyze, Biometra, Göttingen
Heizblock	Dri-Block DB 2, TechneInc., USA
Horizontalschüttler	Heidolph, Schwabach
Inkubator	HeraCell 150, Heraeus, Hanau
Inkubationsschüttler	Multitron, Infors HAT, Basel, Schweiz
Phasenkontrastmikroskop	Olympus IMT-2 (ULWCD 0,30), Olympus, Hamburg Axiovert 25, Zeiss, Jena
Magnetrührer	MR3001, Heidolph, Schwabach
Minigel-Elektrophorese-Apparatur	Hofer Mighty Small II, Hofer, USA
Nanodrop	ND1000, Nanodrop, Wilmington, USA
pH-Meter	SevenEasy, Mettler-Toledo
Photometer	DU 800, Beckmann Coulter, Krefeld
Pipetten (20 µl, 200 µl und 1000 µl)	Gilson, Middleton, USA
Pipette (2,5 µl)	Eppendorf Research, Eppendorf, Hamburg
RealTime-PCR	7500 Fast System, Applied Biosystems, Darmstadt
Rollenschüttler	RollerMixer SRT1, Stuart Scientific, Watford, UK
Spannungsquelle	EPS 2A 200, Hofer, San Francisco, USA PowerPAC 300, BioRad, München
Tankblotapparatur	Mini Trans-Blot Cell, BioRad, München
Thermocycler	PTC-200, MJ Research, Massachusetts, USA
Thermomixer	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg
Wasserbad	GFL, Haake, Karlsruhe
Vortex	Reax2000, Heidolph, Schwabach
Zentrifugen	GS-6R, Beckmann Coulter, Krefeld Biofuge pico, Heraeus, Hanau Centrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg Rotana 96R, Hettich, Tuttlingen Sorvall RC 5C Plus, Kendro, Hanau Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg

IV METHODEN

1 Arbeiten mit prokaryotischen Zellen

Die Arbeiten mit Prokaryoten wurden in *LB*(Luria-Bertani)-*Medium* durchgeführt. Dieses wurde 20 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert. Vor Gebrauch des *LB-Mediums* wurden entsprechend Selektionsantibiotika (100 µg/ml Ampicillin) zugegeben. Für die Herstellung der Agarplatten wurden entsprechende Mengen an Agar dem frisch hergestellten *LB-Medium* zugesetzt und dieses autoklaviert. Nach Abkühlen des *LB-Agars* wurde Antibiotika zugegeben und in Bakterienplatten (Ø 10 cm) gegossen und bei RT zum Gelieren stehen gelassen. Die fertigen LB-Agarplatten wurden bei 4°C gelagert.

LB-Medium

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

LB-Agar

1,5 % Bacto-Agar in LB-Medium

1.1 Bakterienkulturen auf Agarplatten

Zur Isolierung einzelner Kolonien wurden Bakterienzellen entweder von einer anderen Agarplatte, aus einem Bakterien-Gefrierstock (siehe 1.3) oder einem Transformationsansatz (siehe 1.5) mittels einer sterilen Pipettenspitze bzw. einem abgeflammt Drigalski-Spatel auf einer Agarplatte mit geeigneter Kombination von Antibiotika ausgestrichen. Die Agarplatten wurden ÜN bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Arbeiten mit Bakterien wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zum Ausplattieren von Bakterien wurde ein Drigalski-Spatel durch eintauchen in 70% EtOH und Abflammen über einer Bunsenbrennerflamme sterilisiert.

1.2 Flüssigkulturen von *E. coli*

Flüssigkulturen dienen dazu, Bakterien in Größeren Mengen für die Isolierung von Plasmiden zu erhalten. In der Regel wurde die Bakterienkultur aus einer Einzelkolonie herangezogen, wobei sich das Volumen an *LB-Medium*, in dem angeimpft wurde, nach dem Verwendungszweck der Kultur richtete: für Minipräparationen (siehe 1.6.2) und Glycerol-Kulturen (siehe 1.3) wurde von einer 2,5 ml Kultur, für Maxipräparationen (siehe 1.6.1) von einer 400 ml Kultur ausgegangen. Die Kultivierung erfolgte ÜN bei 37°C in einem Schüttler bei 180 rpm.

1.3 Anlegen von Bakterien-Gefrierstocks

Mit dieser Methode ist es möglich, Bakterien-Klone auf Dauer zu lagern, um den Transformationsschritt bei der Plasmid-DNA-Präparation zu umgehen. 750 µl einer Flüssigkultur (siehe 1.2) wurden in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 250 µl 60% sterilem Glycerol versetzt, sorgfältig vermischt und bei -80°C gelagert.

1.4 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

2 ml *LB-Medium* wurden mit einer Einzelkolonie des *E.coli*-Stamms DH5 α angeimpft und ÜN bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 60 ml *LB-Medium* mit 500 μ l der ÜN-Kultur inokuliert. Die Kultur wurde bei 37°C und 180 rpm bis zu einer Zelldichte von OD_{595nm} = 0,5-0,7 kultiviert. Danach wurde die Bakterienkultur für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 4°C und 2000 rpm zentrifugiert. Die Bakteriensedimente wurden anschließend in 15 ml eiskaltem *CaCl₂-Puffer* resuspendiert, für weitere 15 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (s.o.). Die Bakteriensedimente wurden in 6 ml *CaCl₂-Puffer* resuspendiert und durch Zugabe von 15% Glycerol in 200 μ l Aliquots bei -80°C gelagert.

CaCl₂-Puffer

100 mM CaCl₂; sterilfiltriert

1.5 Transformation kompetenter Bakterienzellen mit Plasmid-DNA

50-100 μ l einer kompetenten DH5 α *E.coli*-Zellsuspension wurden auf Eis aufgetaut und mit 10-40 μ l eines Ligationsansatzes (siehe 6.7) bzw. mit ca. 100 ng Plasmid-DNA versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 1 min. Nach Zugabe von 500-900 μ l *LB-Medium* wurde der Transformationsansatz für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden für 2 s bei 14000 rpm sedimentiert und der Überstand bis auf 100-300 μ l abgenommen. In diesem Volumen wurden die Zellen resuspendiert und auf LB-Platte in unterschiedlichen Verdünnungen, mit entsprechendem Antibiotikum, ausplattiert und bei 37°C ÜN inkubiert.

1.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

1.6.1 Maxipräparation

Die Plasmid-Maxipräparation aus Bakterienzellen mittels NucleoBond®AX500 basiert auf einer alkalischen SDS-Lyse der Zellen und der anschließenden Aufreinigung der Plasmid-DNA über einen Anionenaustauscher.

Zur Isolierung großer Mengen an Plasmid-DNA (3-8 mg) in hoher Qualität wurde das Nucleobond AX500 Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

1.6.2 Minipräparation

Plasmidpräparationen im kleinen Maßstab (bis 5 ml) dienen dazu, Ligationen und Transformationen anschließend über Restriktionsspaltung zu analysieren. Hierfür wurden die Puffer und Lösungen des NucleoBond® AX 500 Kit verwendet.

Einzelne Kolonien wurden von einer Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in 2,5 ml *LB-Medium* und entsprechendem Antibiotikum ÜN bei 37°C und 180 rpm kultiviert. Anschließend wurde die Suspension auf Reaktionsgefäße (1,5 ml) verteilt. Ein Rest wurde bei 4°C gelagert, um damit gegebenenfalls *LB-Medium* für eine Maxipräparation animpfen zu können. Die Zellsuspension wurde 2 min bei 12000 rpm und RT zentrifugiert und das Zellsediment in 200 μ l S1

resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer S2 wurde das Lysat durch mehrmaliges Invertieren gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer S3 und mehrfaches Invertieren des Reaktionsgefäßes wurde das Lysat 5-10 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die sich im Überstand befindende Plasmid-DNA wurde mit 600 µl 2-Propanol bei RT in einem neuen Reaktionsgefäß gefällt und durch Zentrifugation für 30 min bei 10000 rpm und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet mit 500 µl 70% EtOH gewaschen und erneut 10 min bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde 10 min an der Luft getrocknet, die Plasmid-DNA in 50-100 µl sterilem Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2 Zellbiologische Methoden

2.1 Kultivierung von adhärennten Zellen

Die Kultivierung eukaryotischer Zellen erfolgte standardmäßig bei 37°C, atmosphärischen Sauerstoffkonzentrationen (21% O₂), 5% CO₂, und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%. Eine 5%ige Sauerstoffkonzentration (physiologische Bedingungen) wurde mit einem Sauerstoff-Sensor und einer Stickstoffquelle erreicht. Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank und mit sterilen Materialien durchgeführt.

Adhärennte Zelllinien aus Mausembryofibroblasten (MEF) wurden als Monolayer-Kulturen in beschichteten Gewebekulturschalen in *DMEM* unter Zusatz von entsprechenden Mengen an hitzeinaktiviertem FCS (im folgenden als Medium bezeichnet) und ohne Zusatz von Antibiotika in Kultur gehalten. Die Zellen wurden subkonfluent gehalten und je nach Dichte des Zellrasens alle zwei bis drei Tage passagiert und im entsprechenden Verhältnis von 1:3 bis 1:10 verdünnt. Für die Subkultivierung wurden die Zellen mit *Trypsin-Lösung* gewaschen, anschließend durch eine kurze Inkubation mit *Trypsin-Lösung* von der Kulturschale gelöst und in frischem Medium suspendiert.

Primäre MEF (siehe 2.3) wurden frisch aufgetaut (Passage 1) und in den Inkubatoren mit 5% O₂ und 21% O₂ kultiviert. Die Passagierung der primären MEF erfolgte nach einem veränderten 3T3-Schema (Todaro & Green 1963): alle 3-4 Tage wurden die MEF in einer Zelldichte von 1x10⁶ Zellen pro 10 cm Kulturschale ausgesät. Die Charakterisierung des Wachstumsverhaltens wurde nach Abschnitt 2.5 durchgeführt.

DMEM

133,8 g DMEM-Pulver
37 g NaHCO₃
in 10 l sterilem ddH₂O, pH 7,1 mit HCl,
sterilfiltrieren, bei 4°C lagern

Trypsin-Lösung

2% (v/v) Trypsin
5 mM EDTA
in PBS, pH 8,0
sterilfiltrieren, bei -20°C lagern

2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese von der Kulturschale trypsinisiert (siehe 2.1), in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 200 g bei RT zentrifugiert. Das Zellsediment einer 80-90% konfluenten Kulturschale (Ø 9 cm) wurde in 1,5 ml *Einfriermedium* (4°C) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und sofort auf Eis gestellt. Die Kryoröhrchen wurden entweder in eine Styroporbox überführt und durch Inkubation für 30 min bei -20°C und anschließend über Nacht bei -80°C langsam abgekühlt, oder zunächst für ca. 1 h in der oberen und ÜN in der unteren Gasphase des Stickstofftanks (ca. -150°C) belassen. Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff (-196°C).

In Kryoröhrchen eingefrorene Zellen wurden schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in 5 ml vorgewärmtes Medium gegeben (50 ml Reaktionsgefäß), 5 min bei 200 rpm und RT zentrifugiert, in frischem Medium (je nach Zellen) resuspendiert und in eine Kulturschale (meist Ø 9 cm) ausplattiert. Bei den hier vorliegenden adhären Zellen wurde am nächsten Tag ein Mediumwechsel durchgeführt.

Einfriermedium

50%	FCS
40%	DMEM
10%	DMSO
bei -20°C lagern	

2.3 Anlegen von Primärkulturen aus Mausembryofibroblasten

Primäre MEF wurden aus 13,5-15,5 Tage jungen Embryonen aus einer Balb/c p53+/- x p53+/- Zucht etabliert. Schwangere Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und dorsal mit 70% EtOH desinfiziert (durchgeführt von Dr. Chr. Heinlein, HPI) Nach Freilegen des Uterus wurden die Embryonen von der Placenta getrennt und in vorgewärmtem PBS gewaschen. Der Kopf und der Schwanz wurden für eine Genotypisierung abgetrennt. Leber, Milz, Niere, Herz, Lunge wurden entfernt und verworfen. Jeder Embryo wurde in 300 µl 0,1x *Trypsin-Lösung* in einer Vertiefung einer 24well Kulturschale zerkleinert und resuspendiert. Diese Zellsuspensionen wurden für 2 h bei 4°C inkubiert und anschließend, nach Zugabe von 400 µl 1x *Trypsin-Lösung*, weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml DMEM und 10% FCS (+ 1% Pen/Strep) wurden sie nochmals resuspendiert um eine homogene Zellsuspension zu erhalten und je ein Embryo auf eine 9 cm Kulturschale ausgesät.

Die primären MEF wurden bei Standardbedingungen kultiviert und nach Erreichen der Konfluenz im Verhältnis 1:3 passagiert. Nach Erreichen hoher Zelldichten wurden die MEF als Passage 0 bezeichnet und in Kryoröhrchen eingefroren. Frisch aufgetaute MEF, die für die Versuche verwendet wurden, befanden sich demnach in Passage 1. Jeder Embryo wurde direkt nach Präparation und, zur Verifizierung des Genotyps, vor dem Einfrieren genotypisiert (siehe 6.8.1).

2.4 Erstellen einer Wachstumskurve

Für die Ermittlung der Wachstumskurve wurde die angegebene Zellzahl in 6well Kulturschalen in entsprechendem Medium ausplattiert. An den nachfolgenden 7-9 Tagen (alle 24-48 h) wurden von jeweils zwei der Kulturschalen die Zellen trypsiniert und ihre Zahl anhand der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wurden vier große Quadrate ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte folgendermaßen: den Mittelwert aus den vier großen Quadraten mit 10^4 multiplizieren, das ergibt die Zellkonzentration pro Milliliter. Die Gesamtzellzahl ergibt sich aus dem Volumen der Zellsuspension mal der Zellzahl pro Milliliter. Anhand der gewonnenen Ergebnisse konnte eine Wachstumskurve erstellt und die Verdopplungszeit berechnet werden.

2.5 Beschreibung des Proliferationsverhaltens

Das Wachstumsverhalten von Zellen kann anhand der Bestimmung der Generationszahl (PDL, *population doubling level*) und der Generationszeit (PDT, *population doubling time*) charakterisiert werden. Die Generationszahl PDL beschreibt die Anzahl der Verdopplungen je Zeiteinheit. Die für die Verdopplung benötigte Zeit ist die Generationszeit PDT.

$$PDL = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2}$$

$$PDT = \frac{\log 2 \times dt}{\log N - \log N_0}$$

mit N = Endzellzahl, die beim Zeitpunkt der nächsten Subkultivierung vorliegt;
 N_0 = Anfangszellzahl, mit der eine neue Subkultur angelegt wird;
 dt = Kultivierungszeit einer Subkultur vom Anlegen bis zur nächsten Subkultivierung in h

Zur Bestimmung des Zellwachstums wurden primäre MEF mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen in 10 cm Kulturschalen (Anfangszellzahl N_0) ausplattiert. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen von zwei unabhängigen Kulturschalen mit der Neubauer-Zählkammer gezählt (Endzellzahl N) und mit 1×10^6 Zellen in 10 cm Kulturschalen subkultiviert. Die erhaltenen Zellzahlen wurden gegen die Wachstumsdauer im Diagramm aufgetragen und PDL und PDT bestimmt.

2.6 Transiente Transfektion von Zellen

Lipofectamine™2000 ist ein käufliches polykationisches Lipidreagenz, das die DNA in Liposomen einschließt und so über die Zellmembran befördert.

Die zu transfizierenden Zellen wurden am Vorabend so ausgesät, dass sie in subkonfluenter Dichte vorlagen (5×10^5 /10cm Kulturschale). 5 µg DNA und 12 µl Lipofectamine™2000-Reagenz wurden separat in jeweils 300 µl OPTI-MEM verdünnt. Die beiden Lösungen wurden vorsichtig gemischt und zur Ausbildung der Liposomen 30 min bei RT inkubiert. Dann wurden 3 ml OPTI-MEM (+10% FCS) zugesetzt und das Gesamtvolumen auf die Zellen gegeben, die zuvor mit OPTI-MEM (+10% FCS) gewaschen wurden. Die Inkubation erfolgte für 4-6 h unter normalen Kulturbedingungen. Danach wurden ein Mediumwechsel mit 10 ml DMEM (+10% FCS) vollzogen. Je nach Versuch

wurden die Zellen weiter kultiviert. Je nach verwendeter Kulturschale wurden die Reagenzien im gleichen Verhältnis verwendet.

2.7 Stabile Transfektion und Selektion von resistenten Klonen

Die stabile Transfektion wird verwendet um Plasmid-DNA dauerhaft in eukaryotische Zellen einzubringen. Nach erfolgreicher Transfektion werden die Zellen mit dem entsprechenden Antibiotikum unter Selektionsdruck gesetzt. Zellen, die Teile des Plasmids mit dem Resistenzgen in ihr Genom integriert haben, besitzen einen Überlebensvorteil.

5×10^5 10-1-Zellen wurden in Kulturschalen (\varnothing 10 cm) ausgesät und in *DMEM* mit 10% FCS kultiviert. 2 μ g DNA wurden mit dem DNA-Kondensationspuffer EC auf ein Volumen von 284 μ l aufgefüllt und mit 16 μ l Enhancer versetzt. Nach einer Inkubation bei RT über 5 min wurden 20 μ l des Effectene™ Transfection Reagent hinzugefügt und durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt. Dann wurde der Reaktionsansatz erneut für 5-10 min bei RT inkubiert, um eine Komplexbildung der DNA mit den kationischen nicht-liposomalen Lipiden zu ermöglichen. Während dieser Zeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und es wurden 4 ml *DMEM* (+FCS) auf die Zellen gegeben. Die Effectene-DNA-Komplexe wurden dann mit 1 ml Medium gemischt und tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation der Zellen mit dem DNA-Effectene-Komplex über einen Zeitraum von 24 h wurden die Zellen in Verhältnissen von 1:10 bis 1:20 ausplattiert. Einen weiteren Tag später wurde die Selektion der transfizierten Zellen begonnen, indem dem Medium 500 μ g/ml G418® zugesetzt wurden. Alle 3-4 d wurde das Selektionsmedium erneuert. Wenn auf den untransfizierten Kontrollschalen alle Zellen abgestorben waren (nach ca. 2 Wochen), wurden die selektionierten Kolonien mit Hilfe von Klonierungszylindern trypsiniert, in 24well Kulturschalen transferiert und als Zelllinien etabliert.

2.8 Substrat-unabhängiges Wachstum

2.8.1 Wachstum adhärenter Zellen in Suspension

Zur Untersuchung des Substrat-unabhängigen Wachstums wurden Kulturschalen verwendet, die eine Adhärenz durch eine spezielle Beschichtung verhindern. 1×10^3 Zellen wurden in *Low Cell Binding* Platten (LCB) von Nunc in *DMEM* (+10% FCS) ausplattiert und unter Standardbedingungen 14 Tage kultiviert. Nach 7 Tagen wurden 5 ml Medium zugegeben. Nach der Kultivierungsdauer wurden die Zellen unter dem Mikroskop (Leica DMI 6000B) analysiert. Der Durchmesser der „schwimmenden“ Foci wurde von mikroskopischen Aufnahmen anhand eines Mikrometers und über Photoshop bestimmt.

2.8.2 Softagar-Assay

Die Softagar Methode wird angewendet um transformierte Zellen zu identifizieren und evtl. klonale Zelllinien zu generieren. Transformierte Zellen besitzen die Eigenschaft Substrat-unabhängig (*anchorage-independent*) zu wachsen und zudem, durch Verlust der Kontaktinhibition

dreidimensionale Klone bilden zu können. Bei diesem Versuch werden die zu untersuchenden Zellen in einer Agarschicht über mehrere Wochen inkubiert und anschließend auf ihre Koloniebildung hin untersucht. Der Agar eines Ansatzes setzt sich aus einer Bodenschicht, zur Verhinderung einer Zellhaftung, bestehend aus 5 ml 0,5% (m/v) Agar und einer Deckschicht aus 0,34% (m/v) Agar in autoklavierten ddH₂O zusammen.

Für die Bodenschicht wurde 0,5% (m/v) Agar in H₂O aufgeköcht, im Wasserbad auf 50°C abgekühlt und auf die Bakterialschalen (Ø 10 cm) pipettiert. Die Platten wurden bei 4°C ÜN gelagert und ca. eine halbe Stunde vor Versuchsbeginn bei RT inkubiert. Für die Deckschicht wurde eine 2%ige Agarlösung aufgeköcht und anschließend ebenfalls im Wasserbad auf 50°C abgekühlt. Die zu untersuchenden Zellen wurden trypsiniert und die entsprechende Zellzahl in 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Für drei Ansätze wurde die Zellsuspension mit 2xDMEM (37°C) auf ein Volumen von 7,2 ml aufgefüllt. Die auf 50°C abgekühlte 2%ige Agarlösung wurde mit 2xDMEM zu einer 0,4%igen Lösung verdünnt und die Zellsuspension mit 36 ml dieser 0,4%igen Agar-2xDMEM-Lösung vermischt (entspricht einer 0,34%igen Lösung). In jede Kulturschale wurden 14,4 ml der Zell-Agar-Suspension vorsichtig, ohne Luftblasen zu erzeugen, pipettiert. Zur schnellen Aushärtung des Agars wurden die Schalen für 15 min bei 4°C inkubiert. Die Soft-Agar-Platten wurden 21-30 Tage unter Standardbedingungen inkubiert und die Kolonien mit *Kristallviolett-Lösung* angefärbt. Die Kolonien wurden mit Hilfe des Mikroskops Axiovert 25 (Zeiss) gezählt und mikroskopische Bilder der Kolonien wurden mit dem Mikroskop DMI 6000B (Leica) aufgenommen. Die quantitative Auswertung der Kolonien erfolgte durch Auszählung von jeweils fünf unabhängigen Feldern von drei bis fünf individuellen Softagar-Schalen am Mikroskop. Dabei wurde zwischen großen (Ø ≥ 150 µm), mittleren (Ø 50–150 µm) und kleinen (Ø ≤ 50 µm) Kolonien unterschieden. Ein Feld hat eine Fläche von 10,75 mm², die gesamte Kultivierungsfläche der 10 cm Petrischale beträgt 56,7 cm². Daraus ergeben sich 527 Felder pro 10 cm Schale. Die durchschnittliche Anzahl der Kolonien unterschiedlicher Größe der fünf Felder wurde auf die gesamte Petrischale übertragen.

2xDMEM

	DMEM
20% (v/v)	FCS
1% (v/v)	Pen/Strep
0,1% (v/v)	Fungizone®

Agar

2% und 0,5% (m/v) Agar (Sigma)
in sterilem ddH₂O

Kristallviolett-Lösung

0,005% Kristallviolett in ddH₂O

2.9 Focus-Formation-Assay

Die Zellen wurden trypsiniert und 1x10³ Zellen in eine 10 cm Kulturschale mit 10 ml Medium (DMEM +10% FCS) gegeben und bei Standardbedingungen 14 Tage inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgt alle 3-4 Tage. Am Versuchsende werden die Kulturschale mit PBS gewaschen, die Zellen mit einer *Kristallviolett-Lösung* für 15 min gefärbt und fixiert und anschließend mit sterilem Wasser gewaschen. Dunkelblau gefärbte, kreisförmige Zonen repräsentieren dabei Kolonien, die sich aus minimal-transformierten Zellen entwickelt haben.

Kristallviolett-Stammlösung

2%	Kristallviolett
1 Teil	Formaldehyd
2 Teile	EtOH 96%
1 Teil	ddH ₂ O

Gebrauchslösung

1 Teil	Stammlösung
1 Teil	Formaldehyd
8 Teile	ddH ₂ O

2.10 Bestrahlung von Zellen

Die Gamma-Bestrahlung der Zellen erfolgte in einer Anlage (LISA) mit einer offenen Caesium-137 Quelle am Heinrich-Pette Institut. Für die Berechnung der Bestrahlungsdauer wurde die spezifische Aktivität der Anlage berücksichtigt. Eine Strahlendosis von 20 Gy entsprach einer Expositionszeit von 16 min. Die Zellen wurden für die berechnete Zeit ohne Entfernung des Mediums in den entsprechenden Kulturschalen in das Gerät gestellt und dann bis zur Weiterverarbeitung der Zellen unter Standardbedingungen kultiviert.

2.11 Herstellung von Zellsedimenten

Zur Herstellung von Zellsedimenten adhärent wachsender Zellen wurde das Medium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS (4°C) gewaschen und dann auf Eis mit einem Gummischaber vom Plattenboden gelöst. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlte Reaktionsgefäße (1,5 ml) überführt und zentrifugiert (6 min, 600 g, 4°C). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellsedimente entweder direkt verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.12 Durchflusszytometrie (FACS Analyse)

Die Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) ermöglicht die Dokumentation von bestimmten Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben sowie das Zählen von Zellen. Anhand der durchflusszytometrischen Messung wurde zum einen das Zellzyklusprofil, d. h. die prozentualen Anteile der distinkten Zellzyklus-Phasen (siehe 2.12.2), und zum anderen eine Zellsortierung anhand GFP-Expression und anschließende GFP-Messung untersucht (siehe 2.12.3). Die Unterscheidung von G1, S und G2/M Phase-Zellen sowie apoptotischer Zellfragmente beruht dabei auf dem unterschiedlichen DNA-Gehalt der Zelle, der durch Färbung mit dem fluoreszierenden DNA-Interkalator Propidiumiodid (PI) detektiert werden kann. Die Fluoreszenz einer Zelle ist dabei proportional zu ihrem DNA-Gehalt; G2 und M Phase-Zellen können mit dieser Methode nicht voneinander unterschieden werden. Sub-G1 Zellen besitzen einen geringeren DNA-Gehalt als normale Zellen einer G1-Phase und sind ein qualitativer Indikator für apoptotische Zellen. Diese verlieren nach Fixierung der Zellen einen Teil der fragmentierten DNA und lagern weniger PI ein.

2.12.1 Fixierung der Zellen für die Durchflusszytometrie

Die Fixierung der Zellen für die durchflusszytometrische Zellzyklus-Analyse erfolgte mit 80% EtOH. Von adhärent wachsenden Zellen (Ø 10 cm) wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit PBS/EDTA (37°C) gewaschen. Die Zellen wurden durch kurze Inkubation mit *Trypsin-Lösung*

(37°C) vom Boden der Kulturschale gelöst und in 10 ml *PBS/EDTA* (4°C) in 15 ml Zentrifugenröhrchen aufgenommen. Diese wurden zentrifugiert (6 min, 310 g, 4°C) und der Überstand von den Zellpellets abgenommen. Für die Fixierung wurde das Zellpellet aufgelockert und unter stetigem Vortexen bei geringer Stufe tropfenweise 5 ml 80% EtOH (-20°C) zugefügt. Die Zellsuspension wurde mindestens 30 min auf Eis inkubiert um einen erfolgreichen Austausch des intrazellulären Wassers mit EtOH zu gewährleisten, bevor sie bei -20°C gelagert wurden.

PBS/EDTA

0,1% (w/v) EDTA in PBS
pH 7,5

2.12.2 Erstellung des Zellzyklusprofils

Für die DNA-Färbung der mit EtOH fixierten Zellen (siehe 2.12.1) wurden diese zunächst auf RT erwärmt (ca. 10 min) und anschließend abzentrifugiert (6 min, 310 g, 16°C). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in jeweils 5 ml *PBS/EDTA* (siehe 2.12.2) vorsichtig resuspendiert, für ca. 5 min bei RT stehen gelassen und nochmals zentrifugiert (6 min, 310 g, 16°C). Nach Absaugen des Überstands wurden die Zellpellets mit 200-800 µl (je nach Größe) *PI-Lösung* resuspendiert und für mindestens 30 min bei Dunkelheit und 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Proben wurden vor der Messung im Dunkeln auf RT abgekühlt. Die PI-Messung erfolgte an einem COULTER®EPICS®XL-MCL™-Gerät (Beckmann-Coulter). Dabei wurden jeweils 20000 Ereignisse ohne Zelltrümmer und Dubletten erfasst. Die Darstellung der FACS-Profilen erfolgte mit der Software Expo-32 (Beckmann-Coulter).

PI-Lösung

1:15 Propidiumiodid-Stammlösung
1:30 RNase A-Stammlösung in PBS
jeweils frisch angesetzt; Lagerung lichtgeschützt

Propidiumiodid-Stammlösung

0,5 mg/ml PI in 380 mM Natriumcitrat pH 7,0; Lagerung lichtgeschützt bei 4°C

RNase A-Stammlösung

10 mg/ml RNase A in 10 mM Natriumacetat pH 5,2 lösen, 15 min kochen, nach langsamer Abkühlung auf RT pH-Wert durch Zugabe von 1/10 Volumen 1 M Tris-HCl pH 7,4 einstellen. Lagerung in Aliquots bei -20°C.

2.12.3 GFP-Fluoreszenz-Messung

Die Zellen wurden 24 h vor der GFP-Messung in 6 cm Kulturschalen transferiert, so dass sie eine 70-80%ige Konfluenz erreichten. Die Zellen wurden mit *PBS/EDTA* (siehe 2.12.1) gewaschen und trypsiniert und in 1,5 ml PBS aufgenommen. Zur Vereinzelnung der Zellen wurde die Zellsuspension über einen Filter in FACS-Röhrchen gegeben. Es wurden je 25000 Zellen pro Durchlauf in dem COULTER®EPICS®XL-MCL™ Durchflusszytometer (Beckmann Coulter) analysiert. Die Daten wurden mit dem Excel-Programm ausgewertet.

2.12.4 Zellsortierung

Mit dem Durchflusszytometer ist es möglich Fluoreszenzfarbstoffe zu detektieren, die entweder

mittels Antikörper an die Zellen gekoppelt sind oder von Reporter genen gebildet werden.

Die Zellsortierung anhand der GFP-Fluoreszenz diente der Anreicherung von Zellen, die mit Retrovirus transduziert wurden. Dies führte über das Plasmid pMysIG oder pMYcLT zur Expression des Reportergens GFP. Der Sortiervorgang erfolgte in dem BD FACSAria™ Durchflusszytometer (Becton Dickinson) in der Abteilung für Großgeräte am Heinrich-Pette-Institut durch Arne Düsedau.

In einem ersten Schritt wurden die adhären t wachsenden Zellen 48 h nach Transduktion von der Kulturschale mit Trypsin abgelöst, in Medium aufgenommen und durch ein Sieb in ein steriles FACS-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation der Zellen (RT, 300 g, 5 min) wurde das Zellpellet mit 500 µl PBS (2% FCS, 1% Pen/Strep) resuspendiert und die GFP-exprimierenden Zellen in vorgelegtes Medium (10% FCS, 1% Pen/Strep) sortiert. Hierbei wurden zwischen stark und schwach GFP-exprimierenden Zellen unterschieden, die im weiteren Verlauf als S bzw. W bezeichnet wurden. Die sortierten Zellen wurden anschließend entsprechend ihrer Zellzahl in geeignete Kulturgefäße ausplattiert und unter Standardbedingungen kultiviert. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde dem Medium für die ersten Passagen nach dem Sortieren 1% Pen/Strep zugesetzt.

3 Virologische Methoden

3.1 Herstellung von SV40-Virus-Stocks

Für die Herstellung von SV40-Virus-Stocks wurden COS-1 Zellen verwendet, die permissiv für die SV40-Replikation sind.

COS-1 Zellen, die eine Konfluenz von 10-20% zeigten, wurden mit einer *Efficiency of Infection* (EOI, siehe 3.2) von 0,001 bis 0,1 mit SV40 infiziert (siehe 3.3). Damit konnte gewährleistet werden, dass statistisch jede Zelle maximal ein Virion enthielt und nur replikationskompetente Viren sich vermehren konnten. Zu dem Zeitpunkt an dem die Zellen zu mehr als 80% lysiert waren wurden diese mit dem gesamten Medium in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Alle Zellen wurden durch zweimaliges Frieren (-70°C) und Tauen (RT) der Zellsuspension aufgebrochen. Anschließend wurde die Zellsuspension ca. 10 min in einem Ultraschallbad sonifiziert und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (3000 rpm, 10 min, RT) abgetrennt. Der Überstand, der die Virionen enthält, wurde sterilfiltriert (0,2 µm-Filter), aliquotiert und die EOI bestimmt. Virus-Stocks wurden zur längeren Haltbarkeit bei -80°C eingefroren; wiederholtes Frieren und Tauen wurde jedoch vermieden. Nach dem Auftauen wurden sie für ca. 15 sec im Ultraschallbad sonifiziert und konnten anschließend für einige Wochen bei 4°C gelagert werden.

Für jeden Virus-Stock wurde diese SV40-Replikation in COS-1 Zellen nur ein Mal durchgeführt, um eine Anreicherung von "defektiven interferierenden Partikeln" durch Rekombination auszuschließen.

3.2 Bestimmung der *Efficiency of Infection* eines Virus-Stocks

Die Bestimmung der EOI erfolgte durch Infektion von Zellen (hier: Balb/c 3T3) mit unterschiedlichen Verdünnungen des Virus-Stocks in *DMEM*. Die Zellen wurden ca. 24 h vor Infektion auf Deckgläschen ausplattiert und 48 h nach Infektion auf die LT-Expression anhand indirekter Immunfluoreszenz (siehe 4.2) untersucht.

Sind 90-99% Zellen LT-positiv in der Immunfluoreszenz spricht man von einer EOI von 1. Eine EOI von 10 ist vorhanden, wenn bei einer 1:10-Verdünnung des Virus-Stocks noch eine Expression von LT in 90-99% der Zellen gegeben ist. Für die Infektion der COS-1 Zellen wurde der Virus-Stock gegebenenfalls mit *DMEM* verdünnt. Die EOI ist zellspezifisch und muss für jede Ziel-Zelllinie einzeln bestimmt werden.

3.3 SV40-Infektion von adhärennten Zellen

Die Zellen wurden am Vortag der Infektion so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Ernte in subkonfluenter Dichte auf der Kulturschale vorlagen (hier: 4×10^5 Zellen/10 cm oder 1×10^5 Zellen/6well). Zur Überprüfung der SV40-Infektion anhand indirekter Immunfluoreszenz (siehe 4.2) wurden zusätzlich Deckgläschen in die Kulturschalen vor dem Ausplattieren der Zellen gegeben. Zur Infektion wurde das Kulturmedium abgesaugt und gegen 2-4 ml Virus-Suspension/10 cm Kulturschale (0,75 ml/6well) ersetzt. Dann wurden die Zellen für 3 h im Brutschrank inkubiert, wobei die Kulturschalen alle 20 min vorsichtig geschwenkt wurden. Anschließend wurde die Virussuspension abgesaugt und frisches Kulturmedium auf die Zellen gegeben. Je nach Versuch wurden zu den angegebenen Zeitpunkten die Deckgläschen entnommen und in Aceton (-20°C) fixiert (siehe 4.1) und die Zellen für die Zellyse pelletiert (siehe 2.11).

3.4 Retroviraler Gentransfer

Bei den Retroviren liegt die Erbinformation als RNA vor und wird nach erfolgreicher Infektion der Wirtszelle als Provirus in das Wirtsgenom integriert. Retroviren lassen sich aufgrund der spezifischen Bindung des *envelope*-Proteins an Rezeptoren auf der Wirtszelloberfläche klassifizieren. Dabei erkennen ecotrope Viren ausschließlich den Rezeptor mCAT-1 auf Maus- und Rattenzellen, wohingegen amphotrope Viren den Rezeptor RAM-1 und xenotrope Viren die Rezeptoren GALV und RAM-1 bei vielen Säugetierzellen erkennen. Rekombinante Retroviren wurden für den Gentransfer etabliert, da sie die Zielzellen sehr effizient und einmalig infizieren und dabei ihr rekombinantes Genom integrieren können ohne weiter zu replizieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich ecotrope Retroviren, die nur Nagerzellen infizieren können, eingesetzt. Der retrovirale Gentransfer beinhaltet folgende Komponenten: den retroviralen Vektor und die Verpackungszelllinie. Dabei stellt die Verpackungszelllinie die retroviralen Proteine gag, pol und env zur Verfügung, um die Vektor-RNA zu verpacken. Diese retroviralen Partikel sind jedoch replikationsinkompetent, da der Verpackungszelllinie das Verpackungssignal fehlt. Der retrovirale Vektor besteht aus dem Verpackungssignal ψ und den retroviralen 5' - und 3' - LTRs, welche die Insertionsstelle für das zu übertragende Gen flankieren. Arbeiten mit Retroviren und retroviral transduzierten Zellen fallen unter die Sicherheitsstufe 2 und wurden daher nur in S2-Laboren mit

entsprechenden baulichen Maßnahmen durchgeführt.

Die Expression und Herstellung ecotroper infektiöser retroviraler Partikel wurde unter Verwendung der Verpackungszelllinie EcoPack2™-293 und des retroviralen pMYsIG-Vektors (siehe Material 1 und 6.1) durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde die cDNA von SV40 LT in den Vektor kloniert. Anschließend erfolgten eine transiente Virusproduktion, die Transduktion der Zielzellen und die Selektion GFP-exprimierender Zellen mittels FACS-Sortierung.

3.4.1 Klonierung von SV40 LT cDNA in den retroviralen Vektor pMYsIG

Für den retroviralen Gentransfer in adhärente Zellen wurde die SV40 LT cDNA in die *multiple cloning site* des modifizierten pMYsIG-Vektors (6,14 kb, zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe von Carol Stocking, HPI) stromaufwärts des grünen fluoreszierenden *GFP*-Gens und der *internal ribosomal entry site (IRES)* einkloniert. Flankiert werden die Konstrukte von den *LTRs* (long terminal repeats), die wichtige regulatorische Kontrollsequenzen darstellen. Stromabwärts des 5' *LTR*, der Promotorfunktion besitzt, liegt die sogenannte Verpackungssignalsequenz ψ , die zur Verpackung der viralen RNA in die Viruskapside notwendig ist. Die cDNA von *LT* (2,1 kb) stammt aus dem Vektor pBABE-zeo largeTcDNA (siehe Material 6.3). Der Vektor pMYsIG wurde mit *BamHI* linearisiert, über ein präparatives Gel aufgereinigt (siehe 6.3) und anschließend mit dem Enzym AP behandelt, um die 5' Phosphatgruppen zu entfernen (siehe 6.6). Das LT-Insert wurde mittels Restriktionsverdau (*BamHI*) aus dem Vektor pBABE-zeo largeTcDNA heraus geschnitten. Die Ligation des linearisierten Vektors pMYsIG mit dem aus einem präparativen Agarosegel extrahierten LT-Fragment erfolgte mit Hilfe der T4-DNA Ligase (siehe 6.7). Nach Transformation in *E.coli* DH5 α wurden die Kolonien propagiert und die korrekte Orientierung des Inserts durch einen Verdau mit folgenden Restriktionsenzymen kontrolliert: *BsrGI*, *PstI*, *BamHI*. Zudem wurden die klonierten Fragmente mittels Sequenzierung überprüft. Die Vektorkarte von pMYcLT ist im Anhang dargestellt.

3.4.2 Überprüfung der Funktionalität von pMYcLT

Der Expressionsvektor pMYcLT wurde zur Überprüfung der Funktionalität anhand transienter Transfektion (siehe 2.6) überprüft. 5×10^4 3T3 und 10-1 Zellen wurden 24 h vor Transfektion auf Deckgläschen in 6well Kulturschalen ausplattiert. 24 h und 48 h nach transienter Transfektion wurde die GFP-Expression in lebenden Zellen anhand Fluoreszenzmikroskopie verfolgt und die LT-Expression nach Fixierung der Zellen auf den Deckgläschen durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung (siehe 4.2) nachgewiesen.

3.4.3 Herstellung infektiöser Viruspartikel

Die Herstellung infektiöser Viruspartikel erfolgte durch transiente Transfektion (siehe 2.6) von pMYsIG und pMYcLT in die Produzentenzelllinie EcoPack™2-293. Diese Expressionsvektoren tragen nicht die Sequenzen für die viralen Strukturproteine, Enzyme und Hüllproteine (*gag-*, *pol-*, *env*). Diese werden von der Zelllinie EcoPack™2-293 zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurden die *gag-*, *pol-*, *env*-Sequenzen, die für die Bildung von infektiösen Viruspartikeln notwendig sind, anhand

einer transienten Co-Transfektion mit folgenden Plasmiden in die Zellen gebracht: pSV40-gag/pol und pEcoenv1-puro (siehe Material 6.2).

Für die Transfektion wurden 5×10^5 EcoPack™2-293 Zellen pro Kulturschale (\varnothing 10 cm) ausgesät. 24 h später wurde die zu transfizierende Plasmid-DNA - 3,2 μ g retroviraler Vektor, 10 μ g pSV40-gag/pol und 3 μ g pEcoenv1-puro – und das Lipofectamin-Reagenz (36 μ l) jeweils in einem Volumen von 900 μ l OPTI-MEM aufgenommen und gut durchmischt. Anschließend wurde DNA- und Lipofectamin-Lösung vermischt und nach 30 min 3 ml OPTI-MEM zugefügt. Das Gemisch wurde auf die Zellen gegeben. Nach 4 h erfolgte ein Mediumwechsel mit *DMEM* (+10% FCS). Der virale Kulturüberstand wurde nach 24 h zum ersten Mal entnommen, 5 ml frisches Medium zugegeben und nach 48 h zum zweiten Mal von den Zellen abgenommen, zentrifugiert (500 g, 10 min) und durch einen 0,22 μ m Zellulose-Acetat-Filter filtriert um Zellreste zu entfernen. Diese virale Stocklösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

3.4.4 Transduktion von Zelllinien mit retroviralen Überständen

Bei der retroviralen Transduktion wurden die Zellen mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen/6well eingesetzt und für 6 h in 2 ml Medium inkubiert. Für die Infektion wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 1 ml retroviralen Überstand mit 2 ml Medium und Polybren (Endkonzentration: 8 μ g/ml) versetzt. Die 6well Kulturschale wurde für eine Stunde bei 700 g und 20°C zentrifugiert und die Zellen für 24 h mit diesem Medium bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurde das virushaltige Medium durch frisches Medium ersetzt und die Zellen bis zur Zellsortierung weiter kultiviert. Diese erfolgte nach 48 h und die GFP-exprimierenden Zellen wurden durch die Sortierung angereichert (siehe 2.12.4).

4 Immunzytochemie und Fluoreszenzmikroskopie

4.1 Fixierung der Zellen

Für die Fixierung von adhärent wachsenden Zellen für die indirekte Immunfluoreszenz wurden die Zellen auf Deckgläschen (\varnothing 12 mm, 18x18 mm) kultiviert. Hierfür wurden vor der Passagierung der Zellen die sterilen Deckgläschen in den Kulturschalen vorgelegt. Vor der Fixierung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen entweder zur Fixierung der Zellen in -20°C kaltes Aceton in entsprechende Ständer für mindestens 1 h überführt, oder mit Paraformaldehyd (4%) fixiert. Zur Fixierung der Zellen in PFA wurden die Zellen nach Waschung mit PBS für 10 min bei RT in einer *PFA-Lösung* inkubiert und anschließend für 10 min mit einer *TritonX-100-Lösung* permeabilisiert und dreimal mit PBS gewaschen. Die indirekte Immunfluoreszenzmarkierung erfolgte direkt im Anschluss (siehe 4.2).

PFA-Lösung

4% PFA in ddH₂O; 450 ml ddH₂O wurden auf 60°C erhitzt und unter Rühren wurden 20 g Paraformaldehyd-Pulver sowie ca. 5 Tropfen 2N NaOH zugegeben. Anschließend wurde die Lösung abgekühlt und durch Zugabe von 10x PBS auf 500 ml aufgefüllt. Die Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,2 erfolgte mit 37% HCl. Vor Lagerung der Lösung in Aliquoten bei -20°C wurde diese über ein Filterpapier gegeben.

TritonX-100-Lösung

1% Triton in PBS, pH 7,4

4.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Zur Untersuchung der Expression und Lokalisation von spezifischen Proteinen wurde die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt.

Die Blockierung, wie auch die nachfolgenden Färbeschritte, erfolgten bei RT in einer feuchten Kammer, die mit Whatman-Papier ausgelegt war. Die Deckgläschen wurden nacheinander auf Parafilm, der das Whatman-Papier bedeckte, gelegt und je mit 60 µl (Ø 12 mm) bzw. 100 µl (18 x 18 mm) Blockierungs- bzw. Färbelösung überschichtet, wobei die Antikörper und Blockierungs-Seren in PBS verdünnt wurden. Die Doppelmarkierungen wurden in einer Reaktion durchgeführt und die primären und sekundären Antikörper in einer Lösung auf die Zellen gegeben. Nach Fixierung der Zellen in -20°C kaltem Aceton für mindestens 1 h wurden die Zellen 10 min in PBS bei RT rehydriert. In einem ersten Schritt wurden unspezifische Bindungen durch Inkubation mit normalem Serum aus der gleichen Spezies wie die des sekundären Antikörpers für 10-30 min verhindert. Die Markierung der zu untersuchenden Antigene erfolgte für 30 min mit entsprechenden primären Antikörpern. Anschließend wurden die Proben 15 min in PBS gewaschen. Die gebundenen primären Antikörper wurden mit speziesspezifischen Antikörpern, die mit einem Fluorochrom konjugiert waren, detektiert. Dazu wurden die Zellen 25 min im Dunkeln mit den sekundären farbstoffgekoppelten Antikörpern inkubiert. Die sekundären Antikörper waren affinitätsgereinigt und gegen andere Spezies absorbiert, um Kreuzreaktionen bei einer Doppelmarkierung auszuschließen.

Nach Fixierung der Zellen in *PFA-Lösung* wurden unspezifische Bindungen mit Normalserum in *Inkubationspuffer* für 30 min blockiert. Die Antikörper wurden ebenfalls in *Inkubationspuffer* verdünnt und für 30 min auf die Zellen gegeben bevor diese dreimal für 5 min mit Waschlösung gewaschen wurden. Die Inkubation der sekundären Antikörper erfolgte für 30 min. Nach Waschung der Zellen (s.o.) wurden die Zellen mit 4% *PFA-Lösung* 10 min nachfixiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen.

Die Zellkerne wurden mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt. Hierfür wurden die Zellen mit einer *DAPI-Lösung* überschichtet und 10 min bei RT inkubiert. Im Anschluss an die Markierung wurden die Zellen kurz in PBS gewaschen und in *Mounting Medium* auf einem Objektträger fixiert. Dazu wurde ein Tropfen des *Mounting Mediums* auf einen mit 70% EtOH gereinigten Objektträger aufgetragen und das Deckgläschen nach Entfernen letzter PBS-Reste (Eintauchen in ein Wasserbad) mit der zellbewachsenen und gefärbten Seite nach unten aufgelegt. Zum Trocknen der Präparate wurden sie ÜN bei RT im Dunkeln aufbewahrt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Die Analyse der mikroskopischen Präparate erfolgte mit unterschiedlichen Objektiven an einem Fluoreszenzmikroskop DMRA (Leica).

Inkubationspuffer

0,5% BSA in PBS, pH 7,4

Waschpuffer

0,1% Tween 20 in PBS, pH 7,4

DAPI-Lösung

0,02% (v/v) DAPI (0,1 mg/ml)
in PBS

Mounting Medium

12 g	Polyvinylalkohol
84 ml	H ₂ O
6 ml	Tris-HCl pH 8,5
30%	Glycerol

4.3 Phalloidin-Färbung

Phalloidin, ein Toxin des weißen Knollenblätterpilzes, bindet Aktinfilamente und wurde verwendet um das Zytoskelett adhärent wachsender Zellen darzustellen. Das Phalloidin liegt konjugiert mit einem Fluoreszenzfarbstoff vor.

Die Zellen wurden mit *PFA-Lösung* fixiert und anschließend mit dem Phalloidin-TRITC-Antikörper verdünnt in PBS für 30 min inkubiert. Die nachfolgende Anfärbung der Zellkerne mit DAPI erfolgte wie in Abschnitt 4.2 beschrieben.

5 Proteinanalytische Methoden

5.1 Radioaktive *in vivo* Markierung von p53

Adhärenente Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von etwa 60 – 80% in einer 15 cm Zellkulturschale kultiviert. Nach einmaligem Waschen mit 5 ml Markierungsmedium (MP Biochemicals) wurden die Zellen für 20 min mit 5 ml des Markierungsmediums, das mit 5% dialysiertem FCS versetzt war, inkubiert. Anschließend wurden 12 µl ³⁵S-Met (TransLabel) in das Medium pipettiert und die Zellen für weitere 60 min inkubiert. Danach wurden die [³⁵S]-markierten Zellen mit PBS gewaschen, mit einem Gummischaber von der Zellkulturschale abgekratzt, zentrifugiert (3 min, 300 g, 20°C) und die Zellen lysiert (siehe 5.2) oder bis zur Aufbereitung der Zellextrakte bei –80°C eingefroren.

Markierungsmedium

DMEM ohne L-Glutamin, L-Methionin, L-Cystein (hier: mit 1% Glutamin versetzt)

5.2 Zellyse

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden frisch sedimentierte oder gefrorene Zellsedimente (siehe 2.11) auf Eis aufgetaut und anschließend mit 50-100 µl *E1A-Lysepuffer*⁺ (4°C) versetzt. Durch mehrfaches kräftiges Ratschen der Reaktionsgefäße über eine geriffelte Oberfläche wurden die Zellen im Lysepuffer suspendiert. Für die folgende Zellyse wurden die Ansätze 30 min auf Eis inkubiert, wobei das oben beschriebene Ratschen alle 5-10 min wiederholt wurde. Anschließend erfolgte zur Abtrennung der Zelltrümmer eine Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm und 4°C. Die Überstände (Extrakte) wurden anschließend in frische Reaktionsgefäße (1,5 ml) überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Die Proteinkonzentration wurde anhand der Bradford-Methode (siehe 5.3) bestimmt. Die Gesamtzellextrakte wurden im Anschluss mit einem entsprechenden Volumen an *6x Sample-buffer* versetzt, durch Erhitzen für 5 min bei 95°C denaturiert und bis zur Verwendung bei –20°C gelagert. Die Gesamtzellextrakte,

die für eine Immunpräzipitation (siehe 5.4) verwendet sollten, wurden mit *E1A-Lysepuffer⁺⁺* hergestellt.

E1A-Lysepuffer

50 mM HEPES
 150 mM NaCl
 0,1% (v/v) NP-40
 pH 7,0-7,5; eingestellt mit KOH;
 sterilfiltriert

E1A-Lysepuffer⁺⁺

E1A-Lysepuffer⁺ mit
 5 mM Natriumfluorid
 4 mM EGTA pH 7,5
 1 mM EDTA pH 7,5

E1A-Lysepuffer⁺

E1A-Lysepuffer mit
 0,1% Leupeptin
 (5 mg/ml in H₂O/Glycerol (1/1))
 2% Pepstatin A
 (1 mg/ml in Methanol)
 1% Pefablock sc
 (25 mg/ml in H₂O/Glycerol (1/1))
 1% Traysol
 frisch angesetzt, auf Eis gelagert

6x Sample-buffer

350 mM Tris-HCl pH 6,8
 35% (v/v) Glycerol
 10% (w/v) SDS
 0,6 M DTT
 0,12 g/l Bromphenolblau
 Lagerung in Aliquoten bei -20°C

5.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit der Bradford-Methode (1976) durchgeführt, die auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue an basische und aromatische Aminosäuren in saurer Lösung und einer damit verbundenen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 565 nm beruht (Bradford 1976, Pingoud & Urbanke 1997). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde 1 µl des Gesamtzellextrakts (siehe 5.2) in 800 µl Wasser pipettiert, 200 µl *Bradford Reagenz* zugegeben und gut durchmischt. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurde die Absorption in Halbmikro-Plastikküvetten bei 565 nm im Photometer gemessen. Als Nullwert diente ein Ansatz mit 1 µl *E1A-Lysepuffer⁺*. Von allen Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und die jeweilige Konzentration aus dem Mittelwert der erhaltenen Absorptionen bestimmt. Die Ermittlung der Proteinkonzentration aus der gemessenen Absorption bei 565 nm erfolgte mit Hilfe einer BSA Verdünnungsreihe.

Bradford Reagenz

Protein Assay Farbstoffkonzentrat (BioRad)

5.4 Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation wird ein spezifisches Protein durch einen Antikörper, der an eine Sepharose-Matrix gebunden ist, erkannt. Die Antikörper werden dabei über Protein G Sepharose (PGS) (Pharmacia) an die Matrix gekoppelt. Der Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen kann durch Präzipitation eines Proteins mit Hilfe des Antikörper-gebundenen Proteins erfolgen.

In einem ersten Schritt wurden 100 µl einer 10% PGS-Suspension zentrifugiert (2 min, 1000 rpm, 4°C) und mit *E1A-Lysepuffer⁺⁺* (4°C) gewaschen. Die PGS wurden in 400 µl *E1A-Lysepuffer⁺⁺* mit entsprechender Menge Antikörper (Überstand von Hybridomzelllinien bzw. aufgereinigter Antikörper) aufgenommen. Während der Inkubation von 1-2 h bei 4°C auf einem Horizontalschüttler erfolgte die Bindung der Antikörper an die Matrix. Für die Immunpräzipitation

wurden 160-500 µg Gesamtprotein (aus 5.2) zugesetzt. Die Antigen-Antikörper-Bindung erfolgte bei der anschließenden Inkubation von 1-2 h bei 4°C auf dem Horizontalschüttler. Die Suspension wurde zentrifugiert (2 min, 1000 rpm, 4°C), drei- viermal mit kaltem *E1A-Lysepuffer*⁺⁺ gewaschen, zentrifugiert und das Sediment in 20 µl *2x Sample-buffer* aufgenommen. Die anschließende Denaturierung und Ablösung der Proteine von PGS erfolgte für 5 min bei 95°C. Die zentrifugierten Proben wurden anschließend in der Western-Blot-Analyse (siehe 5.6) eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

10% PGS Suspension

Die PGS (Pharmacia) wurden im 10fachen Volumen sterilem Wasser in 50 ml Zentrifugenröhrchen bis zum Absetzen bei 4°C aufbewahrt. Der Überstand wurde abgenommen und der Waschschrift mit Wasser dreimal und anschließend mit *E1A-Lysepuffer* zweimal wiederholt. Die Gebrauchslösung wurde durch Zugabe von entsprechendem Volumen an *E1A-Lysepuffer* erhalten und bei 4°C gelagert. Vor Gebrauch wurde diese sorgfältig durchmischt.

2x Sample-buffer

125 mM	Tris-HCl pH 6,8
20% (v/v)	Glycerol
4% (w/v)	SDS
200 mM	DTT
10 mg/l	Bromphenolblau; Lagerung in Aliquoten bei -20°C

5.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in Gegenwart eines hohen SDS-Überschusses. Negativ geladenes SDS lagert sich an die Proteine und kompensiert deren positive Ladung, so dass die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine zur Anode durch deren Proteingröße bestimmt wird. Die Proteinanalyse erfolgte entsprechend den Vorschriften von Laemmli (Laemmli 1970). Zur Herstellung diskontinuierlicher Minigele (100 mm x 80 mm x 1,0 mm) wurde zuerst das *SDS-Trenngel* bis ca. 3,5 cm unter den Rand der vertikalen Glasplatten gegossen und mit 1 ml reinem 2-Propanol überschichtet, um eine glatte Trennfläche zu erhalten. Nach Polymerisation des *Trenngels*, wurde das 2-Propanol entfernt und mit ddH₂O gewaschen. Das *Sammelgel* wurde nun auf das *Trenngel* gegossen und der Kamm luftblasenfrei gegeben. Die Elektrophorese erfolgte unter Verwendung des Hoefer-Systems. Eingesetzt wurden jeweils Gesamtzellextrakte (siehe 5.2) mit einer Proteinmenge von 50-100 µg bzw. der gesamte Überstand aus der Immunpräzipitation (siehe 5.4). Zur Abschätzung von Molekulargewichten wurden auf jedem Gel außerdem jeweils 7 µl des *Prestained Markers SDS-7B* (Sigma) bzw des SDS-7B Markers (Biorad) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei konstanten 20-25 mA/Gel durchgeführt. Die SDS-Gele wurden anschließend in der Western-Blot-Analyse (siehe 5.6) eingesetzt oder die Proteinbanden durch Coomassie-Färbung (siehe 5.7.1) sichtbar gemacht.

SDS-Trenngel (jeweils für 5 Gele)

7%	10%	13%	
10,5	15 ml	19,5 ml	Acrylamid/Bisacrylamid
11,25 ml	11,25 ml	11,25 ml	4x Tris/SDS-Puffer pH 8,8
23,25 ml	18,75 ml	14,25 ml	H ₂ O
150 µl	150 µl	150 µl	10% APS
30 µl	30 µl	30 µl	TEMED

SDS-Sammelgel (für 5 Gele)

3,9 ml	Acrylamid/Bisacrylamid
7,5 ml	4x Tris/SDS-Puffer, pH 6,8
18,3 ml	H ₂ O
150 µl	10% APS
30 µl	TEMED

10x Laufpuffer (5 l)

151 g	Tris Base
720 g	Glycin
50 g	SDS
bei 1:10 Verdünnung, pH 8,3	

4x Tris/SDS Puffer pH 6,8

0,5 M	Tris-HCl
0,4%	SDS

4x Tris/SDS Puffer pH 8,8

1,5 M	Tris-HCl
0,4%	SDS

5.6 Western-Blot-Analyse

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE (siehe 5.5) erfolgte die Western-Blot-Analyse, bei der die Proteine auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore) transferiert werden und so für eine Immundetektion zugänglich wurden. Die PVDF-Membran wurde zuvor durch kurze Inkubation in Methanol aktiviert und anschließend in *Transferpuffer* äquilibriert. Für den Transfer, der in einer Hoefer-Tankblotapparatur durchgeführt wurde, wurden das Gel und die Membran in je 3 Lagen in *Transferpuffer* getränktem Whatman-Papier eingespannt. Der Transfer erfolgte für 80 min bei konstant 100 V unter Eis-Kühlung in *Transferpuffer*.

