Regulation der differentiellen Transkription von P53 Zielgenen durch Modulation des proteasomalen P53 Abbaus in transformierten Fibroblasten aus *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1796)

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Maurice Reimann

Hamburg, April 2002

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. Wolfgang Deppert

Hamburg, den

Diese Arbeit wurde am Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg in der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Wolfgang Deppert, Abteilung Tumorvirologie, durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5 - 18
2. Problemstellung	19 - 20
3. Material und Methoden	21 - 42
4. Ergebnisse	43 - 90
5. Diskussion	91 - 110
6. Zusammenfassung	111 - 112
7. Literatur	113 – 135
8. Danksagung	136
9. Eidesstattliche Versicherung	136
10. Lebenslauf	137

1. Einleitung

Die am besten charakterisierte und biologisch wichtigste Funktion des Tumorsuppressors P53 ist die eines sequenz-spezifischen DNA Bindungsproteins, das nach genotoxischem Stress (z.B. UV- und Gammabestrahlung) die Transkription einer großen Anzahl von Genen induziert oder reprimiert (Kastan *et al*., 1991, Zhan *et al*., 1993, Maltzman *et al*., 1984, Lu *et al*., 1993, Fritsche *et al*., 1993). P53 fungiert hierbei als integrierendes Zielprotein einer Reihe von wichtigen Signaltransduktionskaskaden. Diese Aktivierung von P53 führt, in Abhängigkeit von teils noch unverstandenen Parametern zu einem transienten Wachstumsarrest und der DNA-Reparatur oder zum programmierten Zelltod (Apoptose).
Die Inaktivierung von wtp53, welche während der Tumorgenese vieler humaner Krebsformen stattfindet, hat zur Folge, dass auftretende DNA Schäden im Genom nicht mehr ausreichend repariert, sondern als Mutationen an die nächste Zellgeneration weitergegeben werden. Dadurch wird die Grundlage für eine deregulierte Expression anderer wichtiger Zellproteine gelegt (Ryan *et al*., 2001). Die Entkopplung der Funktionen einzelner Zellen aus dem „altruistischen“ Verbund mit anderen Zellen des Organismus kann schließlich zur Entwicklung von Tumoren führen. Die Induktion der Apoptose nach DNA Schädigung stellt wahrscheinlich den wichtigsten Aspekt der tumorsuppressiven Eigenschaften von wtp53 dar. Dies wird aus der Beobachtung abgeleitet, dass eine große Anzahl von P53 Mutanten, die aus Tumoren isoliert wurden, immer noch in der Lage sind, das *p21* Gen und damit einen