Transferpuffer

192 mM	Glycin
50 mM	Tris Base
pH 8,3	

5.7 Immunologische Detektion und ECL-Reaktion

Für die immunologische Detektion der Proteine auf der PVDF-Membran wurde diese zunächst zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen unter Schwenken für 30-60 min in *Blockpuffer* inkubiert und 5 min mit *TBS-Tween* gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers unter Schwenken für 1,5 h bei RT oder ÜN bei 4°C. Danach wurde die Membran zur Entfernung nicht gebundener Antikörper viermal für je 15 min mit ca. 15 ml *TBS-Tween* gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörper für 1 h bei RT unter Schwenken und erneuter Waschung mit *TBS-Tween* (siehe oben).

Mit Hilfe der ECL(*Enhanced Chemiluminescence*)-Reaktion konnten die entsprechenden Proteine detektiert werden. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte HRP spaltet dabei das in der *ECL-Lösung* enthaltene H₂O₂. Die dadurch entstehenden Radikale lösen eine Chemilumineszenz-Reaktion aus, welche zur Schwärzung des Röntgen-Films an der Position des gebundenen HRP-gekoppelten Antikörpers führt. Nach dem Abgießen des letzten Waschpuffers wurden die *ECL-Lösungen A* und *B* im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die PVDF-Membran gegeben. Alternativ wurde das SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate (Pierce) verwendet. Nach 1 min Inkubationszeit wurde die PVDF-Membran kurz abgetropft und in Folie eingeschlagen. Die Detektion der Signale erfolgte mit Röntgenfilmen in einer Filmkassette mit unterschiedlichen Expositionszeiten (1 s bis ÜN). Die belichteten und entwickelten Filme wurden zur Dokumentation eingescannt. Zur Weiterverwendung wurden die Membranen kurz mit *TBS-Tween* gewaschen und getrocknet, oder erneut für 30-60 min in *Blockpuffer* inkubiert, um in eine neue Immunreaktion

eingesetzt zu werden. Getrocknete Membranen wurden vor Einsatz in eine weitere Immunreaktion zunächst mit Methanol benetzt, mit ddH₂O gewaschen und für 30 min in Blockpuffer inkubiert.

TBS-Tween

10 mM	Tris Base pH 8,0
150 mM	NaCl
0,2%	Tween-20

Blockpuffer

5% Magermilchpulver in TBS-Tween

ECL-Lösung A

100 µl	Luminol-Stammlösung
44 µl	4-Cumarsäure-Stammlösung
10 ml	Tris-HCl pH 8,5 (100 mM)

ECL-Lösung B

15 µl	H ₂ O ₂ 30%
10 ml	Tris-HCl pH 8,5 (100 mM)

Luminol-Stammlösung

443 mg in 10 ml DMSO (250 mM)
Lagerung in Aliquoten bei -20 C

4-Cumarsäure-Stammlösung

74 mg in 5 ml DMSO (90 mM)
Lagerung in Aliquoten bei -20 C

5.7.1 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Um Proteinbanden im SDS-Gel sichtbar zu machen, wurden die Gele durch Inkubation für 15 min bei RT in der *Coomassie-Färbelösung* gefärbt. Der Hintergrund wurde nach kurzem Abwaschen der Färbelösung in Wasser durch Schwenken des Gels in *Coomassie-Entfärbelösung* 30-60 min entfärbt, wobei die Proteinbanden blau eingefärbt bleiben. Gefärbte Gele wurden in Zeluphan-Folie getrocknet.

Coomassie-Färbelösung

45%	Methanol
10%	Essigsäure
0,25% (w/v)	Coomassie Brilliant Blau R-250

Coomassie-Entfärbelösung

10% (v/v)	Isopropanol
10% (v/v)	Essigsäure

5.7.2 Fluorographie

Zur fluorographischen Darstellung [³⁵S]-markierter Proteine wurden die Gele nach der Elektrophorese 20 min in 96% Essigsäure entwässert, 20 min in 20% (w/v) 2,5-Diphenyloxazol (PPO) in Essigsäure geschwenkt, mehrere Male mit Wasser gewaschen und weitere 10 min darin inkubiert. Danach wurden die Gele auf Whatman-Papier transferiert und auf dem Geltrockner bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Anschließend wurden sie auf einem Röntgenfilm ÜN exponiert.

6 Molekularbiologische Methoden

6.1 DNA-Isolierung

6.1.1 Aufreinigung genomischer DNA aus Mausembryonen

Die Isolierung genomischer DNA aus Balb/c Embryonen-Köpfchen für die Genotypisierung wurde unter Verwendung des NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel) gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

6.1.2 Schnelle Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Für die DNA-Isolierung aus Zellen wurden entweder frisch pelletierte Zellen oder eingefrorene Zellsedimente (siehe 2.11) verwendet, die in 100 µl *Lysispuffer* resuspendiert wurden. Durch Zugabe von 10 µg *Proteinase K* wurde der proteolytische Abbau gestartet. Hierzu wurden die Proben 3-4 h bei 55°C im Thermomixer inkubiert. Durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min bei RT wurden unlösliche Zellfragmente sedimentiert, der Überstand abgenommen und zur Präzipitation der DNA mit 1 Vol 2-Propanol versetzt. Nach Pelletieren der DNA (10 min, 13000 rpm, RT) wurde diese mit 1 ml 70% EtOH gewaschen. Das getrocknete DNA-Pellet wurde in Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

Lysispuffer

100 mM	Tris-HCl (pH 8,5)
5 mM	EDTA
0,2% (w/v)	SDS
200 mM	NaCl

Proteinase K Stammlösung

20 mg/ml in H₂O; Lagerung bei -20°C

6.2 Ethanolfällung von DNA

Zur Aufkonzentrierung und Reinigung von DNA aus verdünnter Lösung wurde die Methode der Ethanolfällung eingesetzt. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 6,0 versetzt. Durch Zugabe des 2,5-fachen Vol. an absolutem EtOH und Inkubation von 30 min bei -20°C erfolgte die DNA-Präzipitation. Nach Sedimentation der DNA durch Zentrifugation (30 min, 14000 rpm, 4°C) wurde der Überstand entfernt und das Präzipitat mit 70% EtOH gewaschen. Die DNA wurde für 30 min bei RT getrocknet und im Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

6.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der analytischen und präparativen Auftrennung, Reinigung und Identifizierung von DNA- und RNA-Fragmenten. Hierbei macht man sich zunutze, dass Nukleinsäuren, die bei einem neutralen pH negativ geladen ist, in einem elektrischen Feld zur Anode wandern. Je nach Fragmentgröße wurden Agarose-Gele (gelöst in 1x TAE) von 0,8-2% verwendet. Die Charakterisierung und Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte in einer horizontalen Elektrophoreseapparatur mit 14x11x1 cm, 11x9x1 cm und 8x9x1 cm Agarose-Gelen bei Spannungen zwischen 60 V bis 120 V in 1x TAE-Puffer. Die zu untersuchende DNA-Probe wurde mit 10x bzw. 6x DNA-Probenpuffer versetzt und das EtBr-haltige Agarose-Gel mit der Probe beladen. Die Größe der einzelnen DNA-Banden konnte durch den Vergleich mit verschiedenen DNA-Längenmarkern abgeschätzt werden. Die aufgetrennten DNA-Banden wurden mit Hilfe eines UV-Transilluminators detektiert und mit einer Geldokumentationsanlage aufgenommen.

DNA-Probenpuffer (10x)

0,1%	Xylencyanol
50%	Glycerol
10x	TAE
0,1 M	EDTA pH 8,0
0,1%	SDS

DNA-Probenpuffer (6x)

0,25% (w/v)	Bromphenolblau
0,25% (w/v)	Xylencyanol
30% (v/v)	Glycerol

6.4 Agarose-Gelextraktion

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des JETSORB Gel Extraction Kit (Genomed) und NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey-Nagel) aus Agarose-Gelen extrahiert. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

6.5 Restriktionsspaltung von Nukleinsäuren

Die Restriktionsspaltung von DNA dient u. a. der Gewinnung von DNA-Fragmenten oder Linearisierung von zirkulärer DNA für eine Klonierung sowie der Kontrolle der Klonierung und der analytischen Charakterisierung unbekannter Sequenzen.

In der Regel katalysiert eine Einheit (1 U) einer Restriktionsendonuklease die Spaltung von 1 µg DNA in einem Reaktionsvolumen von 50 µl in einer Stunde. Ein spezieller Puffer, je nach Restriktionsenzym, garantiert eine optimale Ionenstärke und einen optimalen pH-Wert.

Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 20-50 µl, mindestens aber im 10-fachen Volumen der eingesetzten Enzymmenge, da das Glycerol, in dem die Restriktionsenzyme aufbewahrt werden, die enzymatische Aktivität beeinträchtigen kann. Der Restriktionsansatz wurde für 1 h bei der für das Restriktionsenzym optimalen Temperatur inkubiert. Sollten bei der Restriktion zwei Enzyme verwendet werden, wurde das vom Hersteller vorgeschlagene Puffersystem verwendet. Bei zu unterschiedlichen Puffersystemen, mussten die Enzyme einzeln verwendet werden. Der Reaktionsansatz konnte mit EtOH-Präzipitation (siehe 6.2) gereinigt und durch die Agarose-Gelelektrophorese (siehe 6.3) überprüft werden.

6.6 5' Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Antarktische Phosphatase (AP) ist Enzym, das die 5'-Phosphatgruppe von RNA und DNA dephosphoryliert. Für die Klonierung von DNA-Fragmenten ist die Dephosphorylierung des linearisierten Vektors notwendig, um eine Rezirkularisierung zu vermeiden und um einen Einbau von DNA-Fragmenten zu erhalten.

Linearisierte Vektor-DNA (500 ng) mit überhängenden Enden wurden nach einem Restriktionsverdau mit 5 Einheiten AP für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 65 °C für 5 min.

6.7 Ligation

Für die schnelle Ligation von DNA-Fragmenten wurde das Rapid DNA Ligation Kit (Roche) verwendet. Dazu wurde die zu ligierende DNA (dephosphorylierter Vektor und DNA-Fragment) in 40 µl 1x DNA-Verdünnungspuffer aufgenommen und 20 µl 2x T4 DNA-Ligase-Puffer hinzugegeben. Das molare Verhältnis von Vektor zu DNA-Fragment betrug 1:2. Die Ligation wurde durch die Zugabe von 1 µl T4 DNA-Ligase (5 U) gestartet und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100 µl einer Suspension von kompetenten Bakterien mit den 40 µl Ligationsansatzes transformiert (siehe 1.5).

6.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) dient dazu, eine DNA-Zielsequenz (Target-DNA) *in vitro* zu amplifizieren. Man nutzt hierbei die Fähigkeit von thermostabilen DNA-Polymerasen, einen DNA-Einzelstrang ausgehend von einem kurzen doppelsträngigen Bereich zu einem Doppelstrang polymerisieren zu können. An das 3'-Ende eines zuvor hybridisierten Oligonukleotidprimer hängt die DNA-Polymerase die zur Zielsequenz komplementären Nukleotide an. Durch mehrmaliges Wiederholen der einzelnen Schritte der DNA-Denaturierung, dem Hybridisieren der Oligonukleotidprimer und der anschließenden Elongations-Reaktion kommt es zu einer exponentiellen Anreicherung (ca. 10^6 - 10^7 -fach) eines DNA-Abschnittes zwischen zwei jeweils zu einem der beiden DNA-Stränge komplementären Oligonukleotidprimern. Synthetische Oligonukleotidprimer wurden von der Firma Sigma und MWG herangezogen (siehe Material 5). Die Oligonukleotidprimer haben eine mittlere Länge von 20 bis 30 Nukleotiden. Bei der Festlegung der Oligonukleotidprimer ist darauf zu achten, dass zwei parallel verwendete Primer eine ähnliche Schmelztemperatur (T_m) besitzen, nicht komplementär zueinander sind und keine Sekundärstrukturen ausbilden können (Saiki *et al.*, 1988).

Das PCR-Programm wurde für jede Analyse optimiert. Die Anzahl der Zyklen variierte von 30-35, je nach PCR. Die Annealing-Temperatur sollte der Hybridisierungstemperatur (T_H) der Primer entsprechen und wird nach folgender Formel berechnet: $T_H = T_m - 5 = [(G + C) \times 4 + (A + T) \times 2] - 5$. Die Elongationszeit hängt von der Länge des zu amplifizierenden Fragments ab. In der Regel gilt für die Elongationszeit: 1000 bp/min. Bei *proof reading* Polymerasen wurde diese Zeit verlängert.

Die PCR-Reaktion wurde in einem Volumen von 25 bzw. 50 μ l und folgender Zusammensetzung durchgeführt: PCR-Puffer (1x), dNTP-Mix (je 0,2 mM), Vorwärts-Primer (0,2-0,4 μ M), Rückwärts-Primer (0,2-0,4 μ M). Als Ausgangs-DNA wurden 1 μ l cDNA aus einer Reversen Transkriptions-Reaktion (siehe 6.11), ca. 100 ng genomische DNA (siehe 6.1), oder 10 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Es wurden sowohl die *Taq*-Polymerase (0,02 U/ μ l, Eppendorf) als auch die Phusion™ High-Fidelity Polymerase (0,02 U/ μ l, New England Biolabs) verwendet. Letztere *proof reading* Polymerase zeichnet sich durch besonders hohe Genauigkeit aus.

6.8.1 Genotypisierung primärer MEF

Die Genotypisierung der Embryonen und der primären MEF aus der Verpaarung von Balb/c p53+/- x p53+/- Mäusen erfolgte mit genomischer DNA (siehe 6.1) anhand PCR unter Standardbedingungen mit der *Taq*-Polymerase (siehe 6.8). Zur Identifizierung eines p53+/-, p53+/- und p53-null Genotyps wurden zwei PCR-Reaktionen mit je einer internen *Aktin*-Kontrolle durchgeführt.

Ein p53+/- und p53+/- Genotyp wurde mit folgenden PCR-Bedingungen identifiziert

35x	}	94°C	3 min
		94°C	30 s
		63°C	30 s
		72°C	1 min
		72°C	5 min

Mit den hierbei verwendeten Primern I1F und I2R (siehe Material 5) betrug das PCR-Amplifikat 1000 bp. Für einen p53-null Genotyp entsteht bei dieser PCR kein Produkt. Dieser Genotyp kann,

ebenso wie ein p53+/- Genotyp, mit den Primern NEOI und NEOII (siehe Material 5) ein PCR-Amplifikat von 300 bp hervorrufen, während man für den p53+/+ Genotyp keine Bande erhält. Die NEO-PCR wurde mit einer Annealing-Temperatur von 65°C und einer Elongationszeit von 20 s durchgeführt. Das PCR-Amplifikat für *Aktin* mit den Primern actin-N und actin-H (siehe Material 5) betrug jeweils 500 bp.

6.8.2 Amplifizierung des p53-Fragments aus MEF5 und MEF20 Zellen

Für die Mutationsanalyse der MEF5 und MEF20 Zellen musste das DNA-Fragment der gesamten p53-cDNA vor der Sequenzierung amplifiziert werden. Hierfür wurde aus frischen Zellen oder gefrorenen Zellpellets RNA isoliert (siehe 6.10), wie in Abschnitt 6.11 beschrieben in cDNA transkribiert und anschließend PCR-Analysen mit Phusion™High-Fidelity Polymerase nach den Standardbedingungen (siehe 6.8) mit Zusatz von 5% DMSO durchgeführt. Es wurde je 1 µl des 20 µl cDNA-Ansatzes für die PCR mit den Primern *E1b* und *1270* (je 0,4 µM) eingesetzt, die ein Fragment von 1380 bp ergaben. Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

30x	}	98°C	30 s
		98°C	10 s
		62°C	30 s
		72°C	3 min
		72°C	5 min

Nach der Aufreinigung des DNA-Fragmentes über ein präparatives Agarose-Gel (siehe 6.3) und Säulchen sowie anschließender EtOH-Fällung (siehe 6.2) wurden ca. 40 ng davon für jeweils zwei unabhängige Sequenzierreaktionen (siehe 6.9) eingesetzt.

6.9 Sequenzierung

Eine Variante der Didesoxy-Sequenzierung nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) stellt das *cycle sequencing* (Sears *et al.*, 1992) dar. Die Reaktion wurde mit dem ABI Prism BigDye™Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. In diesem System dienen fluoreszenzmarkierte ddNTPs als Reaktionsterminatoren. Der Ansatz besteht aus folgenden Komponenten (20 µl Gesamtvolumen): 40 ng DNA aus der aufgereinigten PCR-Reaktion oder 500 ng Plasmid-DNA, 10 pmol Primer, 3 µl BigDye (BD), 4 µl BD-Puffer. Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen:

25x	}	96°C	60 s
		96°C	15 s
		50°C	15 s
		60°C	4 min

Anschließend wurde die DNA mit 3 M Natriumacetat, pH 5,4, und EtOH (abs.) gefällt und getrocknet. Die Analyse erfolgte durch den Sequenzierservice (Institut für Zellbiochemie und klinische Neurologie, Hamburg) in einem ABI-Sequenator 377. Der Sequenzvergleich erfolgte anschließend durch das *BLAST*-Programm des NCBI-Servers (www.ncbi.nlm.nih.gov).

6.10 Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen

Von adhärenz wachsenden Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend zentrifugiert (5 min, 200 g, RT). Dem Zellpellet wurde 1 ml Trizol (Invitrogen) zugegeben und die Zellen vorsichtig resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden nach Zugabe von 200 µl Chloroform 15 s lang geschüttelt, für weitere 3 min bei RT inkubiert und zentrifugiert (10 min, 12000 g, 4°C). Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und in einem neuen Reaktions-Gefäß (1,5 ml) mit 500 µl 2-Propanol versetzt, invertiert und 10 min bei RT inkubiert. Die RNA wurde durch erneutes Zentrifugieren (10 min, 12000 g, 4°C) sedimentiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde das Pellet mit 1 ml 70% EtOH (mit 0,1% (v/v) DEPC-H₂O) gewaschen, und zentrifugiert (5 min, 8000 g, 4°C). Das RNA-Pellet wurde nach vorsichtigem Abpipettieren des EtOH ca. 5-10 min bei RT getrocknet. Je nach Pellet-Größe wurden 45-90 µl 0,1% (v/v) DEPC-H₂O zugegeben. Das RNA-Pellet wurde bei 50°C für 10 min gelöst. Noch vorhandene DNA wurde mit Hilfe des Turbo DNA-free™ Kits (Ambion) nach Herstellerangaben verdaut.

Zusätzlich wurde zur RNA-Isolierung mit Trizol das RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers benutzt.

Die Reinheit der RNA wurde photometrisch durch den Quotienten 260/280 nm bestimmt und sollte zwischen 1,9 und 2,1 liegen. Einer photometrischen Konzentrationsbestimmung (Nanodrop) folgte die Überprüfung der RNA (400 ng) auf einem 1% Agarose-Gel (30 min bei 100 V). RNA-Sekundärstrukturen wurden durch Erhitzen der RNA bei 70°C für 10 min in 10 µl RNA-Ladepuffer gelöst. Intakte RNA hoher Qualität sollte nach Auftrennung in einem Agarose-Gel zwei distinkte Banden der ribosomalen RNA (28S:16S) mit einer Ratio von 2:1 zeigen.

<u>Ladepuffer</u>		<u>RNA-Ladepuffer</u>	
50%	Glycerol	240 µl	Formamid
50%	H ₂ O	60 µl	Ladepuffer
1 Spatelspitze	Bromphenol-Blau	Lagerung bei -20°C	

6.11 Reverse Transkription

Für die Generierung von komplementärer DNA (cDNA) aus RNA durch die Reverse Transkription wurden Oligo-dT Primer in 5'-3' Richtung durch virale Polymerase (ThermoScript RT, Invitrogen) komplementär zur RNA verlängert. Für die Reaktionen wurde insgesamt 1 µg isolierter RNA eingesetzt (siehe 6.10). Dabei wurde folgender Reaktionsansatz mit DEPC-H₂O auf ein Gesamtvolumen von 11 µl aufgefüllt:

DEPC-H₂O
1 µg RNA,
5 µM Oligo-dT Primer

Der Ansatz wurde für 10 min bei 72°C inkubiert und während einer Pause von 5 min bei 4°C wurde folgender Ansatz dazugegeben, so dass das Endvolumen 20 µl pro Reaktion ergab:

1x cDNA Synthese-Puffer (5x Puffer)
1 mM dNTP Mix (10 mM)
5 µM DTT (0,1M)
2 U RNaseOUT (40 U/µl)
0,75 U ThermoScript RT (15 U/µl)

Die RNA wurde bei 52°C in 50 min in cDNA umgeschrieben. Die Reaktion wurde durch eine Inkubation von 15 min bei 75°C gestoppt. Die RNA wurde anschließend durch Zugabe von 0,1 U/ μ l *E. coli* RNaseH bei 37°C für 30 min verdaut. Die Langzeitlagerung der RNA erfolgte bei -80°C, die der cDNA bei -20°C.

6.12 Quantitative RealTime-PCR (qRT-PCR)

Anhand der quantitativen RealTime-PCR (qRT-PCR) ist es möglich, die exakte Quantifizierung von PCR-Produkten innerhalb eines großen dynamischen Bereiches zu ermitteln. Dabei stehen zwei Arten der Quantifizierungsstrategien zur Verfügung: die absolute und die relative Quantifizierung. Die absolute Quantifizierung von vorliegender SV40-DNA nach SV40-Infektion in 3T3 und 10-1 Zellen erfolgte anhand einer Standardkurve, basierend auf einer Verdünnungsreihe von SV40-DNA (Forml, Invitrogen). Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression der Zielgene (hier: SV40 *LT*) mit der eines nicht regulierten *housekeeping gene* (hier: *gapdh*) normalisiert. Eine Optimierung der relativen Quantifizierung erreicht man durch Berücksichtigung der unterschiedlichen RealTime-PCR Effizienzen.

Die qRT-PCR wurde in 96-well-Platten mit dem Applied Biosystems 7500 Fast RealTime-PCR System durchgeführt, welches Fluoreszenzsignale detektiert, die mit der PCR-Produktbildung durch eine Polymerase einhergehen. Die Detektion erfolgte hierbei mit dem fluoreszierenden Farbstoff SYBR[®]Green, der unspezifisch in doppelsträngige DNA interkaliert. Die Intensität der emittierten Fluoreszenz ist direkt proportional zur Menge an doppelsträngiger DNA und wird graphisch gegen die Zykluszahl aufgetragen. Die Quantifizierung bezieht sich dabei auf den von der Software berechneten Fluoreszenzschwellenwert, der in der frühen exponentiellen Phase erreicht wird und bei dem die Fluoreszenzintensität größer als die gemessene Hintergrundfluoreszenz ist. Die Anzahl der Zyklen, bei dem dieser Wert überschritten wird, wird als Schwellenwertzyklus (*cycle threshold*, Ct-Wert) bezeichnet. Die Ct-Werte sind indirekt proportional der Menge an Proben-DNA. Während der exponentiellen Phase erreicht die PCR die optimale Amplifikationsperiode, bei der unter optimalen Bedingungen pro Zyklus eine Proben-Verdoppelung stattfindet. Die Plateauphase wird erreicht, wenn die Reaktionskomponenten zur Neige gehen und die Fluoreszenzintensität für die Berechnung nicht mehr brauchbar ist. Anhand der sich an die qRT-PCR anschließenden Schmelzkurvenanalyse wird die charakteristische Schmelztemperatur der PCR-Produkte bestimmt. Bei kontinuierlicher Temperaturerhöhung wird die Fluoreszenzabnahme in der Reaktion gemessen, die durch Bildung von Einzelsträngen aus PCR-Doppelstrangprodukten entsteht. Somit entsteht eine charakteristische Schmelzkurve mit einer spezifischen Schmelztemperatur für die PCR-Produkte, die mögliche Kontaminationen oder eine Bildung von Primer-Dimeren erkennen lässt.

Für diesen Versuch wurden 3T3 und 10-1 Zellen in einer Dichte von 1×10^5 /6well, teilweise auf Deckgläschen, ausgesät und 12 h später mit SV40 infiziert. 10 h danach wurden die Zellen gezählt, die Deckgläschen entnommen und in Aceton (-20°C) für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung fixiert (siehe 4.2) und von je drei unabhängigen wells die RNA (siehe 6.10) bzw. die genomische DNA (siehe 6.1.2) isoliert. Die Zellzahl ist wichtig für die Berechnung der relativen Expressionsunterschiede sowie der Anzahl von SV40-DNA pro Zelle.

Alle Messungen wurden mit drei unabhängig isolierten genomische DNA-Proben und in cDNA

umgeschriebene RNA-Proben (siehe 6.11) in Triplikaten durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mit Wasser (*no template control*) mitgeführt.

Die PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt und bestand aus folgenden Komponenten:

2x SYBR® Green PCR Master Mix	10 µl
Primer A (5 µM)	1 µl
Primer B (5 µM)	1 µl
DEPC-H ₂ O	7 µl
DNA	1 µl cDNA bzw. 2,5 ng genomische DNA

Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen:

40x	95°C	10 min	Initialisierung der AmpliTaq Gold® Polymerase
	96°C	15 s	Denaturierung
	60°C	1 min	Amplifikation/Elongation
	95°C	15 s	Schmelzkurve
	60°C	1 min	
	95°C	15 s	
60°C	15 s		

Die Auswertung und Visualisierung der Rohdaten erfolgte mit der 7500 Software v1.4.

6.12.1 Erstellung einer Standardkurve für die absolute Quantifizierung

Die absolute Quantifizierung wurde anhand einer gegebenen Standardkurve durchgeführt, basierend auf einer Verdünnungsreihe von SV40-DNA FormI. Dabei zeigt die Standardkurve das lineare Verhältnis zwischen Ct-Wert und Ausgangsmenge der eingesetzten DNA, anhand derer man für jede Probe mittels des Ct-Wertes die Kopienzahl/-menge bestimmen kann.

Es wurden sechs 10er-Verdünnungen (3x10⁶ bis 30 Kopien) der SV40-DNA FormI folgendermaßen hergestellt:

1. Berechnung der Masse eines Plasmid-Moleküls (hier: SV40-DNA FormI):

$$m = n \times \left(\frac{1 \text{ Mol}}{6,023 \times 10^{23} \text{ bp}} \right) \times \left(\frac{660 \text{ g}}{\text{Mol}} \right)$$

$$m = n \times (1,096 \times 10^{-21})$$

mit n = Plasmid-Größe (hier: 5243 bp)

m = Masse (g)

Avogadrozahl = 6,023x10²³

Molgewicht eines doppelsträngigen DNA-Moleküls = 660 g/Mol

2. Berechnung der Masse an Plasmid, die die gewünschte Anzahl an Kopien enthält.
3. Berechnung der Konzentration der Plasmid DNA, die der gewünschten Kopienzahl entspricht.
4. Herstellung der Verdünnungsreihe direkt vor der Durchführung der absoluten RealTime-PCR.

Die Standards wurden parallel zu den Proben (genomische DNA) mit dem gleichen Ansatz (Primer T5/T12) auf der qRT-Platte analysiert. Dabei wurde 1 µl der Verdünnungen in Triplikaten aufgetragen.

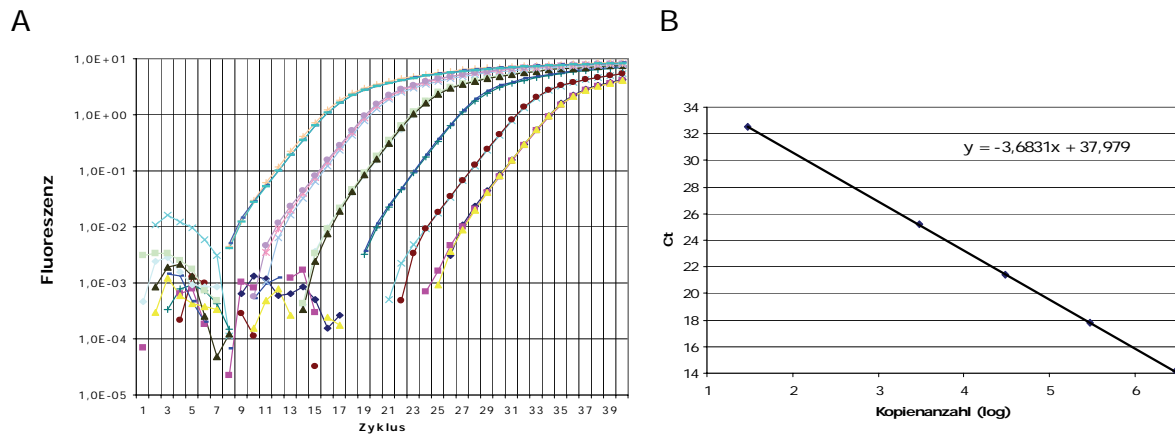


Abbildung 7: Repräsentative Standardkurve mit bekannten Kopienzahlen von SV40-DNA (A) Darstellung des relativen Fluoreszenzsignals des Reporterfarbstoffes in Abhängigkeit vom PCR-Zyklus. **(B)** Die Standardgerade wurde durch Korrelation der gemessenen Ct-Werte mit den Logarithmen der bekannten Konzentrationen (Kopien von SV40-DNA) mit Excel erstellt.

Die Steigung der Standardkurve ist ein Maß für die Effizienz der PCR. Einer Effizienz von 100% (=eine Verdopplung der DNA-Kopien pro Reaktionszyklus) entspricht der Steigung -3,32. Die Steigung der Standardkurve lag bei -3,68, was einer Amplifikationseffizienz ($E = 10^{(-1/\text{Steigung})} - 1$) von 87% pro Zyklus entspricht. Dieser Wert liegt noch im optimalen Bereich. Der Regressionskoeffizient lag bei 0,99. Bei der Schmelzkurvenanalyse ergab sich für den Standard (SV40-DNA FormI) und die Probe (SV40-DNA) eine identische Temperatur von $79,1^{\circ}\text{C} \pm 0,3$.

6.12.2 Bestimmung der SV40-Kopienzahl nach abortiver Infektion

Für den Vergleich der SV40-Kopienzahl nach abortiver Infektion in zwei unterschiedlichen Zelltypen (Balb/c 3T3 und 10-1) wurden $2,5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ aufgereinigte, genomische DNA (siehe 6.1.2) pro RealTime-PCR eingesetzt, sowie in jedem Lauf eine Standardreihe (siehe 6.12.1) mit 3×10^6 bis 30 Kopien/ μl der SV40-DNA FormI (je Dreifachbestimmungen). Es wurden die Primer T5 und T12 eingesetzt, die ein PCR-Amplifikat von 280 bp erzeugten.

6.12.3 Relative Quantifizierung der LT-Transkription nach abortiver Infektion

In der relativen Quantifizierung anhand qRT-PCR wird die Expression der Zielgene (hier: *LT*) mit der eines nicht regulierten *housekeeping gene* (Referenzgen, hier: *gapdh*) normalisiert. Für die Berechnung der Expressionsunterschiede in den 3T3 und 10-1 Zellen nach abortiver SV40-Infektion wird die relative Expression der Proben 10-1+SV40, 10-1 mock (nicht-infiziert) und 3T3 mock („Behandlung“) auf eine der Proben 3T3+SV40 („Kontrolle“) bezogen und erfolgt über die sog. $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ Methode, die im Folgenden dargestellt ist (Livak & Schmittgen 2001).

1. Normierung für Behandlung und Kontrolle: $\Delta\text{Ct} = \text{Ct} (\text{Zielgen}) - \text{Ct} (\text{Referenzgen})$
2. $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} (\text{Behandlung}) - \Delta\text{Ct} (\text{Kontrolle})$
3. Theoretisch verdoppelt sich die Anzahl mit jedem Zyklus exponentiell, daher kann folgende

Berechnung erfolgen, die die relativen Expressionsunterschiede (RQ) zwischen „Behandlung“ und „Kontrolle“ darstellt: $RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

Zur Berechnung der Standardabweichung s der $\Delta\Delta Ct$ -Werte gilt:

$$s = \sqrt{(s_1^2 - s_2^2)}$$

s_1 = Standardabweichung Zielgen
 s_2 = Standardabweichung Referenzgen

Für die Funktion $2^{-\Delta\Delta Ct}$ wird anschließend der Fehlerbereich $2^{-\Delta\Delta Ct \pm s}$ berechnet. Der Fehler wird folgendermaßen angegeben: $\text{Std Err} = (2^{-\Delta\Delta Ct + s}) - (2^{-\Delta\Delta Ct})$

Für diese Expressionsanalyse wurde die aus RNA (1 μg) umgeschriebene cDNA (1 μl) eingesetzt (siehe 6.11). Es wurden die Primer T5 und T20 eingesetzt, die ein PCR-Amplifikat von 212 bp erzeugten, sowie für die endogene *gapdh*-Kontrolle die Primer *gapdh1* und *gapdh2* mit einem PCR-Amplifikat von 238 bp.

V ERGEBNISSE

In der Literatur wurden bereits einige Studien im Hinblick auf die spontane Immortalisierung primärer muriner Zellen durchgeführt in deren Mittelpunkt der Tumorsuppressor p53 stand. Für die vorliegende Arbeit war es jedoch entscheidend, den Einfluss von p53 in zwei wichtigen Situationen bezüglich der malignen Veränderungen zu vergleichen: die spontane Immortalisierung, die der erste Schritt in Richtung Transformation ist, und die LT-induzierte Transformation.

Daher wurde im ersten Teil der Arbeit zunächst die Rolle von p53 in der spontanen Immortalisierung von primären Balb/c Mausembryofibroblasten (MEF) untersucht. Inwieweit exogene Stressfaktoren (oxidativer Stress), bedingt durch die Kultivierungsbedingungen, einen Einfluss auf die Immortalisierung haben, sollte anhand physiologischer Sauerstoffkonzentrationen (5% O₂) parallel zu Standardbedingungen (21% O₂) bestimmt werden. Im zweiten Teil sollte das Postulat einer positiven Rolle von p53 im LT-p53 Komplex bei der LT-induzierten Transformation genauer analysiert werden. Die Bindung von p53 durch LT wäre dann nicht vergleichbar mit einer LT-Expression in einer p53-null Situation. Grundlage für diese Untersuchungen waren etablierte Zelllinien mit einem wtp53 (Balb/c 3T3) und p53-null (Balb/c 10-1) Genotyp.

1 p53 in der spontanen Immortalisierung primärer Balb/c MEF

1.1 Die spontane Immortalisierung primärer Balb/c MEF bei 5% und 21% Sauerstoff

Für die spontane Immortalisierung von MEF wird im Allgemeinen das von Todaro und Green (1963) etablierte 3T3-Protokoll angewendet. Die primären Fibroblasten werden alle 3 Tage in einer Zelldichte von 3×10^5 Zellen pro 6 cm Kulturschale ausgesät bis die Zellen ihr Proliferationslimit erreichen und ihr Wachstum einstellen. Durch spontane Mutationen und/oder epigenetische Veränderungen, die während der Kultivierung auftreten können, werden nur wenige Zellen von den Seneszenz-auslösenden Mechanismen unabhängig und proliferieren unbegrenzt. Die Zellen sind immortal bzw. immortalisiert. Im Folgenden wurden primäre Balb/c MEF bei den jeweiligen Sauerstoffkonzentration bis zum Auftreten immortalisierter Zellen passagiert und das Proliferationsverhalten charakterisiert. Die primären MEF stammen aus der Verpaarung p53-heterozygoter Balb/c-Mäuse in laboreigener Züchtung. Embryonen wurden am Tag 13,5-15,5 entnommen, die MEF isoliert und ihr Genotyp anhand spezifischer PCR untersucht und anschließend kryokonserviert.

Primäre MEF mit wtp53- und p53-null Genotyp (Passage 1) wurden aufgetaut und in Kultur genommen. Die Kultivierung erfolgte dabei in je zwei 10 cm Kulturschalen bei Standardbedingungen (21% O₂) und bei physiologischen (5% O₂) Bedingungen, welche im Inkubator durch einen Sauerstoff-Sensor und einer Stickstoffquelle hergestellt wurden. Alle 3 bis 4 Tage wurden die primären Fibroblasten nach einem leicht modifizierten 3T3-Schema passagiert. Bis zum Erreichen der Seneszenz nach ca. 15-20 Tagen wurden 1×10^6 Zellen in 10 cm Kulturschalen ausgesät. Aufgrund des Wachstumsarrests der MEF bei 21% O₂ erfolgte die Aussaat

dieser Fibroblasten in den darauf folgenden Passagen (alle 3 bis 4 Tage) in geringeren Zelldichten. Für MEF, die bei 5% O₂ kultiviert wurden, konnte das 1x10⁶-Schema beibehalten werden. Während der Kultivierung wurde das Proliferationsverhalten durch Zellzählung, Berechnung der Generationszahl (PDL, *population doubling level*) und der Generationszeit charakterisiert. In Abbildung 8 sind die Ergebnisse der wtp53-exprimierenden MEF unter dem Einfluss der jeweiligen O₂-Konzentrationen dargestellt.

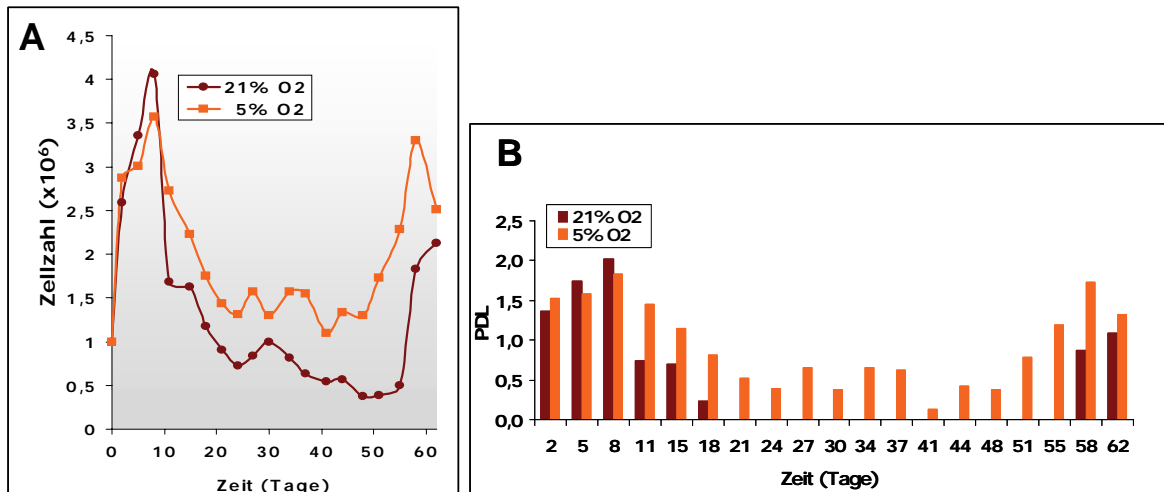


Abbildung 8: Zellwachstum der wtp53-exprimierenden MEF bei 5% und 21% Sauerstoff. MEF wurden bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen nach einem 3T3-ähnlichen Schema (1x10⁶ Zellen pro 10 cm Kulturschale) alle 3 bis 4 Tage in DMEM/10% FCS passagiert. **(A)** Die Gesamtzellzahl von zwei Kulturschalen wurde vor jeder Passage mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Kulturschalen. **(B)** Darstellung der Generationszahlen (PDL, *population doubling level*) über einen Zeitraum von 62 Tagen. Die Werte wurden mit folgender Formel berechnet: $(\log N - \log N_0) / \log 2$ wobei N_0 = Ausgangszellzahl und N = Zellzahl zum Ableszeitpunkt. PDL < 0 wurden nicht berücksichtigt.

In den ersten 10 Tagen (4 Passagen) betrug die durchschnittliche Anzahl der Verdopplungen (PDL, pro drei Tage) für wtp53 MEF 1,7 bei 21% Sauerstoff und 1,6 bei 5% Sauerstoff. Die p53-null MEF zeigten bei den unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen kaum Unterschiede in den Generationszahlen (2,6 bei 21% O₂ und 2,4 bei 5% O₂), teilten sich jedoch schneller als die wtp53 MEF (Daten nicht dargestellt). Die Verdopplungszeit (PDT), die während der exponentiellen Wachstumsphase berechnet wurde, betrug mit 41,2 h (21% O₂) bzw. 42,2 h (5% O₂) für wtp53 MEF fast das 2-fache im Vergleich zu p53-null MEF mit 26,1 h (21% O₂) bzw. 29,9 h (5% O₂) (hier nicht dargestellt). Nach 5 Passagen verringerte sich die Wachstumsrate der wtp53 MEF bis sie in einen Seneszenz-ähnlichen Zustand gelangten, der vor allem bei 21% Sauerstoff sehr ausgeprägt war (PDL < 0). Der Anteil an Zellen mit morphologisch seneszentem Phänotyp (vakuolisiertes Zytoplasma, vergrößerte Zellen mit großem Nukleus) nahm mit der Passagenzahl zu (hier nicht dargestellt). Die Generationszahl der bei 21% Sauerstoff kultivierten wtp53 MEF zeigte von Tag 21 bis Tag 51 negative Werte, was vermutlich auf ein Absterben der Zellen zurückzuführen ist. Interessanterweise konnte eine verringerte Sauerstoffkonzentration das Eintreten von wtp53 MEF in die Seneszenz (ab Tag 21) vermindern was an den höheren PDL-Werten sichtbar wird. Die Wachstumsrate der MEF bei 5% O₂ und 21% O₂ stieg etwa zum gleichen Zeitpunkt (Tag 55) wieder an, was sich auch in der Generationszahl widerspiegelte, die sich bei 21% O₂ auf einen Wert von 1,1 bzw. bei 5% auf einen Wert von 1,3 einpendelte. Es konnten somit einige Zellen der

Seneszenz entkommen und einen immortalen Phänotyp annehmen.

Wie auch schon in der Literatur gezeigt, führte die Kultivierung von primären Balb/c wtp53 MEF unter den beschriebenen Bedingungen nach 15 bis 20 Tagen zu einer Seneszenz der Fibroblasten (Todaro & Green 1963). Eine geringere Sauerstoffkonzentration wirkte sich positiv auf die Kultivierung der wtp53 MEF aus, was sich in einer Verlängerung der Lebensdauer zeigte. Zudem ließ sich anhand der PDL-Werte erkennen, dass der exogene Stress, der durch die atmosphärische Sauerstoffkonzentration ausgelöst wurde (negative PDL-Werte), durch die Kultivierung der MEF bei 5% Sauerstoff vermindert werden konnte.

p53-null MEF zeigten im Gegensatz zu wtp53 MEF kaum eine Veränderung in ihren Wachstumseigenschaften (Daten nicht gezeigt). Die durchschnittliche Generationszahl über 62 Tage betrug 2,5 ($\pm 0,4$) bei Kultivierung bei 21% Sauerstoff und 2,0 ($\pm 0,3$) bei 5% Sauerstoff. Die p53-null MEF haben einen geringen Wachstumsvorteil bei atmosphärischem (21% O₂) Sauerstoffgehalt. Die p53-null Fibroblasten wiesen hinsichtlich ihrer Morphologie keine Unterschiede bei 21% O₂ und 5% O₂ auf, und der seneszente Phänotyp war kaum zu erkennen. Ein eindeutiger Wachstumsarrest war bei der Kultivierung der p53-defizienten MEF nicht zu beobachten, und wie schon beschrieben wurde immortalisieren diese Zellen spontan (Harvey *et al.*, 1993).

Die spontan immortalisierten wtp53 Fibroblasten wurden im weiteren Verlauf als MEF20 (21% Sauerstoff) und MEF5 (5% Sauerstoff) bezeichnet. Es handelt sich hierbei nicht um selektionierte Klone sondern um heterogene Populationen, typisch für das 3T3-Protokoll. In Abbildung 9 ist zunächst das Wachstumsverhalten der MEF20 und MEF5 Zellen der Passage 29 dargestellt, sowie der Kontrollzelllinie FTE3. Die wtp53-exprimierende FTE3 Zelllinie wurden ebenfalls aus Balb/c MEF nach dem 3T3 Schema etabliert (Tiemann & Deppert 1994a) und zeigen die gleichen Eigenschaften wie die original Balb/c 3T3 Zelllinie (siehe 2.1).

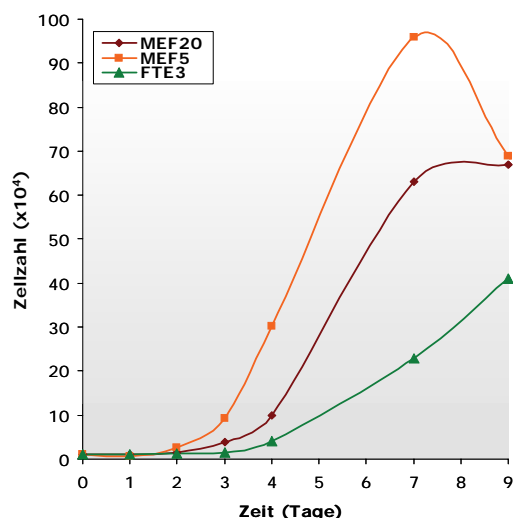


Abbildung 9: Proliferationsverhalten der spontan immortalisierten MEF5 und MEF20 im Vergleich zu wtp53-exprimierenden immortalen MEF. 1×10^4 Zellen der Passage 29 wurden in 6well Kulturschalen in DMEM/10% FCS ausplattiert und lebende Zellen wurden alle 24-48 h mit der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die gemittelten Gesamtzellzahlen aus zwei Vertiefungen sind dargestellt. Immortale FTE3 Zellen dienen als wtp53 Kontroll-Zelllinie.

Für die Wachstumskurve wurden 1×10^4 MEF5, MEF20 und FTE3 Zellen in 6well Kulturschalen ausgesät und über 9 Tage bei den jeweiligen Sauerstoffkonzentrationen kultiviert. Die FTE3 Zellen wurden bei 21% O₂ inkubiert. Nach der Adaptionphase der Fibroblasten, die vergleichbar lang

andauerte, folgte die exponentielle Phase. Es wurde deutlich, dass MEF5 eine erhöhte Proliferation aufweisen und im Vergleich zu MEF20 und vor allem zu FTE3 Zellen zu einer höheren Sättigungsdichte heranwachsen können. Die Plateauphase wurde bei den MEF5 und MEF20 Fibroblasten nach 7 Tagen erreicht, während die FTE3 Zellen aufgrund des verlangsamten Wachstums nach 9 Tagen diese stationäre Proliferationsphase noch nicht erreicht hatten. Die spontane Immortalisierung der Balb/c MEF in dieser Arbeit führte zu zellulären Veränderungen, die sich in einem verstärkten Proliferationsverhalten gegenüber FTE3 Zellen zeigten. Da MEF5 und MEF20 Zellen bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen während der Aufnahme der Wachstumskurve kultiviert wurden, könnten die Unterschiede in der Proliferation auch daher resultieren.

1.2 Analyse der p53-Expression in MEF5 und MEF20 Zellen auf Proteinebene

Die erhöhte Proliferationskapazität der MEF5 und MEF20 Zellen (Abbildung 9) könnte auf einen Verlust oder eine Mutation von *p53* zurückzuführen sein, da *wtp53* eine Hauptfunktion in der Zellzyklusregulation hat. Kamijo *et al.* (1997) konnten zeigen, dass MEF, die bei 21% Sauerstoff kultiviert werden und spontan immortalisieren, meist die *p53*-Funktion durch Mutationen im *p53*-Gen verlieren. *wtp53* kann in normalen, nicht gestressten Zellen aufgrund seiner geringen Halbwertszeit von ca. 20 min kaum nachgewiesen werden (Levine *et al.*, 1991). Durch einen Aminosäure-Austausch mutiertes *p53* hingegen, für das die Expression eines Proteins in voller Länge typisch ist, weist in den meisten Fällen eine verlängerte Halbwertszeit von 1 bis 24 h auf und wird dadurch immunbiochemisch detektierbar (Lane & Benchimol 1990; Soussi 2005).

In Western-Blot-Analysen sollte deshalb zunächst die Expression von *p53* auf Proteinebene analysiert werden. Das *p53*-Zielgen, *p21^{Waf1/Cip1}*, und das Tumorsuppressor-Gen *p16^{INK4a}*, das ebenfalls häufig von Mutationen während der spontanen Immortalisierung betroffen ist, wurden in die Untersuchungen mit einbezogen. Die analysierten Gesamtzellextrakte stammen von MEF unterschiedlicher Passagen (P2 - P21), die bei 5% O₂ und 21% O₂ kultiviert wurden. Aufgrund der überwiegend seneszenten Kultur der *wtp53* MEF bei atmosphärischem Sauerstoffgehalt konnten von Fibroblasten der Passagen 14 und 16 keine Proben entnommen werden.

Die Western-Blot-Analyse in Abbildung 10 zeigt, dass *p53* in den ersten Passagen der MEF biochemisch nicht nachweisbar war, jedoch in Passage 21 deutlich akkumulierte. Dies konnte mit zwei spezifischen Antikörpern gegen *p53* detektiert werden. Parallel wurden indirekte Immunfluoreszenzfärbungen der Fibroblasten durchgeführt, bei denen in den ersten Passagen der Zellen nur vereinzelt (<1%) eine schwache *p53*-Färbung detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Auffallend in Passage 21 war auch der gleichzeitige Verlust einer detektierbaren *p21^{Waf1/Cip1}*-Menge, welches in den niedrigeren Passagen deutlich detektierbar war und in seiner Menge bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen leicht variierte. Eine Sauerstoffreduktion führte zu einer geringeren Menge an *p21^{Waf1/Cip1}*. Der Tumorsuppressor *p53* transaktiviert *p21^{Waf1/Cip1}* bei zytotoxischem Stress um einen Übergang der Zellen von der G1- in die S-Phase durch Arretierung der Zellproliferation zu verhindern (el-Deiry *et al.*, 1993; Harper *et al.*, 1993). Die erhöhte *p21^{Waf1/Cip1}*-Menge bei 21% O₂ ist somit ein Indiz dafür, dass atmosphärische

Sauerstoffkonzentrationen eine stärkere Stressantwort von p53 auslösen. Ab Passage 21 konnte, parallel zur Zunahme der p53-Menge, kein p21^{Waf1/Cip1} mehr detektiert werden. Es wurde bereits beschrieben, dass mutiertes p53 aufgrund der fehlenden DNA-Bindung die Transaktivierungsfunktion verloren hat (Cho *et al.*, 1994). Die nicht-detektierbare p21^{Waf1/Cip1} Menge in Passage 21 könnte, trotz hochreguliertem p53, somit ein Hinweis auf eine Mutation im p53-Gen sein.

Aus Abbildung 10 wird auch eine Passagen-abhängige p16^{INK4a}-Akkumulation während der Kultivierung deutlich, die unabhängig von der O₂-Konzentration zu sein scheint. Dies konnte bereits von Zindy *et al.* gezeigt werden (Zindy *et al.*, 1997). Eine Mutation von p16^{INK4a} wurde dabei nicht in Betracht gezogen. Da die Balb/c MEF bei Passage 21 bereits immortal waren, scheint eine p16^{INK4a}-abhängige Aufrechterhaltung der Seneszenz bei der Immortalisierung hier nicht von Bedeutung zu sein.

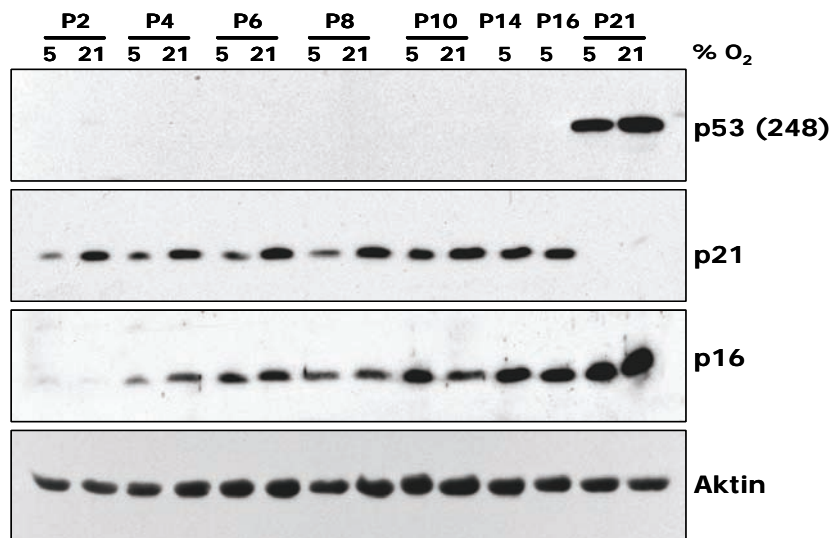


Abbildung 10: Western-Blot-Analyse der MEF aus unterschiedlichen Passagen, die bei 5% und 21% O₂ kultiviert wurden. Der p53-(PAb248), p21- und p16-(M156) Gehalt der Zellen (50 µg Gesamtprotein) während kontinuierlicher Passage (P2-P21) wurde auf einem 13%igen SDS-Gel anhand Western-Blot-Analysen untersucht. Aktin diente als Ladekontrolle.

Zur Analyse der Lokalisation von akkumuliertem p53, welche die Western-Blot-Analyse deutlich zeigt, wurden indirekte Immunfluoreszenzfärbungen der MEF weiterer Passagen durchgeführt. Exemplarisch sind mikroskopische Aufnahmen der MEF5 und MEF20 Zellen der Passage 23, sowie wtp53 MEF der Passage 6 in Abbildung 11 dargestellt. Mit einem p53-spezifischen Antikörper konnte die nukleäre Akkumulation des p53-Proteins detektiert werden. Man sieht deutlich, dass das p53-Expressionsmuster innerhalb der MEF5 bzw. MEF20 Population heterogen ist. Dieses Ergebnis konnte auch durch Färbungen von MEF5 und MEF20 Fibroblasten späterer Passagen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

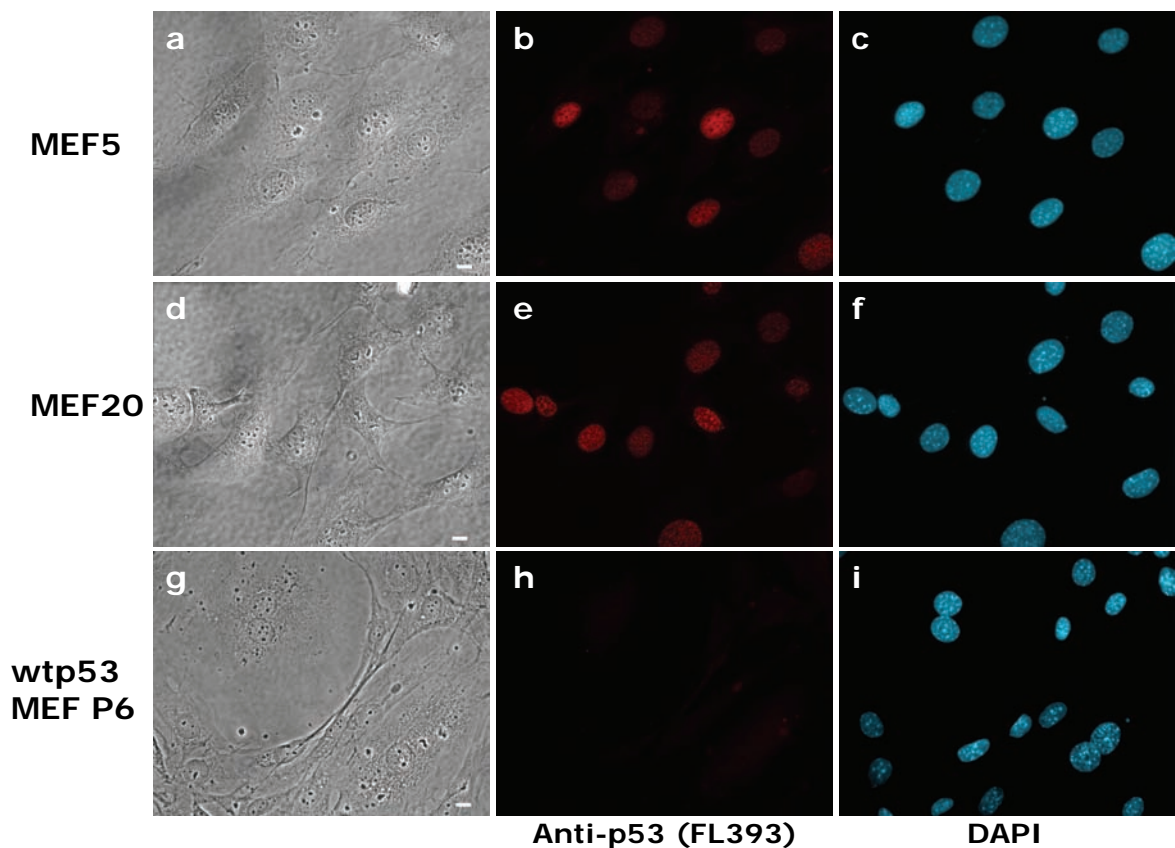


Abbildung 11: p53-Expression in MEF5 und MEF20 der Passage 23. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung der MEF5 und MEF20 Zellen nach Fixierung in Aceton (-20°C). p53 (FL393) ist in rot dargestellt und das Chromatin (DAPI) in blau. Die Phasenkontrastbilder dienen der Veranschaulichung der Morphologie. wtp53 MEF der Passage 6 (P6) exprimieren wtp53 in geringen Mengen, die nicht mittels IF nachgewiesen werden konnten. Längenmaßstab: 10 µm.

In verschiedenen Analysen konnte bereits gezeigt werden, dass eine stabile Kernexpression von p53 ohne akute Stressinduktion mit dem Mutationsstatus korreliert (Marks *et al.*, 1991; Soussi & Beroud 2001). p53-Konformationsmutanten zeigen eine veränderte Tertiärstruktur und lassen sich mit konformationsspezifischen Antikörpern nachweisen, wohingegen Kontaktmutanten dadurch nicht detektierbar sind (Milner 1994).

In einem nächsten Schritt wurde daher die Konformation [³⁵S]-markierter p53-Proteine in MEF5 und MEF20 Zellen der Passage 30 durch Immunpräzipitation von p53 mit konformationsspezifischen Antikörpern analysiert (Abbildung 12). p53-Konformationsmutanten können mit dem Antikörper PAb240 im nicht-denaturierten Zustand detektiert werden (Cho *et al.*, 1994). wtp53 sowie Kontakt-Mutanten können mit diesem Antikörper nicht nachgewiesen werden, hierfür wurde PAb246 verwendet (Yewdell *et al.*, 1986). Es wurden gleiche Mengen von Gesamtzellextrakt und Antikörper eingesetzt. Letzteres wurde über eine Coomassie-Färbung kontrolliert (Daten nicht gezeigt).

p53 aus Balb/c 3T3 Zellen präzipitierte wie angenommen nur mit dem für wtp53-spezifischen Antikörper. In MEF20 lag neu synthetisiertes p53 hauptsächlich in Wildtyp-Konformation vor. MEF5 Zellen zeigten bei Immunpräzipitation mit PAb246 eine sehr schwache Bande. Es lag mehr p53 in

Mutanten-Konformation vor. Die Ergebnisse aus Abbildung 12 lassen vermuten, dass die MEF5 Zellen aus zwei Populationen bestehen: einer geringen wtp53- oder mutp53-Zellpopulation in Wildtyp-Konformation und einer in Mutanten-Konformation.

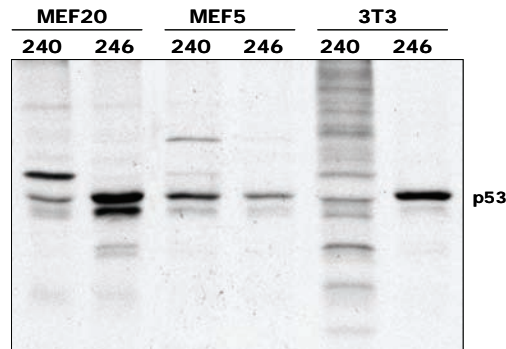


Abbildung 12: Expression von p53 in Wildtyp- und Mutanten Konformation. MEF5, MEF20 der Passage 30 und Balb/c 3T3 Zellen wurden auf 15 cm Kulturschalen kultiviert. *De novo* synthetisierte Proteine wurden für 1 h mit 100 μ Ci [35 S]-Methionin/Cystein markiert. 160 μ g Protein wurde für die Immunpräzipitation mit folgenden Antikörpern eingesetzt: PAb240 und PAb246. Nach Auftrennung der Proteine auf einem 12%igen SDS-Gel wurden sie mittels Autoradiographie sichtbar gemacht.

1.3 Mutationsanalyse von p53 in MEF5 und MEF20 Fibroblasten

Im Folgenden wurden Mutationsanalysen des *p53*-Gens durchgeführt, um zu überprüfen ob es sich bei dem stabilisierten p53 in MEF5 und MEF20 Zellen (Abbildung 10) um mutiertes p53 handelte. Hierfür wurde die Gesamt-RNA aus MEF5 und MEF20 Zellen der Passage 23 und als Kontrolle aus den ursprünglichen primären wtp53 MEF isoliert und in cDNA transkribiert. Durch spezifische Primer (*E1b* und *1270*), die im Exon I und im 3' Bereich von *p53* binden, wurde die gesamte *p53* cDNA amplifiziert (1380 bp). Um die Fehlerrate bei der Amplifikation möglichst gering zu halten erfolgte die PCR mit der *PhusionTM High-Fidelity* DNA-Polymerase. Es wurden zwei unabhängige Sequenzierreaktionen durchgeführt, in denen die Sequenzierprimer so gewählt wurden, dass die gesamte cDNA von Exon II bis XI auf Mutationen analysiert werden konnte (Abbildung 13A). *p53*-Introne wurden nicht untersucht.

Die Mutationsanalysen der MEF, die bei 21% und 5% O₂ spontan immortalisierten, zeigten in den 10 untersuchten *p53*-Exons eine *missense*-Punktmutation die zum Austausch einer Aminosäure führt (Abbildung 13B). Diese konnten in zwei unabhängigen Sequenzierungen mit je zwei unterschiedlichen Primern bestätigt werden. In MEF20 Zellen wurde in Exon VIII, Codon 273, eine homozygote Mutation von **GCC** \rightarrow **GGC** gefunden, die mit einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Glycin einhergeht. MEF5 Zellen wiesen eine Mutation in Exon V auf. In Codon 149 war die Mutation **CCA** \rightarrow **GCA** erkennbar, die zu einem Ersatz von Prolin durch Alanin führte. Zusätzlich war aber noch die Original-Base Cytosin in dem Chromatogramm erkennbar. Es könnte sich einerseits um eine heterozygote Mutation handeln, oder aber eine heterogene Population an MEF5 Zellen widerspiegeln, bestehend aus einer Subpopulation mit wtp53-Genotyp, und einer Subpopulation mit einer Mutation im Codon 149. Da bei der spontanen Immortalisierung der wtp53 MEF keine Einzelklone selektiert wurden, könnte eine Mischpopulation in der Passage 23 durchaus noch vorhanden gewesen sein. Eine erneute Mutationsanalyse von Zellen der Passage 35

konnte die Mutationen im *p53*-Gen der MEF20 und MEF5 Fibroblasten bestätigen (Daten nicht gezeigt).

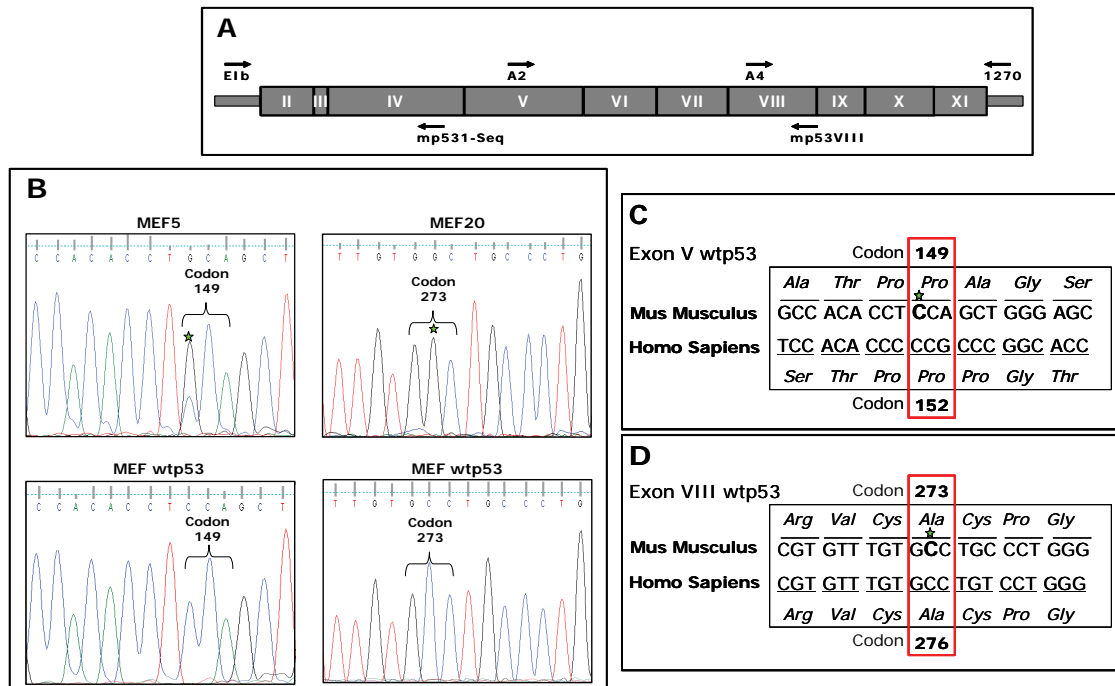


Abbildung 13: Mutationsanalyse der MEF20 und MEF5 Zellen (Passage 23). (A) Schema der *p53* cDNA. Die Lage der Sequenzierprimer ist gekennzeichnet. (B) Chromatogramm-Ausschnitt der Mutationsstellen in MEF20 und MEF5 und im Vergleich dazu Ausschnitte der primären wtp53 MEF. MEF5: an Position 69401944 befinden sich die Original-Base Cytosin und die mutierte Base Guanin. MEF20: An Position 69403118 befindet sich die Base Guanin statt Cytosin. (C) und (D) Vergleich der humanen und murinen *p53*-Sequenzen im Bereich der Mutationen der MEF5 und MEF20 Fibroblasten. (C) Dargestellt ist der Ausschnitt 69401935 – 69401955 von Chromosom 11 (*Mus Musculus*) und 7519176 – 7519196 von Chromosom 17 (*Homo Sapiens*). Das murine *p53*-Codon 149 entspricht dem humanen Codon 152 und kodiert für die Aminosäure Prolin. (D) Dargestellt ist der Ausschnitt 69403109 – 69403129 von Chromosom 11 (*Mus Musculus*) und 7517840 – 7517860 von Chromosom 17 (*Homo Sapiens*). Das murine *p53*-Codon 273 entspricht dem humanen Codon 276 und kodiert für die Aminosäure Alanin. Das Sternchen markiert jeweils die Punktmutation, die zu einem Aminosäure-Austausch führt. Die Auswertung erfolgte anhand folgender Sequenzen des UCSC (*University of California, Santa Cruz*) *Genome Browser*: murines *p53* (X01237), humanes *p53* (NM_000546).

Die detektierten Punktmutationen liegen in der DNA-Bindedomäne (DBD, AS 102 und 292) von *p53*, die auch in der Literatur als meist betroffener Angriffspunkt von Mutationen in humanen Tumoren beschrieben wurde (Hollstein *et al.*, 1991; Hainaut *et al.*, 1997). Im Bereich der detektierten Mutation der MEF20 Zellen war eine Homologie von 99% bezüglich der Basenabfolge und der Aminosäure zwischen murinem und humanem *p53* gegeben (Alanin zu Glycin). Das murine Codon 273 entspricht dem humanen Codon 276, da das murine *p53* drei Aminosäuren kürzer ist als das humane *p53* (390 AS). Die mutierte Base in den MEF5 Zellen war ebenfalls homolog zu der humanen *p53* Sequenz und auch hier war die gleiche Aminosäure (Prolin zu Alanin) von dem Austausch betroffen (Abbildung 13C, 13D). Die aufgetretenen Mutationen in den Balb/c MEF spiegeln somit die Mutationsfrequenz in der *p53*-DBD humaner Tumore wider.

Bei der hier gezeigten spontanen Immortalisierung von primären Balb/c MEF nach dem 3T3-Schema kam es, unabhängig von der Sauerstoffkonzentration, während der Kultivierung zur Punktmutation in essentiellen Bereichen von *p53*, die auch in humanen Tumoren zu detektieren sind (IARC TP53 Datenbank, www-p53.iarc.fr). Dabei setzte sich jeweils nur eine detektierbare

Mutation durch. Der geringere oxidative Stress, der für 5% O₂ postuliert wird (Parrinello *et al.*, 2003; Roy *et al.*, 2003) konnte somit eine Veränderung im *p53*-Gen nicht verhindern.

1.4 Verlust bzw. Verringerung der wtp53-Transaktivatorfunktion in MEF5 und MEF20 Fibroblasten

Die Transaktivierung von *p53*-abhängigen Zielgenen (*Mdm2*, *GADD45*, *p21^{Waf1/Cip1}*) erfolgt nach Aktivierung von *p53* durch Stresssignale, wie z.B. Chemotherapeutika, Hypoxie, ionisierende oder UV-Strahlung oder aktivierende Onkogene (c-myc, E1A) (Jin & Levine 2001). Die Aktivierung von z.B. *p21^{Waf1/Cip1}* durch *p53* leitet den Wachstumsarrest ein, die DNA kann auf Schäden überprüft und gegebenenfalls repariert werden (el-Deiry *et al.*, 1993). In Zellen mit mutp53 ist diese transkriptionelle Funktion von *p53* überhaupt nicht oder nur eingeschränkt vorhanden. Dies konnte auch nach Bestrahlung der MEF5 und MEF20 Fibroblasten detektiert werden.

MEF5 und MEF20 Fibroblasten der Passage 38 wurden mit 20 Gy Gamma-Bestrahlung geschädigt und bereits nach 4 h analysiert, da die Transaktivierung von *p21^{Waf1/Cip1}* und *Mdm2* ein sehr schneller *p53*-abhängiger zellulärer Prozess ist.

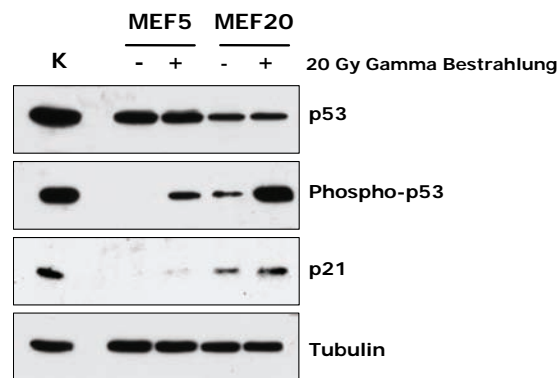


Abbildung 14: Analyse der *p53*-Antwort nach DNA-Schädigung durch Bestrahlung in MEF5 und MEF20 Fibroblasten auf Proteinebene. Die Zellen der Passage 38 wurden mit 20 Gy Gamma bestrahlt (15 cm Kulturschalen) und 4 h später geerntet. 70 µg Lysat wurden auf ein 13%iges SDS-Gel aufgetragen. Gezeigt sind die Resultate des Western-Blot mit den spezifischen Antikörpern *p53* (FL393), Phospho-*p53*, und *p21*. Tubulin diente als Ladekontrolle. K: Kontroll-Lysat von E1SV2 Zellen (SV40 transformierte MEF).

Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, wurde in MEF5 Fibroblasten durch DNA-Schädigung *p21^{Waf1/Cip1}* nur schwach induziert. Im Gegensatz dazu führte die Aktivierung von *p53* in MEF20 Zellen zu einer gesteigerten Akkumulation der *p21^{Waf1/Cip1}*-Menge. Eine Transaktivierung von *p21^{Waf1/Cip1}* durch mutiertes *p53* ist keine Seltenheit und für einige Mutationen gezeigt worden (Blagosklonny 2000). Nach DNA-Schädigung ist auch in beiden Populationen eine Phosphorylierung von *p53* an Serin18 (human: Serin15) detektierbar, die jedoch variierte. MEF5 Zellen zeigten im nicht-induzierten Zustand kein phosphoryliertes *p53* im Gegensatz zu MEF20 Zellen. Bei MEF20 Zellen wurde nach Gamma-Bestrahlung eine starke Akkumulation von phosphoryliertem *p53* detektiert, die Gesamtmenge an *p53* stieg jedoch nicht an. Auch in MEF5 Zellen war die Menge an Gesamt-*p53* nach Gamma-Bestrahlung nicht erhöht; insgesamt war aber die Menge an Gesamt-*p53* in MEF5 Zellen höher als in MEF20 Fibroblasten. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von *p53* von der Fähigkeit abhängig ist eine Wildtyp-Konformation anzunehmen

(Ullrich *et al.*, 1992). Dies ist vereinbar mit den Ergebnissen der Konformationsanalyse (siehe Abbildung 12), die für p53 in MEF20 Zellen eine deutliche Wildtyp-Konformation zeigt. Bei p53 in MEF5 Zellen dominiert hingegen die Mutanten-Konformation. Die Ubiquitinligase Mdm2 konnte in beiden Populationen nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass mutp53 in den MEF5 und MEF20 Zellen, bezüglich *Mdm2*, transkriptionell inaktiv ist.

In weiteren Experimenten wurde in MEF5 und MEF20 Zellen die Apoptose-Induktion durch Gamma-Bestrahlung mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse untersucht. Die angewandte Sub-G1 Peak-Analyse basiert auf der Tatsache, dass der DNA-Gehalt apoptotischer Zellen, unterhalb des DNA-Gehalts einer Zelle in der G1-Phase liegt (hypodiploid) (Nicoletti *et al.*, 1991; Fraker *et al.*, 1995). MEF der 25. Passage sowie 10-1 und 3T3 Zellen wurden mit 20 Gy bestrahlt, 24 h später geerntet und für die FACS Analyse fixiert. Es ist bekannt, dass Mausfibroblasten abhängig von ihrem p53 Status unterschiedlich auf diese Schädigung reagieren (Speidel *et al.*, 2006). Während wtp53 Zellen vor Apoptose geschützt sind und in einen seneszenten Zustand übergehen, werden p53-null Zellen sowie mutp53 Zellen durch ein p53-unabhängiges apoptotisches Programm eliminiert.

Abbildung 15A zeigt deutlich, dass die Schädigung der Zellen durch 20 Gy Gamma-Bestrahlung in den p53-defizienten 10-1 Zellen vermehrt zur DNA-Fragmentierung führte. MEF20 Zellen zeigten ein sehr ähnliches Bild. Diese Ergebnisse konnten auch durch indirekte Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt werden, die eine Kernfragmentierung zeigten (Daten nicht gezeigt). wtp53-exprimierende Zellen (3T3) hingegen zeigten nach Bestrahlung mit 20 Gy eine geringere Anzahl apoptotischer Zellen. Die S-Phase Population nahm ab und die Zellen akkumulierten in der G1-Phase (2n) und der G2/M-Phase (4n). MEF5 Zellen zeigten eine Antwort auf die Bestrahlung, die der Antwort der 3T3 Zellen gleich kam. Die Anzahl der Zellen mit fragmentierter DNA war hier noch geringer.

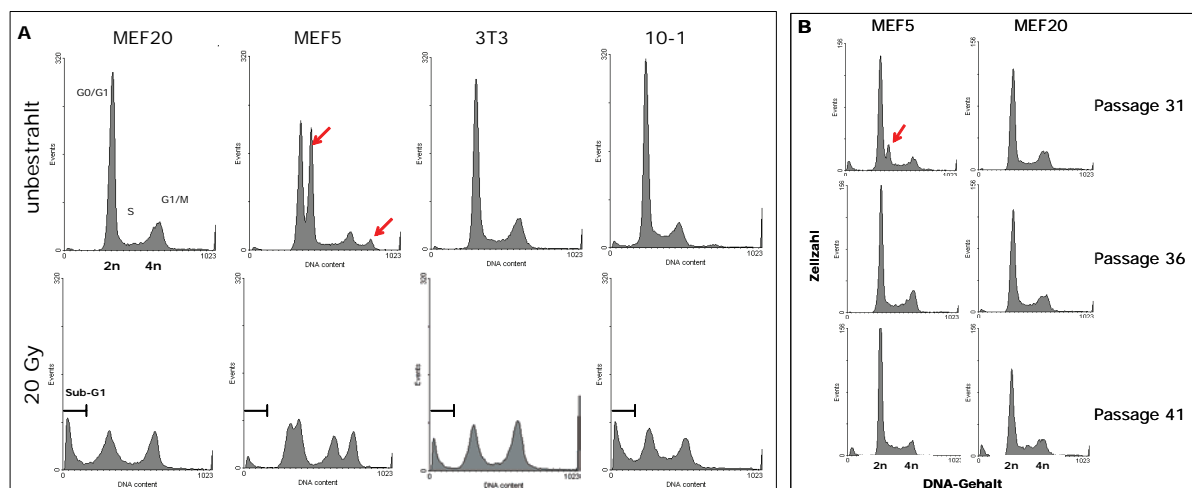


Abbildung 15: Zellzyklusprofil von MEF5 und MEF20 Zellen. (A) Zellzyklusprofil unbestrahlter und mit 20 Gy Gamma-Bestrahlung behandelter Zellen der Passage 25. Die asynchron wachsenden Zellen wurden 24 h kultiviert, mit 20 Gy bestrahlt, weitere 24 h später mit Ethanol fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Es wurden je 20000 Zellen mit dem Durchflusszytometer analysiert. Ordinate: Zellzahl; Abszisse: DNA-Gehalt pro Zelle. Der Sub-G1 Peak (apoptotische Zellen) ist dargestellt. Der rote Pfeil markiert einen „doppelten“ G1- bzw. G2-Peak. **(B)** Die asynchron wachsenden Zellen unterschiedlicher Passagen (31, 36, 41) wurden 48 h bei Standardbedingungen kultiviert und anschließend mit Ethanol fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Es wurden je 10000 Zellen mit dem Durchflusszytometer analysiert. Ordinate: Zellzahl; Abszisse: DNA-Gehalt pro Zelle.

Auffallend an dem Zellzyklusprofil der MEF5 Zellen waren die „doppelten“ G1 und G2 Peaks. Die beiden Haupt-Peaks bestehen aus Zellen mit G0/G1-Phase DNA-Gehalt, die deutlich geringer ausgeprägten Peaks stellen die Zellen dar, die sich in G2- bzw. der Mitose-Phase befinden. Die rechts gelegenen Peaks (roter Pfeil) hatten einen anormalen DNA-Gehalt $>2n$ bzw. $>4n$ (n =einfacher Chromosomensatz). Dieses Phänomen wird allgemein als Aneuploidie bezeichnet, welche häufig in Tumorzellen zu detektieren ist. Da während der spontanen Immortalisierung auch chromosomale Veränderung auftreten können und Zelllinien häufig aneuploid sind (z.B. Balb/c 3T3 Zellen), können bei der Immortalisierung der MEF parallel zwei Populationen mit unterschiedlichem DNA-Gehalt entstanden sein. Um die zwei Zellpopulationen der MEF5 Zellen näher zu analysieren, wurden zusätzlich die in Abbildung 15B gezeigten DNA-Gehalt Analysen der Zellen zu unterschiedlichen Passagen durchgeführt. Es ist deutlich zu sehen, dass die doppelten G1 und G2 Peaks der MEF5 Zellen, die bei Passage 31 noch leicht zu erkennen waren, durch weitere Kultivierung verloren gingen. Dies ist ein Hinweis drauf, dass eine Population während der Kultivierung überhand gewinnt und die andere Population überwächst.

1.5 MEF5 und MEF20 Fibroblasten sind nicht phänotypisch transformiert

In MEF5 und MEF20 Zellen hatte das mutierte p53 keine bzw. nur eine eingeschränkte transkriptionelle Aktivität. Neben diesem *loss of function* wurde für einige mutp53-Proteine auch ein Gewinn an neuer Funktionen (*gain of function*) postuliert, wie z.B. einen Proliferationsvorteil (Dittmer *et al.*, 1993), welche zur zellulären malignen Transformation beitragen können (Deppert *et al.*, 2000; Sigal & Rotter 2000). Das schnellere Wachstum der MEF5 und MEF20 Fibroblasten im Vergleich zu wtp53-exprimierende Zellen könnte ein Hinweis dafür sein (Abbildung 9). Die Wachstumsanalyse der Zellen in Weichagar (im Folgenden als Softagar bezeichnet) sollte klären, ob MEF5 bzw. MEF20 Zellen einen Funktionsgewinn durch das mutp53 erfahren haben, und ob die Zellen nur minimal oder bereits intermediär transformiert waren (Baserga 1997). Der Softagar-Assay wird als vergleichbar stringenter *in vitro* Versuch zur Tumorentstehung *in vivo* nach Injektion tumorigener Zellen in Mäuse angesehen. Transformierte Zellen benötigen für ihr Wachstum keine feste Oberfläche mehr (Substrat-Unabhängigkeit, *anchorage-independence*) und können in Softagar zu Kolonien heranwachsen.

MEF5 und MEF20 Fibroblasten wurden in geringer Zelldichte in Softagar ausplattiert und nach 20 Tagen auf Kolonienbildung untersucht. Als Positiv-Kontrolle dienten die durch SV40 volltransformierten SV3T3 Zellen (Sambrook *et al.*, 1968). Die Negativ-Kontrolle (wtp53 Zellen) ist hier nicht gezeigt, da diese Zellen nicht zu Kolonien im Softagar heranwachsen können. Aus wird ersichtlich, dass MEF5 und MEF20 Zellen nur Substrat-abhängig (*anchorage-dependent*) wachsen können. Im Vergleich zu den SV3T3 Zellen (Positiv-Kontrolle) waren bei den MEF5 und MEF20 Fibroblasten keine Kolonien sichtbar.

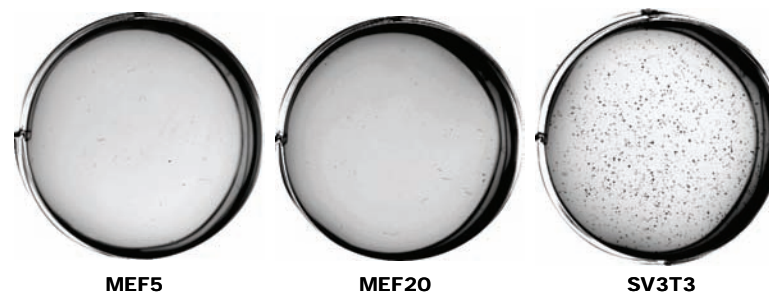


Abbildung 16: MEF5 und MEF20 Zellen (Passage 25) zeigen kein Wachstum im Softagar. Für den Transformationsversuch wurden 1×10^3 , 3×10^3 und 1×10^4 Zellen pro Vertiefung einer 6well Kulturschale in Softagar eingesät und 20 Tage bei Standardbedingungen kultiviert und mit Kristallviolett angefärbt. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse von 1×10^4 Zellen/well. Die SV40 transformierte Zelllinie SV3T3 diente als Positiv-Kontrolle. Die Versuche wurden in Duplikaten ausgeführt.

Die hier untersuchte spontane Immortalisierung von primären Balb/c MEF zeigte, dass unter speziellen Kulturbedingungen Mutationen im *p53*-Gen auftreten können und Zellen mit bestimmten *p53*-Mutationen einen Wachstumsvorteil haben. Der Verlust von p53 und seiner schützenden Funktion vor unkontrollierter Proliferation ist daher ein entscheidendes Ereignis in der spontanen Immortalisierung der Balb/c MEF. Die Kultivierung der Fibroblasten bei physiologischen Sauerstoffkonzentrationen (5% O₂) konnte diese Veränderung des Genoms nicht verhindern, der geringere oxidative Stress reduzierte aber das Ausmaß der zellulären Seneszenz. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Expression eines stabilen, nukleären mutp53 die zellphysiologischen Eigenschaften verändert. Dies äußerte sich in einer erhöhten Proliferation der Zellen und im Verlust der Transaktivatorfunktion von wtp53. Da jedoch die Fähigkeit des Substrat-unabhängigen Wachstums den Zellen durch diese Mutation noch nicht gegeben war sind die immortalisierten Zellen minimal und nicht intermediär transformiert. Um Eigenschaften einer intermediär bzw. vollständig transformierten Zelle zu erhalten, müssten Mutationen in weiteren, Tumor-fördernden Genen auftreten.

2 Der LT-p53 Komplex in der LT-induzierten Balb/c Zelltransformation

Im ersten Teil der Arbeit wurde gezeigt, dass der Verlust der tumorsupprimierenden Funktion von wtp53 zur spontanen Immortalisierung von Balb/c MEF führt. Der aufgetreten Proliferationsvorteil der mutp53-exprimierenden MEF5 und MEF20 Zellen erleichtert den Zellen weitere Mutationen zu akkumulieren. Die Immortalisierung stellt daher die mögliche Vorstufe zur malignen Transformation dar.

DNA-Viren bzw. deren viralen Onkogene schalten die tumorsupprimierende Wirkung von p53 aus indem sie p53 binden und, im Falle von HPV-16 und Ad5, degradieren (Scheffner *et al.*, 1990; Querido *et al.*, 2001). Dadurch erlangen sie mitunter eine Progression durch den Zellzyklus und verhindern das apoptotische Programm der Zelle. Interessanterweise wird p53 infolge einer SV40-Infektion stabilisiert und akkumuliert im Zellkern (Deppert & Haug 1986). Wie schon in der

Einleitung erwähnt wird p53 dadurch transkriptionell - in Bezug auf seine Zielgene - inaktiviert, jedoch lassen Ergebnisse einiger Studien andere p53-Funktionen im Komplex mit LT vermuten, die einen positiven Einfluss auf die Transformation haben. Zusätzlich zeigen Daten aus unserem Labor eine „helfende“ Funktion von p53 in der SV40-induzierten Zelltransformation (Ziegler, 1998; siehe 2.2).

Im Mittelpunkt des zweiten Teils der Arbeit sollte daher die Analyse dieser „neuen“ Rolle von p53 in der LT-vermittelten zellulären Transformation *in vitro* stehen. Diese postulierte positive p53-„Helferfunktion“ steht dabei im Gegensatz zur schützenden Rolle von p53 in der spontanen Immortalisierung. Zum Vergleich der LT-Expression in einem wtp53 Genotyp und einem p53-null Genotyp wurden die Zelllinien Balb/c 3T3 und 10-1 (siehe 2.1) verwendet, um eine Heterogenität der Population, wie sie in primären Zellkulturen auftritt, auszuschließen. Dabei wurde der Effekt von LT auf wtp53 untersucht und mögliche zusätzliche Einflüsse der frühen SV40-Proteine, st und 17kT, durch Verwendung einer LT-cDNA ausgeschlossen. Diese wurde über ein retrovirales Gentransfer-System stabil in die Zellen eingebracht. Die LT konstitutiv exprimierenden Zellen wurden in Kultur gehalten und die Effekte des p53-LT Komplexes auf Zellwachstum und Transformation untersucht.

2.1 Charakterisierung der immortalen Balb/c 3T3 und 10-1 Zelllinien

Die immortalen Zelllinien 3T3 und 10-1 sind aus primären Balb/c MEF nach dem 3T3-Schema etabliert worden (3×10^5 Zellen/6 cm, alle 3 Tage passagiert). In 3T3 Zellen (Aaronson & Todaro 1968) liegt p53 in geringen Mengen vor, welches phänotypisch und genotypisch Wildtyp-Charakter hat (Steinmeyer *et al.*, 1990; Tiemann *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu haben 10-1 Zellen bei der spontanen Immortalisierung eine Deletion im *p53*-Gen erfahren, was zu einem Verlust der p53-Expression führt (Harvey & Levine 1991). Weder 3T3 Zellen noch 10-1 Zellen sind tumorigen (Todaro & Aaronson 1969). Sie können keine Kolonien im Softagar bilden, weisen eine normale Kontaktinhibition auf und gelten daher als minimal transformiert (Zusammenfassung Tabelle 2). Mehrere Studien konnten zudem zeigen, dass eine Rekonstitution von wtp53 in 10-1 Zellen eine zelluläre Schadensantwort hervorruft, die der in endogen wtp53-exprimierende Zellen gleicht (Ruaro *et al.*, 1997; Sablina *et al.*, 1998; Yagi *et al.*, 2003). Auch im Hinblick auf ihre Transformierbarkeit durch SV40 unterscheiden sich 10-1 Zellen nach Rekonstruktion der p53-Expression nicht von 3T3 Zellen (siehe 2.2).

Tabelle 2: Vergleich der Zelllinien Balb/c 3T3 und 10-1

Eigenschaften	3T3	10-1
Ursprung	Balb/c MEF (3T3-Schema) (Aaronson and Todaro, 1968)	Balb/c MEF (3T3-Schema) (Harvey and Levine, 1991)
p53-Expression	wtp53 (phänotypisch und genotypisch)	p53-null (Deletionen der ersten 6 Exone in beiden Allelen)
Karyotyp	aneuploid	aneuploid
Immortalisierung	ja	ja
Tumorigenität in Soft-Agar bzw. immunsupprimierten Mäusen	nein	nein
Kontaktinhibition	ja	ja
Transformierbar durch	SV40, murines Sarkom-Virus	?
Serumabhängigkeit	ja	ja

Zur näheren Charakterisierung der Zelllinien in unserem Kultursystem wurde das Zytoskelett mit spezifischen Antikörpern angefärbt (Abbildung 17) und die Wachstumskinetik sowie die Antwort auf zellulären Schaden auf Proteinebene analysiert (Abbildung 18).

Das Aktin des formgebenden Mikrofilaments der Zelle kann durch einen an Phalloidin (Toxin des Grünen Knollenblätterpilzes, *Amanita phalloides*), gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff sichtbar gemacht werden.

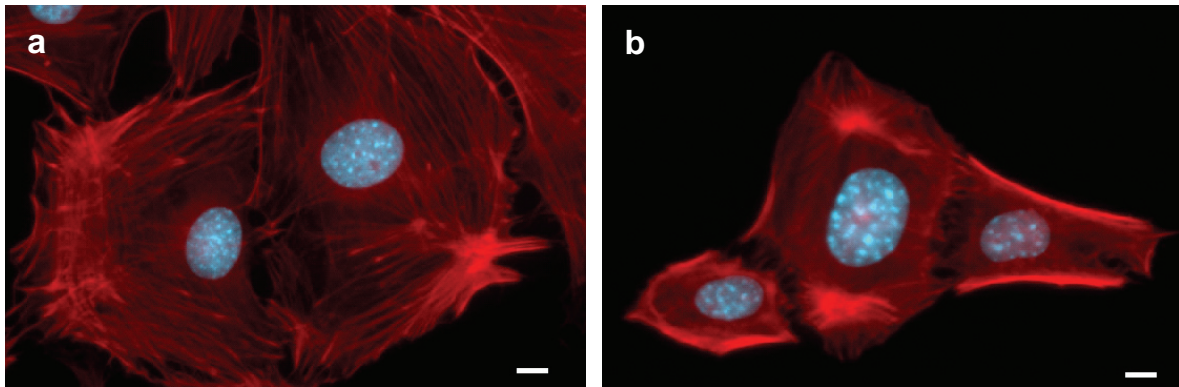


Abbildung 17: Vergleich der Morphologie von Balb/c 3T3 (a) und 10-1 (b) Zellen. Die Zellen wurden mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend doppelt gefärbt für F(filamentöses)-Aktin (Phalloidin-TRITC, rot) und DNA (DAPI, blau). Längenmaßstab: 10 μ m.

Im Zytoplasma der 3T3 Zellen kann man ein geordnetes Netzwerk der Aktinfilamente erkennen (Roger *et al.*, 2006). In den p53-null Zellen zeigt die Färbung des filamentösen Aktins eine eher diffuse Färbung. Die beiden Zelllinien weisen demnach leichte morphologische Veränderungen auf. 3T3 und 10-1 Zellen besitzen aber hinsichtlich der Kontaktinhibition, welche teilweise durch Ausbildung der fokalen Adhäsion über Aktin-Filamente zustande kommt, keine Unterschiede.

Die Wachstumskinetik wurde nicht anhand einer klassischen Wachstumskurve durchgeführt, sondern durch Analyse der Endzellzahlen, die nach 4 Tagen in Medium mit unterschiedlichem Serumgehalt (FCS) erreicht wurden. Hierfür wurden unterschiedliche Ausgangszellzahlen (50, 100, 1000, 5000, 10000) in eine 24well Kulturschale auf Deckgläschen ausplattiert und nach 4 Tagen anhand indirekter Immunfluoreszenz die Zellzahlen bestimmt. Bei einer Kultivierung mit 0,2% Serum wurde 12 h nach Ausplattieren in 10% FCS ein Mediumwechsel von 10% auf 0,2% FCS vorgenommen (Abbildung 18).

Anhand des Vergleichs der Wachstumskinetik der wtp53- und p53-null Zellen bei unterschiedlichem Serumgehalt wird deutlich, dass 10-1 Zellen bei 10% FCS einen Proliferationsvorteil gegenüber den 3T3 Zellen besitzen, der bei sehr geringen Serumkonzentrationen (0,2% FCS) jedoch vernachlässigbar ist. 10-1 Zellen sind trotz fehlender Wachstumskontrolle durch p53 immer noch serumabhängig. Es fällt vor allem auf, dass die Dichte der ausplattierten Zellen entscheidend für ihre Proliferation ist. So wachsen 3T3 Zellen bei niedriger Zellzahl schlechter als 10-1 Zellen. Erst bei einer Ausgangszellzahl von 1×10^4 Zellen erreichen beide Zelllinien nahezu identische Endzellzahlen.

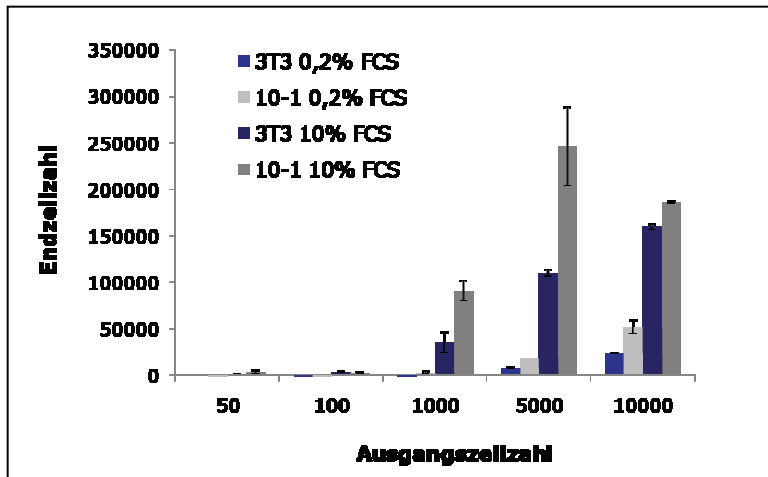


Abbildung 18: Vergleichende Wachstumsanalyse bei 0,2% und 10% Serumgehalt. Unterschiedliche Zellzahlen (Ausgangszellzahl) wurden in eine Vertiefung einer 24well Kulturschale auf Deckgläschen ausplattiert und für 12 h bei 10% Serumgehalt in DMEM inkubiert. Nach Wechsel des Mediums (0,2% bzw. 10% FCS) wurden die Zellen für weitere 92 h kultiviert. Die Deckgläschen wurden entnommen und nach Fixierung in Aceton (-20°C) mit DAPI (DNA) angefärbt. Die Endzellzahlen konnten anhand der Auszählung von mindestens 10 Feldern bestimmt werden, da das Deckgläschen (A = 1,13 cm²) fast die gesamte Kultivierungsfläche (A = 1,9 cm²) bedeckt. (Mikroskop 20x/0.50 HC PL Fluotar).

Für die Analyse der Schadensantwort wurden die Zellen mit 20 Gy Gamma-Bestrahlung geschädigt und die Proteinmenge von unterschiedlichen transkriptionellen p53-Zielgenen zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht.

In p53-negativen 10-1 Zellen war nach 20 Gy Gamma-Bestrahlung in der Western-Blot-Analyse kein p53 zu detektieren. Die fehlende Induktion von p53-abhängigen Proteinen (p21^{Waf1/Cip1}, Mdm2) war ein weiterer Beweis dafür, dass diese Zellen tatsächlich kein p53 exprimierten. In 3T3 Zellen führte die DNA-Schädigung zu einer Phosphorylierung von Serin18, einer gleichzeitigen Stabilisierung von p53 und zu einer Induktion der p53-Zielgene p21^{Waf1/Cip1} und Mdm2. Da Mdm2 in 3T3 Zellen amplifiziert vorliegt (Fakharzadeh *et al.*, 1991), war es auch ohne DNA-Schaden auf Proteinebene sichtbar. Eine Erhöhung der Menge an Mdm2 war im Western-Blot nach 5 h detektierbar. 3T3 Zellen zeigten somit eine für wtp53-Zellen normale Reaktion auf DNA-Schädigung.

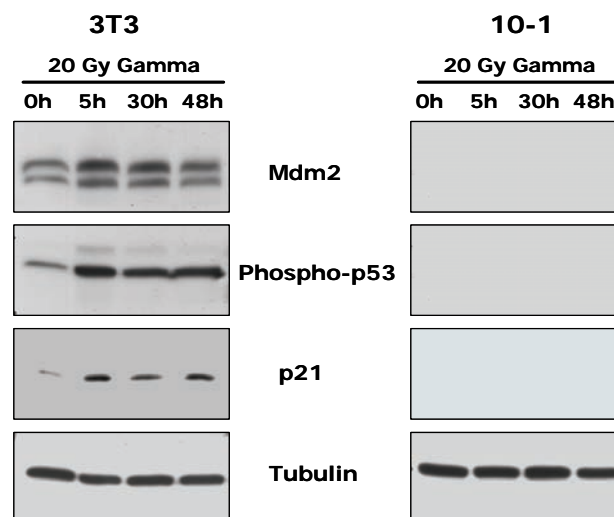


Abbildung 19: Vergleich der Schadensantwort von 10-1 und 3T3 Zellen nach Bestrahlung. Die Zellen wurden mit 20 Gy Gamma bestrahlt (15 cm Kulturschalen) und zu den angegebene Zeitpunkten geerntet. 80 µg Lysat wurden auf ein 13%iges SDS-Gel aufgetragen. Gezeigt sind die Resultate der Western-Blot-Analyse mit den spezifischen Antikörpern Mdm2, Phospho-p53, p21. Tubulin diente als Ladekontrolle.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass 3T3 Zellen einen normalen Phänotyp haben und trotz der Immortalisierung die erwarteten Reaktionen auf zellulären Stress zeigen. Ein Fehlen (10-1 Zellen) bzw. eine Mutation von p53 (MEF5, MEF20 Zellen) hat Auswirkungen auf die Zellphysiologie (Proliferation, Schadensantwort), jedoch bleibt ein normaler Phänotyp erhalten. Hinsichtlich transformationsrelevanter Eigenschaften sind die Zelllinien 3T3 und 10-1 vergleichbar und geeignet für die Untersuchung der Transformation induziert durch SV40 LT.

2.2 Zelluläre Transformation mit der gesamten SV40-frühen Region von Balb/c Fibroblasten

In unserem Labor wurden bereits Versuche bezüglich der Rolle des Tumorsuppressors p53 in der SV40-induzierten Zelltransformation durchgeführt (Ziegler, 1998). Durch Infektion von wtp53 (Balb/c 3T3) und p53-null (10-1) Zellen mit SV40 und der resultierenden Expression der frühen Gene *LT*, *st* und *17kT* wurde ein positiver Einfluss von p53 auf die Zelltransformation erkannt. Im Vergleich zu wtp53 Zellen war die Transformationseffizienz im Softagar von p53-null Zellen signifikant geringer. Eine ektope Expression der temperatursensitiven p53 Mutante $tsp53^{val135}$ (siehe 2.8) in 10-1 Zellen führt zu einer den 3T3-Zellen vergleichbaren Transformationseffizienz bei 39°C. $tsp53^{val135}$ liegt normalerweise bei 32°C (permissive Temperatur) in Wildtyp-Konformation vor und bei 39°C (nicht-permissive Temperatur) in Mutanten-Konformation. Im Komplex mit LT befindet sich $tsp53^{val135}$ bei 39°C jedoch hauptsächlich in der Wildtyp-Konformation, da LT monomeres p53 sofort nach dessen Synthese komplexiert und somit das thermolabile $tsp53$ stabilisiert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass wtp53, nicht aber mutp53, die Funktion eines auxilliären Onkogens in der SV40-vermittelten Transformation ausübt. Zusätzliche Versuche in primären MEF mit unterschiedlichem p53-Status konnten diese Daten ebenfalls bestätigen und zeigten eine reduzierte Transformationsrate in p53-null MEF. Da jedoch bereits gezeigt werden konnte, dass die natürlichen Spleißvarianten von *LT*, *st* und *17kT*, positiv auf die SV40 induzierte Transformation einwirken, kann man die erhöhte Transformationseffizienz nicht uneingeschränkt dem p53-LT Komplex zuschreiben. Um ausschließlich die onkogene Funktion von LT im Zusammenhang mit p53 zu analysieren, wurde das retrovirale System verwendet, in dem nur LT konstitutiv exprimiert wird.

Für die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen ist es wichtig festzuhalten, dass SV40 in p53-rekonstruierten 10-1 Zellen eine den 3T3 Zellen vergleichbare Transformationskompetenz hat wie in 3T3 Zellen. D.h., Ergebnisse aus den beiden Zellsystemen sind direkt vergleichbar; Unterschiede resultieren hauptsächlich aus der An- oder Abwesenheit von wtp53.

2.3 Etablierung stabil LT-exprimierender Balb/c Fibroblasten in einem wtp53 und p53-null Hintergrund zur Untersuchung des LT-p53-Komplexes

In einem ersten Schritt wurde die kodierende Sequenz von *LT* in einen retroviralen Vektor kloniert (pMYsIG), der als Reportergen zudem *GFP* (*Green Fluorescent Protein*) enthält (siehe Methoden 3.4.1). Das retrovirale System wurde verwendet, da es zu einer stabilen Integration der gewünschten Sequenz führt. Die klonierten Gene stehen dabei unter der Transkriptionskontrolle der viralen LTRs. In Abbildung 20 ist der Vektor schematisch dargestellt.



Abbildung 20: Schematische Darstellung des retroviralen LT-Konstruktes pMYcLT basierend auf pMYsIG (Kitamura *et al.*, 2003) mit der cDNA von LT aus pBABEzeo Large TcDNA (addgene). LTR: *long terminal repeat*, IRES: interne Ribosomeneintrittsstelle, GFP: *green fluorescent protein*.

Die beiden Gene sind durch eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES) voneinander getrennt. Dies ermöglicht, dass die beiden kodierten Proteine von einer mRNA exprimiert werden können, da die IRES die Initiation der mRNA Translation von einem internen Start AUG erlaubt. GFP dient als Selektionsmarker und als interne Kontrolle der Proteinmenge (Yuk *et al.*, 2002). Durch Co-Transfektion der rekombinanten retroviralen Vektoren (pMYcLT, pMYsIG) mit Helferplasmiden in die Verpackungszelllinie EcopackTM2-293 konnten infektiöse, replikationsinkompetente Viruspartikel erzeugt werden.

Die Infektion der Balb/c 3T3 (wtp53) und 10-1 (p53-null) Fibroblasten mit diesen Viren führte zur Integration des retroviralen Vektors und zur stabilen Expression von LT zusammen mit GFP. LT-exprimierende Zellen konnten durch das Reporterogen GFP mit Hilfe des Durchflusszytometers detektiert und durch Zellsortierung (FACS, *Fluorescence Activated Cell Sorting*) bis zu einer 98%igen Reinheit angereichert werden. Parallel zum LT-Expressionsvektor wurden auch Viren mit dem leeren Vektor (pMYsIG) hergestellt, mit denen ebenfalls 3T3 und 10-1 Fibroblasten infiziert wurden. Diese Zellen dienten als Negativ-Kontrollen in den Versuchen. Um den Einfluss der GFP- bzw. LT-Menge in den Versuchen berücksichtigen zu können, wurden die infizierten Zellen in zwei Fraktionen sortiert: stark GFP-exprimierende (S) und schwach GFP-exprimierende Zellen (W) (Tabelle 3).

Tabelle 3: Etablierte Zelllinien mit den Expressionsvektoren pMYcLT und pMYsIG

	Zelllinie	Ursprungszelllinie	Transgen
Kontroll-Zelllinien	10-1 IG	10-1 (p53-null)	GFP
	3T3 IG	3T3 (wtp53)	GFP
Stark GFP-exprimierende Zelllinien	10-1 LT S	10-1 (p53-null)	GFP und LT
	3T3 LT S	3T3 (wtp53)	GFP und LT
Schwach GFP-exprimierende Zelllinien	10-1 LT W	10-1 (p53-null)	GFP und LT
	3T3 LT W	3T3 (wtp53)	GFP und LT

Zunächst wurde analysiert, ob das Ausmaß der GFP-Expression im Verhältnis zur LT-Expression in den Zelllinien steht. Wie die Western-Blot-Analyse in Abbildung 21 zeigt, korrelierte die LT-Proteinmenge mit der GFP-Menge. So wiesen stark GFP-exprimierende Zellen eine höhere LT-Menge auf als schwach GFP-exprimierende. Eine Stabilisierung von p53 in den 3T3 LT S/W Zellen durch das Vorhandensein von LT wurde deutlich. Diese Akkumulation von p53 ist spezifisch für die Expression von LT, da die Expression von GFP alleine zu keiner detektierbaren p53-Akkumulation

fürte (3T3 IG). Durch die Komplexbildung mit LT ist die p53-Akkumulation abhängig von der LT-Menge. Dementsprechend zeigten 3T3 LT W Zellen eine niedrigere p53-Proteinmenge im Vergleich zu 3T3 LT S Zellen.

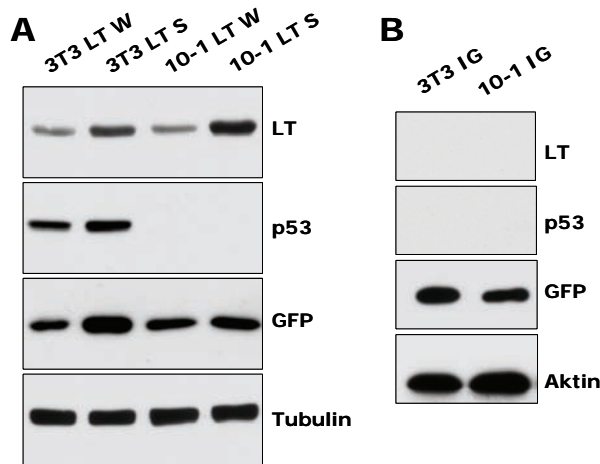


Abbildung 21: Western-Blot-Analyse der LT, p53 und GFP Expression in 10-1 und 3T3 Zellen, die mit dem retroviralen LT-Konstrukt (pMycLT) infiziert wurden. (A) Gezeigt sind die stark (S) und schwach (W) GFP-exprimierenden Zellen der 9. Passage nach durchflusszytometrischer Sortierung. 65 µg Protein wurden über ein 10%iges SDS-Gel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit folgenden Antikörpern: LT (PAb108), p53 (FL393), GFP. Tubulin diente als Ladekontrolle. (B) Die 10-1 und 3T3 Zellen, die mit dem Kontrollvektor transduziert wurden (pMysIG), zeigen keine LT und p53-Expression. Hier diente Aktin als Ladekontrolle.

Für die weiteren Untersuchungen war es wichtig, dass die Anzahl an GFP-positiven und somit LT-exprimierenden 3T3 und 10-1 Zellen vergleichbar sind. Anhand direkter GFP-FACS Messung wurden die Zellen in einem Zeitraum von über 100 Tage in einem Abstand von 10 bis 15 Tagen auf ihre GFP-Expression hin untersucht. Als Negativ-Kontrollen wurden die parentalen Balb/c 3T3 und 10-1 Fibroblasten eingesetzt.

Im folgenden Diagramm (Abbildung 22) wird deutlich, dass die Anzahl GFP-positiver, und somit auch LT-positiver Zellen, bei beiden Zelllinien vergleichbar war. Die Anzahl der GFP-exprimierenden Zellen betrug im zeitlichen Durchschnitt für die 3T3 LT W Zellen 88%±5%, die 3T3 LT S Zellen 95%±2, die 10-1 LT W Zellen 92%±3% und die 10-1 LT S Zellen 93±4%. Auffällig war die Abnahme der 10-1 IG GFP-positiven Zellen. Nach 65 Tagen zeigten nur noch 50% der Zellen eine GFP-Expression.

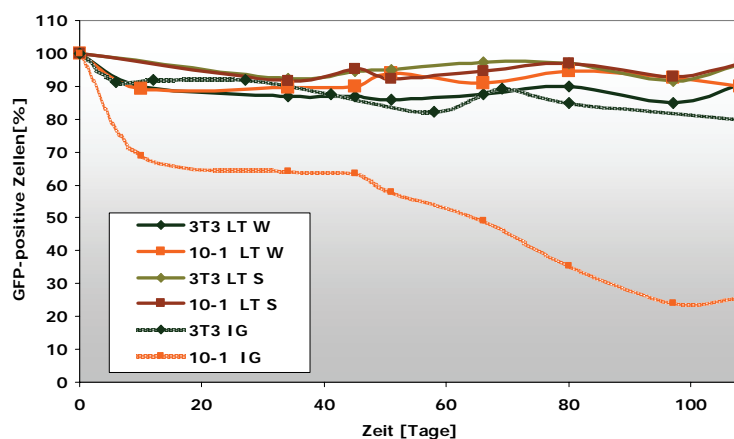


Abbildung 22: Anzahl GFP-exprimierender Zellen während der Kultivierung. Die Zellen wurden 24 h vor der GFP-Messung in 6 cm Kulturschalen transferiert. Für die GFP-Messung wurden die Zellen mit PBS/0,1% EDTA gewaschen, trypsiniert und in 1,5 ml PBS aufgenommen. Zur Vereinzelung der Zellen wurde die Zellsuspension über einen Filter in FACS-Röhrchen pipettiert. Es wurden je 25000 Zellen pro Durchlauf in dem COULTER®EPICS®XL-MCL™ Durchflusszytometer (Beckmann Coulter) analysiert. Die Auswertung erfolgte mit Excel.

Die mittlere Fluoreszenz-Intensität der GFP-positiven Zellen, die ebenfalls anhand der FACS-Analyse ermittelt wurde zeigte, dass diese in den 10-1 LT S/W und den 3T3 LT S/W Zellen zeitlich stabil war und sich deutlich in starke und schwache GFP Intensität unterteilen ließ. Oftmals wird postuliert, dass GFP toxisch für die Zellen sei (Hanazono *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999a). Für die in diesen Experimenten vorliegende Menge war dies aber nicht der Fall.

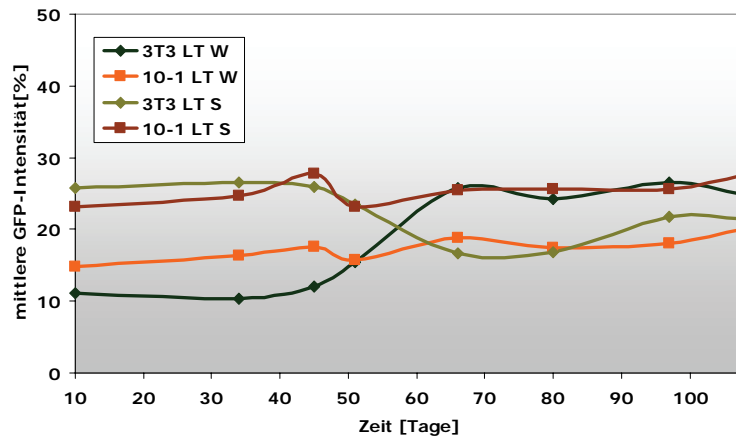


Abbildung 23: Mittlere GFP-Fluoreszenzintensitäten während der Kultivierung. Die Zellen wurden 24 h vor der GFP-Messung in 6 cm Kulturschalen transferiert. Für die GFP-Messung wurden die Zellen mit PBS/0,1% EDTA gewaschen, trypsinisiert und in 1,5 ml PBS aufgenommen. Zur Vereinzelnung der Zellen wurde die Zellsuspension über einen Filter in FACS-Röhrchen pipettiert. Es wurden je 25000 Zellen pro Durchlauf in dem COULTER®EPICS®XL-MCL™ Durchflusszytometer (Beckmann Coulter) analysiert. Die Auswertung erfolgte mit Excel.

Eine indirekte Immunfluoreszenzmarkierung der Fibroblasten konnte zusätzlich bestätigen, dass die Anzahl GFP-positiver Zellen mit der Anzahl LT-exprimierender Zellen übereinstimmt, ein indirekter Hinweis, dass die LT- und die GFP-Expression in ein und derselben Zelle erfolgte. Abbildung 24 zeigt exemplarisch mikroskopische Aufnahmen der stabilen LT-Expression in Zellen der Passagen 6 und 13. Es wird deutlich, dass in 3T3 LT W Zellen LT in großen Mengen im Kern akkumulierte und eine p53-Co-Expression hervorrief. 10-1 LT W Zellen sind p53 negativ, zeigten jedoch ebenfalls eine Kernlokalisierung von LT in vergleichbarer Menge. Für die 3T3 LT S und 10-1 LT S Zellen lag das gleiche Resultat vor (Daten nicht gezeigt). Eine nukleäre und zytoplasmatische Lokalisation von GFP wurde parallel anhand Lebendzell-Mikroskopie detektiert (Daten nicht gezeigt).

Die retrovirale Transduktion mit LT führte somit in wtp53 und p53-null Zellen zu einem stabilen System, das im Folgenden für die Untersuchung des Einfluss des p53-LT Komplexes auf die Transformation verwendet werden konnte.

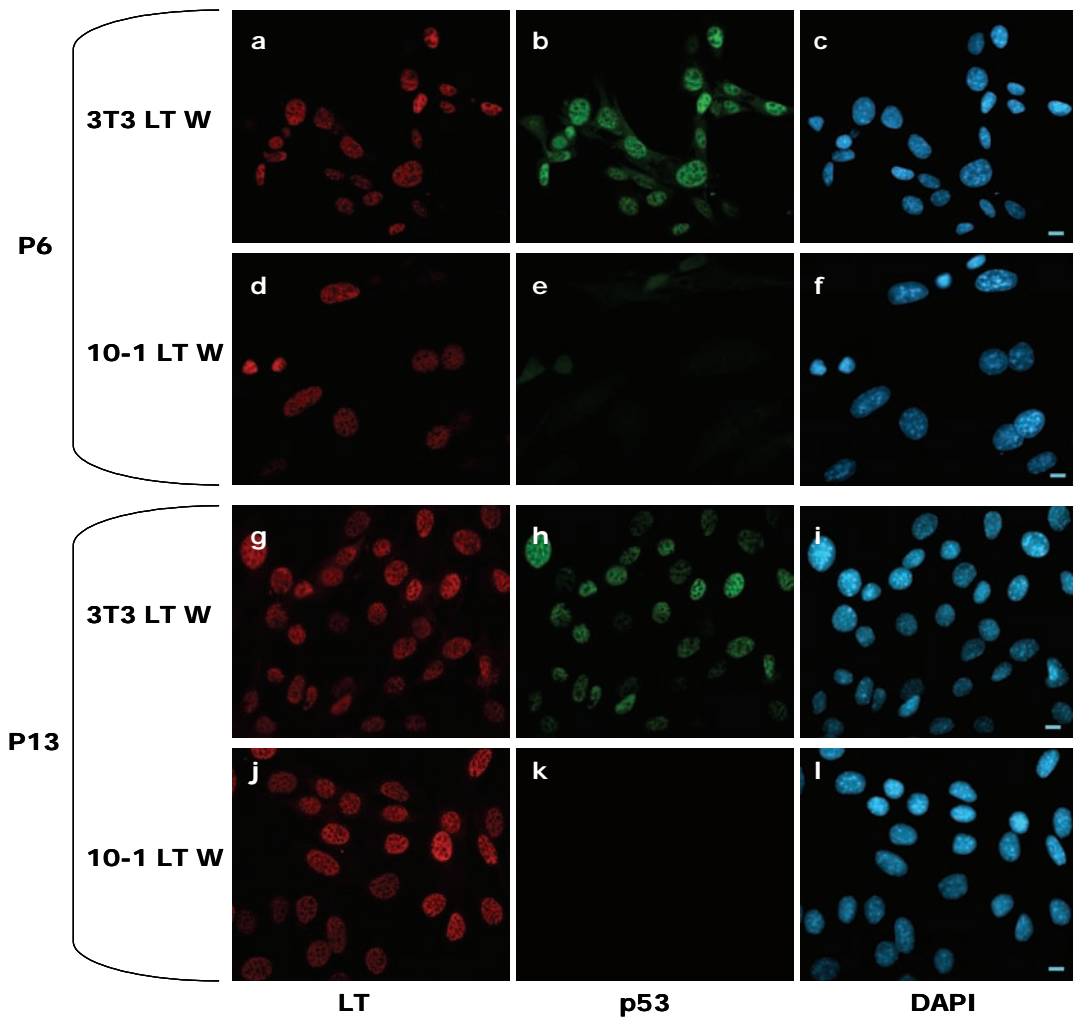


Abbildung 24: Expression und Lokalisation von LT in den 3T3 LT W und 10-1 LT W Zellen. Die Zellen der Passage 6 (P6) und Passage 13 (P13) wurden auf Deckgläsern über Nacht kultiviert. Diese wurden anschließend in Aceton (-20°C) fixiert und mit den entsprechenden primären (LT: PAb 416 (a, d, g, j), p53: FL393 (b, e, h, k)) und sekundären Antikörpern gefärbt. Die exemplarischen Fluoreszenzbilder zeigen LT in rot, p53 in grün und das Chromatin (DAPI) in blau (c, f, i, l). Längenmaßstab: 10 µm.

2.4 Die Expression von LT führt in Anwesenheit von wtp53 zu morphologischen Veränderungen

Die im Organismus im Bindegewebe vorkommenden Fibroblasten, die wichtig für die Synthese der Interzellulärsubstanz sind, bilden in adhärenter Kultur lange zytoplasmatische Fortsätze aus. Beim Erreichen der Konfluenz tritt Kontaktinhibition ein und die Zellen wachsen zu einem gleichmäßigen Monolayer (pflastersteinartiges Muster). Transformierte Fibroblasten verlieren typische Merkmale normaler Zellen. Sie verändern ihre Morphologie, weisen einen Verlust der Kontaktinhibition auf und wachsen mehrschichtig übereinander, so dass es zur Foci-Bildung kommt.

Abbildung 25A zeigt mikroskopische Aufnahmen der LT-exprimierenden und der Kontroll-Zellen (Lebendzellen). Es wird deutlich, dass im p53-null Hintergrund kein auffälliger morphologischer Unterschied durch die LT-Expression hervorgerufen wurde. In den wtp53 Fibroblasten führte die LT-Expression hingegen zu einer drastischen Verkleinerung der Zellen und zur Ausbildung längerer

Fortsätze. Zudem war der Beginn des mehrschichtigen Wachstums erkennbar. Nach weiteren zwei Tagen in der Zellkulturschale sah man bei den 3T3 LT W und 3T3 LT S Zellen deutlich eine Focus-Bildung (Abbildung 25B), ein Anzeichen einer intermediären Transformation (Baserga 1997). Die LT-Expression führte in den p53-null Zellen zu diesem Zeitpunkt ebenfalls zu einer Verkleinerung der Zellen, jedoch war kein Wachstum in mehreren Schichten erkennbar. Dies ist ein Kennzeichen dafür, dass es sich bei 10-1 LT S/W Zellen um minimal transformierte Zellen handelt. Diese Zellen können hohe Sättigungsdichten erreichen, jedoch keine Foci in Monolayer-Kulturen bilden. Die Kontroll-Zellen (3T3 IG, 10-1 IG) zeigen eine deutliche Kontaktinhibition.

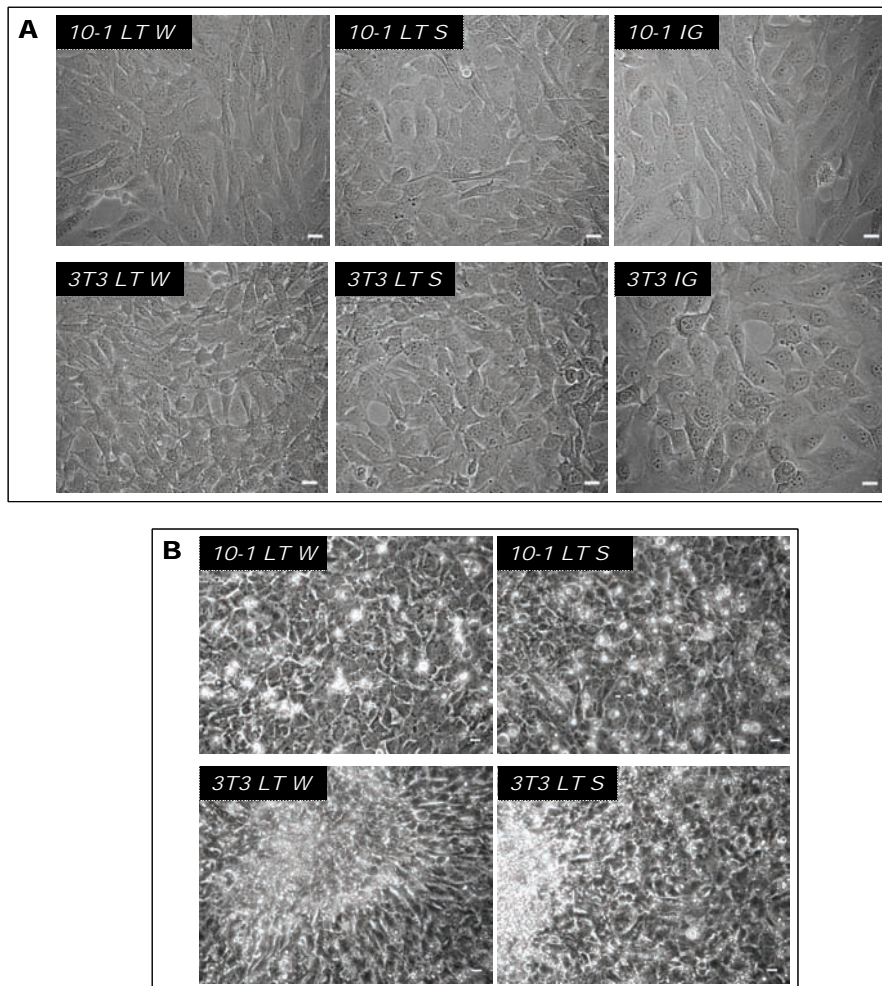


Abbildung 25: Morphologische Veränderungen in wtp53 Zellen (3T3 LT W, 3T3 LT S) nach stabiler Expression von LT. Phasenkontrastaufnahmen konfluenter LT-exprimierender Zelllinien der Passage 9 und der Kontrollzelllinien im Vergleich. 3×10^4 Zellen wurden in eine Vertiefung einer 6well Kulturschale ausgesät und 7 Tage (A) bzw. 9 Tage (B) bei Standardbedingungen und regelmäßigem Mediumwechsel kultiviert. Längenmaßstab: 20 μm .

2.5 LT-exprimierende wtp53 Zellen zeigen im Vergleich zu p53-null Zellen eine erhöhte Proliferationskapazität

Zur Beurteilung eines möglichen Einflusses der LT-Expression und der LT-Menge auf das Proliferationsverhalten der Zellen mit unterschiedlichem p53 Hintergrund wurden Wachstumskurven erstellt. Dazu wurden 3T3 LT S/W, 10-1 LT S/W und die Kontroll-Zellen 3T3 IG und 10-1 IG in geringer Dichte in Medium mit 10% FCS ausgesät. Zu sieben Zeitpunkten in

Intervallen von 24 bis 48 h wurde die Zellzahl bestimmt. Zudem wurden die Verdopplungszeiten (*PDT, population doubling time*) bestimmt.

In Abbildung 26 kann man erkennen, dass die Fibroblasten nach einer Adaptionsphase, die in den unterschiedlichen Zelltypen vergleichbar lang andauerte, in ein exponentielles Wachstum übergingen. Dabei kam es zu einer prägnanten Erhöhung der Proliferation von LT-exprimierenden Fibroblasten. Die Verdopplungszeit (*PDT*), die während der exponentiellen Wachstumsphase berechnet wurde, war mit 33 h (3T3 IG) bzw. 32 h (10-1 IG) der nur GFP-exprimierenden Zellen merklich länger als die der LT-exprimierenden Zellen. Die Menge an LT scheint keinen Einfluss auf die Verdopplungszeit zu haben, jedoch führte die gleichzeitige p53-Expression zu einer schnelleren Verdopplung (3T3 LT W: 25,5 h) im Vergleich zu den p53-null Zellen (10-1 LT W: 28,9 h). Das Wachstumsplateau der 3T3 IG und 10-1 IG Zellen war bereits nach fünf Tagen erreicht (Kontaktinhibition). Die LT-Expression in einem wtp53 Hintergrund resultierte im Vergleich zum p53-null Hintergrund in einer höheren Sättigungsdichte. Die 3T3 LT S/W Zellen waren nachfolgend fähig, Foci auszubilden und weiter zu proliferieren, wie auch aus Abbildung 25 ersichtlich wurde.

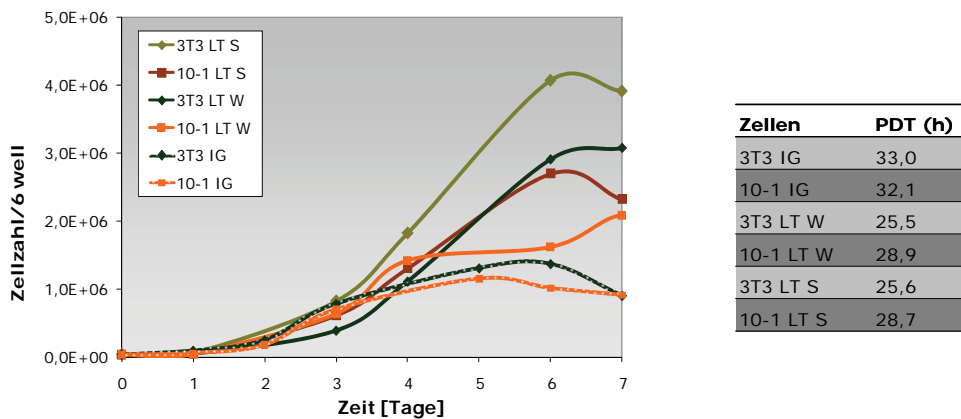


Abbildung 26: Wachstumseigenschaften stabil LT-transduzierter 3T3 und 10-1 Zellen. 3×10^4 Zellen wurden in 6well Kulturschalen in DMEM mit 10% FCS ausplattiert. Die Gesamtzellzahl von zwei Kulturschalen wurde alle 24 bis 48 h anhand der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Vertiefungen (wells). Die Tabelle zeigt den Einfluss von LT auf die Verdopplungszeiten von wtp53 und p53-null Zellen. Diese wurden anhand exponentieller Regressionsgerade zwischen Tag 4 und 5 berechnet (Excel).

Die Expression von LT begünstigte somit die Proliferation und Sättigungsdichte der Balb/c Fibroblasten. Die Intensität der Ausprägung war dabei merklich vom p53-Status abhängig. So verstärkte die Expression von wtp53 den Effekt von LT auf die Proliferationseigenschaften der Zellen. Die erhöhten Sättigungsdichten und die Ausbildung von Foci in Monolayer-Kulturen, vor allem der LT-exprimierenden wtp53 Zellen, deuten zudem auf ein intermediär transformiertes Wachstumsverhalten hin (Baserga 1997).

2.6 LT hat in wtp53 Zellen eine erhöhte Transformationskompetenz

In Abschnitt 2.4 konnte bereits eine erhöhte Sättigungsdichte und teilweise Focus-Bildung bei der Kultivierung der LT-exprimierenden wtp53 und p53-null Zellen detektiert werden. Anhand des Focus-Formation-Assay sollten diese Ergebnisse bestätigt werden. Die Zellen wurden hierbei stark

verdünnt ausplattiert und über zwei Wochen bei regelmäßigem Mediumwechsel kultiviert. In Abbildung 27 sind die mit Kristallviolett gefärbten Zellen dargestellt.

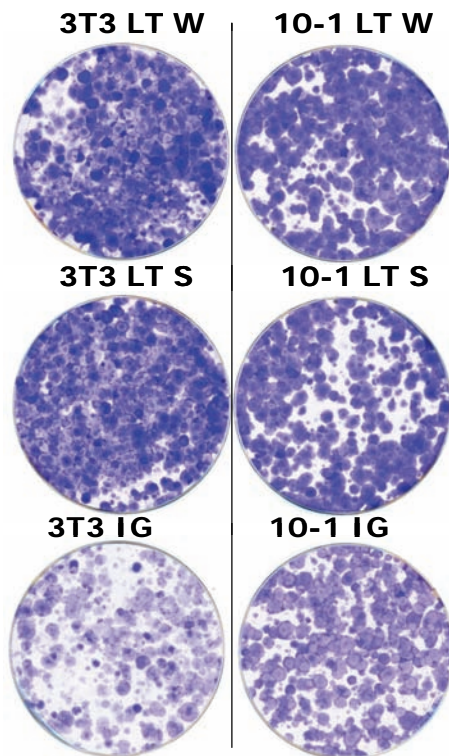


Abbildung 27: Unterschiede zwischen wtp53 und p53-null Zellen im Focus-Formation-Assay. Die LT-Expression in wtp53 Zellen führt zu einer größeren Anzahl von Foci, die insgesamt dichter sind. 3T3 IG und 10-1 IG fungieren als Kontrolle. 1×10^5 Zellen wurden in eine 10 cm Kulturschale ausgesät. Das Medium wurde in regelmäßigen Abständen gewechselt. Nach 14 Tagen wurden die Kolonien mit Kristallviolett angefärbt. Die Aufnahmen wurden mit einem Flachbettscanner (Epson Perfection 4990 Photo) durchgeführt.

Im Gegensatz zu den Kontroll-Zellen bildeten LT-exprimierende wtp53 sowie p53-null Zellen große Foci aus, die sich morphologisch jedoch stark unterschieden. Die Foci der wtp53 Zellen wuchsen sehr stark dreidimensional (in Abbildung 27 erkennbar an der dunkleren Färbung der Foci) und nach einer Woche kam es teilweise zur Abrundung und Ablösung einzelner Foci. Bei den p53-null Zellen führte die Expression von LT zu einer eher breitflächigen, aber weitaus weniger ausgeprägten dreidimensionalen Foci-Bildung.

Ein weiteres wichtiges Merkmal für einen transformierten Phänotyp ist der Verlust der Substrat-Abhängigkeit (*anchorage-dependence*). Transformierte Zellen können sich ohne Anheftung an eine Oberfläche vermehren und sind unabhängig von Wachstumsfaktoren und der extrazellulären Matrix. Hierbei wurden zwei Ansätze verfolgt. Zum einen wurden Zellkulturschalen mit einer Oberfläche für geringe Zellbindung (*Low Cell Binding Plates, LCB*) verwendet, um einen Kolonie-Assay durchzuführen. Die Zellen wurden in geringer Dichte in die LCB-Platten eingesät und unter Standardbedingungen für 14 Tage kultiviert. Zum anderen wurde der Softagar-Assay angewendet, um mögliche Zell-Zell-Kontakte, die bei der Kultivierung in Suspension erfolgen können, zu vermeiden. Bei dieser Methode wurden die Fibroblasten in einem Gel-artigen Agar-Medium-Gemisch ausplattiert, welches hemmend auf die Beweglichkeit der Zellen wirkt. Intermediär transformierte Zellen können in diesem Medium proliferieren und Kolonien ausbilden.

Abbildung 28 zeigt repräsentative Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen der Koloniebildung in Suspension von den 3T3 LT S und 10-1 LT S sowie den Kontrollen und die quantitative Auswertung

der Kolonien-Durchmesser. Die schwach LT-exprimierenden Zellen (3T3 LT W, 10-1 LT W) zeigen keine auffälligen Unterschiede zu den stark LT-exprimierenden Zellen und sind deshalb nicht dargestellt.

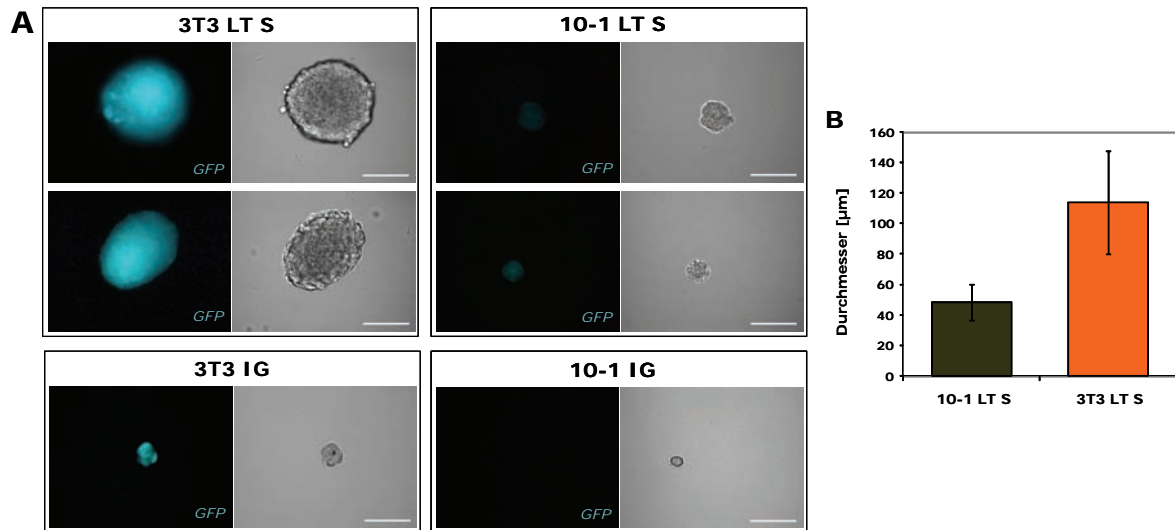
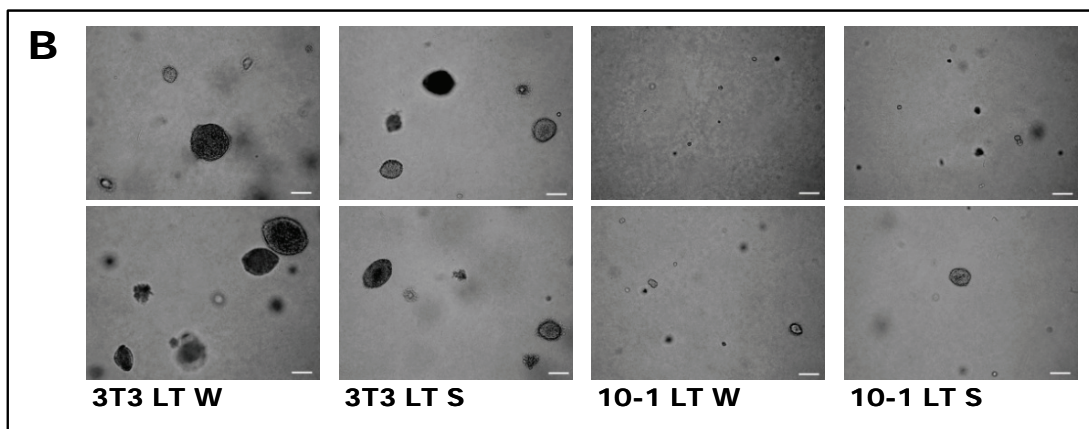
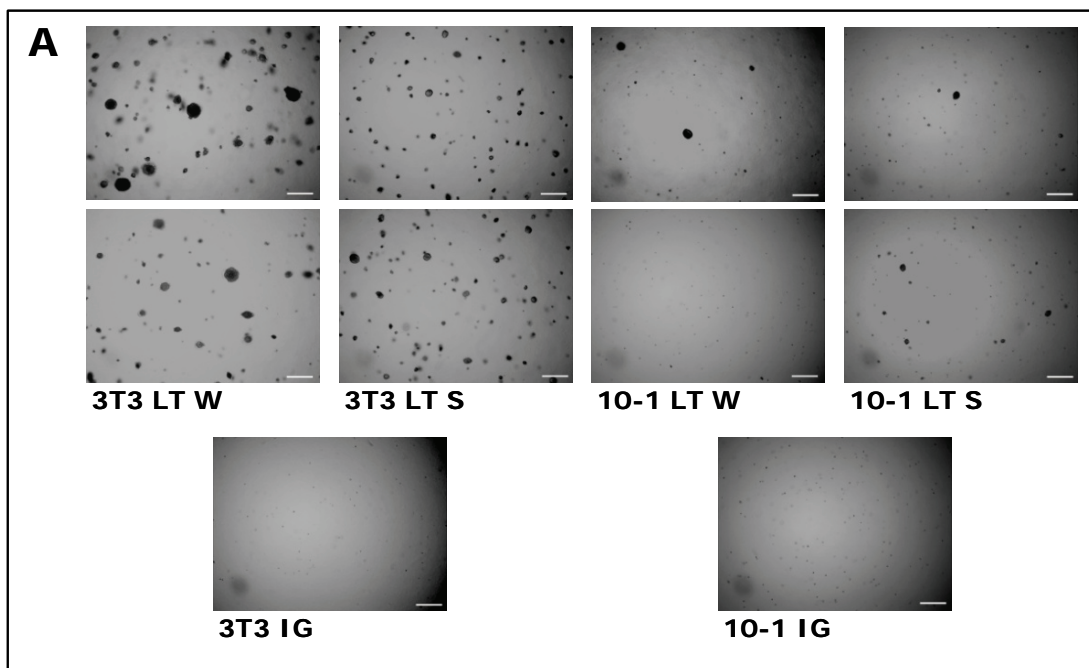


Abbildung 28: Untersuchung der Kolonie-Bildung LT-exprimierender Zellen in Low Cell Binding Plates (LCB). Die LCB-Platten (nunc) verhindern durch ihre Beschichtung eine Adhärenz der Zellen. 1×10^3 3T3 LT S und 10-1 LT S Zellen wurden in 10 cm LCB-Platten ausplattiert. 3T3 IG und 10-1 IG fungieren als Kontrolle. (A) Durchlicht- und Fluoreszenz-Aufnahmen der Kolonien. Nach 14 Tagen wurden bei gleicher Belichtung mikroskopische Bilder mit dem Leica Mikroskop (DMI 6000B) aufgenommen. GFP ist in blau-grün dargestellt. Der Längenmaßstab beträgt 100 µm. (B) Durchschnittlicher Durchmesser der gebildeten Kolonien. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen wurde der Durchmesser der Kolonien von mindestens 5 unabhängigen Feldern bestimmt und der Mittelwert berechnet.

Die 3T3 LT S Fibroblasten waren zu einem Wachstum in Suspension fähig, was an der (nicht quantitativ bestimmten) großen Anzahl der Kolonien deutlich wurde. Die schwimmenden, kugelförmigen Kolonien, die dicht gepackt und deshalb stark fluoreszierend waren, wiesen durchschnittlich einen Durchmesser von 121 µm auf. Neben diesen Zellkolonien gab es auch vereinzelte oder im Verbund von zwei bis drei Zellen. Die Aufnahmen zeigen den markanten Unterschied zum Wachstum der 10-1 LT S Zellen. Diese Kolonien, die nur sehr selten (ca. $<1/\text{Feld}$) in Erscheinung traten, hatten einen um die Hälfte reduzierten Durchmesser (\varnothing 50 µm) und eine geringere Fluoreszenz, die auf eher eindimensionales Wachstum hindeutet („Pfannkuchenform“). Im Gegensatz zu 3T3 LT S Zellen waren hauptsächlich einzelne 10-1 LT S Zellen zu detektieren, die entweder stark vergrößert waren oder Konglomerate aus zwei bis drei Zellen ausgebildet haben. Es lässt sich daher sagen, dass in 3T3 LT S Zellen die dreidimensionale Koloniebildung signifikant durch das Vorhandensein von wtp53 verstärkt wurde.

Für den Softagar-Assay wurden die Zellen in geringer Dichte in dem Agar-Medium-Gemisch über 21 Tage kultiviert und anschließend auf die Kolonie-Bildung hin untersucht. Repräsentative mikroskopische Aufnahmen sind in Abbildung 29 dargestellt. Die quantitative Auswertung zeigt das Balkendiagramm und die zusammenfassende Tabelle. Diese repräsentiert die Auszählung von jeweils fünf unabhängigen Feldern von drei individuellen Petrischalen am Mikroskop. Dabei wurde zwischen großen ($\varnothing \geq 150$ µm), mittleren (\varnothing 50-150 µm) und kleinen ($\varnothing \leq 50$ µm) Kolonien unterschieden. Es wurden zwei biologische Replikate durchgeführt.

Wie aus Abbildung 29 ersichtlich ist, resultiert eine LT-Expression im p53-null Hintergrund (10-1 LT S, 10-1 LT W) im Gegensatz zu wtp53-exprimierenden Zellen in einer sehr geringen Transformationseffizienz. Nur einige wenige Zellen konnten zu Kolonien heranwachsen, die jedoch dicht gepackt mit Zellen waren (Überprüfung durch GFP-Fluoreszenz). Die Größe dieser Kolonien variierte, wobei eine erhöhte Menge an LT (10-1 LT S) diesen Zellen einen leichten Wachstumsvorteil verlieh. So sind in den 10-1 LT S Zellen um den Faktor 2,6 mehr Kolonien zu detektieren als in den 10-1 LT W Zellen. Im Gegensatz dazu konnte ein starkes Wachstum im Softagar der wtp53-exprimierenden Zellen (3T3 LT S, 3T3 LT W) beobachtet werden. Die Substrat-Unabhängigkeit von LT-exprimierenden wtp53 Zellen wurde in der Anzahl sowie in der Größe der Kolonien deutlich. Hierbei überwiegen Kolonien der mittleren Größe (50–150 µm). Die Kontrollzellen, die kein LT exprimieren (3T3 IG und 10-1 IG), konnten keine Kolonien ausbilden. Das Ausmaß der LT-Expression hatte in einem wtp53 Hintergrund, im Gegensatz zu einem p53-null Hintergrund, keinen Einfluss auf die Gesamt-Kolonienzahl.



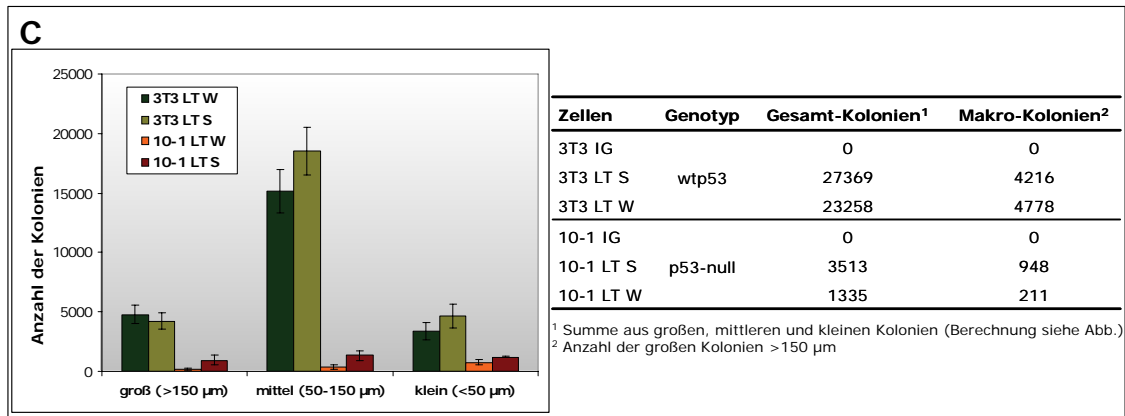


Abbildung 29: Zellwachstum im Softagar Assay. 1×10^5 der angegebenen Zellen wurden in Softagar in Bakterienschalen (\varnothing 10 cm) ausplattiert und über 21 Tage bei Standardbedingungen inkubiert. Mikroskopische Bilder wurden mittels Phasenkontrast aufgenommen. Dargestellt sind repräsentative Bilder in (A) bei 25,6facher Vergrößerung (Längenmaßstab: 500 µm) und in (B) bei 100facher Vergrößerung (Längenmaßstab: 100 µm). (C) Durchschnittliche Anzahl gebildeter Kolonien in Softagar. Die quantitative Auswertung der Kolonien erfolgte durch Auszählung von jeweils fünf unabhängigen Feldern von drei individuellen Petrischalen am Mikroskop. Dabei wurde zwischen großen ($\varnothing \geq 150 \mu\text{m}$), mittleren ($\varnothing 50 - 150 \mu\text{m}$) und kleinen ($\varnothing \leq 50 \mu\text{m}$) Kolonien unterschieden. Ein Feld hat eine Fläche von $10,75 \text{ mm}^2$, die gesamte Kultivierungsfläche der 10 cm Bakterienschale beträgt $56,7 \text{ cm}^2$. Daraus ergeben sich 527 Felder pro 10 cm Schale. Die durchschnittliche Anzahl der Kolonien unterschiedlicher Größe der fünf Felder wurde auf die gesamte Petrischale übertragen. Die Werte sind im Balkendiagramm dargestellt. Auf der Abszisse ist die Koloniengröße dargestellt und auf der Ordinate die durchschnittliche Kolonien-Anzahl pro 10 cm Schale.

Die Experimente, in denen die transformierenden Eigenschaften LT exprimierender Zellen mit unterschiedlichem p53 Hintergrund untersucht wurde, zeigten eindrücklich, dass das Fehlen von wtp53 zu einer Abnahme der Transformationseffizienz führt. Aus anderen Experimenten, die in dieser Arbeit nicht gezeigt wurden, ist jedoch bereits bekannt, dass eine p53-Defizienz in der Transformation partiell durch große Mengen an LT kompensiert werden kann. Der Komplex LT-p53 hat somit - ohne die zusätzliche Expression der SV40 Proteine der frühen Region, st und 17kT - positive Eigenschaften auf die LT-induzierte Transformation der Balb/c Fibroblasten, die im weiteren näher untersucht werden sollte.

2.7 Acetylierung von SV40 LT im C-Terminus ist p53-abhängig

Die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente konnten den postulierten positiven Einfluss von stabilem, nukleären p53 in der SV40-induzierten Transformation (Ziegler, 1998) bestätigen. Da in den hier dargestellten Versuchen nicht mit der gesamten frühen Region von SV40 gearbeitet wurde, sondern ausschließlich mit LT, kann die Transformation der Balb/c Zellen LT zugeschrieben werden. Man kann daher davon ausgehen, dass es der LT-p53 Komplex ist, der neue biologische Aktivitäten erlangt, die der Zelle einen Transformationsvorteil verschaffen. Diese neuen Eigenschaften des Komplexes können ohne p53 nicht ausgeübt werden und es kommt zu einer verminderten Transformationsaktivität von LT, wie in den 10-1 LT S/W Zellen gezeigt werden konnte. Ein signifikanter Unterschied zwischen p53-null und wtp53 Zellen im Zusammenhang mit LT ist die Bindung der Co-Aktivatoren p300 und CBP an LT, die über p53 erfolgt (Lill *et al.*, 1997b; Poulin *et al.*, 2004).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass LT, wie auch p53 und andere virale Onkogene, Ziel der Histon-Acetylase (HAT)-Aktivität von p300/CBP ist. Poulin und Mitarbeiter (2004) sowie Borger

und DeCaprio (2006) wiesen eine Acetylierung des Lysin-Rests K697 am hoch konservierten C-Terminus (*host range, HR*) (Spence & Pipas 1994) von LT nach, die p53-abhängig ist. Die Ergebnisse gelten gleichermaßen für murine und humane Zellen. In den Zellen liegt somit ein ternärer Komplex aus p300/CBP, posttranslational modifiziertem p53 (phosphoryliert und acetyliert) und acetyliertem LT vor, in dem die HAT-Aktivität nicht inhibiert ist (Valls *et al.*, 2003). Bei einem anderen viralen Onkogen, dem adenoviralen E1A, wird dessen Einfluss auf die HAT-Aktivität kontrovers diskutiert: Inhibierung (Chakravarti *et al.*, 1999) vs. Erhöhung (Ait-Si-Ali *et al.*, 1998). Die Funktion von acetyliertem LT im Hinblick auf die zelluläre Transformation ist jedoch weitgehend ungeklärt.

Um die Rolle der Acetylierung von LT bzw. der Interaktion von LT mit p300/CBP und p53 in der Transformation im Detail zu analysieren, sollte in einem ersten Schritt in dem hier vorliegenden Zellsystem die p53-abhängige LT-Acetylierung analysiert werden. Dazu wurden Gesamtzellextrakte von den LT-exprimierenden Zellen, 3T3 LT S/W, 10-1 LT S/W, sowie den Kontroll-Zellen 3T3 IG und 10-1 IG gewonnen, aus denen LT mit einem LT-spezifischen Antikörper präzipitiert wurde. Die in Abbildung 30A dargestellte Western-Blot-Analyse der LT-Immunpräzipitation aus 3T3 LT W und 10-1 LT W Zellen zeigt mit einem spezifischen Antikörper für acetyliertes Lysin deutlich eine p53-abhängige Lysin-Acetylierung von LT. Außerdem ist zu erkennen, dass p53 im Komplex mit LT ebenfalls acetyliert vorliegt. Dies bestätigt die Daten von Borger und DeCaprio (2006), die mit einem spezifischen Antikörper die p53-Acetylierung am humanen Lysin-Rest K373 (murin K376) im Komplex mit LT detektieren konnten.

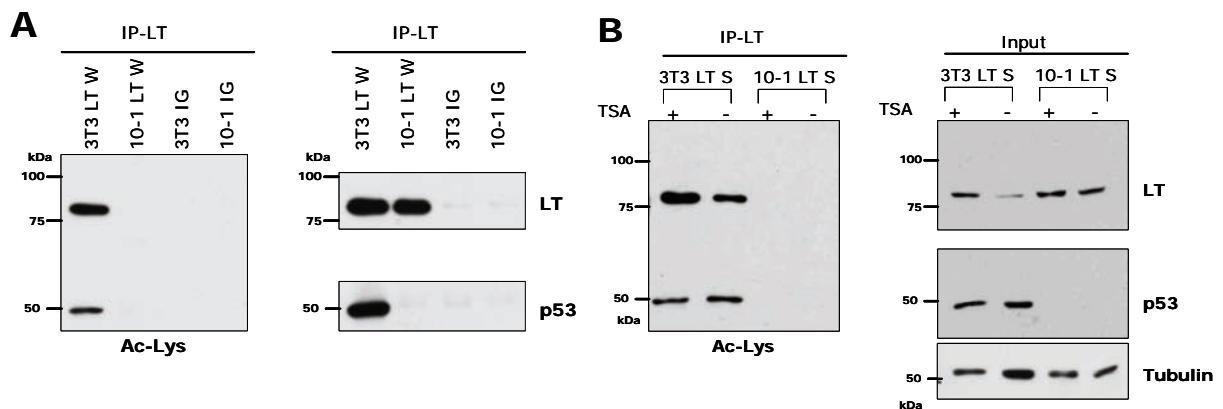


Abbildung 30: p53-abhängige Acetylierung von LT. (A) LT wurde aus Gesamtzellextrakten (300 µg) der 3T3 LT W, 10-1 LT W, 3T3 IG und 10-1 IG Zellen der Passage 21 mit Pab416 präzipitiert. In der dargestellten Western-Blot-Analyse (7%iges SDS-Gel) erfolgte der Nachweis von acetylierten Lysinresten mit einem polyklonalen α -Ac-Lys Antikörper. Parallel wurden die Präzipitate als Kontrolle mit dem monoklonalen Antikörper Pab108 gegen LT und dem polyklonalen Antikörper α -p53 (FL393) inkubiert. Die Immunpräzipitation der 3T3 IG und 10-1 IG dienten als negativ Kontrollen für die Komplexbildung. (B) Die Deacetylierung von LT ist HDAC-abhängig. 3T3 LT S und 10-1 LT S Zellen der Passage 10 wurden für 6 h mit (+) und ohne (-) 300 nM TSA Trichostatin A (TSA) behandelt. Anschließend erfolgten Lyse, Immunpräzipitation und Western-Blot-Analyse wie oben beschrieben. Gleichzeitig wurden die Gesamtzellextrakte (Input, 50 µg) mit den folgenden Antikörpern inkubiert: α -p53 (FL393), α -LT (Pab108). Tubulin diente als Ladekontrolle.

Gegenspieler der HAT sind die Histon-Deacetylasen (HDAC), die neben Histonen z.B. auch in der Deacetylierung des Tumorsuppressors p53 involviert sind (Ito *et al.*, 2002). Diese können durch organische Substanzen inhibiert werden. Trichostatin A (TSA) ist ein spezifischer Inhibitor der

HDAC der Klassen I und II (Furumai *et al.*, 2001), der bereits in der klinischen Forschung Anwendung findet (Vigushin *et al.*, 2001). Die Behandlung der in dieser Arbeit etablierten Zellen mit TSA sollte Aufschluss geben, ob die Deacetylierung von LT abhängig von HDAC ist. Aus Abbildung 30B wird deutlich, dass die LT-Gesamtmenge und die Menge an acetyliertem LT in den 3T3 LT S durch TSA erhöht werden kann. Die p53-Acetylierung scheint in diesem System durch die Inhibition der HAT aber nicht gesteigert zu werden.

Die Bindung von p300/CBP an LT mittels p53-Interaktion scheint einen direkten Einfluss auf LT zu haben, was anhand der Acetylierung ersichtlich wird. Die posttranslationale Modifizierung von Proteinen, wie Phosphorylierung und Acetylierung, hat einen Einfluss auf deren Funktion durch veränderte Protein-Protein-Interaktionen, Protein-Stabilität und transkriptionelle Aktivität (Kouzarides 2000). Im Folgenden sollte deshalb untersucht werden, inwiefern LT durch die p53/p300/CBP-vermittelte Acetylierung seines C-Terminus und/oder die Interaktion mit p300/CBP und p53, einen Einfluss auf die zelluläre Transformation hat. Dazu wurde die LT-induzierte Transformation von wtp53-exprimierenden Zellen im Vergleich zu Zellen untersucht, die ein N-terminal verkürztes p53 exprimieren, welches zur Komplexbildung mit LT fähig ist, jedoch nicht mehr mit p300/CBP interagieren kann.

Die Co-Aktivatoren p300/CBP binden im p53 N-Terminus (AS 1-83), wohingegen die Bindung von LT über die DBD von p53 erfolgt (AS 102-292) (Gu *et al.*, 1997; Lilyestrom *et al.*, 2006). Durch Deletion der Transaktivierungsdomäne von p53 sollte somit die Bindung an LT nicht beeinflusst sein. Dies konnte in dieser Arbeit durch transiente Transfektion von 10-1 Zellen, die stabil LT exprimieren, mit einer N-terminalen p53-Mutante (pCI dNtsp53, siehe 2.8), bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die weiterführende Arbeit mit einer N-terminal trunkierten p53-Mutante sollte Aufschluss über molekulare Grundlagen der positiven Rolle von p53 in der LT-vermittelten Zelltransformation und dem Einfluss von p300/CBP geben.

2.8 Etablierung und Charakterisierung der Zelllinie 10 –1 ΔNtsp53

Zur Untersuchung der Funktion des p53 N-Terminus in der LT-induzierten Transformation wurde zunächst eine Zelllinie etabliert, die stabil eine aminoterminal trunkierte murine temperatur-sensitive p53-Mutante (dNtsp53 = ΔNtsp53; Eismann, 2005) exprimiert. Die ΔNtsp53 Mutante basiert auf der tsp53^{Val135} Mutante, welche in der Literatur bereits sehr gut charakterisiert ist (Michalovitz *et al.*, 1990; Martinez *et al.*, 1991). Eine Kultivierung der Zellen bei einer permissiven Temperatur (32°C) führt zur nukleären Expression von p53 in Wildtyp-Konformation und somit zu einer Transaktivierung von p53-Zielgenen, was zu einem reversiblen Wachstumsarrest führen kann (Del Sal *et al.*, 1996). Bei der nicht-permissiven Temperatur (39°C) hingegen kommt es zur Expression einer p53-Konformationsmutante, die hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert und transkriptionell inaktiv ist. Diese Mutante wurde bereits in Versuchen hinsichtlich der SV40-Transformation in 10-1 Zellen verwendet (siehe 2.2). Dort konnte gezeigt werden, dass tsp53^{Val135} im p53-null Hintergrund einer Rekonstitution von wtp53 nahe kommt und vergleichbare Transformationseffizienzen hervorruft. Da Volle-Länge tsp53^{Val135} in diesen Untersuchungen bereits ausführlich analysiert wurde, wurden in den folgenden Versuchen ausschließlich mit der N-terminal

deletierten *tsp53*-Mutante gearbeitet.

Die $\Delta Ntsp53$ -Mutante besteht aus einem chimären aminoterminalen Teil (Exon/Intron 2-5) der mit einer carboxyterminalen *p53* cDNA (Exon VI- Exon XII) ligiert wurde (zur Verfügung gestellt von Eismann, Thorsten) (siehe Abbildung 31). Der N-Terminus ist um 33 bp verkürzt, wodurch die Transkription an einem alternativen Startcodon an Position 41 beginnt und ein 44 kDa großes Protein erzeugt.

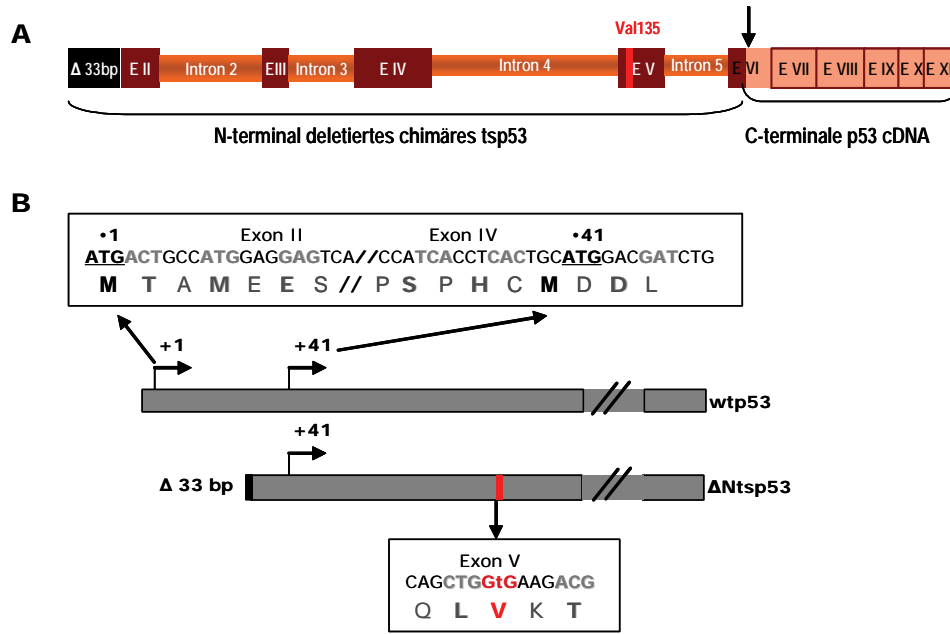


Abbildung 31: Schematische Darstellung von *wtp53* und $\Delta Ntsp53$. (A) Intron-Exon-Struktur der N-terminal verkürzten $\Delta Ntsp53$ -Mutante. Exon II fehlen die ersten 33 bp. Ab Exon VI besteht *p53* aus cDNA. Der Pfeil markiert die Ligationssstelle. In Rot ist die Mutation Val135 dargestellt. (B) Der Transkriptionsstart +1 im Exon II von Voll-Länge *p53* fehlt in der N-terminal trunkeierten *p53*-Mutante $\Delta Ntsp53$ durch Deletion der ersten 33 bp. Die Transkription erfolgt hier in Exon IV an Codon 41, dem alternativen Transkriptionsstart, und führt zu einer verkürzten Isoform. In rot ist die Mutation in Exon V, Codon Val135 (Ala (GCG) → Val (GTG)), dargestellt, die zu einer Expression einer temperatursensitiven $\Delta Ntsp53$ Mutante führt. Die Abbildung zeigt Auszüge aus der DNA- bzw. Proteinsequenz von *p53* (Chr.11, Position: 69393861-69405375, mRNA: X01237, UCSC (University of California, Santa Cruz) Genome Browser).

Für die Etablierung einer stabilen Zelllinie wurde zunächst der Expressionsvektor pCI dNtsp53 (siehe auch Abbildung 32) in die *p53*-null Zelllinie 10-1 transfiziert. Die N-terminal deletierte temperatursensitive *p53* Mutante steht dabei unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Nach Selektion mit G418 wurden insgesamt 55 stabile Klone auf die Expression von $\Delta Ntsp53$ mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht, jedoch konnte in keinem Klon $\Delta Ntsp53$ detektiert werden (Daten nicht gezeigt). In einem zweiten Ansatz sollte ein mögliches Abschalten des CMV-Promotors durch Methylierung (Teschendorf *et al.*, 2002; Brooks *et al.*, 2004) vermieden werden. Dazu wurde das dNtsp53-Fragment aus dem Vektor pCI dNtsp53 in den Expressionsvektor pEF1alpha-neo umklontiert, der den konstitutiven humanen EF1alpha (Elongations-Faktor 1 alpha)-Promotor enthält (Abbildung 32). Dieser Promotor wurde bislang noch nicht mit einer Inaktivierung durch Methylierung in Zusammenhang gebracht.

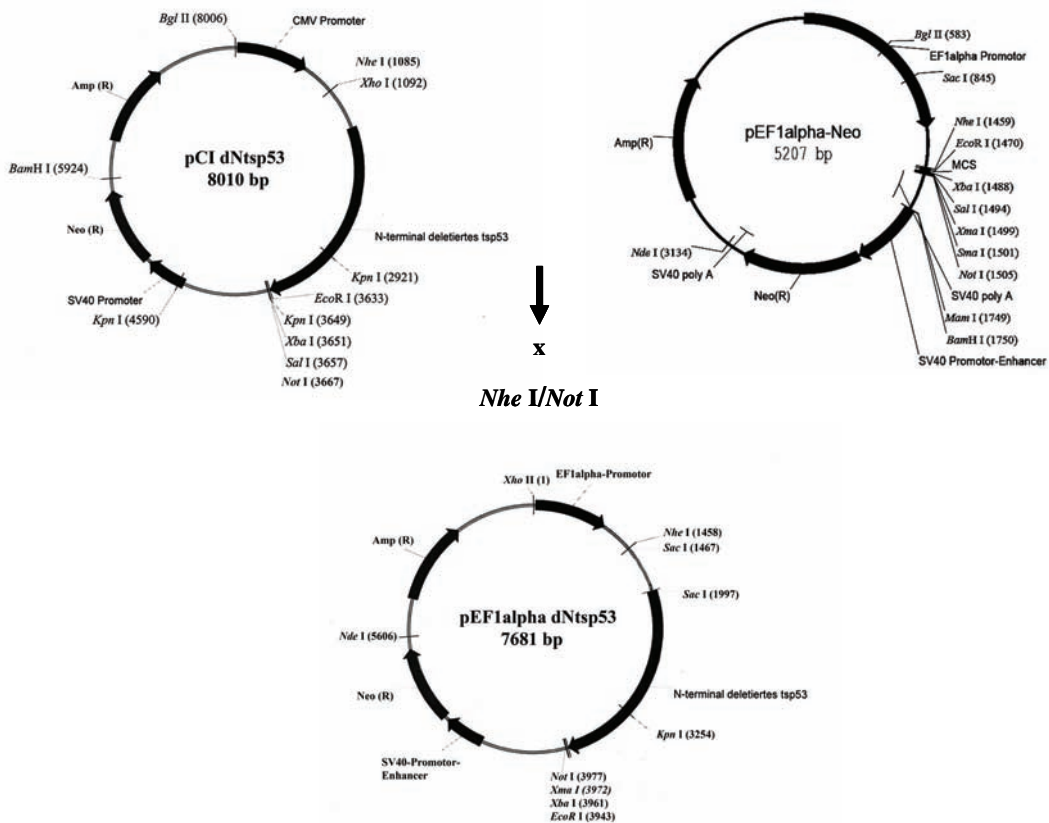


Abbildung 32: Klonierung von pEF1alpha dNtsp53. Es sind die Plasmide pEF1alpha-neo (Expressionsvektor) und pCI dNtsp53 (mit dem chimären N-terminal deletierten *tsp53*) dargestellt, sowie das Klonierungsprodukt pEF1alpha dNtsp53 (7,7 kb). pCI dNtsp53 und pEF1alpha-neo wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Nhe*I und *Not*I geschnitten um zum einen, das dNtsp53-Fragment zu erhalten und zum anderen den Vektor zu öffnen. Das aufgereinigte Fragment und der linearisierte, dephosphorylierte Vektor wurden anschließend im Verhältnis 1:1 mit der T4 Ligase ligiert. Ein Kontrollverdau des Produktes erfolgte mit folgenden Enzymen: *Sma*I, *Sac*I, *Xho*I.

Nach Sequenzierung des Vektors und Überprüfung seiner Funktionalität anhand Test-Transfektion wurde der Expressionsvektor pEF1alpha dNtsp53 stabil in 10-1 Zellen transfiziert, die anschließend bei 37°C kultiviert wurden. Nach erfolgreicher Selektion mit G418 wurden 15 Klone isoliert und auf eine Δ Ntsp53-Expression hin untersucht. Aus diesen Klonen wurde ein Klon ausgewählt (Klon 10-1 Δ Ntsp53#2), der in 90% der Zellen eine nukleäre Akkumulation von Δ Ntsp53 zeigte (Abbildung 33A). Dieser Klon hatte immer noch den immortalen Charakter der parentalen 10-1 Zellen und zeigte keine Anzeichen einer intermediären Transformation, was anhand des Softagar-Assay überprüft wurde (Daten nicht gezeigt) und war daher für die weiteren Versuche geeignet.

In der vergleichenden Western-Blot-Analyse von 10-1 Δ Ntsp53#2 (Abbildung 33B) mit der 10-1cG9 Zelllinie, die volle-Länge *tsp53* (FLp53) exprimiert, sollte die Laufhöhe der Δ Ntsp53-Mutante verifiziert werden. Das Genprodukt von Δ Ntsp53 hat eine Laufhöhe von ca. 44 kDa und ist bei der permissiven Temperatur (32°C) etwas stabiler als bei nicht-permissiver (39°C). Im Vergleich zum volle-Länge Genprodukt ist die Proteinmenge von Δ Ntsp53 geringer. Eine Induktion von p53-Zielgenen, hier am Beispiel von *Mdm2* gezeigt, erfolgt nur in Gegenwart des volle-Länge *tsp53* bei 32°C, bei der es in Wildtyp-Konformation vorliegt.

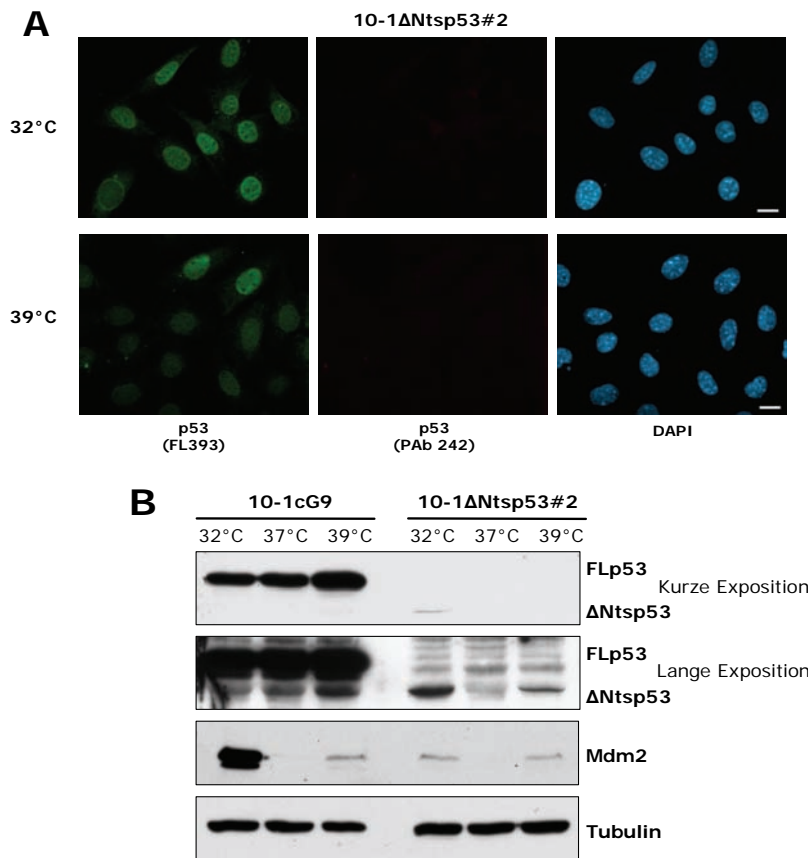


Abbildung 33: Charakterisierung der Zelllinie 10-1ΔNtsp53#2. (A) Bei permissiver (32°C) und nicht-permissiver Temperatur (39°C) akkumuliert ΔNtsp53 im Zellkern. Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen nach Färbung der Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz. Die Zellen wurden auf Deckgläsern ausplattiert und 24 h bei 32°C bzw. 39°C inkubiert. ΔNtsp53 wurde mit dem primären polyklonalen p53-Antikörper (FL393) und dem sekundären Alexa488-gekoppelten Antikörper detektiert (grün). Der Antikörper PAb242 bindet an den N-Terminus von p53 (AS 18-27) und diente hier als Negativkontrolle (rot). Das Chromatin ist mit DAPI gefärbt und in blau dargestellt. (B) pEF1alpha dNtsp53 führt in 10-1 Zellen zur Expression eines 44 kDa Genprodukts. Western-Blot-Analyse der 10-1cG9 und 10-1ΔNtsp53#2 Zellen, die für 24 h bei den angegebenen Temperaturen kultiviert wurden. 80 µg Gesamtzelllysate wurden über ein 10%iges SDS-Gel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit folgenden spezifischen Antikörpern: p53 (FL393), Mdm2. Tubulin diente als Ladekontrolle. FLp53: Voll-Länge p53.

Für die folgenden Versuche war die Komplexierung von LT mit der N-terminal trunkeierten p53-Mutante Voraussetzung. Um die Ausbildung dieses Komplexes zu überprüfen wurden 10-1ΔNtsp53#2 Zellen bei 32°C mit SV40 infiziert oder mit dem LT-Expressionsvektor pSV transient transfiziert. Anschließend wurde LT aus den Gesamtzellextrakten mit einem spezifischen LT-Antikörper präzipitiert. Der Nachweis eines Proteinkomplexes mit ΔNtsp53 erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper gegen p53 (FLp53). Die Lysate der Zellen 3T3 LT S und 10-1 LT S wurden ebenfalls der Immunpräzipitation unterzogen und dienten als positive bzw. negative Kontrolle der erfolgreichen Präzipitation von p53.

Wie aus Abbildung 34 hervorgeht, konnte nur mit dem LT-Expressionsvektor pSV eine LT-ΔNtsp53-Bindung gezeigt werden, da die Expression von LT nach Infektion mit SV40 sehr gering war. Die Anzahl LT positiver Zellen, die anhand indirekter Immunfluoreszenz ermittelt wurden, betrug nach Infektion 53% und nach Transfektion 43% der Gesamtzellen (Daten nicht gezeigt). Die Plasmid-Transfektion führte aber zu einer signifikant höheren Expression von LT. ΔNtsp53

zeigt ein schwächeres Signal als FLp53, obwohl vergleichbare Mengen an LT präzipitiert wurden. Grund hierfür könnte die geringere Menge an exprimierten Δ Ntsp53 im Vergleich zu FLp53 sein (siehe Abbildung 33B) oder die unzureichende Δ Ntsp53-Stabilisierung durch LT nach transienter Transfektion (48 h) im Gegensatz zur konstitutiven LT-Expression in 3T3 LT S bzw. 10-1 LT S Zellen.

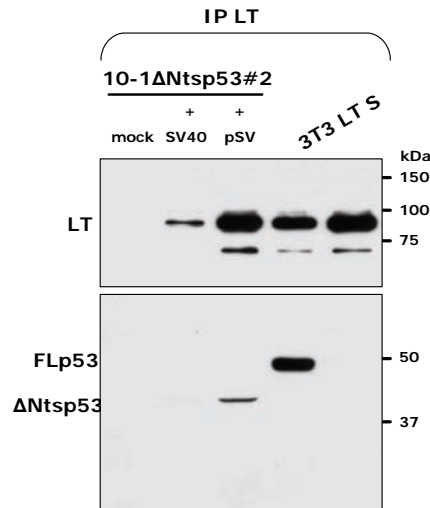


Abbildung 34: Interaktion von Δ Ntsp53 mit LT in 10-1 Δ Ntsp53#2 Zellen. 10-1 Δ Ntsp53#2 Zellen wurden mit SV40 infiziert bzw. dem LT-Expressionsvektor pSV transient transfiziert. 48 h später wurde aus den Gesamtzellextrakten (200 μ g) LT mit dem spezifischen Antikörper PAb416 präzipitiert. In der dargestellten Western-Blot-Analyse (10% SDS-Gel) erfolgte der Nachweis von p53 (Δ Ntsp53 und FLp53) mit einem polyklonalen α -p53 (FL393) Antikörper und der Nachweis von LT mit dem monoklonalen PAb108. Die Immunpräzipitation der 3T3 LT S und 10-1 LT S (Passage 22) dienten als positiv bzw. negativ Kontrollen für die Komplexbildung. FLp53: Volle-Länge p53.

2.9 Die Acetylierung von LT ist abhängig vom p53-Aminoterminus

Um eine stabile Expression von LT in Δ Ntsp53-exprimierenden Zellen zu erreichen, erfolgte nach Etablierung der 10-1 Δ Ntsp53#2 Zelllinie - wie bei 3T3 und 10-1 Zellen - eine Transduktion mit Retroviren, die pMYcLT und pMYIGs enthalten. 72 h später wurden die GFP-positiven Zellen anhand FACS, wie auch bei den 3T3 und 10-1 Zellen (siehe 2.3), in zwei Fraktionen sortiert: stark (S) und schwach (W) GFP-exprimierende Zellen. In Tabelle 4 sind die erhaltenen Zelllinien aufgelistet.

Tabelle 4: Etablierte Zelllinien

Zelllinie	Ursprungszelllinie	Transgen
Δ Np53 IG	10-1 Δ Ntsp53#2	GFP
Δ Np53 LT S	10-1 Δ Ntsp53#2	GFP und LT
Δ Np53 LT W	10-1 Δ Ntsp53#2	GFP und LT

Die sortierten Zellen wurden unter Standardbedingungen bei permissiver Temperatur in Kultur gehalten und die GFP-Expression über 100 Tage analysiert. Im Folgenden werden nur die Daten

bei permissiver Temperatur (32°C) gezeigt, da für die hier gestellte Fragestellung primär $\Delta Ntsp53$ in Wildtyp-Konformation von Interesse war.

Aus Abbildung 35 wird ersichtlich, dass die Anzahl an GFP-positiven Zellen über den untersuchten Zeitraum konstant war. So konnte im Durchschnitt in 90,3% ($\pm 3,5$) der $\Delta Np53$ LT S Zellen eine GFP-Expression detektiert werden. Bei den $\Delta Np53$ LT W Zellen waren es 89,3% ($\pm 4,9$) und bei den Kontroll-Zellen $\Delta Np53$ IG 85,8% ($\pm 3,9$). Die mittleren Fluoreszenzintensitäten wiesen im zeitlichen Verlauf Veränderungen auf. So stieg die GFP-Intensität in den ersten 50 Tagen an und pendelte sich dann bei den $\Delta Np53$ LT S, $\Delta Np53$ LT W und $\Delta Np53$ IG auf einen Wert ein. Die GFP-Intensität der $\Delta Np53$ LT S Zellen ist jedoch fast doppelt so hoch, wie bei den $\Delta Np53$ LT W und $\Delta Np53$ IG Zellen. Dies hatte jedoch keinen negativen Einfluss auf das Wachstum der Zellen.

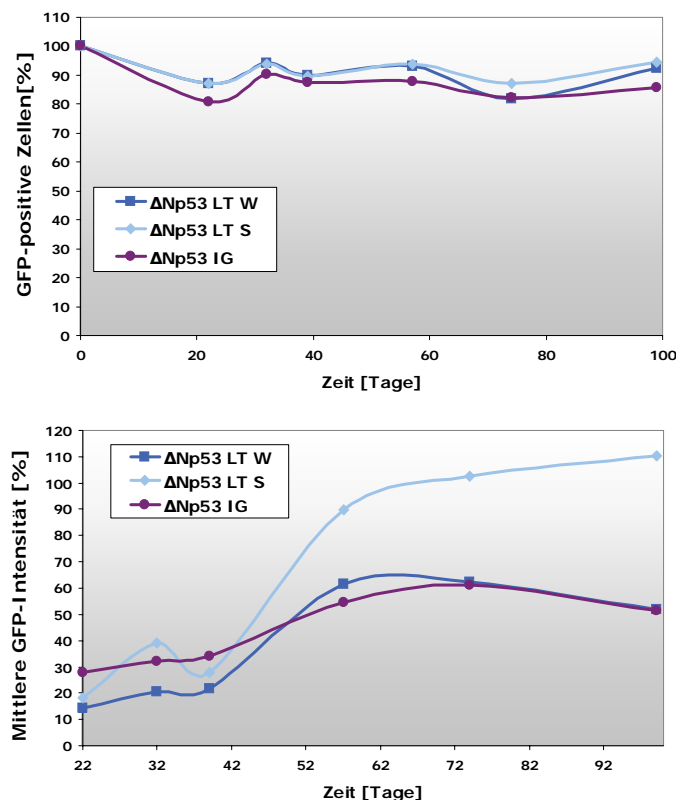


Abbildung 35: Anzahl GFP-produzierender Zellen und mittlere GFP-Fluoreszenzintensitäten während der Kultivierung bei 32°C. Die Zellen wurden 24 h vor der GFP-Messung in 6 cm Kulturschalen transferiert. Für die GFP-Messung wurden die Zellen mit PBS/0,1% EDTA gewaschen, trypsinisiert und in 1,5 ml PBS aufgenommen. Zur Vereinzelung der Zellen wurde die Zellsuspension über einen Filter in FACS-Röhrchen pipettiert. Es wurden je 25000 Zellen pro Durchlauf in dem COULTER®EPICS®XL-MCL™ Durchflusszytometer (Beckmann Coulter) analysiert. Die Auswertung erfolgte mit Excel.

Anhand indirekter Immunfluoreszenzmarkierung konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Anzahl GFP-positiver Zellen mit der Anzahl LT-exprimierender Zellen übereinstimmt, was indirekt bestätigt, dass die LT und die GFP Expression in ein und derselben Zelle erfolgt. Abbildung 36 zeigt exemplarisch die LT-Expression in $\Delta Np53$ LT S Zellen der Passage 5 bei 32°C. LT akkumulierte in großen Mengen im Kern. $\Delta Np53$ lokalisierte in ca. 90% der Zellen ebenfalls im Kern, ist jedoch über die Zellpopulation heterogen verteilt. Ca. 80% der Zellen zeigen zudem eine Korrelation der $\Delta Np53$ -Expression mit der LT-Akkumulation.

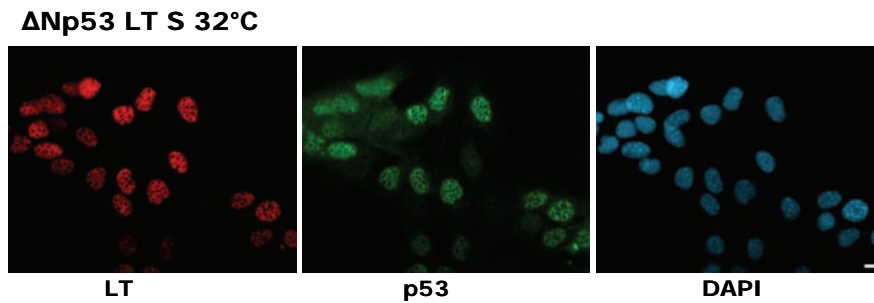


Abbildung 36: Lokalisation von LT in den ΔNp53 LT S/W Zellen. Die ΔNp53 LT S/W Zellen der Passage 5 (P5) wurden auf Deckgläschen über Nacht kultiviert. Diese wurden anschließend in Aceton (-20°C) fixiert und mit den entsprechenden primären (LT: PAb 416, p53: FL393) und sekundären Antikörpern gefärbt. Die exemplarischen Fluoreszenzbilder der ΔNp53 LT S Zellen zeigen LT in rot, p53 in grün und das Chromatin (DAPI) in blau.

In den nachfolgenden Versuchen sollte die Bedeutung des p53 N-Terminus für die gezeigte Helferfunktion von p53 auf die LT-induzierte Transformation untersucht werden. Voraussetzung für eine vergleichende Analyse mit 3T3 LT S/W bzw. 10-1 LT S/W Zellen sind äquivalente LT- bzw. GFP-Proteinmengen in den Zellen. Die in Abbildung 37 dargestellte Western-Blot-Analyse zeigt, dass vergleichbare Mengen an GFP in 10-1 LT S, 3T3 LT S und ΔNp53 LT S (32°C) detektierbar waren. Die LT-Proteinmenge variierten insofern, als 10-1 LT S Zellen leicht erhöhte Mengen an LT aufwiesen. Die Western-Blot-Analyse der 3T3 LT W, 10-1 LT W und ΔNp53 LT W Zellen zeigte das gleiche Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

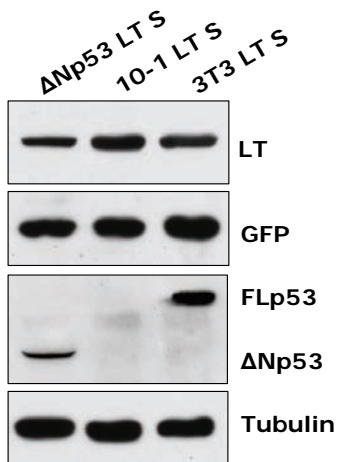


Abbildung 37: Vergleich der LT-Menge auf Proteinebene zwischen den ΔNp53 LT S und den 10-1 LT S bzw. 3T3 LT S Zellen. Western-Blot-Analyse von 10-1, 3T3, und ΔNp53 Zellen, die mit dem retroviralen LT-Konstrukt infiziert wurden. 70 µg Gesamtzellextrakt wurden über ein 10%iges SDS-Gel aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgte mit folgenden spezifischen Antikörpern: LT (PAb108), GFP (Roche), p53 (PAb248). Tubulin diente als Ladekontrolle. FLp53: Volle-Länge p53.

Um den Acetylierungsstatus von LT in Zellen mit N-terminal trunkiertem p53 analysieren zu können, wurden ΔNp53 LT S, 3T3 LT S und 10-1 LT S Zellen lysiert und aus den Gesamtzellextrakten LT mit einem LT-spezifischen Antikörper präzipitiert. Die Western-Blot-Analyse der Zellen weist darauf hin, dass LT in einem ΔNp53 Hintergrund nicht acetyliert vorliegt (Abbildung 38). Aufgrund dieser Daten lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass ein möglicher Grund hierfür die geringere Menge an ΔNp53 ist.

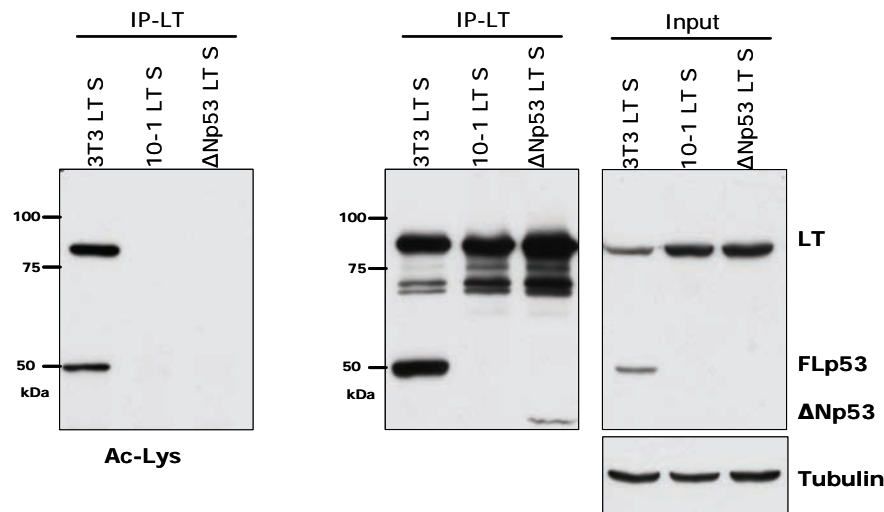


Abbildung 38: Überprüfung des Acetylierungsstatus von LT in Δ Np53 LT S im Vergleich zu 3T3 LT S, 10-1 LT S Zellen. Aus den Gesamtzellextrakten (300 μ g) von 3T3 LT S, 10-1 LT S und Δ Np53 LT S wurde LT mit spezifischen Antikörper PAb416 präzipitiert. In der dargestellten Western-Blot-Analyse (10% SDS-Gel) erfolgte der Nachweis von acetylierten Lysin-Resten mit einem polyklonalen α -Ac-Lys Antikörper. Parallel wurden zur Kontrolle die Präzipitate mit dem polyklonalen Antikörper R15 gegen LT und dem polyklonalen Antikörper α -p53 (FL393) inkubiert. Letzterer wurde auch für die Analyse der Lysate (Input, 70 μ g) verwendet. LT wurde hier mit dem monoklonalen Antikörper PAb108 gegen LT nachgewiesen. Tubulin diente als Ladekontrolle. FLp53: Volle-Länge p53.

2.10 Die morphologischen und proliferativen Eigenschaften LT transformierter Δ Np53 Zellen sind vergleichbar mit denen LT transformierter p53-null Zellen

Aus den vorherigen Experimenten geht hervor, dass in den Δ Np53 LT S/W im Vergleich zu den wtp53 und p53-null Fibroblasten gleiche Mengen an LT exprimiert werden. Es wurde deutlich, dass Δ Np53 dabei, wie auch wtp53, einen Komplex mit LT eingeht. Diese Bindung führte aber im Gegensatz zu der in wtp53 Zellen zu keiner detektierbaren Acetylierung von LT. Im Folgenden sollte untersucht inwieweit Δ Np53 bzw. der LT- Δ Np53 Komplex bei der permissiven Temperatur (32°C) einen Einfluss auf die Morphologie und das Wachstumsverhalten der Zellen hat. Die Ergebnisse sollten Aufschluss geben, ob eine fehlende bzw. verringerte Bindung von p300/CBP an LT in den Δ Np53 LT S/W Zellen, und die damit verbundene fehlende LT-Acetylierung einen Einfluss auf die intermediäre Transformation hat.

Δ Np53 LT S/W sowie die Kontroll-Zellen Δ Np53 IG und die Parentalzelllinie 10-1 Δ Ntsp53#2 wurden für 7 Tage bei 32°C kultiviert und dann im Phasenkontrastmikroskop bei 200x Vergrößerung fotografiert. Um Temperatureinflüsse ausschließen zu können, wurden zusätzlich 3T3 LT S/W, 10-1 LT S/W und deren Kontroll-Zellen, 3T3 IG, 10-1 IG, bei 32°C kultiviert und vergleichend analysiert. Repräsentative Beispiele sind in Abbildung 39 dargestellt.

Die stabile LT-Expression führte in Δ Np53-Zellen zu keinen auffälligen morphologischen Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Δ Np53 IG) bzw. den Parentalzellen (10-1 Δ Ntsp53#2). Die fibroblastische Zellmorphologie blieb erhalten. Die spindelartigen Zellen wuchsen fast parallel zueinander und bildeten eine konfluente Monolayer-Kultur. Die Kontaktinhibition der Zellen blieb auch in späteren Passagen erhalten. Die 3T3 LT S/W, 10-1 LT

S/W Zellen sowie die Kontrollzellen 3T3 IG und 10-1 IG verhalten sich bei 32°C wie bei 37°C (vergleiche Abbildung 25).

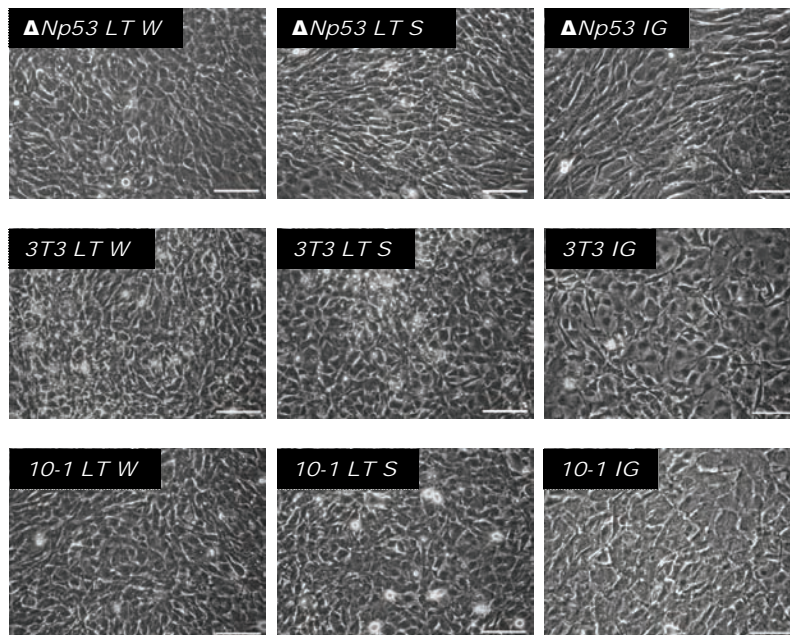
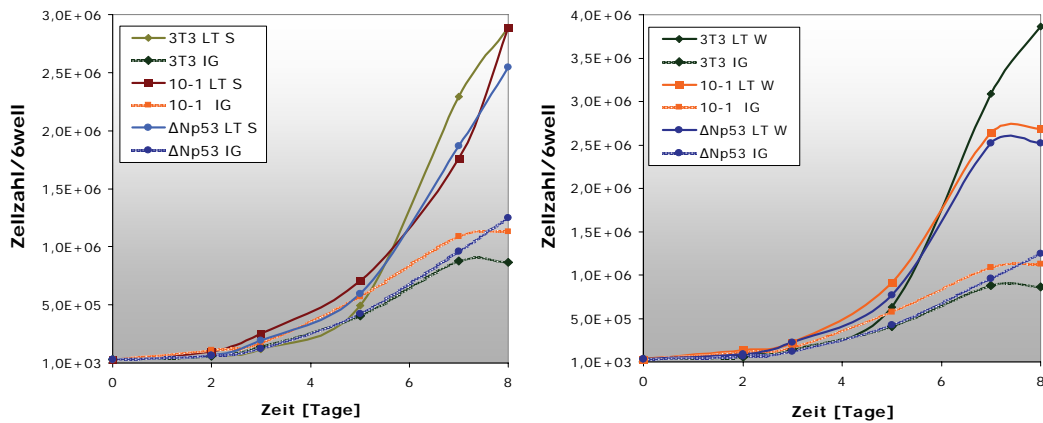


Abbildung 39: Morphologie konstitutiv LT-exprimierender Zellen bei 32°C. Phasenkontrastaufnahmen konfluenter LT-exprimierenden Zellen der Passage 16 (Δ Np53-Zellen) und Passage 24 (3T3- und 10-1 Zellen) und der Kontroll-Zellen im Vergleich. 3×10^4 Zellen wurden in eine Vertiefung einer 6well Kulturschale ausgesät und 7 Tage bei 32°C mit regelmäßigem Mediumwechsel kultiviert. Längenmaßstab: 100 μ m.

Wie in Abschnitt 2.5 beschrieben, hatte konstitutiv exprimiertes LT, in unterschiedlichem Ausmaß, einen Einfluss auf die Wachstumseigenschaften der 3T3 und 10-1 Zellen. Um die Auswirkungen der stabilen Expression von LT auf die Proliferation der Δ Np53-Zellen zu analysieren, wurde die Wachstumsrate der LT-exprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen bei permissiven Temperatur (32°C) untersucht. Parallel wurden Wachstumskurven der 3T3 LT S/W und 10-1 LT S/W Zellen erstellt, um das Wachstumsverhalten bei 32°C zu charakterisieren. Aus den erhaltenen sigmoiden Wachstumskurven lassen sich typische Parameter bestimmen, mit denen der proliferative Zustand von Zellen näher charakterisiert werden kann. Nach der Latenz-Phase und einer kurzen Adaptionphase der Zellen an das Substrat folgt die exponentielle Wachstumsphase. Dieser Bereich wurde für die Berechnung der Populationsverdopplungszeit (PDT) verwendet (zwischen Tag 5 und 7). Beim Erreichen der Konfluenz verringert sich die Proliferationsrate und die so genannte stationäre Phase beginnt. Hier konnte die Sättigungsdichte bestimmt werden. In Abbildung 40 wurden die stark (S) und schwach (W) GFP/LT-exprimierenden Zellen zur vereinfachten und übersichtlichen Darstellung in zwei Diagramme aufgeteilt.

ERGEBNISSE



Zellen bei 32°C	PDT (h)
ΔNp53 IG	33,8
3T3 IG	36,4
10-1 IG	36,0
ΔNp53 LT W	28,2
3T3 LT W	25,7
10-1 LT W	28,7
ΔNp53 LT S	28,5
3T3 LT S	26,8
10-1 LT S	29,3

Abbildung 40: Wachstumskinetik der stabil LT-exprimierenden Zellen bei 32°C. 3×10^4 Zellen wurden in 6well Kulturschalen in DMEM mit 10% FCS ausplattiert und lebende Zellen wurden alle 24 bis 48 h gezählt. Zu jedem Zeitpunkt wurden Doppelbestimmungen der Gesamtzellzahl vorgenommen, die hier dargestellt sind. Die Tabelle stellt den Einfluss von LT auf die Populationsverdopplungszeiten (PDT) von ΔNp53, wtp53 und p53-null Zellen bei 32°C dar. Die Berechnung erfolgte über eine exponentielle Trendlinie (Tag 5 und Tag 7) mit Excel.

Aus den Wachstumskurven wird ersichtlich, dass LT in allen Zellen unabhängig vom p53-Status einen positiven Einfluss auf die Proliferationskinetik der Zellen hat. Die nur GFP-exprimierenden Zellen wiesen eine beträchtlich erniedrigte Wachstumsrate auf, was sich auch in den höheren PDT-Werten reflektierte. Hinsichtlich der Proliferationseigenschaften bewirkte LT im wtp53 Hintergrund die signifikantesten Veränderungen. So besaßen diese Zellen im jeweiligen Vergleich zu den Kontroll-Zellen die kürzeste PDT. Zudem kann man aus den Wachstumskurven erkennen, dass vor allem die 3T3 LT W Zellen erhöhte Sättigungsdichten im Vergleich zu den 10-1 LT W und ΔNp53 LT W Zellen aufwiesen. Dies spiegelte sich auch in den Phasenkontrastaufnahmen in Abbildung 39 wider.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der LT-ΔNp53 Komplex nicht zu den erheblichen morphologischen und proliferativen Veränderungen führte, die in LT-FLp53 exprimierenden Zellen beobachtet wurden. Ungeachtet der Bindung von ΔNp53 an LT entsprachen die Wachstumseigenschaften vielmehr einer p53-null Situation.

2.11 Die wtp53-vermittelte Substrat-Unabhängigkeit LT transformierter Zellen kann im Δ Np53 Hintergrund nicht aufrechterhalten werden

Ob Fibroblasten mit einem N-terminal trunkeierten p53 trotz der geringen morphologischen Veränderungen Anzeichen einer phänotypisch transformierten Zelle aufweisen, wurde *in vitro* anhand des Substrat-unabhängigen Wachstums untersucht. Hierbei wurden die gleichen Ansätze wie bereits in Abschnitt 2.6 durchgeführt. Zum einen wurden *Low Cell Binding Plates* (LCB) und zum anderen der Softagar-Assay verwendet.

In Abbildung 41A sind charakteristische „schwimmende“ Foci der analysierten Zellen in LCB-Platten dargestellt.

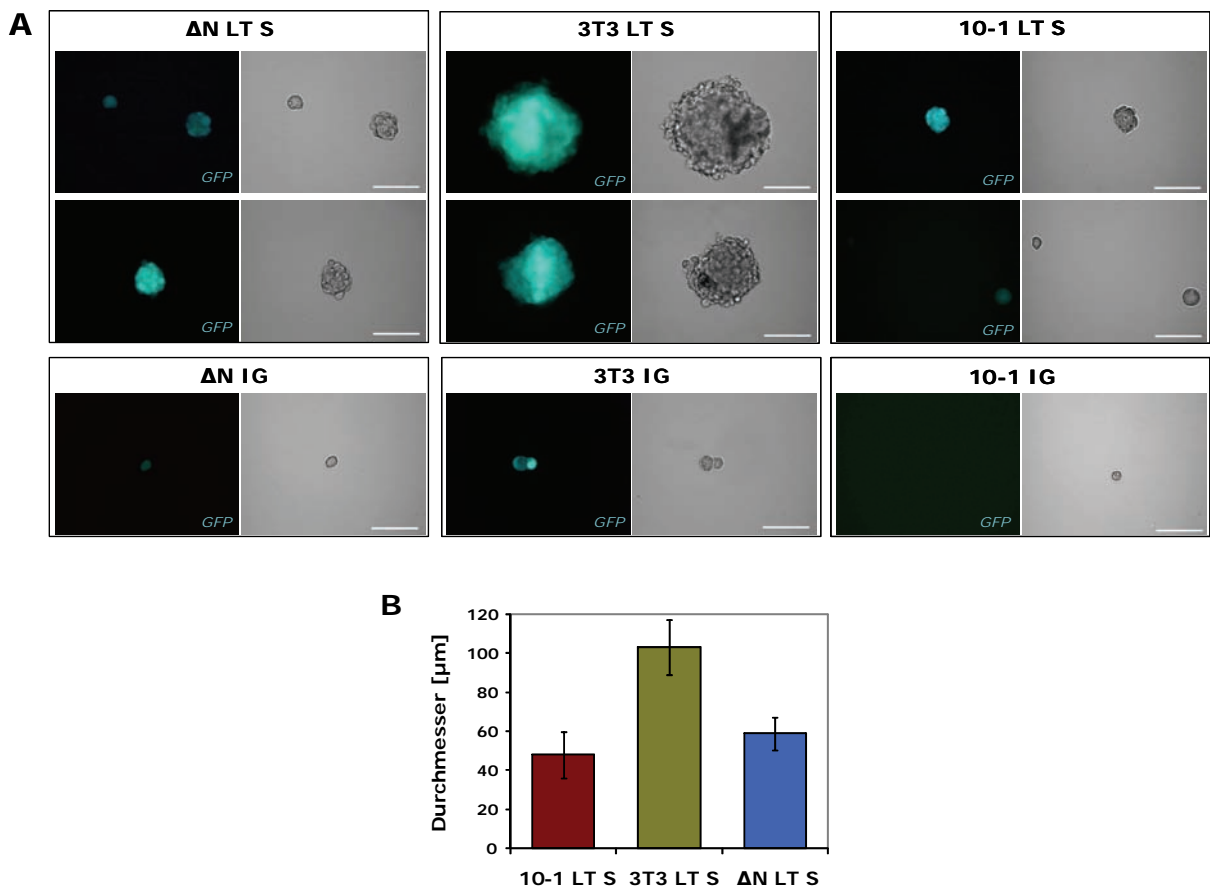


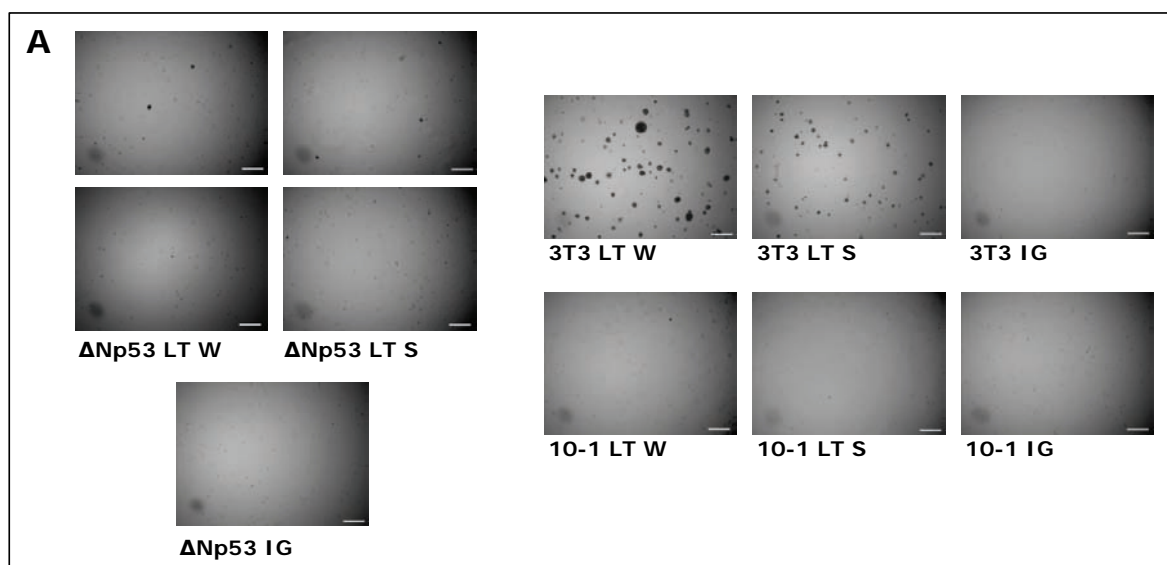
Abbildung 41: LT-induzierte Foci-Bildung in Suspension bei 32°C. Untersuchung der Focus-Bildung LT-exprimierender Zellen in *Low Cell Binding Plates* (LCB) die eine Adhärenz der Zellen verhindern. 1×10^3 Δ Np53 LT S, 3T3 LT S und 10-1 LT S Zellen wurden in 10 cm Kulturschalen ausplattiert und bei 32°C kultiviert. Nach 7 Tagen wurden 4 ml Medium hinzu gegeben. Δ Np53 IG, 3T3 IG und 10-1 IG fungierten als Kontrolle. **(A)** Durchlicht- und Fluoreszenz-Aufnahmen der Kolonien. Nach 14 Tagen wurden bei gleicher Belichtung mikroskopisch Bilder mit dem Leica Mikroskop DMI 6000B von den Zellen aufgenommen. GFP ist in blau-grün dargestellt. Der Längenmaßstab beträgt 100 µm. **(B)** Durchschnittlicher Durchmesser der gebildeten Kolonien. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen wurde der Durchmesser der Kolonien von mindestens 5 unabhängigen Feldern bestimmt und der Mittelwert berechnet.

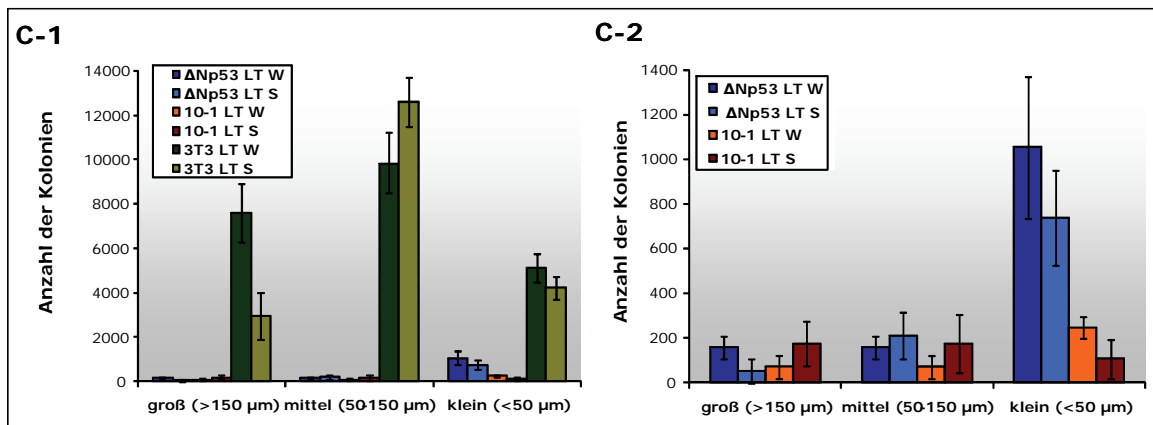
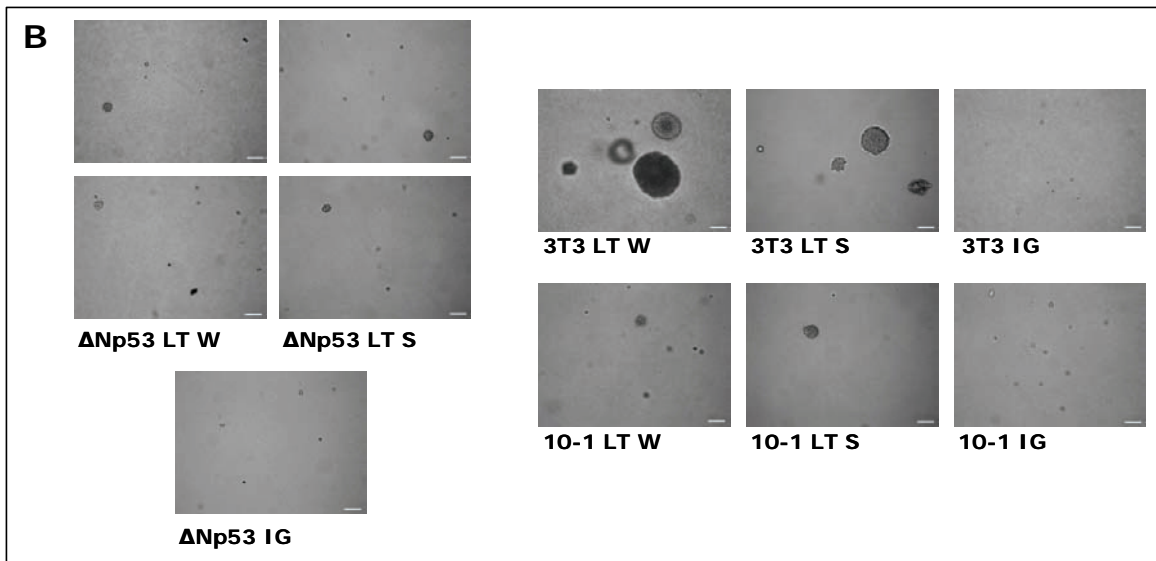
Alle LT exprimierenden Zellen zeigten eine Foci-Bildung im Vergleich zu den Kontroll-Zellen. Die Größe und Art der Foci variierte jedoch stark zwischen den Zellen mit unterschiedlichem p53-Status. So zeigten die wtp53-Zellen bei 32°C, wie auch bei 37°C, die größten und dreidimensionaleren Foci mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 103 µm (± 14 µm). Im Gegensatz dazu hatten die Foci von p53-null Zellen mit 48 µm (± 12 µm) und von Δ Np53-Zellen

mit 59 μm ($\pm 8 \mu\text{m}$) einen deutlich geringeren Durchmesser und wiesen auch eher eine flache Form auf (Abbildung 41B). Die Anzahl der Foci, welche die 3T3 LT S/W Zellen auszubilden vermögen, ist ebenfalls erhöht im Vergleich zu den anderen Zellen. Eine exakte quantitative Bestimmung der Foci-Anzahl ist jedoch aufgrund des „schwimmenden“ Charakters der Foci nicht möglich.

Die Ergebnisse der LCB-Platten konnte darüber hinaus im Softagar-Assay bestätigt werden. Die Resultate der Focus-Bildung im Softagar bei 32°C sind in repräsentativen mikroskopischen Aufnahmen abgebildet (Abbildung 42A+B). In Abbildung 42D ist die quantitative Auswertung der Kolonien dargestellt. Diese erfolgte durch Auszählung von jeweils fünf unabhängigen Feldern aus drei individuellen Petrischalen am Mikroskop. Dabei wurde zwischen großen ($\varnothing \geq 150 \mu\text{m}$), mittleren ($\varnothing 50\text{-}150 \mu\text{m}$) und kleinen ($\varnothing \leq 50 \mu\text{m}$) Kolonien unterschieden.

Wie aus Abbildung 42A und B hervorgeht, sind nur einige wenige ΔNp53 LT S/W Zellen in der Lage, im halbfesten Medium ohne Substratanheftung und Zell-Zell-Kontakte Kolonien auszubilden. Diese Kolonien sind dicht gepackt und zeigen ein dreidimensionales Wachstum, jedoch sind Größe und Anzahl im Gegensatz zu den 3T3 LT S/W Zellen signifikant verringert. Eine LT-Expression in ΔNp53 Zellen führt, wie auch schon im vorherigen Abschnitt gezeigt werden konnte, zu vergleichbaren Ergebnissen wie in einer p53-null Situation. Ein Unterschied zwischen den ΔNp53 LT S/W Zellen und den 10-1 LT S/W Zellen zeigt sich nur in der Anzahl der kleinen ($< 50 \mu\text{m}$) Kolonien, die bei den ΔNp53 LT S/W Zellen in erhöhtem Maße auftreten. Der Softagar-Assay der wtp53- und p53-null Zellen ergab bei 32°C das gleiche Bild wie bei 37°C (vergleiche Abbildung 29). FLP53 hat somit positive Auswirkungen auf die Transformationseigenschaften der LT-exprimierenden Zellen, was sich eindrücklich in der Anzahl der Kolonien im Softagar widerspiegelte (Abbildung 42C1-C2).





D

Zellen	Genotyp	Gesamt-Kolonien ¹	Makro-Kolonien ²
ΔNp53 IG		1	0
ΔNp53 LT S	ΔNtsp53	1001	53
ΔNp53 LT W		1370	158
3T3 IG		0	0
3T3 LT S	wtp53	19762	2951
3T3 LT W		22556	7588
10-1 IG		0	0
10-1 LT S	p53-null	457	176
10-1 LT W		386	70

¹ Summe aus großen, mittleren und kleinen Kolonien (Berechnung siehe Abb.)
² Anzahl der großen Kolonien >150 μm

Abbildung 42: Zellwachstum im Softagar bei 32°C. 1×10^5 der angegebenen Zellen wurden in Softagar in Petrischalen (\varnothing 10 cm) ausplattiert und über 21 Tage bei Standardbedingungen inkubiert. Mikroskopische Bilder wurden mittels Phasenkontrast aufgenommen. Dargestellt sind repräsentative Bilder in **(A)** bei 25,6facher Vergrößerung (Längenmaßstab: 500 μm) und in **(B)** bei 100facher Vergrößerung (Längenmaßstab: 100 μm). **(C)** Durchschnittliche Anzahl gebildeter Kolonien in Softagar. Die quantitative Auswertung der Kolonien erfolgte durch Auszählung von jeweils fünf unabhängigen Feldern von drei individuellen Petrischalen am Mikroskop. Dabei wurde zwischen großen ($\varnothing \geq 150 \mu\text{m}$), mittleren ($\varnothing 50\text{-}150 \mu\text{m}$) und kleinen ($\varnothing \leq 50 \mu\text{m}$) Kolonien unterschieden. Ein Feld hat eine Fläche von $10,75 \text{ mm}^2$, die gesamte Kultivierungsfläche der 10 cm Platte beträgt $56,7 \text{ cm}^2$. Daraus ergeben sich 527 Felder pro 10 cm Platte. Die durchschnittliche Anzahl der Kolonien unterschiedlicher Größe der fünf Felder wurde auf die gesamte Platte übertragen. Die Werte sind im Balkendiagramm dargestellt. Auf der Abszisse ist die Koloniengröße dargestellt und auf der Ordinate die durchschnittliche Kolonien-Anzahl pro 10 cm Platte. **(C-1)** Balkendiagramm von allen analysierten Zellen. **(C-2)** Darstellung der 10-1 LT S/W und ΔNp53 LT S/W Zellen in einem anderen Maßstab. **(D)** Quantitative Auswertung der Koloniebildung im Soft Agar bei 32°C.

Die Ergebnisse der Untersuchungen in einem Δ Np53 Hintergrund im Hinblick auf die durch LT-vermittelte intermediäre Transformation deuten darauf hin, dass der N-Terminus von p53 für den postulierten positiven Einfluss auf die LT-induzierte Transformation von Balb/c Zellen verantwortlich ist. Die transformierenden Eigenschaften der Δ Np53 LT S/W Zellen sind mit einer p53-null Situation vergleichbar, obgleich ein Komplex von LT und Δ Np53 vorliegt. Die Menge des viralen Onkogens ist in wtp53, p53-null und Δ Np53 Zellen vergleichbar und hat daher keinen Einfluss auf das Ausmaß der Transformation. Jedoch liegt nur in wtp53-Zellen LT als acetyliertes Protein vor.

2.12 Hinweise auf eine biologische Funktion des wtp53-LT Komplexes in der SV40-induzierten Zelltransformation

In den vorausgegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass p53 einen „Helfereffekt“ auf die LT-induzierte Transformation hat. Dabei wurde deutlich, dass der N-Terminus von p53 von essentieller Bedeutung ist. Nicht nur für die zelluläre Transformation durch LT, sondern auch für die Acetylierung von LT von. Grund hierfür ist die Rekrutierung von p300/CBP an den Komplex durch p53.

Für den LT-p53 Komplex wurde gezeigt, dass p53 durch diese Interaktion seine transkriptionellen Eigenschaften nicht mehr ausüben kann (Jiang *et al.*, 1993; Segawa *et al.*, 1993). Jedoch kann angenommen werden, dass p53 durch die Brückenbildung mit p300/CBP deren HAT-Aktivität in den Komplex einbringt. Dies bewirkt die Acetylierung von LT und könnte durch Histon-Acetylierung an Promotoren zu Veränderungen des zellulären Transkriptions-Programms beitragen. Valls *et al.* (2003), konnten bereits *in vivo* eine Verstärkung der Histon-Acetylierung und globalen HAT-Aktivität durch LT nachweisen.

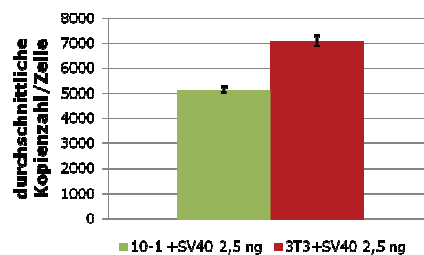
Aufgrund dieser Ergebnisse sollte nun untersucht werden, ob die transformierende „Helferfunktion“ von p53 im LT-p53 Komplex die Übertragung der p300/CBP HAT-Aktivität ist. Dadurch würde die globale Chromatin *Remodeling* Aktivität, die p53 zugesprochen wird (Allison & Milner 2004), auf LT übertragen, wodurch es zu Veränderungen der Gen-Expression im Sinne des Virus kommt.

2.12.1 Spezifischer Effekt

Für p53 ist bekannt, dass, mit p300/CBP im Komplex, es zu einer spezifischen Acetylierung von Histonen in der näheren Umgebung der p53-REs kommt. Für LT war bis zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit noch kein spezifisch LT-regulierter zellulärer Promoter bekannt. LT bindet jedoch in der frühen Phase der SV40-Infektion an seinen eigenen Promoter, um so die Transaktivierung zu erhöhen. Um weitere Hinweise für die positive Rolle von p53 in der SV40-induzierten Transformation zu erhalten, die auf eine direkte oder indirekte Aktivierung von Genen beruht, wurde das SV40 Minichromosom gewählt. Das 5243 bp große SV40 Genom ist mit zellulären Histonen (H2A, H2B, H3 und H4) in Nukleosomen verpackt und liegt als geschlossener Ring vor und kann daher hervorragend als Modellsystem für das zelluläre Chromatin verwendet werden. Mit diesem Modellsystem sollte untersucht werden, ob die Anwesenheit von p53 im Komplex mit LT an einem LT-spezifischen Promotor, nämlich den SV40 frühen Promotor, zu einer gesteigerten Transkription führt.

SV40–Infektionsversuche mit unterschiedlichen murinen Fibroblasten zeigten, dass (nach 16 h–48 h) in 80% der Experimente im wtp53 Hintergrund im Vergleich zum p53-null Hintergrund im Durchschnitt um den Faktor 1,6 mehr LT-positiven Zellen zu detektieren waren (Daten nicht gezeigt). Grund hierfür könnte zum einen eine schlechtere Aufnahme der Viruspartikel in p53-negativen Zellen, oder zum anderen eine geringere LT-Transkription sein. Um dies zu analysieren, wurde das bereits charakterisierte Balb/c System mit 3T3 und 10-1 Zellen verwendet. Nach abortiver SV40-Infektion der 3T3 und 10-1 Zellen wurde mittels RealTime-PCR (qRT-PCR) die durchschnittliche Anzahl an SV40 Minichromosomen pro Zelle und parallel die LT-Transkription analysiert. Es wurde bei den Versuchen davon ausgegangen, dass jede Zelle mit SV40 infiziert wird, jedoch nicht in allen Zellen eine LT-Transkription detektiert werden kann.

Die Zellen wurden in 6well Kulturschalen ausgesät und 12 h später mit SV40 infiziert. Zur Kontrolle wurden nicht-infizierte Zellen verwendet. Zu einem frühen Zeitpunkt, 10 h nach Infektion, in dem noch keine Virus-Integration und Zellteilung stattgefunden hat, wurde pro well die Zellzahl bestimmt, die genomische DNA isoliert und die RNA aufgereinigt. Es wurden drei biologische Replikate durchgeführt, die jeweils in Triplikaten analysiert wurden. Die Infektionseffizienz mit SV40 in den Zelllinien wurde anhand einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung kontrolliert (Abbildung 43, 44).



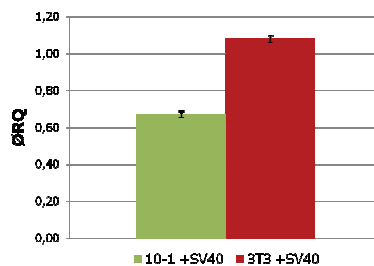
Probe	Kopienzahl/ 2,5 ng	STABWN	Zellzahl/ well	Gesamt- DNA (ng)	Kopienzahl/ Gesamt- DNA	STABWN	Kopienzahl/ Zelle	STABWN	Durschnittl. Kopienzahl/ Zelle	STABWN
10-1 mock	3,23E+00	1,16E+00	2,02E+05	1,40E+04	1,81E+04	1,62E+03	8,96E-02	8,06E-03	1,28E-03	0,00E+00
10-1 +SV40 1	1,49E+05	6,54E+03	1,74E+05	1,38E+04	8,25E+08	9,03E+06	4,74E+03	5,19E+01	5,13E+03	1,18E+02
10-1 +SV40 2	1,62E+05	2,07E+04	1,74E+05	1,41E+04	9,14E+08	2,93E+07	5,25E+03	1,68E+02		
10-1 +SV40 3	1,66E+05	1,64E+04	1,74E+05	1,42E+04	9,40E+08	2,32E+07	5,40E+03	1,33E+02		
3T3 mock	2,99E+00	3,01E-01	1,60E+05	1,11E+04	1,33E+04	3,34E+02	8,29E-02	2,09E-03	1,49E-03	0,00E+00
3T3 +SV40 1	2,92E+05	4,58E+04	1,34E+05	9,88E+03	1,15E+09	4,53E+07	8,61E+03	2,83E+02	7,11E+03	1,73E+02
3T3 +SV40 2	2,55E+05	1,30E+04	1,34E+05	1,10E+04	1,12E+09	1,43E+07	8,36E+03	1,07E+02		
3T3 +SV40 3	1,26E+05	1,80E+04	1,34E+05	1,16E+04	5,83E+08	2,09E+07	4,35E+03	1,30E+02		

Abbildung 43: Vergleichende Quantifizierung der SV40-Kopienzahl pro Zelle nach abortiver Infektion in 3T3 und 10-1 Zellen. Genomische DNA wurde aus SV40 infizierten und nicht-infizierten (mock) Zellen isoliert. 2,5 ng wurden als Template für die LT-Primer (T5, T12) in der RealTime-PCR eingesetzt. Von drei unabhängigen Versuchen wurden je drei Replikate durchgeführt. Die absolute Quantifizierung erfolgte mittels einer Standardkurve, basierend auf einer Verdünnungsreihe von SV40-DNA. Die Kopienzahl/2,5 ng wurde über das 7500 Software v1.4 bestimmt und die weiteren Berechnungen erfolgten in Excel. Die SV40-Kopienzahl pro 2,5 ng, wurde anhand der Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Gesamt-DNA im Durchschnitt auf eine Zelle bezogen und ist im Diagramm dargestellt. STABWN: Standardabweichung.

ERGEBNISSE

Die absolute Quantifizierung der SV40 Minichromosomen pro Zelle erfolgte mittels einer Standardkurve bestehend aus sechs Standards bekannter SV40-Kopienzahl (SV40-DNA FormI). Die genomische DNA der SV40-infizierten und nicht-infizierten (mock) 3T3 und 10-1 Zellen aus drei unabhängigen Versuchen wurde inklusive der Standards in einer qRT-PCR mit spezifischen *LT*-Primern (T5 und T12) analysiert (Dreifachbestimmung). Die Steigung der Standardkurve betrug -3,68 und liegt im tolerierbaren Bereich (siehe Methoden 6.12.1). Aus Abbildung 43 wird deutlich, dass nach abortiver SV40-Infektion in wtp53 Zellen pro Zelle durchschnittlich 1,4-mal mehr SV40 Minichromosomen vorliegen: die infizierten 3T3 Zellen wiesen eine durchschnittliche Viruslast von 7106 Kopien pro Zelle auf, die infizierten 10-1 Zellen nur 5131 Kopien (Standardabweichung von ± 173 bzw. ± 118).

Parallel wurde die *LT*-Expression auf mRNA Ebene in SV40 infizierten wtp53 Zellen im Vergleich zu p53-null Zellen untersucht. Die isolierte RNA aus drei unabhängigen Infektionsversuchen wurde in cDNA umgeschrieben und anschließend mit Hilfe der qRT-PCR und spezifischen *LT*-Primern (T5 und T20) auf relative Expressionsunterschiede (RQ) hin untersucht. Aus einem Lauf mit Dreifachbestimmungen wurden die Ct-Werte ermittelt und anhand der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode das Expressionsverhältnis von *LT* in 3T3 und 10-1 Zellen berechnet. Für die Normierung diente das Referenz-Gen *gapdh*, und die ΔCt -Werte wurden auf eine der drei 3T3 +SV40 Proben (RQ=1) bezogen. In Abbildung 44 sind die relativen *LT*-Expressionslevel in den infizierten 3T3 und 10-1 Zellen normiert auf *gapdh* dargestellt. Die qRT-PCR zeigt deutlich, dass in den 3T3 +SV40 Zellen eine im Durchschnitt 1,6-fache *LT*-Expression im Vergleich zu den 10-1 +SV40 Zellen vorlag.



Probe	Ø LT Ct	Ø Gapdh Ct	ΔCt (LT Ct - Gapdh Ct)	ΔCt Std Err	ΔΔCt (ΔCt - ΔCt 3T3 SV40 1)	RQ relativer Expressionsunterschied ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	RQ Std Err	Ø RQ	Ø RQ Std Err	Gesamt-Zellzahl	Faktor (Gesamt-Zellzahl 3T3/10-1)	RQ bezogen auf Gesamt-Zellzahl
10-1 mock	n.d	16,31	n.d	n.d	n.d	n.d						
10-1 +SV40 1	22,99	16,2	6,79	0,06	0,00	1,00	0,02	0,87	0,02	174000	0,77	0,67
10-1 +SV40 2	23,44	16,23	7,22	0,07	0,43	0,74	0,02					
3T3 mock	n.d	16,38	n.d	n.d	n.d	n.d						
3T3 +SV40 1	22,88	16,09	6,79	0,06	0,00	1,00	0,02	1,08	0,02	134000	0,77	1,08
3T3 +SV40 2	23,44	16,62	6,82	0,05	0,03	0,98	0,01					
3T3 +SV40 3	22,87	16,39	6,47	0,06	-0,25	1,25	0,02					

Abbildung 44: Relative *LT*-Expression nach abortiver SV40-Infektion in 3T3 und 10-1 Zellen auf *gapdh* normiert. Totale RNA wurde aus SV40 infizierten und nicht-infizierten (mock) Zellen isoliert. Mit Reverser Transkriptase wurde aus 1 µg RNA cDNA synthetisiert. 1 µl Aliquots wurden als Template für die *LT*-Primer (T5, T20) und *gapdh*-Primer (*gapdh1*, *gapdh2*) in der RealTime-PCR eingesetzt. Von drei unabhängigen Versuchen wurden je drei Replikate durchgeführt. Die Ct-Werte wurden mit der 7500 Software v1.4 bestimmt und die weiteren Berechnungen mit der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode erfolgten in Excel. Die ΔCt -Werte sind mit *gapdh* normiert worden. Bei der Berechnung des durchschnittlichen Expressionsunterschieds (ØRQ) zwischen 3T3 +SV40 und 10-1 +SV40 wurde die Probe 3T3+SV40 1 gleich 1 gesetzt und anschließend auf die Gesamtzellzahl bezogen. Ct: Cycle threshold; RQ: Relativer Expressionsunterschied; Std Err: Standardabweichung.

Die absolute Quantifizierung der SV40 Minichromosomen pro LT-positiver Zelle 10 h nach abortiver SV40-Infektion führte zu dem Ergebnis, dass die um den Faktor 1,4 erhöhte Menge an SV40 Minichromosom in 3T3 Zellen mit der um den Faktor 1,6 erhöhte LT-Expression korreliert. SV40-Infektionsversuche dieser Zellen zeigten zudem eine um den Faktor 1,6 durchschnittlich erhöhte Anzahl LT-positiver Zellen zu späteren Zeitpunkten (16-48 h), zu denen LT sein volles Expressionslevel erreicht hatte. Zusammenfassend kann man daher sagen, dass nach 10 h kein p53-Effekt auf die LT-Transkription festgestellt werden kann. Mögliche Gründe hierfür könnten einerseits der gewählte Zeitpunkt der Analyse sein und andererseits die Tatsache, dass das SV40 Minichromosom episomal vorliegt. Möglicherweise hat p53 im Komplex mit LT nur dann einen aktivierenden Einfluss, wenn SV40 im Wirtsgenom integriert vorliegt. Zudem kann angenommen werden, dass die Aufnahme von Virus in die 3T3 Zellen im Vergleich zu 10-1 Zellen begünstigt ist, da um den gleichen Faktor mehr SV40-DNA in der Zelle vorliegt wie *LT*-Transkripte und zu späteren Zeitpunkten auch LT-Protein.

2.12.2 Globaler Effekt

Um den postulierten globalen Effekt der Chromatin *Remodeling* Aktivität des LT-p53 Komplexes zu untersuchen, wurden Versuche in einem Zellsystem durchgeführt, in dem diese Aktivität in der Re-Expression eines vollständig bzw. teilweise reprimierten *mutp53*-Transgens (R270H) gemessen werden konnte. Dazu wurde das murine *mutp53*-Transgen in den pCIneo Vektor unter Kontrolle eines CMV-Promotors kloniert und stabil in Balb/c 3T3 Zellen transfiziert. Nur in wenigen selektierten Klonen konnte, trotz erfolgreicher Integration des Transgens in das Genom, eine *mutp53*-Expression detektiert werden. Deshalb wurde vermutet, dass epigenetische Mechanismen für die Repression des Gens verantwortlich sind (vergleiche auch 2.8) (Krepulat *et al.*, 2005).

Für die Analyse der angenommenen Chromatin *Remodeling* Aktivität des LT-p53 Komplexes wurden ausgewählte Klone - der schwach *mutp53*-exprimierende Klon 3T3*mutp53* C2 und der intermediär *mutp53*-exprimierende Klon 3T3*mutp53* C6 - abortiv mit SV40 infiziert. Die Gesamtzellextrakte wurden 34 h nach Infektion im Western-Blot auf Mengenunterschiede in der Expression von *mutp53* mit und ohne SV40 untersucht (Abbildung 45A). *mutp53* konnte vom endogenen *wtp53* unterschieden werden, da an das *mutp53*-Gen ein HA (Hämagglutinin)-Tag fusioniert wurde und somit biochemisch und immunhistochemisch mit einem spezifischen HA-Tag Antikörper nachgewiesen werden konnte.

Die SV40-Infektion führte in allen Zellen zu einer vergleichbaren LT-Expression. Im Vergleich zu nicht-infizierten 3T3*mutp53* C2 und C6 Zellen zeigte vor allem der LT-exprimierende Klon C2 eine signifikant gesteigerte *mutp53*-Menge. Dass es sich hierbei um Chromatin *Remodeling* handelt, konnte durch Versuche, in denen die oben genannten Zellen mit Chloroquin behandelt wurden, bestätigt werden. Chloroquin (CQ) ist eine diprotische schwache Base, welche an DNA binden und ihre superhelikale Struktur verändern kann und somit Einfluss auf die Replikation und Transkription hat (Weber *et al.*, 2000; Bakkenist & Kastan 2003). Behandlung der Zellen mit 50 µM CQ für 24 h führte zu einer erhöhten *mutp53*-Expression vor allem im Klon 3T3*mutp53* C2, die in den weiteren 24 h noch verstärkt wurde.

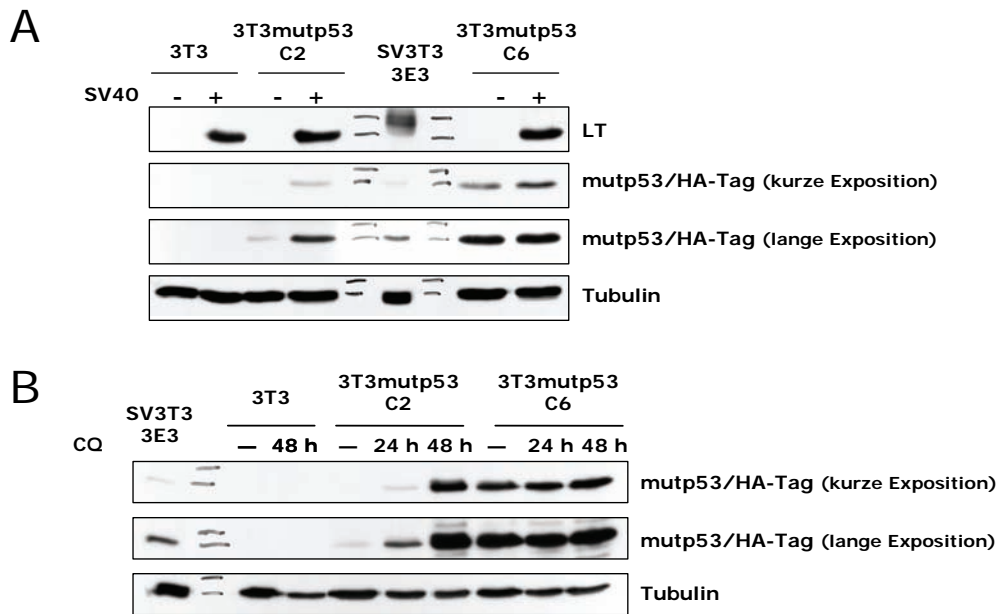


Abbildung 45: Analyse der globalen Chromatin Remodeling Aktivität durch den LT-p53 Komplex. (A) 34 h nach abortiver SV40-Infektion eines schwach mutp53-exprimierenden Klons (3T3mutp53 C2) und eines mittelstark-exprimierenden Klons (3T3mutp53 C6), sowie der Balb/c 3T3 Zellen, wurden Gesamtzellextrakte hergestellt. Diese wurden im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern auf die Expression von mutp53 (α -HA) und LT (R15) untersucht (13%iges SDS-Gel). Tubulin diente als Ladekontrolle und SV3T3 3E3 Zellen als Kontrolle für die mutp53-Expression. SV3T3 3E3 sind SV40 transformierte Balb/c Zellen, die zusätzlich mit dem pCIneomutp53 (R270H)-Konstrukt stabil transfiziert wurden. **(B)** 3T3mutp53 C2 und C6 Zellen wurden in 15 cm Kulturschalen ausplattiert und 24 h später mit 50 μ M CQ behandelt. Weitere 24 h bzw. 48 h später wurden die Gesamtzellextrakte im Western-Blot (13%iges SDS-Gel) mit den gleichen Antikörpern wie in (A) analysiert.

Nachfolgend wurde parallel zu den Versuchen in Zellkultur ein möglicher Einfluss von LT auf die Expression von stillgelegten mutp53-Transgenen *in vivo* analysiert. Diese Analysen wurden von Frau Dr. Krepulat durchgeführt (Krepulat *et al.*, 2005). Hierbei wurde eine WAP-*mutp53R270H* transgene Linie verwendet, die nach Induktion des WAP-Promotors negativ für die Expression von mutp53 auf Transkriptions- und Protein-Ebene war, eine Integration des Transgens jedoch bestätigt wurde. Durch Verpaarungen mit einer SV40 LT transgenen BALB/c WAP-T Maus-Linie (Schulze-Garg *et al.*, 2000), konnte das *in vitro* System nachgestellt werden. Die bi-transgenen WAP-*mutp53R270H* x WAP-T Weibchen wurden nach Induktion der WAP-Promotoren (durch Verpaarung und Schwangerschaft) am vierten Tag der Laktation präpariert und auf eine mögliche Re-Expression von mutp53 untersucht. Diese konnte durch Analyse auf Transkriptionsebene nachgewiesen werden und durch Immunhistochemie die spezifische Co-Expression von mutp53 und LT in einem geringen Prozentsatz (1%) der Mammaepithelzellen bestätigt werden. Auffallend war zudem, dass in allen mutp53-exprimierenden Zellen einen Co-Expression von LT zu detektieren war.

In vitro sowie *in vivo* trug LT in einem wtp53 Hintergrund zu einer Re-Expression bzw. verstärkten Expression teilweise reprimierter Transgene (*mutp53*) bei, die unter Kontrolle von nicht LT-spezifischen Promotoren (CMV, WAP) standen.

VI DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde in Balb/c Mausembryofibroblasten (MEF) die schützende Funktion von p53 in der spontanen Immortalisierung der postulierten p53-Helferfunktion in der LT- bzw. SV40-induzierten zellulären Transformation gegenüber gestellt. Ziel dieser Arbeit war die vergleichende Analyse dieser dualen Rolle des Tumorsuppressors p53.

Die Schutzfunktion von p53 vor der malignen Entartung und damit Immortalisierung der Zellen ist ausführlich analysiert worden, jedoch wird immer noch diskutiert, inwieweit die Standard-Kulturbedingungen einen „Zellkulturschock“ auslösen und verantwortlich sind für das häufige Auftreten spontaner Mutationen im *p53*-Gen muriner Primärzellen. Eine Aufgabe dieser Arbeit war es daher, neben der Darstellung der postulierten konträren Funktionen von p53, auch die Antwort des Tumorsuppressors auf den Einfluss der atmosphärischen Sauerstoffkonzentration (21%) im Vergleich zur physiologischen Sauerstoffkonzentration (im Gewebe: 0,5-10%; hier: 5%) während der Immortalisierung zu untersuchen. Neben dieser Analyse bestand das Hauptziel der Arbeit darin, neue Erkenntnisse über die Funktion von p53 im Komplex mit SV40 LT zu erlangen, die eine LT-induzierte Transformation begünstigen.

1 p53 als Ziel von spontanen Mutationen in der Immortalisierung, dem ersten Schritt in Richtung Transformation

1.1 Einfluss von oxidativem Stress auf die spontane Immortalisierung von Balb/c MEF: Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und „Zellkulturschock“

Die Immortalisierung einer Zelle ist ein wichtiger Schritt in Richtung ihrer malignen Transformation. Um die unbegrenzte Proliferation zu verhindern, besitzen Säugetierzellen verschiedene Mechanismen. Die Barriere bei der Kultivierung primärer MEF ist ein früher Wachstumsarrest nach bereits 10-15 Populationsverdopplungen. Dieser wird entweder direkt durch aktiviertes p53 oder über p19^{ARF}, welches z.B. durch das Onkogen Ras aktiviert wird, ausgelöst. Alternativ können apoptotische Signalwege über Transkription weiterer p53-Zielgene eingeleitet werden. Es wird diskutiert, ob die schnell eintretende zelluläre Seneszenz der primären MEF nach Explantation durch die Kultivierungsbedingungen *in vitro* ausgelöst wird, die einen sogenannten „Zellkulturschock“ hervorrufen (Sherr & DePinho 2000). Bei der Präparierung von MEF aus Embryonen werden die physiologischen Zustände drastisch verändert. So verlieren primäre Fibroblasten unter anderem ihre natürlichen Zell-Zell-Kontakte, sind nicht mehr an die streng regulierte Nährstoff-, Hormon- und Salzversorgung des natürlichen Organismus angeschlossen und müssen sich statt dessen an die Plastikoberfläche der Zellkulturschale und an neue Medium-Zusammensetzungen (Serum) anpassen. Weiterhin sind sie einer nicht-physiologischen Sauerstoffkonzentration ausgesetzt (21% O₂ vs. 0,5 – 10% O₂), die eine vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und somit oxidativen Stress hervorrufen kann (de Groot & Littauer 1989). Daher ist es wahrscheinlich, dass dieser „Zellkulturschock“ für die Zelle Stress bedeutet und sie mit Seneszenz und Zelltod reagiert. Eine Adaption an diese unnatürlichen Kultivierungsbedingungen könnte durch Mutationen in wichtigen

zellulären Schutzmechanismen erfolgen und zu einer Immortalisierung der Zelle führen. Dennoch sollte man diesen Wachstumsarrest der Zelle als einen evolutionären Schutzmechanismus vor onkogenen Einflüssen betrachten, da die *in vitro* Kultivierungsbedingungen die gleiche zelluläre Antwort auslösen wie z.B. onkogenes Ras. Eine Mutation in entweder $p19^{ARF}$ oder $p53$ - und damit der Verlust des ARF/p53-Signalweges - reicht aus, damit einige wenige Klone den Wachstumsarrest bzw. die zelluläre Seneszenz überwinden und als immortale Zellen weiter proliferieren können (Kamijo *et al.*, 1997).

Primäre Balb/c wtp53 MEF, die in dieser Arbeit nach einem 3T3-ähnlichen Schema passagiert wurden, zeigten bei atmosphärischem Sauerstoff (21% O₂) nach 10 Populationsverdopplungen einen seneszenten Phänotyp (vergrößerte, abgeflachte Morphologie, Expression der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase) (Dimri *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu hatten die bei physiologischen 5% O₂ kultivierten wtp53 MEF einen weit weniger ausgeprägten seneszenten Phänotyp, was auch anhand der PDL gezeigt werden konnte. MEF bei 5% O₂ verringerten ebenfalls ihre Proliferationsaktivität nach ca. 8 Populationsverdopplungen. Es kam jedoch zu keinen negativen PDL-Werten wie bei den bei 21% O₂ kultivierten MEF, die ein Absterben der Zellen implizieren (Abbildung 8). Es waren somit deutliche Unterschiede in der Wachstumskinetik für die unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen zu erkennen, die einen negativen Einfluss von unnatürlichem hohem Sauerstoffgehalt vermuten lassen. Diese Tendenz stimmt mit den Ergebnissen der Arbeit von Parrinello *et al.* (2003) überein. MEF verschiedener Mausstämme wurden in dieser Studie bei physiologischen Sauerstoffgehalt (3% O₂) und bei Standardbedingungen (20% O₂) kultiviert. Dabei war eine erhöhte Proliferationskapazität sowie höhere Sättigungsdichten bei 3% O₂ zu erkennen. Zudem zeigten MEF aus unterschiedlichen Mausstämmen bei physiologischen Bedingungen keine Anzeichen von Seneszenz (FVB, C57Bl/6) oder nur eine verminderte Seneszenz (Balb/c).

Ein weiterer Hinweis auf eine erhöhte Stressinduktion durch nicht-physiologische Bedingungen zeigte sich auch in der gesteigerten Akkumulation von $p21^{Waf1/Cip1}$ während des Passagierens dieser Zellen (Abbildung 10). Bei der Kultivierung von Balb/c wtp53 MEF bei 5% und 21% Sauerstoff war jedoch keine Expression von p53 in der Western-Blot-Analyse detektierbar (Abbildung 10). In anderen Studien konnte bereits die Transaktivierung von $p21^{Waf1/Cip1}$ durch geringe Mengen von p53 bei mäßigem zellulären Stress beobachtet werden. Die Expression von $p21^{Waf1/Cip1}$ kann durch Inhibierung G1- und S-Phase abhängiger Kinasen, den sogenannten Zyklin-abhängigen Kinasen (cdk) (Luo *et al.*, 1995) zum Zellzyklusarrest führen; außerdem verringert $p21^{Waf1/Cip1}$ die DNA-Replikation durch Blockierung der DNA-Polymerase Aktivität. Die Zelle erlangt dadurch Zeit, aufgetretene DNA-Schäden zu reparieren.

Der „Zellkulturschock“ kann die Zellen auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Wie die Ergebnisse zeigen, haben die erhöhte Sauerstoffkonzentration und der dadurch vermutlich ausgelöste oxidative Stress während der Kultivierung einen negativen Einfluss auf die Proliferation der Zellen. Oxidativer Stress bezieht sich dabei auf ein Ungleichgewicht zwischen der Konzentration zellulärer Antioxidantien und der Erzeugung von ROS. Dieser auf die Zelle einwirkende genotoxische Stress führt zur genomischen Instabilität und ist *in vivo* Auslöser zahlreicher Krankheiten, z.B. Krebserkrankungen, Arteriosklerose, Alzheimer, Myotone Dystrophie und Diabetes (Kaneto *et al.*, 2007; Moylan & Reid 2007; Bonomini *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2008).

Aerobe Organismen sind ständig ROS ausgesetzt, die täglich ca. 20 000 DNA-Basen verändern (Beckman & Ames 1997). ROS, zu denen Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikale ($\text{OH}\cdot$) und Superoxid ($\text{O}_2\cdot^-$) zählen, sind Nebenprodukte normaler biologischer Prozesse, die z.B. bei der mitochondrialen Atmung, bei Entzündung (*respiratory burst*), oder der metabolischen Hydroxylierung entstehen. Eine vermehrte ROS Bildung kann auch bei Einwirken von ionisierenden Strahlen, Chemotherapeutika und UV-Licht beobachtet werden. ROS können DNA-Schäden auslösen, die zu Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen (DSB) und zur Oxidation der Base Guanin zu 8-Hydroxyguanin führen können (Karanjawala *et al.*, 2002). Zudem wirken ROS aktivierend auf Onkogene bzw. supprimierend auf Tumorsuppressoren und können Lipide (Lipidperoxidation) und Proteine (Denaturierung) angreifen. Deshalb werden sie auch als intrazelluläre Mutagene bezeichnet. Die Zelle besitzt zahlreiche Antioxidantien, wie z.B. die Katalase (CAT), die Superoxiddismutase (SOD), die Glutathionperoxidase (GPx) oder Vitamine, die die freien Radikale neutralisieren können und so für einen niedrigen ROS-Gehalt sorgen (Michiels *et al.*, 1994) (Abbildung 46).

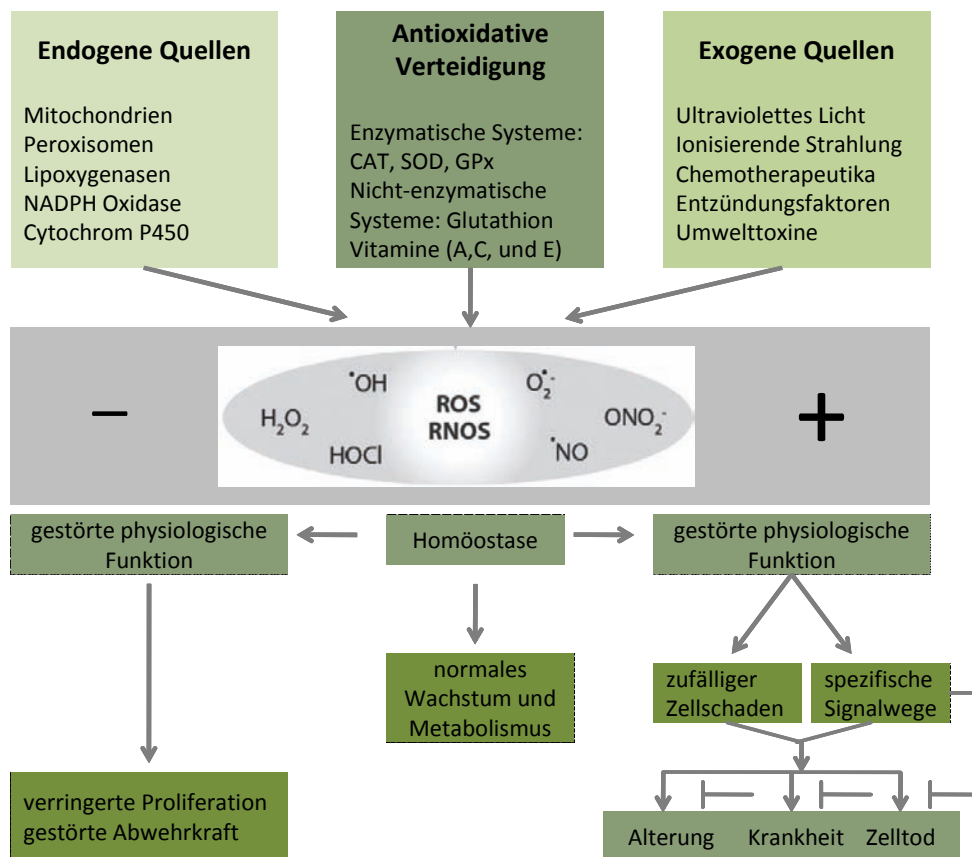


Abbildung 46: Gleichgewicht zwischen Oxidation und Antioxidation. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden während des normalen Metabolismus in Mitochondrien und Peroxisomen sowie von zytosolischen Enzymen erzeugt. Zusätzlich lösen externe Faktoren die ROS Produktion aus. Ein hochentwickeltes enzymatisches und nicht-enzymatisches antioxidatives Verteidigungssystem reguliert den allgemeinen ROS-Gehalt um die physiologische Homöostase zu bewahren. Zu ihnen zählen Katalase (CAT), Superoxiddismutase (SOD) und Glutathion Peroxidase (GPx). Eine Verringerung der ROS-Konzentration unter den homöostatischen Level kann die physiologische Rolle der ROS in der Proliferation und dem Abwehrmechanismus der Zelle stören. Gleichzeitig sind vermehrte ROS schädlich für die Zelle und führen zu Zelltod, schnelleren Alterung und altersbedingten Krankheiten. Die Beeinträchtigung wird durch Schaden an Proteinen, Lipiden und DNA ausgelöst. Zusätzlich werden Stresssignale durch erhöhte ROS-Level ausgesandt, die spezifische Redox-sensitive Signalwege aktivieren. Diese wiederum können schützende oder auch schädliche Funktionen für die Zelle haben; verändert nach (Finkel & Holbrook 2000).

Kürzlich konnte für p53 eine direkte antioxidative Funktion nachgewiesen werden, was seine Bedeutung als „Wächter des Genoms“ zusätzlich hervorhebt (Sablina *et al.*, 2005). Bei mildem reversiblen DNA-Schaden, der durch natürlich auftretende ROS ausgelöst wird, können geringe p53-Mengen die Transaktivierung antioxidativer Gene steuern, wie z.B. Gene der Sestrin-Familie (Budanov *et al.*, 2004) und GPx (Tan *et al.*, 1999). Diese senken den intrazellulären ROS-Gehalt und schützen somit die Zelle vor DNA-Schaden. Geringe Mengen an ROS, die z.B. durch Wachstumsfaktoren induziert werden, können als Signalüberträger in zellulären Signalkaskaden agieren, wodurch die Aktivierung von proliferativen Genen erfolgt (Lo *et al.*, 1996; Irani *et al.*, 1997). Bei intermediären Dosen an ROS kann aktiviertes und dadurch stabilisiertes p53 entweder einen reversiblen oder irreversiblen Wachstumsarrest einleiten. Durch massiven oxidativen Stress wird ein positiver *feedback loop* zwischen p53 und ROS ausgelöst (Martindale & Holbrook 2002): hohe Dosen an ROS aktivieren p53, welches unter diesen Bedingungen pro-oxidative Gene, wie z.B. PIG3 (Polyak *et al.*, 1997) und Gene, welche die mitochondriale Atmung aktivieren können (Matoba *et al.*, 2006), transaktiviert, die zu einem weiteren Anstieg von ROS führen. Die daraus resultierenden hohen ROS-Level sind daran beteiligt, irreparabel DNA-geschädigte Zellen durch den Zelltod (Apoptose oder Nekrose) zu beseitigen (Johnson *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1999). Damit besitzt die Zelle einen wichtigen Schutzmechanismus vor Entartung aufgrund ROS-vermittelter Mutationen. In vielen Tumoren werden erhöhte Mengen an ROS detektiert und Antioxidantien können durch Reduktion von ROS zur einer verminderten Tumorigenität beitragen (Behrend *et al.*, 2003; Klaunig & Kamendulis 2004).

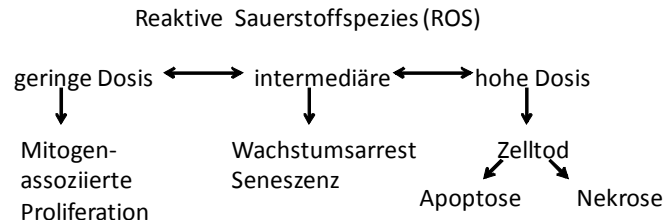


Abbildung: ROS führen zu einem breiten Spektrum von zellulären Antworten. Die Antworten sind von der Schwere des Schadens, dem Zelltyp, dem Ausmaß der Dosis und der Expositionslänge abhängig. Normalerweise sind geringe ROS-Dosen mitogen und fördern die Zellproliferation, während intermediäre Dosen zu einem temporären oder permanenten Wachstumsarrest (z.B. replikative Seneszenz) führen. Massiver oxidativer Stress verursacht Zelltod entweder durch Apoptose oder Nekrose (nach Martindale & Holbrook 2002).

Die aufgetretene zelluläre Seneszenz (und der Zelltod) in den Balb/c MEF bei 21% Sauerstoff kann daher Resultat einer Akkumulation von oxidativem Stress, genauer gesagt einer erhöhten ROS-Produktion und möglicherweise fehlender wichtiger Antioxidantien (z.B. α -Tocopherol und Ascorbat) im Zellkulturmedium während der Kultivierung sein. Durch Reduktion der Sauerstoffgehalts (5% O₂) kann ein seneszenten Phänotyp der Balb/c MEF vermindert werden. Bis zum Eintreten der Seneszenz konnte jedoch wtp53 biochemisch nicht detektiert werden, was eher für einen geringen Schaden durch ROS spricht und einer Proliferation zugute kommen müsste (Abbildung 10). Man kann vermuten, dass geringe Mengen von p53 in diesem System, welches transkriptionell aktiv ist ($p21^{Waf1/Cip1}$), ausreichen um einen irreversiblen Wachstumsarrest einzuleiten. Hinzu kommt, dass zum Zeitpunkt der Seneszenz keine Proben der wtp53 MEF bei 20% O₂ entnommen werden konnten und so eine mögliche erhöhte p53-Konzentration nicht

nachgewiesen werden konnte.

Die Analyse der Immortalisierung von primären Balb/c p53-null MEF in dieser Arbeit zeigte keine Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration. p53-defiziente Balb/c MEF proliferierten mit annähernd konstanten PDL bei 5% und 21% Sauerstoff, und es konnte weder eine Verlangsamung der Proliferation noch Anzeichen eines Wachstumsarrests detektiert werden. Die Immortalisierung der p53-null MEF erfolgte spontan, unabhängig von den Kultivierungsbedingungen, wie auch schon in ähnlichen Studien beschrieben werden konnte (Harvey & Levine 1991). Ein möglicher Grund hierfür ist der Verlust der tumorsupprimierenden p53-Funktionen bezüglich Einleitung der Seneszenz bzw. Apoptose. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass durch Verlust von p53 und fehlender Aktivierung antioxidativer Gene es zu einer Akkumulation von ROS kommt. Diese führt zu einer höheren ROS-abhängigen DNA-Schadensrate und zu einer für die Malignität vorteilhaften genetischen Instabilität (Sablina *et al.*, 2005). Aufgrund eines fehlenden ROS-p53 *feedback loop* und somit keiner weiteren Erhöhung der intrazellulären ROS-Menge, die unter normalen Bedingungen zur Apoptose bzw. Nekrose führt, können p53-defizienten Zellen uneingeschränkt proliferieren.

Interessanterweise wurde vor kurzem beschrieben, dass humane p53-null Tumorzellen im Vergleich zu isogenen p53-heterozygoten und wtp53 Zellen eine erhöhte glykolytische Aktivität bei vergleichbar produzierten ATP-Mengen aufweisen (Matoba *et al.*, 2006). Diese wiederum führt zu einer Reduktion von zu hohem ROS-Gehalt in p53-defizienten Zellen, und kann durch Schutz vor ROS-induzierter Seneszenz und Apoptose diesen Zellen eine verstärkte Proliferationskapazität verleihen (Brand & Hermfisse 1997). Studien mit murinen embryonalen Stammzellen (ES), die ein natürlich unbegrenztes Proliferationspotential besitzen, zeigen vergleichbare Resultate: eine hohe Aktivität glykolytischer Enzyme, einen verstärkten glykolytischen Fluss, eine geringe mitochondriale Sauerstoffaufnahme sowie eine verstärkte Abwehr gegen oxidativen Schaden auch bei 20% O₂ (Kondoh *et al.*, 2007). Dieser metabolische Wechsel von mitochondrialer Atmung auf aerobe Glykolyse, der allgemein in Tumorzellen beobachtet werden kann, wird als Warburg Effekt bezeichnet und bleibt auch unter normalen O₂-Konzentrationen erhalten (Warburg 1956; Kim & Dang 2006). Tumorzellen (und murine ES Zellen) erlangen infolgedessen gegenüber Nicht-Tumorzellen einen Wachstumsvorteil in einer hypoxischen Umgebung, wie z.B. suboptimal mit O₂ versorgte Tumore (Gatenby & Gillies 2004). Die ATP-Menge, die durch Glykolyse erzeugt wird, ist stöchiometrisch weniger effizient als die durch mitochondriale Atmung erzeugte ATP-Menge. Jedoch wird durch das Onkogen Akt ein ausreichend hoher glykolytischer Fluss erzeugt, um die Zelle mit adäquaten Mengen an ATP zu versorgen (Elstrom *et al.*, 2004; Plas & Thompson 2005).

Kürzlich konnte das *SCO2*-Gen, das eine Schlüsselfunktion in der aeroben Atmung hat, als p53-Zielgen in Mäusen und humanen Tumorzellen identifiziert werden (Matoba *et al.*, 2006). *SCO2* ist ein Co-Aktivatoren der Cytochrom-C-Oxidase, der in einem Multiproteinkomplex eines der wichtigsten terminalen Enzyme der mitochondrialen Atmungskette ist. Demgemäß konnte in p53-null oder mutp53 Zellen *in vitro* und *in vivo* beobachtet werden, dass aufgrund einer verringerten Transaktivierung von *SCO2* eine verringerte Sauerstoffaufnahme durch die Mitochondrien und ein kompensatorischer Wechsel zur Glykolyse vorliegt. Durch Re-Expression von *SCO2* kann die aerobe Atmung in p53-defizienten und mutp53 Zellen wieder hergestellt werden, die die Zellen wieder empfindlicher gegenüber oxidativen Stress (ROS) macht (Matoba *et al.*, 2006). Der

Tumorsuppressor p53 hat somit einen entscheidenden Einfluss in der Regulation von oxidativem Stress und Metabolismus und verbindet dadurch Glykolyse, ROS und Zellproliferation.

Die in den Balb/c wtp53 MEF aufgetretenen Unterschiede der Proliferation während der Immortalisierung und auch der p53-Mutation nach erfolgter spontaner Immortalisierung können ebenfalls mit den oben beschriebenen Mechanismen der aeroben Glykolyse und Reduktion des Ausmaß an oxidativem Stress erklärt werden. Kondoh *et al.* (2007) konnten in primären wtp53 MEF (C57Bl/6 Mäuse) einer frühen Passage bei 3% O₂ im Gegensatz zu 20% O₂ einen 2fach erhöhten glykolytischen Fluss detektieren. Ausserdem konnten sie zeigen, dass durch eine Kultivierung bei geringer Sauerstoffkonzentration (3% O₂) der oxidative Schaden vermindert werden kann. Dies wurde anhand 8-OHdG (8-Hydroxy-2-deoxy-Guanosin), einem Biomarker für oxidativen Stress, gemessen. Somit können das verringerte Ausmaß der Seneszenz bei 5% O₂ und die „heterozygote“ Mutation der MEF5 Zellen (siehe auch Ergebnisse 1.3) der erhöhten glykolytischen Aktivität und verstärkten Resistenz gegen oxidativen Schaden dieser Zellen zugesprochen werden.

1.2 Verminderte Schadensreparatur in Balb/c MEF

Die spontane Immortalisierung der primären Balb/c wtp53 MEF geht unabhängig von der Sauerstoffkonzentration mit einer Mutation im *p53*-Gen einher. So wurde sowohl bei einer Kultivierung bei atmosphärischen Sauerstoffbedingungen (MEF20) als auch bei physiologischen Bedingungen (MEF5) eine Punktmutation in der DBD von *p53* festgestellt. Auffällig war jedoch, dass die Sequenzanalyse der MEF5 Zellen eine heterozygote Mutation aufweist, die wahrscheinlich auf zwei Populationen zurückzuführen ist, eine wtp53 und eine mutp53 Population (Details siehe Ergebnisse 1.3).

Die relativ häufig auftretenden *p53*-Gen Mutationen in Balb/c wtp53 MEF während der spontanen Immortalisierung (Harvey & Levine 1991) könnten aus einem fehlerhaften Reparaturmechanismus resultieren. Der Balb/c Mausstamm zeigt Polymorphismen in zwei für die Beseitigung von DNA-Schäden wichtigen Loci: dem *Prkdc*-Locus, der für die katalytische Untereinheit des DNA Doppelstrangbruch-Reparaturenzyms DNA-PK (DNA-PKcs) kodiert und dem *Cdkn2a*-Locus, der für die im Zellzyklus wichtigen Proteine p16^{INK4a} und p19^{ARF} kodiert. Mutiertes p16^{INK4a} kann infolgedessen die Phosphorylierung von pRb durch Zyklin-Cdk Komplexe nur sehr begrenzt inhibieren, welche für die Einleitung eines Wachstumsarrests notwendig ist. Die p19^{ARF}-Funktionen sind von dem Polymorphismus nicht betroffen (Zhang *et al.*, 1998; Blackburn *et al.*, 2003). Die für die Seneszenz in murinen Zellen verantwortlichen Gene, *p19^{ARF}* und *p53*, zeigen somit keine genetischen Veränderungen in den primären Zellen dieses Mausstammes. Der Polymorphismus im *Prkdc*-Locus (Abbildung 47) führt jedoch zu einer verminderten Aktivität der DNA-PKcs und somit zu einer geringeren DNA-Schadenreparatur in den Balb/c Zellen (Yu *et al.*, 2001). DNA-PKcs führt zusammen mit den regulatorischen Untereinheiten Ku70 und Ku80 im Multiproteinkomplex DNA-PK seine Funktionen aus.

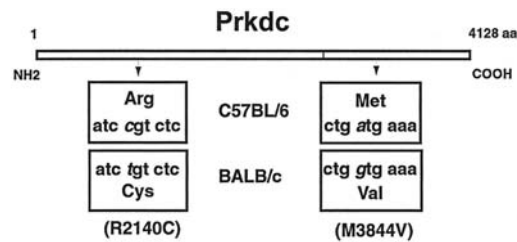


Abbildung 47: Schematische Darstellung des Prkdc-Polymorphismus. Der gesamte *open reading frame* von Prkdc wurde in cDNA-Fragmenten sequenziert, die aus mRNA von BALB/cByJ und C57BL/6ByJ stammen. Zwei Nukleotid-Veränderungen konnten detektiert werden, die zu dem Polymorphismus in Codon R2140C und M3844V führen (Yu *et al.*, 2001).

DNA-PKcs, die, wie auch ATM und ATR, der Familie der Phosphatidylinositol-3-Kinase verwandten Kinasen (PIKKs) angehört, spielt eine wichtige Rolle in der DNA-Schadenserkennung, -Reparatur und der Transkription sowie dem Erhalt der chromosomalen Stabilität und der Telomer-Integrität (Espejel *et al.*, 2002). Durch das Ku-Heterodimer (Ku70 und Ku80) wird es an DSB rekrutiert, wodurch es sich selbst phosphorylieren kann. Phosphoryliertes DNA-PKcs komplexiert nun mit der DNA-Ligase-IV, die zur Religation des DSB nach Prozessierung der Strang-Enden führt. DNA-PKcs hat somit eine wichtige Funktion im nicht-homologen *end-joining* (NHEJ) (Gottlieb & Jackson 1993; DeFazio *et al.*, 2002). Zudem kann DNA-PKcs andere DNA-Bindeproteine sowie Transkriptionsfaktoren phosphorylieren. So wird p53 an Serin15 und Serin37 durch DNA-PKcs phosphoryliert, wodurch es stabilisiert und aktiviert wird, und infolgedessen eine Verstärkung der Schadensantwort auftritt (Lakin *et al.*, 1999). Weiterführende Studien zeigen jedoch, dass nach DNA-Schaden die transkriptionelle Aktivität von p53 und die daraus folgende Kontrolle des Zellzyklus auch in Zellen mit mutierten DNA-PKcs normal funktioniert (Huang *et al.*, 1996; Jongmans *et al.*, 1996). Diese Erkenntnis steht im Einklang damit, dass in Balb/c wtp53 MEF trotz verminderter DNA-PKcs-Aktivität die Induktion eines Wachstumsarrests möglich ist.

Einen Hinweis auf eine erhöhte Mutationsfrequenz bei oxidativem Stress in Zellkultur konnten auch Busuttil *et al.* geben (Busuttil *et al.*, 2003). Sie untersuchten mit Hilfe des *lacZ* Reportergens die Häufigkeit und das Spektrum auftretender Mutationen in MEF von *lacZ* Mäusen. Ergebnis ihrer Studie war ein Auftreten von Seneszenz und eine Akkumulation von Mutationen während der Immortalisierung bei 20% Sauerstoff, wohingegen bei 3% O₂ keine Seneszenz auftrat und keine erhöhte Mutationsrate im Vergleich zu MEF der ersten Passage erkannt werden konnte. ROS können in der Zelle DNA-Schäden erzeugen, deren Signatur oft eine Transversion von G:C nach T:A ist, welche auch Busuttil *et al.* bei *lacZ*-MEF feststellen konnte. Bei oxidativem Stress sind die DNA-Reparaturmechanismen überfordert wodurch Fehler in der DNA akkumulieren können. Die daraus resultierenden Mutationen können dann wiederum der Zelle einen Wachstumsvorteil verschaffen und zur Transformation der Zelle beitragen. Die Mutationen in den MEF5 und MEF20 Fibroblasten zeigen nicht die typische Signatur des oxidativen Stress, sondern G:C nach C:G Transitionen (Abbildung 13). Da aber hier nur zwei Populationen aus einem Embryo untersucht wurden ist statistisch keine Aussage möglich.

Ein weiterer Grund für das Auftreten von p53-Mutationen in Balb/c MEF könnte auch die Zelldichte

während der Kultivierung sein. Die Dichte der Zellen während der Kultivierung *in vitro* hat einen großen Einfluss auf Zell-Zell-Kontakte sowie durch Adhäsion ausgelösten Signale und Zell-Matrix-Interaktionen. Durch Herauslösen der MEF aus dem streng kontrollierten *in vivo* Zellverbund können sich während der Kultivierung der MEF verschiedene zelluläre Prozesse verändern, wie z.B. die Versorgung mit Wachstumsfaktoren und die Zell-Motilität. MEF wurden bei Busuttil *et al.* mit $1 \times 10^6/150$ cm²-Flaschen passagiert. Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Arbeit Zelldichten von $1 \times 10^6/10$ cm Kulturschale (entspricht 56 cm²) verwendet. Rittling und Denhardt konnten zeigen, dass *p53* Mutationen bevorzugt bei höheren Zelldichten während der Kultivierung auftreten (3T12 Schema, $1,2 \times 10^6/6$ cm) (Rittling & Denhardt 1992). Ausserdem konnte festgestellt werden, dass eine erhöhte Zelldichte die *p53*-Antwort auf DNA-Schaden abschwächt (Bar *et al.*, 2004), und so zum vermehrten Auftreten von DNA-Mutationen beitragen kann.

1.3 Charakterisierung der *p53*-Punktmutationen in MEF5 und MEF20 Zellen

Auffällige Merkmale der Immortalisierung der Balb/c MEF in der hier vorliegenden Arbeit waren das Auftreten von je einer Punktmutation in der DBD von *p53* und der zeitliche Rahmen bzw. Zeitpunkt, in dem die *p53*-Mutation aufgetreten ist. Die MEF stammen aus dem gleichen Embryo und wurden in Passage 1 in zwei Inkubatoren mit entweder 5% oder 21% Sauerstoffgehalt überführt und nach einem abgewandelten 3T3-Schema passagiert. Die Untersuchung der Mutationen erfolgte nach Synthese von cDNA aus der mRNA von *p53*. Demzufolge wurden nur die *p53*-kodierenden Exone auf Mutationen untersucht.

Sowohl bei 5% als auch bei 21% Sauerstoff konnte ab Passage 21 in der Western-Blot-Analyse *p53* detektiert werden, welches nachweislich mutiert war (Abbildung 10). Da es sich bei MEF5 und MEF20 Zellen um keine selektionierten Einzelklone handelt, kann der genaue Zeitpunkt der Mutation nicht festgestellt werden, jedoch ist das relativ gleichzeitige Auftreten (bzw. die Detektion) von mutiertem *p53* bemerkenswert. Gegen epigenetische Veränderungen während der Immortalisierung spricht die „klonale“ Natur der MEF5 und MEF20 Zellen, die jeweils nur eine Punktmutation im *p53*-Gen zeigen (Abbildung 13). Diese hat sich während der hier angewandten Kultivierungsbedingungen durchgesetzt. Epigenetische Mechanismen würden sich global auf die gesamte immortale Population auswirken und eventuell mehrere Klone hervorrufen.

MEF5 Zellen zeigten eine *missense*-Punktmutation im Codon 149 (CCA → GCA; P149A) und MEF20 Zellen im Codon 273 (GCC → GGC; A273G). Diese Punktmutationen liegen beide in der zentralen Domäne von *p53* und führen zur Expression eines Volle-Länge mutp53 mit verlängerter Halbwertszeit. Auch in humanen Tumoren sind *missense*-Punktmutationen in der DBD von *p53* die häufigste Mutationsform (Hussain & Harris 1998). Somatische Mutationen im Mensch, die zu dem gleichen AS-Austausch führen wie in MEF5 und MEF20 Zellen, treten jedoch sehr selten auf. In der *IARC TP53 Database* konnten in 20458 untersuchten Individuen zwei somatische Mutationen im humanen *p53* Codon 152 (P152A; entspricht murin P149A) in einem Leberkarzinom und Nebennierentumor gefunden werden (Reincke *et al.*, 1994; Tannapfel *et al.*, 2001). Allerdings beträgt die Häufigkeit von Transitionen von G:C>C:G nur ca. 2% der Mutationen in diesem Codon; dort wurden hauptsächlich G:C>A:T (30%) Transversionen detektiert. Das Codon 276 (murin 273)

war in drei von 20458 untersuchten Individuen so mutiert, dass es zu einem AS-Austausch von Alanin zu Glycin kam. Die Tumore betrafen Brust, Hals und Nacken sowie Magen (Strickler *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1998; Cabelguenne *et al.*, 2000). Auch in diesem Codon werden vermehrt Transversionen detektiert. Bei einem Vergleich der humanen *p53*-Mutationen mit denen des murinen Systems muss jedoch berücksichtigt werden, dass trotz der großen *p53*-Homologie zwischen den beiden Spezies Unterschiede vorliegen (Hergenhahn *et al.*, 2004).

MEF5 Zellen zeigten in der Sequenzanalyse von *p53* an der mutierten Stelle zwei Basen: die mutierte Base (G) und die Original Base (C) (Abbildung 13). Da keine Einzelstrang-Konformationsanalyse (SSCP, *single-strand-conformation-polymorphism analysis*) (Orita *et al.*, 1989) durchgeführt wurde, kann man nicht entscheiden, ob es sich dabei um zwei Populationen handelt, einer *wtp53*- und einer *mutp53*-Expimierenden oder aber um eine heterozygote *p53*-Mutation.

Mutp53 kann mit *wtp53* Hetero-Oligomere bilden und somit einen dominant negativen Effekt gegenüber *wtp53* ausüben, wodurch die Wildtyp-Funktionen verloren gehen. Ein Verlust der *wtp53* Funktion konnte für MEF5 Zellen nach Bestrahlung der Zellen mit 20 Gy Gamma-Strahlung anhand der Western-Blot-Analyse bestätigt werden (Abbildung 14). Dieses Ergebnis spricht für eine heterozygote *p53*-Mutation in MEF5 Zellen und einen dominant-negativen Effekt des exprimierten *mutp53*. MEF20 Fibroblasten zeigten trotz homozygoter Mutation dagegen noch eine Transaktivierung von *p21^{Waf1/Cip1}*. Dies ist aber nicht ungewöhnlich, da unterschiedliche Studien eine residuale *p53*-Transaktivierung von Zielgenen von mutiertem *p53* beobachten konnten (Monti *et al.*, 2002). Typisch für diese Mutanten war eine Induktion von *p21^{Waf1/Cip1}*, jedoch nicht von *Bax* (Ludwig *et al.*, 1996; Rowan *et al.*, 1996). Die verringerte DNA-Bindung der Mutanten reichte wahrscheinlich noch aus für die hoch-affinen Bindungsstellen des *p21^{Waf1/Cip1}* Promoters jedoch nicht für Promotoren, an die *wtp53* weniger stark bindet.

Aufgrund der höheren Proliferationskapazität der MEF5 und MEF20 im Vergleich zu *wtp53* Zellen (Abbildung 9) kann man davon ausgehen, dass Zellen mit mutiertem *p53* sich während der Kultivierung durchgesetzt haben. Es ist daher wahrscheinlich, dass vor Passage 21 bereits in manchen Zellen *mutp53* exprimiert wurde, die Menge jedoch für biochemische Analysen nicht ausreichte.

2 *p53* unterstützt die LT-vermittelte Transformation von Balb/c Zellen

In dem hier verwendeten Balb/c-System konnte bestätigt werden, dass der Tumorsuppressor *p53* aufgrund seiner Funktion als negativer Zellzyklusregulator ein bevorzugtes Ziel für Mutationen in der spontanen Immortalisierung ist. Eine Zelle kann durch Verlust von *wtp53* (*loss of function*) durch Deletionen (selten) bzw. Punktmutationen, oder durch Verlust bestimmter *p53*-Aktivierungswege (*p19^{ARF}*) immortalisiert und für weitere genetische Veränderungen zugänglich werden, die letztendlich zur Transformation führen. Während der SV40 bzw. SV40 LT-vermittelten Transformation von Balb/c Fibroblasten scheint *wtp53* nach den hier vorliegenden und anderen

Arbeiten aber Eigenschaften zu besitzen, die die LT-vermittelte Transformation unterstützen. Allgemeiner Konsens ist, dass SV40 LT seine transformierenden Funktionen nach nicht-permissiver Infektion des Virus durch Rekrutierung der negativen Zellzyklusregulatoren pRb und p53 und deren transkriptioneller Inaktivierung ausübt, wobei die beiden anderen frühen SV40-Proteinen, st und 17kT, einen unterstützenden Einfluss haben. SV40 LT bindet dabei an die p53-DBD und führt im Gegensatz zu Onkogenen von Adeno- bzw. Papillomaviren, zur metabolischen Stabilisierung von p53 im Nukleus der Zellen, die p53 durch Degradation eliminieren. Dies impliziert einen Gewinn neuer Funktionen von p53 im LT-Komplex in der zellulären Transformation, vergleichbar mit einem *gain of function* stabiler nukleärer mutp53 Proteine in Tumorzellen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen bestätigen dieser Annahme.

So konnte gezeigt werden, dass alleine die Expression von LT ausreicht (ohne st und 17kT), damit endogenes wtp53 im Zellkern in großen Mengen akkumuliert (3T3 LT S/W) (Abbildung 21). Die LT-Expression führte in Zellen mit einem wtp53 Hintergrund (physiologische p53-Konzentrationen) im Gegensatz zu Zellen, die kein oder N-terminal trunkiertes p53 exprimierten (10-1 LT S/W) zu einer effizienteren Transformation unter Substrat-unabhängigen Bedingungen. Im Durchschnitt konnten in Zellen, die endogenes wtp53 und zusätzlich stabil SV40 LT exprimieren, ca. 10mal mehr Zellen im Softagar-Assay zu Kolonien heranwachsen (Abbildung 29, 42). Auch die Größe der Kolonien im wtp53 Hintergrund war signifikant erhöht. Zusätzlich konnte eine p53-abhängige vermehrte Bildung von „schwimmenden“ dreidimensionalen Foci beobachtet werden (Abbildung 28). Die wenigen Foci von LT-exprimierenden p53-null bzw. Δ Np53 Zellen zeigten eine eher flachere Morphologie. Man könnte annehmen, dass ein erhöhtes Absterben der LT-exprimierenden p53-null Zellen zu der verringerten Ausbildung von Kolonien bei fehlender Anhaftung an den Boden einer Kulturschale führt. Ein signifikanter Zelltod konnte jedoch nicht detektiert werden. Der größte Anteil an Zellen, die 14 Tage in LCB-Platten kultiviert wurden, zeigte nach Transfer in normal-beschichteten Kulturschalen wieder eine normale Proliferation (Daten nicht gezeigt). Ein möglicher Einfluss einer limitierenden Menge an viralem Onkogen kann zudem ausgeschlossen werden, da die Zellen mit unterschiedlichem p53-Hintergrund gleiche Mengen an SV40 LT exprimierten (Abbildung 37). Es konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass durch Rekonstitution von p53 in p53-defizienten Zellen (siehe Ergebnisse 2.2) eine mit wtp53 Zellen vergleichbare Transformationseffizienz von SV40 erreicht werden kann. Unter Substrat-abhängigen Wachstumsbedingungen (Focus-Formation-Assay, Wachstumskurve) führte die LT-Expression in einem wtp53 und p53-null bzw. Δ Np53 Hintergrund zu weniger signifikanten Unterschieden (Abbildung 26, 27, 40). Durchflusszytometrische Analysen wtp53 und p53-defizienter Zellen 24 h nach SV40-Infektion bei gleichzeitiger Färbung von LT konnten aber eine Veränderung des Zellzyklusprofils nur in LT-exprimierenden wtp53 Zellen erkennen (signifikante Erhöhung der S-Phase, geringere G1-Phase Population) (Daten nicht gezeigt). Zwischen LT-positiven und LT-negativen p53-null Zellen, die bereits eine erhöhte S-Phase Population aufweisen, waren keine Unterschiede im Zellzyklus detektierbar. Diese Daten geben einen Hinweis darauf, dass LT in wtp53 Zellen im Gegensatz zu p53-defizienten Zellen zu einer stärkeren Deregulation des Zellzyklusprogramms führt, die eine essentielle Rolle in der Transformation bzw. Tumorgenese spielt. Die Überwindung des Kontrollpunktes (G1/S-Phase) wird zum einen über die Bindung und transkriptionelle Inaktivierung von p53 durch LT, bezogen auf die negative Zellzykluskontrolle über

Transaktivierung von p21^{Waf1/Cip1}, erreicht, und zum anderen über mögliche neue positive Funktionen des p53-LT Komplexes. Diese neuen unterstützenden Funktionen kommen hauptsächlich unter limitierenden Bedingungen, wie z.B. bei Substrat-unabhängigem Wachstum zum Tragen. Die relativ große Anzahl von Kolonien LT exprimierender p53-null Zellen im Weichagar spricht für p53-unabhängige Mechanismen in der Fehlregulation des Zellwachstums.

Die hier verwendeten Balb/c 3T3 und 10-1 Zellen sind beide aneuploid, zeigen Kontaktinhibition und weisen eine vergleichbare Morphologie auf (Ergebnisse 2.1). Dennoch sieht man bei p53-null Zellen einen sehr instabilen Karyotyp und eine erhöhte Tendenz in Richtung Polyploidisierung (Agapova *et al.*, 1996). Chromosomale Instabilität, Kennzeichen vieler Tumore, wird häufig als Ursache für die Tumorentstehung angesehen (Rajagopalan *et al.*, 2003). p53-defiziente Zellen, die kein LT-exprimieren, können jedoch im Softagar nur sehr selten zu Kolonien heranwachsen (Abbildung 29, 42), was für eine Funktion von LT in der Koloniebildung von 10-1 LT S/W Zellen spricht. Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Serin/Threonin Kinase Bub1, ein Schlüsselprotein des mitotischen Spindel-Kontrollpunktes, mit LT über dessen N-Terminus einen Komplex bildet (Cotsiki *et al.*, 2004). Bub1 inhibiert bei einer normalen Zellzyklusprogression die Ubiquitinligase-Aktivität des APC-Komplexes, wodurch die Mitose so lange verhindert wird, bis die Chromosomen korrekt an die Spindel gebunden sind (Chan *et al.*, 1999a). Verlust von Bub1 konnte mit der Tumorentstehung in Zusammenhang gebracht werden (Ru *et al.*, 2002) und Verlust der Bub1-Komplexierung durch LT resultierte in einer verminderten Transformationsfähigkeit von Rattenfibroblasten (Cotsiki *et al.*, 2004). Neueste Erkenntnisse lassen vermuten, dass LT zu einer Akkumulation und Hyperphosphorylierung von Bub1 führt und dadurch chromosomale Instabilität und Aneuploidie hervorruft (Guo *et al.*, 2006). Diese Funktion von LT, die Beeinträchtigung des Spindel-Kontrollpunktes, könnte in manchen p53-defizienten (und Δ Np53) Zellen zu erhöhten Zelltransformation führen. Die hier beschriebenen Daten zeigen aber zusätzlich einen unterstützender Effekt von wtp53 in der LT-induzierten Transformation, für den der N-Terminus von p53 verantwortlich ist.

3 Der Einfluss der HAT bei der „Helferfunktion“ von p53 in der LT-induzierten zellulären Transformation

3.1 Der p53 N-Terminus als Mediator der „Helferfunktion“ von p53 in der LT-induzierten Zelltransformation

Die in dieser Arbeit durchgeführten klassischen *in vitro* Transformationsversuche mit konstitutiv LT-exprimierenden Zellen zeigten einen signifikant positiven Effekt von wtp53: nicht nur die Proliferation LT-exprimierender Zellen war in einem wtp53 Hintergrund im Vergleich zu p53-null Zellen erhöht, sondern auch die Kolonien-Anzahl in Softagar. Eine N-terminal deletierte p53 Mutante konnte den positiven Einfluss von wtp53 auf Substrat-abhängiges und -unabhängiges Wachstum nicht aufrecht erhalten. Somit verhielten sich Δ Np53 Zellen wie p53-null Zellen. Dies zeigt, dass der Amino-Terminus von p53 im Komplex mit LT eine zentrale Rolle in der p53-vermittelten „Helferfunktion“ spielt.

Die Δ Np53-Mutante wurde so gewählt, dass dieses Protein einer natürlich vorkommenden p53-Isoform entspricht. Um eine stabile Expression von Δ Np53 in den 10-1 Zellen zu erreichen wurde der humane EF1 α -Promotors (Teschendorf *et al.*, 2002) verwendet. Die Transkriptmenge der Δ Np53-Isoform, die vor kurzem in Zelllinien sowie in normalen Zellen aus unterschiedlichen humanem Geweben identifiziert werden konnte, beträgt im Vergleich zur Expression des Volle-Länge Proteins ca. 5% (Yin *et al.*, 2002; Scrable *et al.*, 2005). Die Δ N-Isoform kann mit wtp53 oligomerisieren und scheint eine transiente, negative Funktion während der Zellzyklusprogression auszuüben, die jedoch noch nicht gänzlich geklärt ist. Ein Einfluss auf die DNA-Schadensantwort wurde ausgeschlossen, da keine Akkumulation von Δ Np53 nach genotoxischem Stress detektiert werden konnte (Courtois *et al.*, 2002). Maier *et al.* konnten kürzlich zeigen, dass das Gleichgewicht der Proteinmengen von murinem Δ Np53 (p44) und p53 eine positive, kontrollierende Rolle - über den IGF-Signalweg - in Bezug auf Größe und Lebensdauer von Mäusen spielt (Maier *et al.*, 2004).

Der für die Transaktivierung von Zielgenen und Protein-Protein-Interaktionen wichtige N-Terminus von p53 (AS 1-108) besteht aus zwei Transaktivierungsdomänen (Abbildung 1). Darüber wird die Bindung an unterschiedliche Proteine, wie z.B. Mdm2, die Kinasen ATM und DNA-PK, die Co-Aktivatoren p300/CBP, die Argininmethyltransferase PRMT1 und Faktoren der Transkriptionsmaschinerie (TFIID, TFIIH). Es konnte bereits gezeigt werden, dass wtp53 einen ternären Komplex mit LT und p300/CBP ausbildet (Eckner *et al.*, 1996; Lill *et al.*, 1997b). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Acetylierung (murin: Lysin379) und zudem eine Phosphorylierung (murin: Serin18) von wtp53 detektiert (Daten nicht gezeigt, vergleiche auch Borger & DeCaprio 2006), so dass man davon ausgehen kann, dass in dem analysierten System eine Bindung von ATM und p300/CBP vorliegt, die für diese posttranslationalen Modifizierungen von p53 notwendig ist. Da zudem gezeigt werden konnte, dass eine Phosphorylierung an Serin15 die Bindung von p300 und CBP (Lambert *et al.*, 1998; Dumaz & Meek 1999) erhöht, liegt in den LT-exprimierenden 3T3 Zellen mit Volle-Länge p53 sehr wahrscheinlich ein stabiler LT-p53-CBP/p300 Komplex vor.

Die Rekrutierung von p300/CBP in den LT-p53 Komplex über p53 zeigt sich nicht nur in einer p53-Acetylierung, sondern auch in einer Acetylierung von LT an Lysin697 (Poulin *et al.*, 2004). Diese posttranslationale Modifizierung wird über den N-Terminus von p53 vermittelt, da LT in p53-null und Δ Np53 Zellen (diese Arbeit) sowie in p53^{L220/W235} Zellen (Poulin *et al.*, 2004) nicht-acetyliert vorliegt. Eine Acetylierung der N-terminal deletierten p53-Mutante im Komplex mit LT konnte in dieser Arbeit ebenfalls nicht detektiert werden (Abbildung 38). Die biologische Funktion von acetyliertem LT ist noch nicht geklärt, weder in der Virusreplikation von permissiven Zellen noch in der Transformation von nicht-permissiven Zellen. Es gibt jedoch zahlreiche Beispiele anderer viraler Onkogene, die acetyliert in der Wirtszelle vorliegen und dadurch sowohl ihre Funktionen spezifizieren können als auch das Acetylierungsprogramm der Wirtszelle ausnutzen können um einen Überlebensvorteil zu erlangen. Ausserdem ist auch die p53-Funktion über diese posttranslationale Modifizierung und Rekrutierung der Co-Aktivatoren und deren Histon-Acetyltransferase (HAT)-Aktivität reguliert (siehe Einleitung 2.2).

3.2 Acetylierung von Histonen, Transkriptionsfaktoren und viralen Proteinen

Acetylierung und Deacetylierung spielen eine entscheidende Rolle in vielen zellulären Prozessen, wie z.B. Transkription, Zellzyklusprogression, Differenzierung usw. (Glozak *et al.*, 2005). Eine Acetylierung erfolgt durch Übertragung von Acetyl-Resten von Acetyl-CoenzymA auf ϵ -Aminogruppen konservierter Lysin-Reste in der N-terminalen Region von Proteinen. Die Histon-Acetyltransferasen können die Lysine von Histonen (H2A, H2B, H3, H4) und Nicht-Histonproteinen acetylieren (Sternier & Berger 2000). Die Acetylierung ist reversibel und kann durch die Aktivität der Histon-Deacetylasen (HDAC) oder/und NAD-abhängiger Deacetylasen rückgängig gemacht werden.

Im Fall der Histone führt die reversible Lysin-Acetylierung zur Neutralisierung der positiv geladenen Aminosäure wodurch die Affinität zur negativ geladenen DNA vermindert und die Nukleosomen-Struktur aufgelockert wird. Die HDAC verstärken dagegen durch Deacetylierung der Lysin-Reste die Histon/DNA-Interaktion und führen zur dichten Verpackung des Chromatins, die mit einer anderen Kombination von posttranslationalen Modifizierungen einhergeht (Kadosh & Struhl 1998). Diese Acetylierung und Deacetylierung von Histonen ist wichtig in der Regulation der Gen-Transkription in vielen Zelltypen (Grunstein 1997). Letztendlich reguliert das Zusammenspiel verschiedener Chromatin-Modifizierungen (Methylierung, Phosphorylierungen, Acetylierung), auch als *Histon-Code* bezeichnet (Strahl & Allis 2000), mit ATP-abhängigen Chromatin *Remodeling* Komplexen den Zugang für Transkriptionsfaktoren zur DNA (Lee *et al.*, 1993; Kingston *et al.*, 1996).

Viele Transkriptionsfaktoren sind ebenfalls Ziel der Acetylierungs- und Deacetylierungs-Maschinerie, wie z.B. p53 und TFIIF (Bannister & Miska 2000). Die Funktion der p53-Acetylierung wird immer noch diskutiert. Es wird vermutet, dass die Rekrutierung von HAT, die anschließende Acetylierung der Histone in der näheren Umgebung der p53-RE und die folgende transiente epigenetische Veränderung das Ausmaß der Zielgen-Expression bestimmt (Liu *et al.*, 2003). Ähnlich den Histonen haben unterschiedliche Kombinationen von posttranslationalen Modifikationen verschiedene Auswirkung auf die Genexpression. So vermittelt z.B. der N-Terminus von p53 eine Bindung der Argininmethyltransferase PRMT1, die mit p300/CBP in der Modifizierung von Histonen an p53-spezifischen Promotoren kooperieren kann (An *et al.*, 2004). p53 erlangt seine transkriptionelle Aktivität durch lokale Veränderungen der Chromatinstruktur, die über verschiedene HAT, HDAC und auch ATP-abhängige *Remodeling* Komplexe, wie z.B. SWI/SNF reguliert werden (Allison & Milner 2004). Aber auch eine p53-spezifische globale Chromatin-Modifikation konnte beobachtet werden. So wurden nach UV-Bestrahlung von wtp53 und p53-null Zellen unterschiedliche Acetylierungsmuster an Lysin-Resten von Histon H3 detektiert, die wichtig für die DNA-Reparatur sind. H3 Modifikationen werden jedoch auch unter normalen Wachstumsbedingungen von transkriptionell inaktivem p53 beeinflusst. Zu diesen Modifikationen zählt auch die Serin10 Phosphorylierung an H3, die entscheidend für die korrekte Durchführung der Chromosomenkondensation und Chromosomensegregation in der Mitose ist (Allison & Milner 2003). Die Funktionen von p53 in der Tumorsuppression sind demnach eng mit der Chromatin-Struktur verbunden (Abbildung 48).

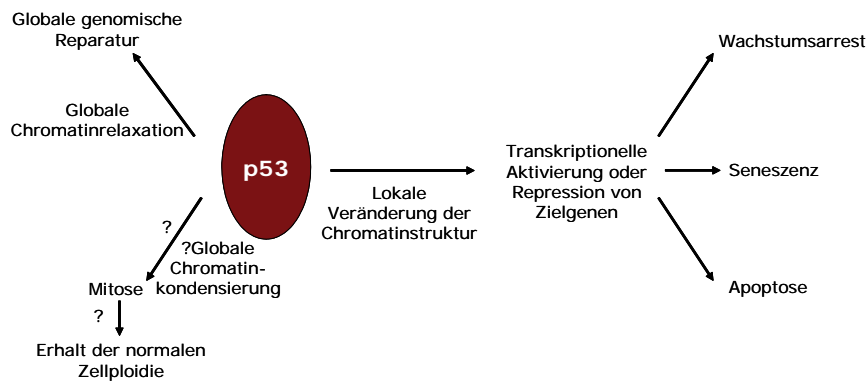


Abbildung 48: Die Rolle von p53 als „Wächter des Genoms“ im Chromatin Remodeling. Zusätzlich zur lokalen Veränderung der Chromatinstruktur für die Transkription hat p53 auch einen Einfluss die Chromatinstruktur auf globaler Ebene. Dies ist wichtig für die GGR (globale genomische Reparatur) und die korrekte Durchführung der Mitose und den Erhalt der Ploidie (verändert nach Allison und Milner 2004).

Die Acetylierung und Deacetylierung von Histonen und Transkriptionsfaktoren sind neben anderen epigenetischen Mechanismen wichtige Bestandteile der Regulation zellulärer Prozesse. Auch eine virale Infektion beeinflusst den Acetylierungsstatus verschiedener Proteine der Wirts-Zelle. Viren versuchen die Kontrolle über verschieden Signalwege der Zelle nach Infektion zu erhalten um sie für ihre Zwecke einzusetzen. In den letzten Jahren konnte diesbezüglich gezeigt werden, dass virale Proteine mit HAT und HDAC direkt oder indirekt interagieren und durch Zerstörung des reversiblen Acetylierungs- und Deacetylierungs-Mechanismus zelluläre Vorgänge steuern können. Gleichfalls wurde festgestellt, dass auch Lysine viraler Onkogene Ziel der Acetylierung sind, die zur Modifikation ihrer Aktivität führt.

Das HIV-1 Tat Protein ist ein transkriptioneller Aktivator der HIV-1 Gene und somit notwendig für die virale Replikation. Die Acetylierung von Tat reguliert dabei zwei wichtige Schritte im zeitlichen Ablauf der Transkription: die Bindung des P-TEFb-Komplex und folglich der TAR-RNA durch Acetylierung an Lysin28 (PCAF) zur Erhöhung der RNA PolIII Prozessivität und die Loslösung von Tat von der TAR-RNA durch Acetylierung an Lysin50 (p300) (Nakatani 2002) für die Transkriptionselongation. Tat im Komplex mit p300/CBP erhöht zudem deren Bindung an zwei Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie, TBP und TFIIB (Deng *et al.*, 2000), und kann zusammen mit PCAF chromosomal integrierte HIV-1 LTR aktivieren (Marzio & Giacca 1999). Die Bindung von Tat an z.B. CBP und GCN5, führt zur spezifischen Inhibierung ihrer HAT-Aktivität bezüglich der Acetylierung aller Histone, jedoch nicht der Transkriptionsfaktoren, z.B. p53 und MyoD (Col *et al.*, 2002). Tat kann durch Bindung der HAT deren HAT-Aktivität übernehmen, dadurch seine eigene Funktion spezifizieren und eine Veränderung des Gen-Expressionsprogramms zu Gunsten einer effizienten Virusreplikation durchführen (Ott *et al.*, 2004). Cereseto *et al.* konnten die Acetylierung der HIV-1 Integrase (IN) zeigen, die die Integration ins humane Genom vermittelt (Cereseto *et al.*, 2005). So kann p300 die Integrase im C-Terminus an den Lysin-Resten K264, K266 und K273 acetylieren und dadurch seine DNA-Affinität sowie die DNA-Strang Transferaktivität erhöhen.

Auch das adenovirale Protein E1A hat die Eigenschaft, unterschiedliche HAT zu binden und deren Aktivität zu nutzen. 12S E1A wird in seinem C-Terminus an Lysin239 durch die HAT p300/CBP, PCAF und GCN5 acetyliert. Diese Acetylierung verhindert die Bindung des Co-Repressors CtBP, der mit HDAC einen Komplex bildet, und dadurch vermutlich die Transformationskapazität durch eine Gen-Aktivierung von E1A erhöhen kann (Zhang *et al.*, 2000).

Die Komplexierung von p300/CBP durch E1A hat aber noch andere Auswirkungen, vor allem auf die Zellzyklusregulation. So kann z.B. E1A die HAT-Aktivität von p300 für die Acetylierung des Transkriptionsfaktors c-Jun nutzen. c-Jun hat eine zentrale Rolle in der Proliferation und Differenzierung und dessen Acetylierung führt zur Repression c-Jun-abhängiger Gene (z.B. Collagenase) (Vries *et al.*, 2001). E1A induziert ausserdem die Acetylierung des Tumorsuppressors pRb über p300, wodurch eine verstärkte Bindung von Mdm2 und eine verringerte Phosphorylierung von pRb vermittelt wird, die wiederum zur Inaktivierung von pRb und damit zu einer Zellzyklusprogression führt (Chan *et al.*, 2001). E1A ist auch in der Lage, die HAT-Aktivität und die Substrat-Spezifität von p300/CBP zu verändern. So werden z.B. die Transkriptionsfaktoren p53 und E2F und auch Histone nicht mehr oder nur vermindert acetyliert (Ait-Si-Ali *et al.*, 1998; Chakravarti *et al.*, 1999; Hamamori *et al.*, 1999).

3.3 Die Rekrutierung der p300/CBP HAT-Aktivität durch SV40 LT führt zur epigenetischen Veränderung zellulärer Prozesse

Die zwei beschriebenen Beispiele, HIV-1 Tat und E1A, zeigen eindrücklich, dass zelluläre Mechanismen, die durch Acetylierung reguliert werden, ein wichtiger Faktor in der Übernahme der viralen Kontrolle über die Wirtszelle sind. So kann die Acetylierung viraler Onkogene zur Spezifikation ihrer Funktionen führen oder die HAT-Aktivität durch Komplexierung der Acetylasen durch viralen Onkogene für die Regulation der zellulären Genexpression ausgenutzt werden. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die Rekrutierung von p300/CBP über p53 und die daraus resultierende Acetylierung von SV40 LT eine wichtige Rolle in der Transformation und/oder der Replikation spielen. p300/CBP sind nah verwandte Co-Aktivatoren, welche Regulatorfunktion in der Transkription zellulärer und viraler Gene besitzen (Abbildung 49). Diese üben sie durch Modifizierung der Chromatinstruktur über ihre HAT-Aktivität, Interaktion mit der Transkriptionsmaschinerie sowie ihrem Einfluss auf die Zellzyklusprogression aus.

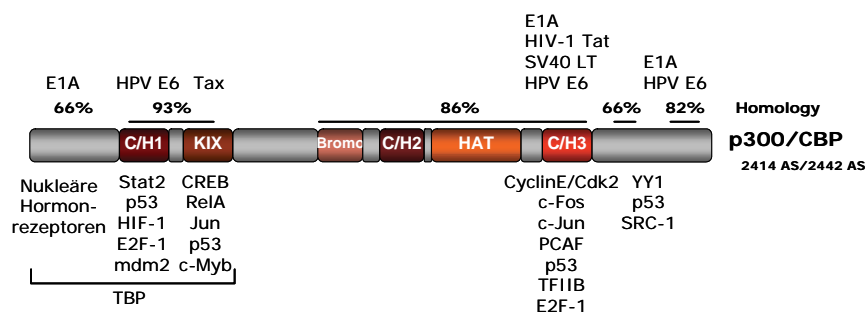


Abbildung 49: Struktur der Co-Aktivatoren p300/CBP. Die Interaktionen von p300/CBP mit zellulären und viralen Proteinen sind dargestellt, ebenso wie die funktionellen Domänen. Die AS-Homologien zwischen den beiden Co-Aktivatoren sind in Prozent angegeben. Abkürzungen: C/H1-3: Cystein/Histidin-reiche Region; HAT: Histon-Acetyltransferase Domäne; AS: Aminosäure (verändert nach Chen *et al.* 2001).

Die zelluläre Transformation betreffend kamen Shimazu *et al.* zu dem Ergebnis, dass die Acetylierung von LT zu einer verringerten LT-Proteinstabilität und zu einem verminderten Substrat-unabhängigen Wachstum führt (Shimazu *et al.*, 2006). Dies steht im Gegensatz zu den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen. Hier waren keine signifikanten Mengenunterschiede zwischen acetyliertem (in 3T3 Zellen) und nicht-acetyliertem (in 10-1 und Δ Np53 Zellen) LT detektierbar (Abbildung 37). Zudem konnte überwiegend in wtp53-Zellen, in denen LT acetyliert vorliegt, eine Substrat-unabhängige Kolonien-Bildung erkannt werden (Abbildung 29, 42). Ein möglicher Grund hierfür könnten die unterschiedlichen experimentellen Ansätze sein, die angewandt wurden. So verwendeten Shimazu *et al.* eine LT-Mutante, die eine Acetylierung von Lysin697 nachahmt (K697Q), transfizierten diese stabil in NIH3T3 Zellen (wtp53) und kultivierten die Zellen in poly-HEMA-beschichteten Kulturschalen. Nach vier Tagen wurde anhand der XTT-Methode das Substrat-unabhängige Wachstum zwischen Wildtyp LT und mutiertem LT verglichen. Bei dieser Methode, die ein Indikator für die metabolische Aktivität der Zellen ist, werden farblose oder schwach gefärbte Tetrazoliumsalze in intensiv gefärbte Formazanderivate von lebenden Zellen umgewandelt, die mittels eines Spektrophotometers quantifiziert werden können. Bei den Versuchen in der vorliegenden Arbeit wurde das Substrat-unabhängige Wachstum in Softagar von Wildtyp LT-transduzierten p53-null, Δ Np53 Zellen und wtp53 Zellen über 21 Tage analysiert. Hauptunterschied zwischen beiden Untersuchungen ist jedoch, dass Shimazu *et al.* die Stabilität eines LT-Wildtyp Proteins mit der einer LT-Mutante verglichen. Da die Proteinkonformation einen starken Einfluss auf die Proteindegradation haben kann, ist nicht auszuschließen, dass die von Shimazu *et al.* verwendete LT-Mutante per se einen erhöhten *turnover* zeigt und die Korrelation mit der LT-Acetylierung ein Epiphänomen darstellt.

Dennoch kann der von Shimazu *et al.* postulierte Einfluss der LT-Menge auf die Transformation nicht außer Acht gelassen werden, da in weiteren, in dieser Arbeit nicht gezeigten Versuchen durch starke Überexpression von LT in p53-null Zellen eine mit der wtp53-Situation vergleichbare Transformationseffizienz erreicht werden konnte. D.h. bei ausreichend großer LT-Menge ist die Transformation einer Zelle nicht mehr abhängig von ihrem p53-Status. Weitere Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen diese Aussage. So waren vermehrt größere Kolonien bei den 10-1 LT S Zellen zu beobachten als in den schwach LT-exprimierenden 10-1 LT W Zellen (Abbildung 29). Man kann daher vermuten, dass durch die Überexpression des viralen Onkoproteins die Regulationsmechanismen der Zelle überrollt werden und die Zelle in die Transformation fördernden Zustand gebracht wird.

Ein direkter Einfluss der Acetylierung von LT auf die Transformation von murinen Zellen scheint jedoch fragwürdig, da Manos und Gluzman schon 1985 zeigen konnten, dass die letzten 49 AS von LT (660-708) für die Transformation nicht notwendig sind (Manos & Gluzman 1985). Eine C-terminal deletierte Mutante (Δ 49), die ATPase Aktivität, *ori*-Bindung und Komplexbildung mit p53 zeigt, konnte zur Transformation von MEF führen. Anhand von Analysen in permissiven Zellen konnten sie aber mögliche Auswirkungen der C-terminalen Deletion von LT auf die SV40-Replikation nicht ausschließen.

Aufgrund der oben dargestellten Möglichkeiten der viralen Interferenz mit den Funktionen von p53 und der Acetylierungsmaschinerie der Wirtszelle ist es wahrscheinlicher, dass p53 im Komplex mit p300/CBP und LT die HAT-Aktivität auf LT übermitteln kann, wohingegen die Acetylierung von LT

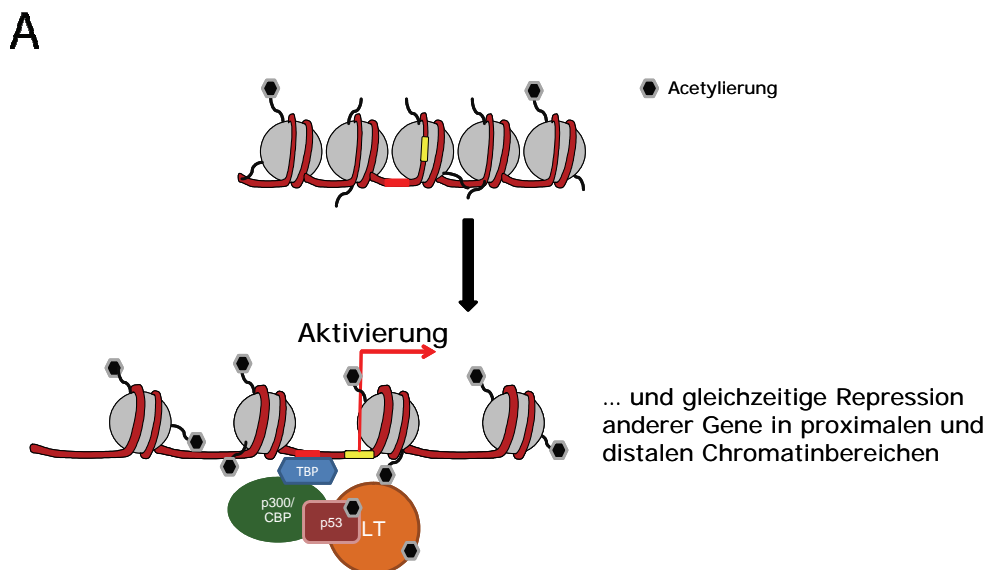
selbst für die Transformation eher ein Nebeneffekt ist. Diese „indirekte“ Chromatin *Remodeling* Aktivität von LT könnte auch die Ursache für die Reaktivierung der durch epigenetische Ereignisse reprimierten mutp53-Expression *in vitro* und *in vivo* sein, die im Abschnitt 2.12 der Arbeit dargestellt ist. Die globale Veränderung der Chromatinstruktur durch Rekrutierung von p53, und damit einhergehend auch p300/CBP, durch LT könnte zu einer veränderten Chromatinstruktur der partiell reprimierten Promotoren (CMV und WAP) führen und der Transkriptionsmaschinerie Zugang zu ihnen verschaffen. Ein mögliches Beispiel dieser über p53-vermittelten Chromatin *Remodeling* Aktivität von LT könnte auch eine kürzlich publizierte Studie sein, die eine von einem p53-LT-p300/CBP-pRb Komplex abhängige Promotor-Aktivierung detektieren konnten, die für das maligne Zellwachstum notwendig ist (Bocchetta *et al.*, 2008).

Da man außer seinem eigenen keinen spezifischen Promotor kennt, an den LT direkt bindet, sollten Versuche nach SV40-Infektion einen Hinweis auf die spezifische transkriptionelle Regulation des LT-Promotors durch LT-p53-p300/CBP vermittelte Hyperacetylierung geben. Das SV40-Chromosom, das in Histonen verpackt ist, stellt ein passendes Modellsystem dar. Es konnte bereits gezeigt werden, dass es während der lytischen Infektion zu einer programmierten Veränderung der H3 und H4 Histon-Acetylierung innerhalb des SV40-Chromatins kommt und dass die Hyperacetylierung von H3 und H4 mit einer verstärkten Transkription korreliert (Milavetz 2004). Zudem wurde kürzlich auch eine direkte Regulation der dynamischen Histon-Hyperacetylierung und der Transkription durch die RNA Polymerase II (RNA PolII) beschrieben, die abhängig von der Anwesenheit von p300 ist (Balakrishnan & Milavetz 2007a; Balakrishnan & Milavetz 2007b). Folgendes Modell wird postuliert: für die Initiation der Transkription benötigt RNA PolII eine HAT, z.B. p300. Der Komplex migriert entlang der kodierenden Region bis er während der aktiven Transkription auf ein Nukleosom trifft. Dort führt p300 zu einer angemessenen Hyperacetylierung der Histone. Nach erfolgreicher Transkription wandert der Komplex weiter und die Histone werden deacetyliert. Dies impliziert einen dynamischen Prozess zwischen Acetylierung und Deacetylierung (Orphanides & Reinberg 2000). Eine spezifische HDAC, die zur Deacetylierung beiträgt konnte noch nicht identifiziert werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen sollte ein möglicher Einfluss von wtp53 auf die Transkription von LT im SV40-Chromatin im Balb/c System untersucht werden. Die über RealTime-PCR erhaltenen Daten zeigten zehn Stunden nach SV40-Infektion von 3T3 (wtp53) und 10-1 (p53-null) Zellen jedoch keinen Unterschied zwischen der Menge von SV40-DNA und dem Ausmaß der LT-Transkription (Abbildung 43, 44). Die erhöhte Menge an SV40-Chromatin in den 3T3 Zellen korreliert mit der gesteigerten Transkription von LT und ist proportional zu den Ergebnissen der 10-1 Zellen. Dies spricht für eine ähnliche Transkriptionsrate für die frühe SV40 mRNA in beiden Zelllinien, zumindest zum untersuchten Zeitpunkt, da Versuche in permissiven Zellen bereits nach acht Stunden einen Rückgang der frühen Genexpression zeigen konnten (Fields *et al.*, 1996). Es liegen jedoch keine Daten bezüglich der exakten zeitlichen LT-Transkription in nicht-permissiven Zellen vor (Graessmann *et al.*, 1978). Interessanterweise zeigen SV40-Infektionsversuche von 3T3 und 10-1 Zellen zu späteren Zeitpunkten (16-48 h) eine im Durchschnitt um den Faktor 1,6 erhöhte Anzahl an LT-positiven Zellen in einem wtp53 Hintergrund, die das anhand qRT-PCR ermittelte Verhältnis von SV40-DNA und LT-Transkription pro Zelle nach zehn Stunden widerspiegelt. Man kann daher vermuten, dass die erhöhte LT-Expression in 3T3 Zellen eine

erhöhte Aufnahme von SV40 widerspiegelt. Die diesem Experiment zunächst zugrunde gelegte Annahme, dass 3T3 und 10-1 Zellen statistisch gesehen gleich viel Virus pro Zelle aufnehmen, war somit falsch. Die gleichen Relationen zwischen vorliegender SV40 DNA, Transkription und LT-Protein implizieren demnach eine vergleichbare Transkriptionsrate in wtp53 und p53-null Zellen. Nicht ausgeschlossen werden kann aber die Möglichkeit, dass fehlende Unterschiede in der Transkription der frühen SV40 Genregion in 3T3 und 10-1 Zellen darauf zurückzuführen sind, dass p53 in infizierten 3T3 Zellen noch nicht ausreichend stabilisiert wurde. So konnten zehn Stunden nach Infektion in der indirekten Immunfluoreszenz nur in wenigen Zellen eine deutliche nukleäre Akkumulation von p53 detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Demnach könnte der positive Einfluss von p53 erst in einem stabilen Komplex mit LT deutlich werden, wenn eine bestimmte p53-Menge vorliegt. In den in dieser Arbeit etablierten LT-retroviral transduzierten Zellen war p53 in einem stabilen nukleären Komplex mit LT und somit stark angereichert. Deshalb konnte der postulierte positive Effekt von p53 im Komplex ausgeübt und eine gesteigerte Transformationseffizienz gegenüber LT-exprimierenden p53-null Zellen beobachtet werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass p53 eine „Helferfunktion“ in der LT-induzierten Transformation von Balb/c Zellen hat, die sehr wahrscheinlich über das Einbringen der HAT-Aktivität von p300/CBP in den LT-p53 Komplex ausgeführt wird. Folgendes Modell wird deshalb vorgeschlagen (Abbildung 50). Durch eine Acetylierung über den p300/CBP-p53-LT Komplex von Histonen in der Nähe spezifischer Promotoren kommt es zur Auflockerung der Chromatinstruktur und zur transkriptionellen Aktivierung dieser Gene. Einhergehend erlangt die Chromatinstruktur an anderer Stelle einen kompakten Zustand der zur Repression anderer Gene führen kann. Dieses Zusammenspiel von Genregulation und Chromatinstatus, das durch den LT-p53-Komplex beeinflusst zu sein scheint, könnte einen entscheidenden Einfluss in einer erfolgreichen Zelltransformation ausüben.



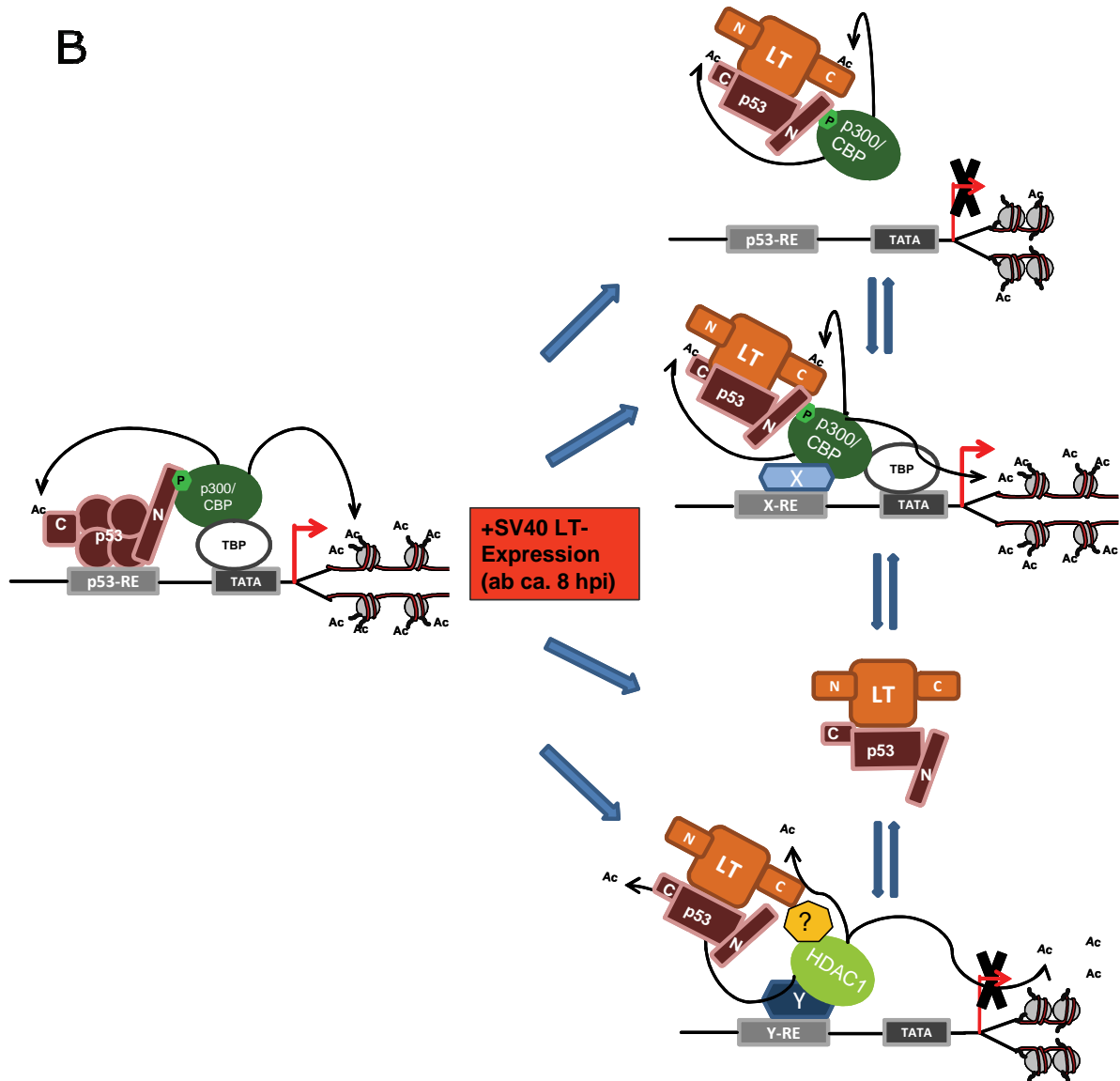


Abbildung 50: Modell der Chromatin-Veränderung durch einen p53-p300/CBP-LT Komplex zur transkriptionellen Aktivierung. (A) Übersichtsschema: die Auflockerung der Chromatinstruktur über einen p300/CBP-p53-LT-Komplex führt zur Aktivierung spezifischer Gene. In anderen Chromatinbereichen kommt es durch Veränderung der Chromatinstruktur (Kompaktierung) zur Repression anderer Gene. Diese über die Chromatinstruktur regulierte Genexpression ist für die SV40-Transformation förderlich. (B) Detaillierte Darstellung: nach SV40 Infektion folgt in den ersten Stunden eine normale p53-Stressantwort, die mit Hilfe von p300/CBP und Acetylierung von Histonen (und p53-Tetramer) in der Nähe des Zielgen-Promotors zur Transkription von p53-Zielgenen führt. 8 h nach Infektion (hpi) kommt es zur Transkription von LT und der folgenden Komplexierung von monomerem p53, wobei es zur Konformationsänderung der p53-DBD kommt. p53 liegt demnach alleine im Komplex mit LT, oder im ternären p53-p300/CBP-LT Komplex vor. Letzterer kann durch fehlende Bindung von p53 an DNA keine Transkription der p53-Zielgene aktivieren, jedoch könnten andere DNA-gebundene Faktoren (X) über p300/CBP von dem ternären Komplex gebunden werden und die Transkription durch Veränderung der Chromatin Struktur durch z.B. Acetylierung erleichtern. In diesem Komplex liegt p53 und auch LT acetyliert vor. Eine Phosphorylierung von p53 verstärkt die Bindung von p300/CBP. Zudem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Histon-Deacetylase HDAC1 an LT bindet, was auf eine spezifische Repression wiederum anderer Gene hindeutet (Valls *et al.*, 2007). Inwieweit andere Proteine diese Interaktion beeinflussen, ist nicht genau bekannt. In der Bindung von p53 und HDAC1 konnte gezeigt werden, dass mSin3a einen Einfluss hat (Murphy *et al.*, 1999). p53 und LT werden von HDAC1 deacetyliert (Ito *et al.*, 2002; Shimazu *et al.*, 2006). hpi: *hours post infection*; P: Phosphorylierung; Ac: Acetylierung; TBP: *TATA binding protein*; RE: *response element*.

VII LITERATURVERZEICHNIS

- Aaronson, S.A. and Todaro, G.J. 1968. Development of 3T3-like lines from Balb-c mouse embryo cultures: transformation susceptibility to SV40. *J Cell Physiol* **72**(2): 141-148.
- Abercrombie, M. 1970. Contact inhibition in tissue culture. *In Vitro* **6**(2): 128-142.
- Adams, P.D. 2001. Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. *Biochim Biophys Acta* **1471**(3): M123-133.
- Agapova, L.S., Ilyinskaya, G.V., Turovets, N.A., Ivanov, A.V., Chumakov, P.M., and Kopnin, B.P. 1996. Chromosome changes caused by alterations of p53 expression. *Mutat Res* **354**(1): 129-138.
- Ahuja, D., Saenz-Robles, M.T., and Pipas, J.M. 2005. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene* **24**(52): 7729-7745.
- Ait-Si-Ali, S., Ramirez, S., Barre, F.X., Dkhissi, F., Magnaghi-Jaulin, L., Girault, J.A., Robin, P., Knibiehler, M., Pritchard, L.L., Ducommun, B., Trouche, D., and Harel-Bellan, A. 1998. Histone acetyltransferase activity of CBP is controlled by cycle-dependent kinases and oncoprotein E1A. *Nature* **396**(6707): 184-186.
- Ali, S.H., Kasper, J.S., Arai, T., and DeCaprio, J.A. 2004. Cul7/p185/p193 binding to simian virus 40 large T antigen has a role in cellular transformation. *J Virol* **78**(6): 2749-2757.
- 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**(20): 6674-6679.
- Allison, S.J. and Milner, J. 2004. Remodelling chromatin on a global scale: a novel protective function of p53. *Carcinogenesis* **25**(9): 1551-1557.
- An, W., Kim, J., and Roeder, R.G. 2004. Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. *Cell* **117**(6): 735-748.
- Anderson, H.A., Chen, Y., and Norkin, L.C. 1996. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol Biol Cell* **7**(11): 1825-1834.
- Andrews, P., He, Y.J., and Xiong, Y. 2006. Cytoplasmic localized ubiquitin ligase cullin 7 binds to p53 and promotes cell growth by antagonizing p53 function. *Oncogene* **25**(33): 4534-4548.
- Avantaggiati, M.L., Carbone, M., Graessmann, A., Nakatani, Y., Howard, B., and Levine, A.S. 1996. The SV40 large T antigen and adenovirus E1a oncoproteins interact with distinct isoforms of the transcriptional co-activator, p300. *EMBO J* **15**(9): 2236-2248.
- Avantaggiati, M.L., Ogryzko, V., Gardner, K., Giordano, A., Levine, A.S., and Kelly, K. 1997. Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* **89**(7): 1175-1184.
- Bakkenist, C.J. and Kastan, M.B. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**(6922): 499-506.
- Balakrishnan, L. and Milavetz, B. 2007a. Histone hyperacetylation during SV40 transcription is regulated by p300 and RNA polymerase II translocation. *J Mol Biol* **371**(4): 1022-1037.
- Balakrishnan, L. and Milavetz, B. 2007b. Histone hyperacetylation in the coding region of chromatin undergoing transcription in SV40 minichromosomes is a dynamic process regulated directly by the presence of RNA polymerase II. *J Mol Biol* **365**(1): 18-30.
- Bannister, A.J. and Miska, E.A. 2000. Regulation of gene expression by transcription factor acetylation. *Cell Mol Life Sci* **57**(8-9): 1184-1192.
- Baptiste, N., Friedlander, P., Chen, X., and Prives, C. 2002. The proline-rich domain of p53 is required for cooperation with anti-neoplastic agents to promote apoptosis of tumor cells. *Oncogene* **21**(1): 9-21.
- Bar, J., Cohen-Noyman, E., Geiger, B., and Oren, M. 2004. Attenuation of the p53 response to DNA damage by high cell density. *Oncogene* **23**(12): 2128-2137.
- Bargonetti, J., Reynisdottir, I., Friedman, P.N., and Prives, C. 1992. Site-specific binding of wild-type p53 to cellular DNA is inhibited by SV40 T antigen and mutant p53. *Genes Dev* **6**(10): 1886-1898.
- 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**(6): 1243-1254.

- Bartek, J. and Lukas, J. 2001. Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* **13**(6): 738-747.
- Baserga, R. 1997. The price of independence. *Exp Cell Res* **236**(1): 1-3.
- Bates, S., Phillips, A.C., Clark, P.A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R.L., and Vousden, K.H. 1998. p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* **395**(6698): 124-125.
- Beausejour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P., and Campisi, J. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* **22**(16): 4212-4222.
- Beckman, K.B. and Ames, B.N. 1997. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* **272**(32): 19633-19636.
- Behrend, L., Henderson, G., and Zwacka, R.M. 2003. Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans* **31**(Pt 6): 1441-1444.
- Berger, M., Stahl, N., Del Sal, G., and Haupt, Y. 2005. Mutations in proline 82 of p53 impair its activation by Pin1 and Chk2 in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* **25**(13): 5380-5388.
- Bikel, I., Montano, X., Agha, M.E., Brown, M., McCormack, M., Boltax, J., and Livingston, D.M. 1987. SV40 small t antigen enhances the transformation activity of limiting concentrations of SV40 large T antigen. *Cell* **48**(2): 321-330.
- Blackburn, A.C., Brown, J.S., Naber, S.P., Otis, C.N., Wood, J.T., and Jerry, D.J. 2003. BALB/c alleles for Prkdc and Cdkn2a interact to modify tumor susceptibility in Trp53^{+/-} mice. *Cancer Res* **63**(10): 2364-2368.
- Blagosklonny, M.V. 2000. p53 from complexity to simplicity: mutant p53 stabilization, gain-of-function, and dominant-negative effect. *FASEB J* **14**(13): 1901-1907.
- Blair Zajdel, M.E. and Blair, G.E. 1988. The intracellular distribution of the transformation-associated protein p53 in adenovirus-transformed rodent cells. *Oncogene* **2**(6): 579-584.
- Bocchetta, M., Di Resta, I., Powers, A., Fresco, R., Tosolini, A., Testa, J.R., Pass, H.I., Rizzo, P., and Carbone, M. 2000. Human mesothelial cells are unusually susceptible to simian virus 40-mediated transformation and asbestos cocarcinogenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18): 10214-10219.
- Bocchetta, M., Elias, S., De Marco, M.A., Rudzinski, J., Zhang, L., and Carbone, M. 2008. The SV40 large T antigen-p53 complexes bind and activate the insulin-like growth factor-I promoter stimulating cell growth. *Cancer Res* **68**(4): 1022-1029.
- Bode, A.M. and Dong, Z. 2004. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **4**(10): 793-805.
- Bonomini, F., Tengattini, S., Fabiano, A., Bianchi, R., and Rezzani, R. 2008. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol* **23**(3): 381-390.
- Borger, D.R. and DeCaprio, J.A. 2006. Targeting of p300/CREB binding protein coactivators by simian virus 40 is mediated through p53. *J Virol* **80**(9): 4292-4303.
- Bos, J.L. 1989. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* **49**(17): 4682-4689.
- Boulaire, J., Fotedar, A., and Fotedar, R. 2000. The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21WAF1. *Pathol Biol (Paris)* **48**(3): 190-202.
- Boyapati, A., Wilson, M., Yu, J., and Rundell, K. 2003. SV40 17KT antigen complements dnaj mutations in large T antigen to restore transformation of primary human fibroblasts. *Virology* **315**(1): 148-158.
- Braastad, C.D., Han, Z., and Hendrickson, E.A. 2003. Constitutive DNase I hypersensitivity of p53-regulated promoters. *J Biol Chem* **278**(10): 8261-8268.
- 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.
- Braig, M. and Schmitt, C.A. 2006. Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development. *Cancer Res* **66**(6): 2881-2884.
- Brand, K.A. and Hermfisse, U. 1997. Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J* **11**(5): 388-395.
- Brooks, A.R., Harkins, R.N., Wang, P., Qian, H.S., Liu, P., and Rubanyi, G.M. 2004. Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med* **6**(4): 395-404.

- Brooks, C.L. and Gu, W. 2003. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol* **15**(2): 164-171.
- Brooks, C.L. and Gu, W. 2006. p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol Cell* **21**(3): 307-315.
- Budanov, A.V., Sablina, A.A., Feinstein, E., Koonin, E.V., and Chumakov, P.M. 2004. Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science* **304**(5670): 596-600.
- Bullock, A.N. and Fersht, A.R. 2001. Rescuing the function of mutant p53. *Nat Rev Cancer* **1**(1): 68-76.
- Busuttil, R.A., Rubio, M., Dolle, M.E., Campisi, J., and Vijg, J. 2003. Oxygen accelerates the accumulation of mutations during the senescence and immortalization of murine cells in culture. *Aging Cell* **2**(6): 287-294.
- Butel, J.S. and Lednický, J.A. 1999. Cell and molecular biology of simian virus 40: implications for human infections and disease. *J Natl Cancer Inst* **91**(2): 119-134.
- Cabelguenne, A., Blons, H., de Waziers, I., Carnot, F., Houllier, A.M., Soussi, T., Brasnu, D., Beaune, P., Laccourreye, O., and Laurent-Puig, P. 2000. p53 alterations predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective series. *J Clin Oncol* **18**(7): 1465-1473.
- Cacciotti, P., Strizzi, L., Vianale, G., Iaccheri, L., Libener, R., Porta, C., Tognon, M., Gaudino, G., and Mutti, L. 2002. The presence of simian-virus 40 sequences in mesothelioma and mesothelial cells is associated with high levels of vascular endothelial growth factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**(2): 189-193.
- Campisi, J. 2001. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol* **11**(11): S27-31.
- Cawley, S., Bekiranov, S., Ng, H.H., Kapranov, P., Sekinger, E.A., Kampa, D., Piccolboni, A., Sementchenko, V., Cheng, J., Williams, A.J., Wheeler, R., Wong, B., Drenkow, J., Yamanaka, M., Patel, S., Brubaker, S., Tammanna, H., Helt, G., Struhl, K., and Gingeras, T.R. 2004. Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell* **116**(4): 499-509.
- Cereseto, A., Manganaro, L., Gutierrez, M.I., Terreni, M., Fittipaldi, A., Lusic, M., Marcello, A., and Giacca, M. 2005. Acetylation of HIV-1 integrase by p300 regulates viral integration. *EMBO J* **24**(17): 3070-3081.
- Chakravarti, D., Ogryzko, V., Kao, H.Y., Nash, A., Chen, H., Nakatani, Y., and Evans, R.M. 1999. A viral mechanism for inhibition of p300 and PCAF acetyltransferase activity. *Cell* **96**(3): 393-403.
- Chan, G.K., Jablonski, S.A., Sudakin, V., Hittle, J.C., and Yen, T.J. 1999a. Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC. *J Cell Biol* **146**(5): 941-954.
- Chan, H.M., Krstic-Demonacos, M., Smith, L., Demonacos, C., and La Thangue, N.B. 2001. Acetylation control of the retinoblastoma tumour-suppressor protein. *Nat Cell Biol* **3**(7): 667-674.
- Chan, T.A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. 1999b. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* **401**(6753): 616-620.
- Chang, B.D., Xuan, Y., Broude, E.V., Zhu, H., Schott, B., Fang, J., and Roninson, I.B. 1999. Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene* **18**(34): 4808-4818.
- Chao, C., Saito, S., Kang, J., Anderson, C.W., Appella, E., and Xu, Y. 2000. p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage. *EMBO J* **19**(18): 4967-4975.
- Chauvin, C., Suh, M., Remy, C., and Benabid, A.L. 1990. Failure to detect viral genomic sequences of three viruses (herpes simplex, simian virus 40 and adenovirus) in human and rat brain tumors. *Ital J Neurol Sci* **11**(4): 347-357.
- Chen, J., Tobin, G.J., Pipas, J.M., and Van Dyke, T. 1992. T-antigen mutant activities in vivo: roles of p53 and pRB binding in tumorigenesis of the choroid plexus. *Oncogene* **7**(6): 1167-1175.
- Cheng, H.L., Mostoslavsky, R., Saito, S., Manis, J.P., Gu, Y., Patel, P., Bronson, R., Appella, E., Alt, F.W., and Chua, K.F. 2003. Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(19): 10794-10799.
- 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**(5170): 346-355.
- Christofori, G., Naik, P., and Hanahan, D. 1995. Deregulation of both imprinted and expressed alleles of

- the insulin-like growth factor 2 gene during beta-cell tumorigenesis. *Nat Genet* **10**(2): 196-201.
- Chuikov, S., Kurash, J.K., Wilson, J.R., Xiao, B., Justin, N., Ivanov, G.S., McKinney, K., Tempst, P., Prives, C., Gambelin, S.J., Barlev, N.A., and Reinberg, D. 2004. Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature* **432**(7015): 353-360.
- Clark, E.A. and Brugge, J.S. 1995. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* **268**(5208): 233-239.
- Col, E., Gilquin, B., Caron, C., and Khochbin, S. 2002. Tat-controlled protein acetylation. *J Biol Chem* **277**(40): 37955-37960.
- Conzen, S.D. and Cole, C.N. 1995. The three transforming regions of SV40 T antigen are required for immortalization of primary mouse embryo fibroblasts. *Oncogene* **11**(11): 2295-2302.
- Cotsiki, M., Lock, R.L., Cheng, Y., Williams, G.L., Zhao, J., Perera, D., Freire, R., Entwistle, A., Golemis, E.A., Roberts, T.M., Jat, P.S., and Gjoerup, O.V. 2004. Simian virus 40 large T antigen targets the spindle assembly checkpoint protein Bub1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(4): 947-952.
- Courtois, S., Verhaegh, G., North, S., Luciani, M.G., Lassus, P., Hibner, U., Oren, M., and Hainaut, P. 2002. DeltaN-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53. *Oncogene* **21**(44): 6722-6728.
- Curtin, J.C. and Spinella, M.J. 2005. p53 in human embryonal carcinoma: identification of a transferable, transcriptional repression domain in the N-terminal region of p53. *Oncogene* **24**(9): 1481-1490.
- Danial, N.N. and Korsmeyer, S.J. 2004. Cell death: critical control points. *Cell* **116**(2): 205-219.
- Daniels, R., Sadowicz, D., and Hebert, D.N. 2007. A very late viral protein triggers the lytic release of SV40. *PLoS Pathog* **3**(7): e98.
- Day, M.L., Foster, R.G., Day, K.C., Zhao, X., Humphrey, P., Swanson, P., Postigo, A.A., Zhang, S.H., and Dean, D.C. 1997. Cell anchorage regulates apoptosis through the retinoblastoma tumor suppressor/E2F pathway. *J Biol Chem* **272**(13): 8125-8128.
- de Groot, H. and Littauer, A. 1989. Hypoxia, reactive oxygen, and cell injury. *Free Radic Biol Med* **6**(5): 541-551.
- DeCaprio, J.A., Ludlow, J.W., Figge, J., Shew, J.Y., Huang, C.M., Lee, W.H., Marsilio, E., Paucha, E., and Livingston, D.M. 1988. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* **54**(2): 275-283.
- DeFazio, L.G., Stansel, R.M., Griffith, J.D., and Chu, G. 2002. Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J* **21**(12): 3192-3200.
- Del Sal, G., Murphy, M., Ruaro, E., Lazarevic, D., Levine, A.J., and Schneider, C. 1996. Cyclin D1 and p21/waf1 are both involved in p53 growth suppression. *Oncogene* **12**(1): 177-185.
- Deng, L., de la Fuente, C., Fu, P., Wang, L., Donnelly, R., Wade, J.D., Lambert, P., Li, H., Lee, C.G., and Kashanchi, F. 2000. Acetylation of HIV-1 Tat by CBP/P300 increases transcription of integrated HIV-1 genome and enhances binding to core histones. *Virology* **277**(2): 278-295.
- Deppert, W., Gohler, T., Koga, H., and Kim, E. 2000. Mutant p53: "gain of function" through perturbation of nuclear structure and function? *J Cell Biochem Suppl* **Suppl 35**: 115-122.
- Deppert, W. and Haug, M. 1986. Evidence for free and metabolically stable p53 protein in nuclear subfractions of simian virus 40-transformed cells. *Mol Cell Biol* **6**(6): 2233-2240.
- Deppert, W., Haug, M., and Steinmayer, T. 1987. Modulation of p53 protein expression during cellular transformation with simian virus 40. *Mol Cell Biol* **7**(12): 4453-4463.
- Deppert, W. and Pates, R. 1979. Cell surface location of simian virus 40-specific proteins on HeLa cells infected with adenovirus type 2-simian virus 40 hybrid viruses Ad2+ND1 and Ad2+ND2. *J Virol* **31**(2): 522-536.
- Deppert, W. and Steinmayer, T. 1989. Metabolic stabilization of p53 in SV40-transformed cells correlates with expression of the transformed phenotype but is independent from complex formation with SV40 large T antigen. *Curr Top Microbiol Immunol* **144**: 77-83.
- Deppert, W., Steinmayer, T., and Richter, W. 1989. Cooperation of SV40 large T antigen and the cellular protein p53 in maintenance of cell transformation. *Oncogene* **4**(9): 1103-1110.
- Di Agostino, S., Strano, S., Emiliozzi, V., Zerbini, V., Mottolese, 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**(3): 191-202.
- Di Como, C.J., Gaiddon, C., and Prives, C. 1999. p73 function is inhibited by tumor-derived p53 mutants

- in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **19**(2): 1438-1449.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., and et al. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(20): 9363-9367.
- 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**(1): 42-46.
- Dobner, T., Horikoshi, N., Rubenwolf, S., and Shenk, T. 1996. Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. *Science* **272**(5267): 1470-1473.
- Dornan, D., Shimizu, H., Mah, A., Dudhela, T., Eby, M., O'Rourke, K., Seshagiri, S., and Dixit, V.M. 2006. ATM engages autodegradation of the E3 ubiquitin ligase COP1 after DNA damage. *Science* **313**(5790): 1122-1126.
- Drexler, H.G., Fombonne, S., Matsuo, Y., Hu, Z.B., Hamaguchi, H., and Uphoff, C.C. 2000. p53 alterations in human leukemia-lymphoma cell lines: in vitro artifact or prerequisite for cell immortalization? *Leukemia* **14**(1): 198-206.
- Du, W. and Pogoriler, J. 2006. Retinoblastoma family genes. *Oncogene* **25**(38): 5190-5200.
- Dumaz, N. and Meek, D.W. 1999. Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *EMBO J* **18**(24): 7002-7010.
- Eckner, R., Ludlow, J.W., Lill, N.L., Oldread, E., Arany, Z., Modjtahedi, N., DeCaprio, J.A., Livingston, D.M., and Morgan, J.A. 1996. Association of p300 and CBP with simian virus 40 large T antigen. *Mol Cell Biol* **16**(7): 3454-3464.
- Eisenman, R.N. and Cooper, J.A. 1995. Signal transduction. Beating a path to Myc. *Nature* **378**(6556): 438-439.
- Eismann, T. 2005. Identifizierung und Charakterisierung einer Verankerungsdomäne auf dem Tumorsuppressorgen *p53*, welche für die Inaktivierung durch zytoplasmatische Retention verantwortlich ist. Dissertation, Fachbereich Medizin, Universität Hamburg.
- el-Deiry, W.S., Harper, J.W., O'Connor, P.M., Velculescu, V.E., Canman, C.E., Jackman, J., Pietenpol, J.A., Burrell, M., Hill, D.E., Wang, Y., and et al. 1994. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* **54**(5): 1169-1174.
- el-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. 1992. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* **1**(1): 45-49.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**(4): 817-825.
- Eliyahu, D., Michalovitz, D., and Oren, M. 1985. Overproduction of p53 antigen makes established cells highly tumorigenic. *Nature* **316**(6024): 158-160.
- Elstrom, R.L., Bauer, D.E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M.H., Plas, D.R., Zhuang, H., Cinalli, R.M., Alavi, A., Rudin, C.M., and Thompson, C.B. 2004. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* **64**(11): 3892-3899.
- Espejel, S., Franco, S., Sgura, A., Gae, D., Bailey, S.M., Taccioli, G.E., and Blasco, M.A. 2002. Functional interaction between DNA-PKcs and telomerase in telomere length maintenance. *EMBO J* **21**(22): 6275-6287.
- Fakharzadeh, S.S., Trusko, S.P., and George, D.L. 1991. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J* **10**(6): 1565-1569.
- Fanning, E., Westphal, K.H., Brauer, D., and Corlin, D. 1982. Subclasses of simian virus 40 large T antigen: differential binding of two subclasses of T antigen from productively infected cells to viral and cellular DNA. *EMBO J* **1**(9): 1023-1028.
- Fields, B., Knipe, D. and Howley, P. 1996. *Fields Virology* 3, Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Fiers, W., Contreras, R., Haegemann, G., Rogiers, R., Van de Voorde, A., Van Heuverswyn, H., Van Herreweghe, J., Volckaert, G., and Ysebaert, M. 1978. Complete nucleotide sequence of SV40 DNA. *Nature* **273**(5658): 113-120.
- Finkel, T. and Holbrook, N.J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**(6809): 239-247.
- Foddiss, R., De Rienzo, A., Broccoli, D., Bocchetta, M., Stekala, E., Rizzo, P., Tosolini, A., Grobelny, J.V., Jhanwar, S.C., Pass, H.I., Testa, J.R., and Carbone, M. 2002. SV40 infection induces telomerase

- activity in human mesothelial cells. *Oncogene* **21**(9): 1434-1442.
- Fraker, P.J., King, L.E., Lill-Elghanian, D., and Telford, W.G. 1995. Quantification of apoptotic events in pure and heterogeneous populations of cells using the flow cytometer. *Methods Cell Biol* **46**: 57-76.
- 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**(7): 3735-3743.
- Frisch, S.M. and Francis, H. 1994. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* **124**(4): 619-626.
- Fujiwara, T., Bandi, M., Nitta, M., Ivanova, E.V., Bronson, R.T., and Pellman, D. 2005. Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature* **437**(7061): 1043-1047.
- Furumai, R., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Yoshida, M., and Horinouchi, S. 2001. Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(1): 87-92.
- Gannon, J.V., Greaves, R., Iggo, R., and Lane, D.P. 1990. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J* **9**(5): 1595-1602.
- Gartel, A.L., Serfas, M.S., and Tyner, A.L. 1996. p21--negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med* **213**(2): 138-149.
- Gatenby, R.A. and Gillies, R.J. 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* **4**(11): 891-899.
- Gazdar, A.F., Butel, J.S., and Carbone, M. 2002. SV40 and human tumours: myth, association or causality? *Nat Rev Cancer* **2**(12): 957-964.
- Geisler, S., Borresen-Dale, A.L., Johnsen, H., Aas, T., Geisler, J., Akslen, L.A., Anker, G., and Lonning, P.E. 2003. TP53 gene mutations predict the response to neoadjuvant treatment with 5-fluorouracil and mitomycin in locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* **9**(15): 5582-5588.
- Giono, L.E. and Manfredi, J.J. 2006. The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *J Cell Physiol* **209**(1): 13-20.
- Gjoerup, O., Chao, H., DeCaprio, J.A., and Roberts, T.M. 2000. pRB-dependent, J domain-independent function of simian virus 40 large T antigen in override of p53 growth suppression. *J Virol* **74**(2): 864-874.
- Glozak, M.A., Sengupta, N., Zhang, X., and Seto, E. 2005. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* **363**: 15-23.
- Gluzman, Y. 1981. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**(1): 175-182.
- 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**(3): 1087-1100.
- Goldstein, S. 1990. Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science* **249**(4973): 1129-1133.
- Goodman, R.H. and Smolik, S. 2000. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* **14**(13): 1553-1577.
- Gorbsky, G.J. 2001. The mitotic spindle checkpoint. *Curr Biol* **11**(24): R1001-1004.
- Gottlieb, T.M. and Jackson, S.P. 1993. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* **72**(1): 131-142.
- Graessmann, A., Graessmann, M., Guhl, E., and Mueller, C. 1978. Quantitative correlation between simian virus 40 T-antigen synthesis and late viral gene expression in permissive and nonpermissive cells. *J Cell Biol* **77**(1): R1-8.
- Grossman, S.R. 2001. p300/CBP/p53 interaction and regulation of the p53 response. *Eur J Biochem* **268**(10): 2773-2778.
- Grunstein, M. 1997. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**(6649): 349-352.
- Gu, W., Shi, X.L., and Roeder, R.G. 1997. Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature*

- 387**(6635): 819-823.
- Gualberto, A., Aldape, K., Kozakiewicz, K., and Tlsty, T.D. 1998. An oncogenic form of p53 confers a dominant, gain-of-function phenotype that disrupts spindle checkpoint control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9): 5166-5171.
- Gudkov, A.V. and Komarova, E.A. 2003. The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat Rev Cancer* **3**(2): 117-129.
- Guo, C., Wu, G., Chin, J.L., Bauman, G., Moussa, M., Wang, F., Greenberg, N.M., Taylor, S.S., and Xuan, J.W. 2006. Bub1 up-regulation and hyperphosphorylation promote malignant transformation in SV40 tag-induced transgenic mouse models. *Mol Cancer Res* **4**(12): 957-969.
- Gurney, E.G., Harrison, R.O., and Fenno, J. 1980. Monoclonal antibodies against simian virus 40 T antigens: evidence for distinct subclasses of large T antigen and for similarities among nonviral T antigens. *J Virol* **34**(3): 752-763.
- Hainaut, P. and Hollstein, M. 2000. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* **77**: 81-137.
- Hainaut, P., Soussi, T., Shomer, B., Hollstein, M., Greenblatt, M., Hovig, E., Harris, C.C., and Montesano, R. 1997. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects. *Nucleic Acids Res* **25**(1): 151-157.
- Hamamori, Y., Sartorelli, V., Ogryzko, V., Puri, P.L., Wu, H.Y., Wang, J.Y., Nakatani, Y., and Kedes, L. 1999. Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A. *Cell* **96**(3): 405-413.
- Hammond, E.M. and Giaccia, A.J. 2005. The role of p53 in hypoxia-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **331**(3): 718-725.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hanazono, Y., Yu, J.M., Dunbar, C.E., and Emmons, R.V. 1997. Green fluorescent protein retroviral vectors: low titer and high recombination frequency suggest a selective disadvantage. *Hum Gene Ther* **8**(11): 1313-1319.
- Harada, J.N., Shevchenko, A., Pallas, D.C., and Berk, A.J. 2002. Analysis of the adenovirus E1B-55K-anchored proteome reveals its link to ubiquitination machinery. *J Virol* **76**(18): 9194-9206.
- Harlow, E., Crawford, L.V., Pim, D.C., and Williamson, N.M. 1981. Monoclonal antibodies specific for simian virus 40 tumor antigens. *J Virol* **39**(3): 861-869.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**(4): 805-816.
- Harris, S.L. and Levine, A.J. 2005. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* **24**(17): 2899-2908.
- Hartl, F.U. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**(6583): 571-579.
- Harvey, D.M. and Levine, A.J. 1991. p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Genes Dev* **5**(12B): 2375-2385.
- Harvey, M., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S., Bradley, A., and Donehower, L.A. 1993. Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nat Genet* **5**(3): 225-229.
- Hayflick, L. 1961. The establishment of a line (WISH) of human amnion cells in continuous cultivation. *Exp Cell Res* **23**: 14-20.
- Hergenbahn, M., Luo, J.L., and Hollstein, M. 2004. p53 designer genes for the modern mouse. *Cell Cycle* **3**(6): 738-741.
- Herzig, M., Novatchkova, M., and Christofori, G. 1999. An unexpected role for p53 in augmenting SV40 large T antigen-mediated tumorigenesis. *Biol Chem* **380**(2): 203-211.
- Hickman, E.S., Moroni, M.C., and Helin, K. 2002. The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev* **12**(1): 60-66.
- Hilleman, M.R. 1998. Discovery of simian virus 40 (SV40) and its relationship to poliomyelitis virus vaccines. *Dev Biol Stand* **94**: 183-190.
- Holley, R.W. 1975. Control of growth of mammalian cells in cell culture. *Nature* **258**(5535): 487-490.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C.C. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science* **253**(5015): 49-53.

- Huang, J., Perez-Burgos, L., Placek, B.J., Sengupta, R., Richter, M., Dorsey, J.A., Kubicek, S., Opravil, S., Jenuwein, T., and Berger, S.L. 2006. Repression of p53 activity by Smyd2-mediated methylation. *Nature* **444**(7119): 629-632.
- Huang, L.C., Clarkin, K.C., and Wahl, G.M. 1996. p53-dependent cell cycle arrests are preserved in DNA-activated protein kinase-deficient mouse fibroblasts. *Cancer Res* **56**(13): 2940-2944.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S., and Howley, P.M. 1995. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(7): 2563-2567.
- Hussain, S.P. and Harris, C.C. 1998. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res* **58**(18): 4023-4037.
- Iliakis, G., Wang, Y., Guan, J., and Wang, H. 2003. DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* **22**(37): 5834-5847.
- Inga, A., Storici, F., Darden, T.A., and Resnick, M.A. 2002. Differential transactivation by the p53 transcription factor is highly dependent on p53 level and promoter target sequence. *Mol Cell Biol* **22**(24): 8612-8625.
- Irani, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Sollott, S.J., Der, C.J., Fearon, E.R., Sundaresan, M., Finkel, T., and Goldschmidt-Clermont, P.J. 1997. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* **275**(5306): 1649-1652.
- Ito, A., Kawaguchi, Y., Lai, C.H., Kovacs, J.J., Higashimoto, Y., Appella, E., and Yao, T.P. 2002. MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *EMBO J* **21**(22): 6236-6245.
- Ito, A., Lai, C.H., Zhao, X., Saito, S., Hamilton, M.H., Appella, E., and Yao, T.P. 2001. p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO J* **20**(6): 1331-1340.
- Iyer, N.G., Ozdag, H., and Caldas, C. 2004. p300/CBP and cancer. *Oncogene* **23**(24): 4225-4231.
- Jiang, D., Srinivasan, A., Lozano, G., and Robbins, P.D. 1993. SV40 T antigen abrogates p53-mediated transcriptional activity. *Oncogene* **8**(10): 2805-2812.
- Jin, S. and Levine, A.J. 2001. The p53 functional circuit. *J Cell Sci* **114**(Pt 23): 4139-4140.
- Jin, S., Tong, T., Fan, W., Fan, F., Antinore, M.J., Zhu, X., Mazzacurati, L., Li, X., Petrik, K.L., Rajasekaran, B., Wu, M., and Zhan, Q. 2002. GADD45-induced cell cycle G2-M arrest associates with altered subcellular distribution of cyclin B1 and is independent of p38 kinase activity. *Oncogene* **21**(57): 8696-8704.
- Joerger, A.C., Ang, H.C., Veprintsev, D.B., Blair, C.M., and Fersht, A.R. 2005. Structures of p53 cancer mutants and mechanism of rescue by second-site suppressor mutations. *J Biol Chem* **280**(16): 16030-16037.
- Johnson, T.M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Lowenstein, R.A., and Finkel, T. 1996. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21): 11848-11852.
- Jones, G.M., Sanford, K.K., Parshad, R., Gantt, R., Price, F.M., and Tarone, R.E. 1985. Influence of added catalase on chromosome stability and neoplastic transformation of mouse cells in culture. *Br J Cancer* **52**(4): 583-590.
- Jongmans, W., Artuso, M., Vuillaume, M., Bresil, H., Jackson, S.P., and Hall, J. 1996. The role of Ataxia telangiectasia and the DNA-dependent protein kinase in the p53-mediated cellular response to ionising radiation. *Oncogene* **13**(6): 1133-1138.
- Kadosh, D. and Struhl, K. 1998. Targeted recruitment of the Sin3-Rpd3 histone deacetylase complex generates a highly localized domain of repressed chromatin in vivo. *Mol Cell Biol* **18**(9): 5121-5127.
- Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M.F., Quelle, D.E., Downing, J.R., Ashmun, R.A., Grosveld, G., and Sherr, C.J. 1997. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* **91**(5): 649-659.
- Kaneto, H., Katakami, N., Kawamori, D., Miyatsuka, T., Sakamoto, K., Matsuoka, T.A., Matsuhisa, M., and Yamasaki, Y. 2007. Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes. *Antioxid Redox Signal* **9**(3): 355-366.
- Karanjawala, Z.E., Murphy, N., Hinton, D.R., Hsieh, C.L., and Lieber, M.R. 2002. Oxygen metabolism causes chromosome breaks and is associated with the neuronal apoptosis observed in DNA double-strand break repair mutants. *Curr Biol* **12**(5): 397-402.

- Karlseder, J., Smogorzewska, A., and de Lange, T. 2002. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* **295**(5564): 2446-2449.
- Kautz, A.R., Schneider, A., Weisshart, K., Geiger, C., and Nasheuer, H.P. 2001. Different regions of primase subunit p48 control mouse polyomavirus and simian virus 40 DNA replication in vitro. *J Virol* **75**(4): 1751-1760.
- Kelley, W.L. and Landry, S.J. 1994. Chaperone power in a virus? *Trends Biochem Sci* **19**(7): 277-278.
- Kierstead, T.D. and Tevethia, M.J. 1993. Association of p53 binding and immortalization of primary C57BL/6 mouse embryo fibroblasts by using simian virus 40 T-antigen mutants bearing internal overlapping deletion mutations. *J Virol* **67**(4): 1817-1829.
- Kim, E. and Deppert, W. 2003. The complex interactions of p53 with target DNA: we learn as we go. *Biochem Cell Biol* **81**(3): 141-150.
- Kim, E. and Deppert, W. 2004. Transcriptional activities of mutant p53: when mutations are more than a loss. *J Cell Biochem* **93**(5): 878-886.
- Kim, H.Y., Ahn, B.Y., and Cho, Y. 2001. Structural basis for the inactivation of retinoblastoma tumor suppressor by SV40 large T antigen. *EMBO J* **20**(1-2): 295-304.
- Kim, J.W. and Dang, C.V. 2006. Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect. *Cancer Res* **66**(18): 8927-8930.
- Kingston, R.E., Bunker, C.A., and Imbalzano, A.N. 1996. Repression and activation by multiprotein complexes that alter chromatin structure. *Genes Dev* **10**(8): 905-920.
- Kitamura, T., Koshino, Y., Shibata, F., Oki, T., Nakajima, H., Nosaka, T., and Kumagai, H. 2003. Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp Hematol* **31**(11): 1007-1014.
- Klaunig, J.E. and Kamendulis, L.M. 2004. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**: 239-267.
- Koga, H. and Deppert, W. 2000. Identification of genomic DNA sequences bound by mutant p53 protein (Gly245-->Ser) in vivo. *Oncogene* **19**(36): 4178-4183.
- Kohrman, D.C. and Imperiale, M.J. 1992. Simian virus 40 large T antigen stably complexes with a 185-kilodalton host protein. *J Virol* **66**(3): 1752-1760.
- Kondoh, H., Leonart, M.E., Nakashima, Y., Yokode, M., Tanaka, M., Bernard, D., Gil, J., and Beach, D. 2007. A high glycolytic flux supports the proliferative potential of murine embryonic stem cells. *Antioxid Redox Signal* **9**(3): 293-299.
- Kouzarides, T. 2000. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J* **19**(6): 1176-1179.
- Kraemer, H.P. and Sedlacek, H.H. 1986. Human tumor test systems: a new screening approach. *Behring Inst Mitt*(80): 103-112.
- Krepulat, F., Lohler, J., Heinlein, C., Hermannstadter, A., Tolstonog, G.V., and Deppert, W. 2005. Epigenetic mechanisms affect mutant p53 transgene expression in WAP-mutp53 transgenic mice. *Oncogene* **24**(29): 4645-4659.
- Kuzumaki, T., Matsuda, A., Ito, K., and Ishikawa, K. 1996. Cell adhesion to substratum and activation of tyrosine kinases are essentially required for G1/S phase transition in BALB/c 3T3 fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* **1310**(2): 185-192.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lakin, N.D., Hann, B.C., and Jackson, S.P. 1999. The ataxia-telangiectasia related protein ATR mediates DNA-dependent phosphorylation of p53. *Oncogene* **18**(27): 3989-3995.
- Lambert, P.F., Kashanchi, F., Radonovich, M.F., Shiekhhattar, R., and Brady, J.N. 1998. Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP. *J Biol Chem* **273**(49): 33048-33053.
- Lane, D.P. and Benchimol, S. 1990. p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev* **4**(1): 1-8.
- Lane, D.P. and Crawford, L.V. 1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**(5701): 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., El-Naggar, A.K., and Lozano, G. 2004. Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* **119**(6): 861-872.

- Langley, E., Pearson, M., Faretta, M., Bauer, U.M., Frye, R.A., Minucci, S., Pelicci, P.G., and Kouzarides, T. 2002. Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J* **21**(10): 2383-2396.
- Lansdorp, P.M. 2000. Repair of telomeric DNA prior to replicative senescence. *Mech Ageing Dev* **118**(1-2): 23-34.
- Laptenko, O. and Prives, C. 2006. Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ* **13**(6): 951-961.
- Laronga, C., Yang, H.Y., Neal, C., and Lee, M.H. 2000. Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression. *J Biol Chem* **275**(30): 23106-23112.
- Lee, D.Y., Hayes, J.J., Pruss, D., and Wolffe, A.P. 1993. A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* **72**(1): 73-84.
- Levine, A.J., Momand, J., and Finlay, C.A. 1991. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* **351**(6326): 453-456.
- Li, J.J. and Kelly, T.J. 1985. Simian virus 40 DNA replication in vitro: specificity of initiation and evidence for bidirectional replication. *Mol Cell Biol* **5**(6): 1238-1246.
- 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**(5652): 1972-1975.
- Li, M., Luo, J., Brooks, C.L., and Gu, W. 2002. Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J Biol Chem* **277**(52): 50607-50611.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**(4): 479-489.
- Li, P.F., Dietz, R., and von Harsdorf, R. 1999. Superoxide induces apoptosis in cardiomyocytes, but proliferation and expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts. *FEBS Lett* **448**(2-3): 206-210.
- Li, Y., Jenkins, C.W., Nichols, M.A., and Xiong, Y. 1994. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* **9**(8): 2261-2268.
- Lill, N.L., Grossman, S.R., Ginsberg, D., DeCaprio, J., and Livingston, D.M. 1997a. Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* **387**(6635): 823-827.
- Lill, N.L., Tevethia, M.J., Eckner, R., Livingston, D.M., and Modjtahedi, N. 1997b. p300 family members associate with the carboxyl terminus of simian virus 40 large tumor antigen. *J Virol* **71**(1): 129-137.
- Lilyestrom, W., Klein, M.G., Zhang, R., Joachimiak, A., and Chen, X.S. 2006. Crystal structure of SV40 large T-antigen bound to p53: interplay between a viral oncoprotein and a cellular tumor suppressor. *Genes Dev* **20**(17): 2373-2382.
- 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**(12): 2387-2390.
- Lin, J.Y. and Simmons, D.T. 1991. The ability of large T antigen to complex with p53 is necessary for the increased life span and partial transformation of human cells by simian virus 40. *J Virol* **65**(12): 6447-6453.
- 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**(1): 43-52.
- Liu, G. and Chen, X. 2006. Regulation of the p53 transcriptional activity. *J Cell Biochem* **97**(3): 448-458.
- Liu, G., Xia, T., and Chen, X. 2003. The activation domains, the proline-rich domain, and the C-terminal basic domain in p53 are necessary for acetylation of histones on the proximal p21 promoter and interaction with p300/CREB-binding protein. *J Biol Chem* **278**(19): 17557-17565.
- Liu, H.S., Jan, M.S., Chou, C.K., Chen, P.H., and Ke, N.J. 1999a. Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem Biophys Res Commun* **260**(3): 712-717.
- Liu, L., Scolnick, D.M., Trievel, R.C., Zhang, H.B., Marmorstein, R., Halazonetis, T.D., and Berger, S.L. 1999b. p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* **19**(2): 1202-1209.
- Liu, X. and Marmorstein, R. 2006. When viral oncoprotein meets tumor suppressor: a structural view. *Genes Dev* **20**(17): 2332-2337.

- 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**(4): 402-408.
- Lo, Y.Y., Wong, J.M., and Cruz, T.F. 1996. Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. *J Biol Chem* **271**(26): 15703-15707.
- Logan, I.R., Gaughan, L., McCracken, S.R., Sapountzi, V., Leung, H.Y., and Robson, C.N. 2006. Human PIRH2 enhances androgen receptor signaling through inhibition of histone deacetylase 1 and is overexpressed in prostate cancer. *Mol Cell Biol* **26**(17): 6502-6510.
- Loo, D.T., Fuquay, J.I., Rawson, C.L., and Barnes, D.W. 1987. Extended culture of mouse embryo cells without senescence: inhibition by serum. *Science* **236**(4798): 200-202.
- Ludlow, J.W., Shon, J., Pipas, J.M., Livingston, D.M., and DeCaprio, J.A. 1990. The retinoblastoma susceptibility gene product undergoes cell cycle-dependent dephosphorylation and binding to and release from SV40 large T. *Cell* **60**(3): 387-396.
- Ludwig, R.L., Bates, S., and Vousden, K.H. 1996. Differential activation of target cellular promoters by p53 mutants with impaired apoptotic function. *Mol Cell Biol* **16**(9): 4952-4960.
- 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**(2): 137-148.
- Luo, Y., Hurwitz, J., and Massague, J. 1995. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* **375**(6527): 159-161.
- Ma, B., Pan, Y., Gunasekaran, K., Venkataraghavan, R.B., Levine, A.J., and Nussinov, R. 2005. Comparison of the protein-protein interfaces in the p53-DNA crystal structures: towards elucidation of the biological interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(11): 3988-3993.
- Macpherson, I. and Montagnier, L. 1964. Agar Suspension Culture for the Selective Assay of Cells Transformed by Polyoma Virus. *Virology* **23**: 291-294.
- Maier, B., Gluba, W., Bernier, B., Turner, T., Mohammad, K., Guise, T., Sutherland, A., Thorner, M., and Scoble, H. 2004. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev* **18**(3): 306-319.
- Malumbres, M. and Carnero, A. 2003. Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *Prog Cell Cycle Res* **5**: 5-18.
- Manfredi, J.J. and Prives, C. 1994. The transforming activity of simian virus 40 large tumor antigen. *Biochim Biophys Acta* **1198**(1): 65-83.
- Manos, M.M. and Gluzman, Y. 1985. Genetic and biochemical analysis of transformation-competent, replication-defective simian virus 40 large T antigen mutants. *J Virol* **53**(1): 120-127.
- Marks, J.R., Davidoff, A.M., Kerns, B.J., Humphrey, P.A., Pence, J.C., Dodge, R.K., Clarke-Pearson, D.L., Iglehart, J.D., Bast, R.C., Jr., and Berchuck, A. 1991. Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* **51**(11): 2979-2984.
- Martindale, J.L. and Holbrook, N.J. 2002. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* **192**(1): 1-15.
- Martinez, J., Georgoff, I., and Levine, A.J. 1991. Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature-sensitive p53 protein. *Genes Dev* **5**(2): 151-159.
- Marzio, G. and Giacca, M. 1999. Chromatin control of HIV-1 gene expression. *Genetica* **106**(1-2): 125-130.
- Masters, J.R. 2000. Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(3): 233-236.
- Masumori, N., Thomas, T.Z., Chaurand, P., Case, T., Paul, M., Kasper, S., Caprioli, R.M., Tsukamoto, T., Shappell, S.B., and Matusik, R.J. 2001. A probasin-large T antigen transgenic mouse line develops prostate adenocarcinoma and neuroendocrine carcinoma with metastatic potential. *Cancer Res* **61**(5): 2239-2249.
- Matoba, S., Kang, J.G., Patino, W.D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrillova, O., Hurley, P.J., Bunz, F., and Hwang, P.M. 2006. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* **312**(5780): 1650-1653.
- Meek, R.L., Bowman, P.D., and Daniel, C.W. 1977. Establishment of mouse embryo cells in vitro. Relationship of DNA synthesis, senescence and malignant transformation. *Exp Cell Res* **107**(2): 277-284.
- Michalovitz, D., Eliyahu, D., and Oren, M. 1986. Overproduction of protein p53 contributes to simian virus 40-mediated transformation. *Mol Cell Biol* **6**(10): 3531-3536.
- Michalovitz, D., Halevy, O., and Oren, M. 1990. Conditional inhibition of transformation and of cell

- proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell* **62**(4): 671-680.
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O., and Remacle, J. 1994. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **17**(3): 235-248.
- Milavetz, B. 2004. Hyperacetylation and differential deacetylation of histones H4 and H3 define two distinct classes of acetylated SV40 chromosomes early in infection. *Virology* **319**(2): 324-336.
- Miller, R.W. and Rubinstein, J.H. 1995. Tumors in Rubinstein-Taybi syndrome. *Am J Med Genet* **56**(1): 112-115.
- Milner, J. 1994. Forms and functions of p53. *Semin Cancer Biol* **5**(3): 211-219.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., and Reed, J.C. 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* **9**(6): 1799-1805.
- Miyashita, T. and Reed, J.C. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**(2): 293-299.
- Monti, P., Campomenosi, P., Ciribilli, Y., Iannone, R., Inga, A., Abbondandolo, A., Resnick, M.A., and Fronza, G. 2002. Tumour p53 mutations exhibit promoter selective dominance over wild type p53. *Oncogene* **21**(11): 1641-1648.
- Morita, S., Kojima, T., and Kitamura, T. 2000. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* **7**(12): 1063-1066.
- Moylan, J.S. and Reid, M.B. 2007. Oxidative stress, chronic disease, and muscle wasting. *Muscle Nerve* **35**(4): 411-429.
- Muntoni, A., Fleming, J., Gordon, K.E., Hunter, K., McGregor, F., Parkinson, E.K., and Harrison, P.R. 2003. Senescing oral dysplasias are not immortalized by ectopic expression of hTERT alone without other molecular changes, such as loss of INK4A and/or retinoic acid receptor-beta: but p53 mutations are not necessarily required. *Oncogene* **22**(49): 7804-7808.
- Murphy, M., Ahn, J., Walker, K.K., Hoffman, W.H., Evans, R.M., Levine, A.J., and George, D.L. 1999. Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev* **13**(19): 2490-2501.
- Murphy, M.E., Leu, J.I., and George, D.L. 2004. p53 moves to mitochondria: a turn on the path to apoptosis. *Cell Cycle* **3**(7): 836-839.
- Nagaich, A.K., Zhurkin, V.B., Durell, S.R., Jernigan, R.L., Appella, E., and Harrington, R.E. 1999. p53-induced DNA bending and twisting: p53 tetramer binds on the outer side of a DNA loop and increases DNA twisting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5): 1875-1880.
- Nakano, K. and Vousden, K.H. 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **7**(3): 683-694.
- Nakatani, Y. 2002. HIV-1 transcription: activation mediated by acetylation of Tat. *Structure* **10**(4): 443-444.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F., and Riccardi, C. 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* **139**(2): 271-279.
- Norkin, L.C., Anderson, H.A., Wolfrom, S.A., and Oppenheim, A. 2002. Caveolar endocytosis of simian virus 40 is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *J Virol* **76**(10): 5156-5166.
- Nowell, P.C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**(4260): 23-28.
- 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**(5468): 1053-1058.
- Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H., and Nakatani, Y. 1996. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* **87**(5): 953-959.
- Ogryzko, V.V., Wong, P., and Howard, B.H. 1997. WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol* **17**(8): 4877-4882.
- Olive, K.P., Tuveson, D.A., Ruhe, Z.C., Yin, B., Willis, N.A., Bronson, R.T., Crowley, D., and Jacks, T. 2004. Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* **119**(6): 847-860.

- Olivier, M., Eeles, R., Hollstein, M., Khan, M.A., Harris, C.C., and Hainaut, P. 2002. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* **19**(6): 607-614.
- Oppenheim, A., Siani, M., Sandalon, Z., and Mengeritsky, G. 1994. Dynamics of the nucleoprotein structure of simian virus 40 regulatory region during viral development. *J Mol Biol* **238**(4): 501-513.
- Oren, M. 2003. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* **10**(4): 431-442.
- Oren, M., Maltzman, W., and Levine, A.J. 1981. Post-translational regulation of the 54K cellular tumor antigen in normal and transformed cells. *Mol Cell Biol* **1**(2): 101-110.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., and Sekiya, T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(8): 2766-2770.
- Orphanides, G. and Reinberg, D. 2000. RNA polymerase II elongation through chromatin. *Nature* **407**(6803): 471-475.
- Ott, M., Dorr, A., Hetzer-Egger, C., Kaehlcke, K., Schnolzer, M., Henklein, P., Cole, P., Zhou, M.M., and Verdin, E. 2004. Tat acetylation: a regulatory switch between early and late phases in HIV transcription elongation. *Novartis Found Symp* **259**: 182-193; discussion 193-186, 223-185.
- Owen-Schaub, L.B., Zhang, W., Cusack, J.C., Angelo, L.S., Santee, S.M., Fujiwara, T., Roth, J.A., Deisseroth, A.B., Zhang, W.W., Kruzel, E., and et al. 1995. Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol* **15**(6): 3032-3040.
- Palii, S.S. and Robertson, K.D. 2007. Epigenetic control of tumor suppression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **17**(4): 295-316.
- Palmero, I., Pantoja, C., and Serrano, M. 1998. p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* **395**(6698): 125-126.
- Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., and Campisi, J. 2003. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* **5**(8): 741-747.
- Peden, K.W. and Pipas, J.M. 1985. Site-directed mutagenesis of the simian virus 40 large T-antigen gene: replication-defective amino acid substitution mutants that retain the ability to induce morphological transformation. *J Virol* **55**(1): 1-9.
- Peden, K.W., Srinivasan, A., Farber, J.M., and Pipas, J.M. 1989. Mutants with changes within or near a hydrophobic region of simian virus 40 large tumor antigen are defective for binding cellular protein p53. *Virology* **168**(1): 13-21.
- Peden, K.W., Srinivasan, A., Vartikar, J.V., and Pipas, J.M. 1998. Effects of mutations within the SV40 large T antigen ATPase/p53 binding domain on viral replication and transformation. *Virus Genes* **16**(2): 153-165.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J., and Helenius, A. 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* **3**(5): 473-483.
- Pingoud and Urbanke 1997. Arbeitsmethoden der Biochemie. *De Gruyter*, Berlin.
- Pipas, J.M. 1992. Common and unique features of T antigens encoded by the polyomavirus group. *J Virol* **66**(7): 3979-3985.
- Plas, D.R. and Thompson, C.B. 2005. Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene* **24**(50): 7435-7442.
- Polisky, B. and McCarthy, B. 1975. Location of histones on simian virus 40 DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(8): 2895-2899.
- Pollack, R., Osborn, M., and Weber, K. 1975. Patterns of organization of actin and myosin in normal and transformed cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(3): 994-998.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. 1997. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**(6648): 300-305.
- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlov, I., Lee, H.W., Cordon-Cardo, C., and DePinho, R.A. 1998. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* **92**(6): 713-723.
- Porras, A., Bennett, J., Howe, A., Tokos, K., Bouck, N., Henglein, B., Sathyamangalam, S., Thimmapaya, B., and Rundell, K. 1996. A novel simian virus 40 early-region domain mediates transactivation of the cyclin A promoter by small-t antigen and is required for transformation in

- small-t antigen-dependent assays. *J Virol* **70**(10): 6902-6908.
- Porras, A., Gaillard, S., and Rundell, K. 1999. The simian virus 40 small-t and large-T antigens jointly regulate cell cycle reentry in human fibroblasts. *J Virol* **73**(4): 3102-3107.
- Poulin, D.L., Kung, A.L., and DeCaprio, J.A. 2004. p53 targets simian virus 40 large T antigen for acetylation by CBP. *J Virol* **78**(15): 8245-8253.
- Quartin, R.S., Cole, C.N., Pipas, J.M., and Levine, A.J. 1994. The amino-terminal functions of the simian virus 40 large T antigen are required to overcome wild-type p53-mediated growth arrest of cells. *J Virol* **68**(3): 1334-1341.
- Querido, E., Blanchette, P., Yan, Q., Kamura, T., Morrison, M., Boivin, D., Kaelin, W.G., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Branton, P.E. 2001. Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes Dev* **15**(23): 3104-3117.
- Rajagopalan, H., Nowak, M.A., Vogelstein, B., and Lengauer, C. 2003. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* **3**(9): 695-701.
- Ramel, S., Sanchez, C.A., Schimke, M.K., Neshat, K., Cross, S.M., Raskind, W.H., and Reid, B.J. 1995. Inactivation of p53 and the development of tetraploidy in the elastase-SV40 T antigen transgenic mouse pancreas. *Pancreas* **11**(3): 213-222.
- Rangarajan, A., Hong, S.J., Gifford, A., and Weinberg, R.A. 2004. Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell* **6**(2): 171-183.
- Rao, J.Y., Bonner, R.B., Hurst, R.E., Liang, Y.Y., Reznikoff, C.A., and Hemstreet, G.P., 3rd. 1997. Quantitative changes in cytoskeletal and nuclear actins during cellular transformation. *Int J Cancer* **70**(4): 423-429.
- Reincke, M., Karl, M., Travis, W.H., Mastorakos, G., Allolio, B., Linehan, H.M., and Chrousos, G.P. 1994. p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. *J Clin Endocrinol Metab* **78**(3): 790-794.
- Reznikoff, C.A., Bertram, J.S., Brankow, D.W., and Heidelberger, C. 1973. Quantitative and qualitative studies of chemical transformation of cloned C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of cell division. *Cancer Res* **33**(12): 3239-3249.
- Risser, R. and Pollack, R. 1974. A nonselective analysis of SV40 transformation of mouse 3T3 cells. *Virology* **59**(2): 477-489.
- Rittling, S.R. and Denhardt, D.T. 1992. p53 mutations in spontaneously immortalized 3T12 but not 3T3 mouse embryo cells. *Oncogene* **7**(5): 935-942.
- Roger, L., Gadea, G., and Roux, P. 2006. Control of cell migration: a tumour suppressor function for p53? *Biol Cell* **98**(3): 141-152.
- Rowan, S., Ludwig, R.L., Haupt, Y., Bates, S., Lu, X., Oren, M., and Vousden, K.H. 1996. Specific loss of apoptotic but not cell-cycle arrest function in a human tumor derived p53 mutant. *EMBO J* **15**(4): 827-838.
- Roy, S., Khanna, S., Bickerstaff, A.A., Subramanian, S.V., Atalay, M., Bierl, M., Pendyala, S., Levy, D., Sharma, N., Venojarvi, M., Strauch, A., Orosz, C.G., and Sen, C.K. 2003. Oxygen sensing by primary cardiac fibroblasts: a key role of p21(Waf1/Cip1/Sdi1). *Circ Res* **92**(3): 264-271.
- Ru, H.Y., Chen, R.L., Lu, W.C., and Chen, J.H. 2002. hBUB1 defects in leukemia and lymphoma cells. *Oncogene* **21**(30): 4673-4679.
- Ruaro, E.M., Collavin, L., Del Sal, G., Haffner, R., Oren, M., Levine, A.J., and Schneider, C. 1997. A proline-rich motif in p53 is required for transactivation-independent growth arrest as induced by Gas1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(9): 4675-4680.
- Rundell, K. and Parakati, R. 2001. The role of the SV40 ST antigen in cell growth promotion and transformation. *Semin Cancer Biol* **11**(1): 5-13.
- Rushton, J.J., Jiang, D., Srinivasan, A., Pipas, J.M., and Robbins, P.D. 1997. Simian virus 40 T antigen can regulate p53-mediated transcription independent of binding p53. *J Virol* **71**(7): 5620-5623.
- Sablina, A.A., Budanov, A.V., Ilyinskaya, G.V., Agapova, L.S., Kravchenko, J.E., and Chumakov, P.M. 2005. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* **11**(12): 1306-1313.
- Sablina, A.A. and Hahn, W.C. 2008. SV40 small T antigen and PP2A phosphatase in cell transformation. *Cancer Metastasis Rev.*
- Sablina, A.A., Ilyinskaya, G.V., Rubtsova, S.N., Agapova, L.S., Chumakov, P.M., and Koppin, B.P. 1998. Activation of p53-mediated cell cycle checkpoint in response to micronuclei formation. *J Cell Sci*

111 (Pt 7): 977-984.

- Saenz Robles, M.T., Symonds, H., Chen, J., and Van Dyke, T. 1994. Induction versus progression of brain tumor development: differential functions for the pRB- and p53-targeting domains of simian virus 40 T antigen. *Mol Cell Biol* **14**(4): 2686-2698.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**(4839): 487-491.
- Sakaguchi, K., Saito, S., Higashimoto, Y., Roy, S., Anderson, C.W., and Appella, E. 2000. Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding. *J Biol Chem* **275**(13): 9278-9283.
- Sambrook, J., Westphal, H., Srinivasan, P.R., and Dulbecco, R. 1968. The integrated state of viral DNA in SV40-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **60**(4): 1288-1295.
- Sanford, K.K., Parshad, R., Handleman, S.L., Price, F.M., Gantt, R.R., and Evans, V.J. 1979. Serum-induced chromosome damage and neoplastic transformation of mouse cells in vitro. *In Vitro* **15**(7): 488-496.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-5467.
- Sawai, E.T. and Butel, J.S. 1989. Association of a cellular heat shock protein with simian virus 40 large T antigen in transformed cells. *J Virol* **63**(9): 3961-3973.
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J., and Howley, P.M. 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**(6): 1129-1136.
- Schulze-Garg, C., Lohler, J., Gocht, A., and Deppert, W. 2000. A transgenic mouse model for the ductal carcinoma in situ (DCIS) of the mammary gland. *Oncogene* **19**(8): 1028-1037.
- Schumm, K., Rocha, S., Caamano, J., and Perkins, N.D. 2006. Regulation of p53 tumour suppressor target gene expression by the p52 NF-kappaB subunit. *EMBO J* **25**(20): 4820-4832.
- Scrabble, H., Sasaki, T., and Maier, B. 2005. DeltaNp53 or p44: priming the p53 pump. *Int J Biochem Cell Biol* **37**(5): 913-919.
- Sears, L.E., Moran, L.S., Kissinger, C., Creasey, T., Perry-O'Keefe, H., Roskey, M., Sutherland, E., and Slatko, B.E. 1992. CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase. *Biotechniques* **13**(4): 626-633.
- Segawa, K., Minowa, A., Sugawara, K., Takano, T., and Hanaoka, F. 1993. Abrogation of p53-mediated transactivation by SV40 large T antigen. *Oncogene* **8**(3): 543-548.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**(5): 593-602.
- Shah, K.V. 2007. SV40 and human cancer: a review of recent data. *Int J Cancer* **120**(2): 215-223.
- Sharpless, N.E., Bardeesy, N., Lee, K.H., Carrasco, D., Castrillon, D.H., Aguirre, A.J., Wu, E.A., Horner, J.W., and DePinho, R.A. 2001. Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* **413**(6851): 86-91.
- Shelton, D.N., Chang, E., Whittier, P.S., Choi, D., and Funk, W.D. 1999. Microarray analysis of replicative senescence. *Curr Biol* **9**(17): 939-945.
- Shen, Y., Kitzes, G., Nye, J.A., Fattaey, A., and Hermiston, T. 2001. Analyses of single-amino-acid substitution mutants of adenovirus type 5 E1B-55K protein. *J Virol* **75**(9): 4297-4307.
- Sherr, C.J. 1998. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev* **12**(19): 2984-2991.
- Sherr, C.J. 2006. Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nat Rev Cancer* **6**(9): 663-673.
- Sherr, C.J. and DePinho, R.A. 2000. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* **102**(4): 407-410.
- Sherr, C.J. and McCormick, F. 2002. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* **2**(2): 103-112.
- Shi, Q., Xu, H., Kleinman, W.A., and Gibson, G.E. 2008. Novel functions of the alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex may mediate diverse oxidant-induced changes in mitochondrial enzymes associated with Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* **1782**(4): 229-238.

- Shiloh, Y. 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3**(3): 155-168.
- Shimazu, T., Komatsu, Y., Nakayama, K.I., Fukazawa, H., Horinouchi, S., and Yoshida, M. 2006. Regulation of SV40 large T-antigen stability by reversible acetylation. *Oncogene* **25**(56): 7391-7400.
- Sigal, A. and Rotter, V. 2000. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* **60**(24): 6788-6793.
- Skoczylas, C., Henglein, B., and Rundell, K. 2005. PP2A-dependent transactivation of the cyclin A promoter by SV40 ST is mediated by a cell cycle-regulated E2F site. *Virology* **332**(2): 596-601.
- Sladek, T.L., Laffin, J., Lehman, J.M., and Jacobberger, J.W. 2000. A subset of cells expressing SV40 large T antigen contain elevated p53 levels and have an altered cell cycle phenotype. *Cell Prolif* **33**(2): 115-125.
- Smith, J.R. and Pereira-Smith, O.M. 1990. Genetic and molecular studies of cellular immortalization. *Adv Cancer Res* **54**: 63-77.
- Sompayrac, L. and Danna, K.J. 1991. The amino-terminal 147 amino acids of SV40 large T antigen transform secondary rat embryo fibroblasts. *Virology* **181**(1): 412-415.
- Sompayrac, L. and Danna, K.J. 1992. An amino-terminal fragment of SV40 T antigen transforms REF52 cells. *Virology* **191**(1): 439-442.
- Sontag, E., Fedorov, S., Kamibayashi, C., Robbins, D., Cobb, M., and Mumby, M. 1993. The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation. *Cell* **75**(5): 887-897.
- Soussi, T. 2005. The p53 pathway and human cancer. *Br J Surg* **92**(11): 1331-1332.
- Soussi, T. and Beroud, C. 2001. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* **1**(3): 233-240.
- Soussi, T. and Lozano, G. 2005. p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **331**(3): 834-842.
- Speidel, D., Helmbold, H., and Deppert, W. 2006. Dissection of transcriptional and non-transcriptional p53 activities in the response to genotoxic stress. *Oncogene* **25**(6): 940-953.
- Spence, S.L. and Pipas, J.M. 1994. Simian virus 40 large T antigen host range domain functions in virion assembly. *J Virol* **68**(7): 4227-4240.
- Srinivasan, A., McClellan, A.J., Vartikar, J., Marks, I., Cantalupo, P., Li, Y., Whyte, P., Rundell, K., Brodsky, J.L., and Pipas, J.M. 1997. The amino-terminal transforming region of simian virus 40 large T and small t antigens functions as a J domain. *Mol Cell Biol* **17**(8): 4761-4773.
- Srinivasan, A., Peden, K.W., and Pipas, J.M. 1989. The large tumor antigen of simian virus 40 encodes at least two distinct transforming functions. *J Virol* **63**(12): 5459-5463.
- St Clair, S., Giono, L., Varmeh-Ziaie, S., Resnick-Silverman, L., Liu, W.J., Padi, A., Dastidar, J., DaCosta, A., Mattia, M., and Manfredi, J.J. 2004. DNA damage-induced downregulation of Cdc25C is mediated by p53 via two independent mechanisms: one involves direct binding to the cdc25C promoter. *Mol Cell* **16**(5): 725-736.
- Steinmeyer, K., Maacke, H., and Deppert, W. 1990. Cell cycle control by p53 in normal (3T3) and chemically transformed (Meth A) mouse cells. I. Regulation of p53 expression. *Oncogene* **5**(11): 1691-1699.
- Sterner, D.E. and Berger, S.L. 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(2): 435-459.
- Stoker, M., O'Neill, C., Berryman, S., and Waxman, V. 1968. Anchorage and growth regulation in normal and virus-transformed cells. *Int J Cancer* **3**(5): 683-693.
- 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**(6): 1660-1672.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**(6765): 41-45.
- Strickler, J.G., Zheng, J., Shu, Q., Burgart, L.J., Alberts, S.R., and Shibata, D. 1994. p53 mutations and microsatellite instability in sporadic gastric cancer: when guardians fail. *Cancer Res* **54**(17): 4750-4755.

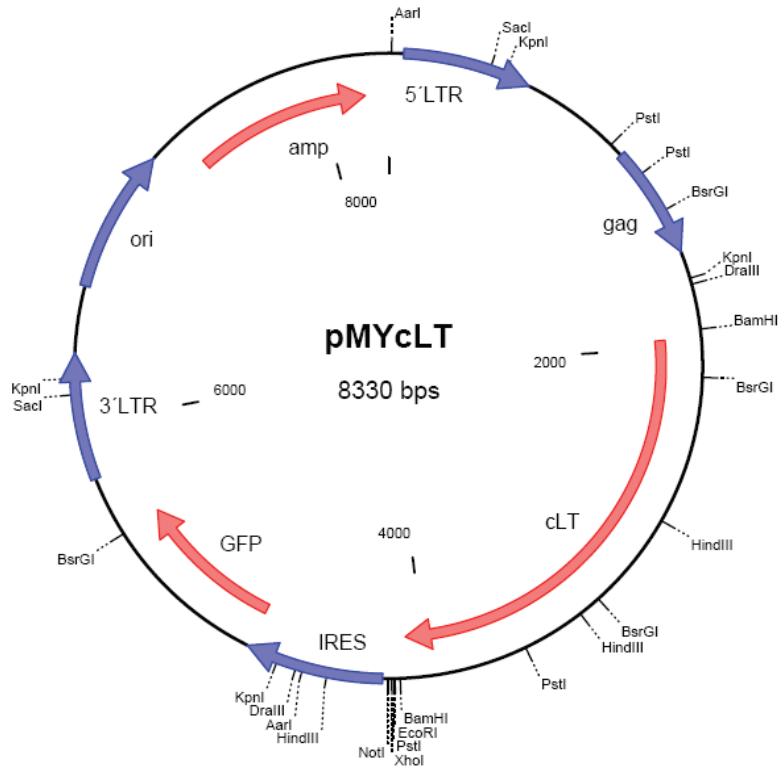
- Stuart, R.A., Cyr, D.M., and Neupert, W. 1994. Hsp70 in mitochondrial biogenesis: from chaperoning nascent polypeptide chains to facilitation of protein degradation. *Experientia* **50**(11-12): 1002-1011.
- Sullivan, A. and Lu, X. 2007. ASPP: a new family of oncogenes and tumour suppressor genes. *Br J Cancer* **96**(2): 196-200.
- Sullivan, C.S., Grundhoff, A.T., Tevethia, S., Pipas, J.M., and Ganem, D. 2005. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* **435**(7042): 682-686.
- Sullivan, C.S. and Pipas, J.M. 2002. T antigens of simian virus 40: molecular chaperones for viral replication and tumorigenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**(2): 179-202.
- Sullivan, C.S., Tremblay, J.D., Fewell, S.W., Lewis, J.A., Brodsky, J.L., and Pipas, J.M. 2000. Species-specific elements in the large T-antigen J domain are required for cellular transformation and DNA replication by simian virus 40. *Mol Cell Biol* **20**(15): 5749-5757.
- Symonds, H., Krall, L., Remington, L., Saenz-Robles, M., Lowe, S., Jacks, T., and Van Dyke, T. 1994. p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell* **78**(4): 703-711.
- Talis, A.L., Huibregtse, J.M., and Howley, P.M. 1998. The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells. *J Biol Chem* **273**(11): 6439-6445.
- Tan, M., Li, S., Swaroop, M., Guan, K., Oberley, L.W., and Sun, Y. 1999. Transcriptional activation of the human glutathione peroxidase promoter by p53. *J Biol Chem* **274**(17): 12061-12066.
- Tannapfel, A., Busse, C., Weinans, L., Benicke, M., Katalinic, A., Geissler, F., Hauss, J., and Wittekind, C. 2001. INK4a-ARF alterations and p53 mutations in hepatocellular carcinomas. *Oncogene* **20**(48): 7104-7109.
- Taylor, W.R. and Stark, G.R. 2001. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* **20**(15): 1803-1815.
- Technau, A., Wolff, A., Sauder, C., Birkner, N., and Brandner, G. 2001. p53 in SV40-transformed DNA-damaged human cells binds to its cognate sequence but fails to transactivate target genes. *Int J Oncol* **18**(2): 281-286.
- Teschendorf, C., Warrington, K.H., Jr., Siemann, D.W., and Muzyczka, N. 2002. Comparison of the EF-1 alpha and the CMV promoter for engineering stable tumor cell lines using recombinant adeno-associated virus. *Anticancer Res* **22**(6A): 3325-3330.
- Tevethia, M.J., Pipas, J.M., Kierstead, T., and Cole, C. 1988. Requirements for immortalization of primary mouse embryo fibroblasts probed with mutants bearing deletions in the 3' end of SV40 gene A. *Virology* **162**(1): 76-89.
- Tiemann, F. and Deppert, W. 1994a. Immortalization of BALB/c mouse embryo fibroblasts alters SV40 large T-antigen interactions with the tumor suppressor p53 and results in a reduced SV40 transformation-efficiency. *Oncogene* **9**(7): 1907-1915.
- Tiemann, F. and Deppert, W. 1994b. Stabilization of the tumor suppressor p53 during cellular transformation by simian virus 40: influence of viral and cellular factors and biological consequences. *J Virol* **68**(5): 2869-2878.
- Tiemann, F., Zerrahn, J., and Deppert, W. 1995. Cooperation of simian virus 40 large and small T antigens in metabolic stabilization of tumor suppressor p53 during cellular transformation. *J Virol* **69**(10): 6115-6121.
- Todaro, G.J. and Aaronson, S.A. 1969. Properties of clonal lines of murine sarcoma virus transformed Balb-3T3 cells. *Virology* **38**(1): 174-179.
- Todaro, G.J. and Green, H. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* **17**: 299-313.
- Toyoshima, H. and Hunter, T. 1994. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* **78**(1): 67-74.
- Trouche, D., Cook, A., and Kouzarides, T. 1996. The CBP co-activator stimulates E2F1/DP1 activity. *Nucleic Acids Res* **24**(21): 4139-4145.
- Ullrich, S.J., Mercer, W.E., and Appella, E. 1992. Human wild-type p53 adopts a unique conformational and phosphorylation state in vivo during growth arrest of glioblastoma cells. *Oncogene* **7**(8): 1635-1643.

- Ungermann, C., Neupert, W., and Cyr, D.M. 1994. The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria. *Science* **266**(5188): 1250-1253.
- Valls, E., Blanco-Garcia, N., Aquizu, N., Piedra, D., Estaras, C., de la Cruz, X., and Martinez-Balbas, M.A. 2007. Involvement of chromatin and histone deacetylation in SV40 T antigen transcription regulation. *Nucleic Acids Res* **35**(6): 1958-1968.
- Valls, E., de la Cruz, X., and Martinez-Balbas, M.A. 2003. The SV40 T antigen modulates CBP histone acetyltransferase activity. *Nucleic Acids Res* **31**(12): 3114-3122.
- Vasiliev, J.M. 2004. Cytoskeletal mechanisms responsible for invasive migration of neoplastic cells. *Int J Dev Biol* **48**(5-6): 425-439.
- 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**(2): 149-159.
- Verderame, M., Alcorta, D., Egnor, M., Smith, K., and Pollack, R. 1980. Cytoskeletal F-actin patterns quantitated with fluorescein isothiocyanate-phalloidin in normal and transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(11): 6624-6628.
- Vigushin, D.M., Ali, S., Pace, P.E., Mirsaidi, N., Ito, K., Adcock, I., and Coombes, R.C. 2001. Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo. *Clin Cancer Res* **7**(4): 971-976.
- Vogel, C., Kienitz, A., Hofmann, I., Muller, R., and Bastians, H. 2004. Crosstalk of the mitotic spindle assembly checkpoint with p53 to prevent polyploidy. *Oncogene* **23**(41): 6845-6853.
- Vries, R.G., Prudenziati, M., Zwartjes, C., Verlaan, M., Kalkhoven, E., and Zantema, A. 2001. A specific lysine in c-Jun is required for transcriptional repression by E1A and is acetylated by p300. *EMBO J* **20**(21): 6095-6103.
- Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D., and Stillman, B. 1994. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**(6481): 574-578.
- Wang, G.Q., Wieckowski, E., Goldstein, L.A., Gastman, B.R., Rabinovitz, A., Gambotto, A., Li, S., Fang, B., Yin, X.M., and Rabinowich, H. 2001. Resistance to granzyme B-mediated cytochrome c release in Bak-deficient cells. *J Exp Med* **194**(9): 1325-1337.
- 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**(28): 25568-25576.
- Warburg, O. 1956. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* **124**(3215): 269-270.
- Weber, S.M., Levitz, S.M., and Harrison, T.S. 2000. Chloroquine and the fungal phagosome. *Curr Opin Microbiol* **3**(4): 349-353.
- Wei, C.L., Wu, Q., Vega, V.B., Chiu, K.P., Ng, P., Zhang, T., Shahab, A., Yong, H.C., Fu, Y., Weng, Z., Liu, J., Zhao, X.D., Chew, J.L., Lee, Y.L., Kuznetsov, V.A., Sung, W.K., Miller, L.D., Lim, B., Liu, E.T., Yu, Q., Ng, H.H., and Ruan, Y. 2006. A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell* **124**(1): 207-219.
- Weinberg, R.A. 1989. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* **49**(14): 3713-3721.
- Weinberg, R.L., Freund, S.M., Vepintsev, D.B., Bycroft, M., and Fersht, A.R. 2004. Regulation of DNA binding of p53 by its C-terminal domain. *J Mol Biol* **342**(3): 801-811.
- Welcker, M. and Clurman, B.E. 2005. The SV40 large T antigen contains a decoy phosphodegron that mediates its interactions with Fbw7/hCdc4. *J Biol Chem* **280**(9): 7654-7658.
- Will, K., Warnecke, G., Albrechtsen, N., Boulikas, T., and Deppert, W. 1998. High affinity MAR-DNA binding is a common property of murine and human mutant p53. *J Cell Biochem* **69**(3): 260-270.
- Williams, C., Norberg, T., Ahmadian, A., Ponten, F., Bergh, J., Inganas, M., Lundeberg, J., and Uhlen, M. 1998. Assessment of sequence-based p53 gene analysis in human breast cancer: messenger RNA in comparison with genomic DNA targets. *Clin Chem* **44**(3): 455-462.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., and Graham, M.W. 1989. Quantitative evaluation of Escherichia coli host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**(9): 3469-3478.
- Wu, 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., Hamilton, S.R., Spinner, N.B., Markowitz, S., Wu, G., and el-Deiry, W.S.

1997. KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet* **17**(2): 141-143.
- Yaciuk, P., Carter, M.C., Pipas, J.M., and Moran, E. 1991. Simian virus 40 large-T antigen expresses a biological activity complementary to the p300-associated transforming function of the adenovirus E1A gene products. *Mol Cell Biol* **11**(4): 2116-2124.
- Yagi, A., Hasegawa, Y., Xiao, H., Haneda, M., Kojima, E., Nishikimi, A., Hasegawa, T., Shimokata, K., and Isoke, K. 2003. GADD34 induces p53 phosphorylation and p21/WAF1 transcription. *J Cell Biochem* **90**(6): 1242-1249.
- Yewdell, J.W., Gannon, J.V., and Lane, D.P. 1986. Monoclonal antibody analysis of p53 expression in normal and transformed cells. *J Virol* **59**(2): 444-452.
- Yin, Y., Stephen, C.W., Luciani, M.G., and Fahraeus, R. 2002. p53 Stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products. *Nat Cell Biol* **4**(6): 462-467.
- Yu, Y., Okayasu, R., Weil, M.M., Silver, A., McCarthy, M., Zabriskie, R., Long, S., Cox, R., and Ullrich, R.L. 2001. Elevated breast cancer risk in irradiated BALB/c mice associates with unique functional polymorphism of the Prkdc (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) gene. *Cancer Res* **61**(5): 1820-1824.
- Yuk, I.H., Wildt, S., Jolicoeur, M., Wang, D.I., and Stephanopoulos, G. 2002. A GFP-based screen for growth-arrested, recombinant protein-producing cells. *Biotechnol Bioeng* **79**(1): 74-82.
- 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**(36): 5667-5676.
- Zerrahn, J., Knippschild, U., Winkler, T., and Deppert, W. 1993. Independent expression of the transforming amino-terminal domain of SV40 large T antigen from an alternatively spliced third SV40 early mRNA. *EMBO J* **12**(12): 4739-4746.
- Zerrahn, J., Tiemann, F., and Deppert, W. 1996. Simian virus 40 small t antigen activates the carboxyl-terminal transforming p53-binding domain of large T antigen. *J Virol* **70**(10): 6781-6789.
- 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**(18): 2892-2900.
- Zhang, Q., Yao, H., Vo, N., and Goodman, R.H. 2000. Acetylation of adenovirus E1A regulates binding of the transcriptional corepressor CtBP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14323-14328.
- Zhang, S., Ramsay, E.S., and Mock, B.A. 1998. Cdkn2a, the cyclin-dependent kinase inhibitor encoding p16INK4a and p19ARF, is a candidate for the plasmacytoma susceptibility locus, Pctr1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2429-2434.
- Zhang, Z. and Zhang, R. 2005. p53-independent activities of MDM2 and their relevance to cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* **5**(1): 9-20.
- Zhao, K., Chai, X., Johnston, K., Clements, A., and Marmorstein, R. 2001. Crystal structure of the mouse p53 core DNA-binding domain at 2.7 Å resolution. *J Biol Chem* **276**(15): 12120-12127.
- Zhu, J., Rice, P.W., Gorsch, L., Abate, M., and Cole, C.N. 1992. Transformation of a continuous rat embryo fibroblast cell line requires three separate domains of simian virus 40 large T antigen. *J Virol* **66**(5): 2780-2791.
- Ziegler, C. 1998. Der Tumorsuppressor p53 als auxiliäres Onkogen in der Simian Virus 40-induzierten Zelltransformation. Dissertation, Fachbereich Biologie, Universität Hamburg.
- Zindy, F., Quelle, D.E., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. 1997. Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene* **15**(2): 203-211.

VIII ANHANG

1 Vektorkarte pMYcLT



2 Sicherheitstechnische Daten

2.1 Gefahrenstoffe

Gefahrenstoff	Gefahren -symbol	R-Sätze	S-Sätze
2-Mercaptoethanol	T, N	R 22-24-34-51/53	S 26-36/37/39-45-61
2-Propanol	F, Xi	R 11-36-67	S 7-16-24-26
3-Aminophthalhydrazid	Xi	R 36/37/38-20/21/22-40-50/53	S 24/25
4-Cumarsäure	Xi	R 36/37/38	S 24/25-22-26-36/37/39
Aceton	F, Xi	R 11-36-66-67	S 9-16-26
Acrylamid	T	R 45-46-20/21-25-36/38-43-48/23/24/25-62	S 53-45-24-36/37
Ammoniumperoxodisulfat	O, Xn	R 8-22-36/37/38-42/43	S 22-24-26-37
Bisacrylamid	Xn	R 22-20/21/22	S 24/25-36/37
Chloroform	Xn	R 22-38-40-48/20/22	S 36/37
Diethylpyrocarbonat	Xn	R 22-36/37/38	S 26-37/39

LITERATURVERZEICHNIS

Dimethylformamid	T	R 61-20/21-36	S 53-45
Dithiothreitol	Xn	R 22-36/38	S 24/25
Essigsäure 100%	C	R 10-35	S 23.2-26-45
Ethanol	F	R 11	S 7-16
Ethidiumbromid	T+	R 22-26-36/37/38-68	S 26-28.2-36/37-45
Ethylendiamin-tetraessigsäure	Xi	R 22-36/37/38	S 26-36
Isoamylalkohol	Xn	R 10-20	S 24/25
Methanol	F, T	R 11-23/24/25-39/23/24/25	S 7-16-36/37-45
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin	F, C	R 11-20/22-34	S 16-26-36/37/39-45
Natriumazid	T+, N	R 28-32-50/53	S 28.1-45-60-61
Natriumdodecylsulfat	Xn	R 21/22-36/37/38	S 26-36/37
Natriumhydroxid	C	R 35	S 26-37/39-45
Phenol	T	R 23/24/25-34-48/20/21/22-68	S 24/25-26-28.6-36/37/39-45
Salzsäure 37%	C	R 34-37	S 26-36/37/39-45
Wasserstoffperoxid 30%	C	R 34	S 3-26-36/37/39-45

2.2 Verzeichnis der Gefahrensymbole

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

2.3 Verzeichnis der R- und S-Sätze

2.3.1 Gefahrenhinweise (R-Sätze)

R 8	Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen
R 10	Entzündlich
R 11	Leichtentzündlich
R 20	Gesundheitsschädlich beim Einatmen
R 22	Gesundheitsschädlich beim Verschlucken
R 24	Giftig bei Berührung mit der Haut
R 25	Giftig beim Verschlucken
R 26	Sehr giftig beim Einatmen
R 28	Sehr giftig beim Verschlucken
R 32	Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase
R 34	Verursacht Verätzungen
R 35	Verursacht schwere Verätzungen
R 36	Reizt die Augen
R 37	Reizt die Atmungsorgane
R 38	Reizt die Haut
R 40	Verdacht auf krebserzeugende Wirkung
R 43	Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich
R 45	Kann Krebs erzeugen
R 46	Kann vererbare Schäden verursachen
R 61	Kann das Kind im Mutterleib schädigen
R 62	Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen
R 66	Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen
R 67	Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen
R 68	Irreversibler Schaden möglich

2.3.2 Kombination der R-Sätze

R 20/21	Gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut
R 20/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken
R 20/21/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
R 21/22	Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
R 23/24/25	Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
R 24/25	Giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
R 36/38	Reizt die Augen und die Haut
R 36/37/38	Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut
R 39/23/24/25	Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
R 42/43	Sensibilisierung durch Einatmen und Hautkontakt möglich
R48/20/21/22	Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
R 48/20/22	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken
R 48/23/24/25	Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
R 50/53	Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben
R 51/53	Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben

2.3.3 Sicherheitsratschläge (S-Sätze)

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

2.3.4 Kombination der S-Sätze

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

DANKSAGUNG

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

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert für die Möglichkeit, meine Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen, dieses interessante Thema bearbeiten zu können, für seine stetige Diskussionsbereitschaft, Unterstützung, Geduld sowie Betreuung und die Begutachtung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Ulrich Hahn danke ich für die Übernahme der Begutachtung meiner Dissertation am Department Chemie der Universität Hamburg.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Dr. Carol Stocking für die Bereitstellung des pMYsIG-Vektors und bei Arne Düsedau für die Durchführung der Zellsortierung.

Ein besonderer Dank geht an Daniel Speidel für die produktiven Diskussionen, methodischen Hilfestellungen, die moralische Unterstützung und Motivation während der Arbeit. Bei Genrich Tolstonog und Antony Braithwaite bedanke ich mich ebenfalls für die interessanten Diskussionen und Ideen bezüglich der Arbeit.

Herzlichst bedanke ich mich bei meiner Laborkollegin Marion Kurth (Kühl in spe) für die Einweisung in zahlreiche Methoden, die tägliche Unterstützung im Labor, die netten Gespräche und vor allem für ihre Freundschaft.

Von Herzen möchte ich mich bei Nina Heinlein bedanken, die mich durch ihre positive Art, ihre Motivation und moralische Unterstützung vorangetrieben hat. Danke auch für die produktiven Diskussionen, die „Cola“-Pausen in der Sonne, das Korrekturlesen im fernen Australien und allem voran die schöne Zeit in Hamburg und die treue Freundschaft.

Ein Dankeschön geht an alle Mitarbeiter der Abteilung Tumorstudiologie für das tolle Arbeitsklima, die Hilfsbereitschaft und jede Menge Spaß. Ganz herzlich möchte ich mich bei Heike Helmbold und Lars Tögel vor allem für ihre Freundschaft, das Korrekturlesen und das „Händchenhalten“ beim Drucken bedanken, bei Jasmin Oehlmann für die Unterstützung bei der Genotypisierung, bei Martina Hintz-Malchow für die Unterstützung bei Angelegenheiten außerhalb des Labors, bei Peter Pably, Timo Quante für den Spaß im Labor, Rudolph Reimer für die Einführung in die Welt der Mikroskopie und kompetente Hilfe bei Computerproblemen, bei Wolfgang Bohn für die nette Umsorgung und Gabi Warnecke, ohne die das Arbeiten im Labor unmöglich wäre.

Danke auch an meine Freunde, die mich bestärkt haben und für die nötige Ablenkung vom „Laboralltag“ gesorgt haben. Katharina Peschek danke ich von Herzen dafür, dass sie immer für mich da war und ist, an mich geglaubt hat und mich fortwährend unterstützt hat.

Abschließend möchte ich denen von Herzen danken, ohne die ich gar nicht so weit gekommen wäre, meiner Familie und Erwin. Danke für euren Glauben an mich, die moralische Unterstützung, unendlich viel Verständnis, und dass es euch gibt!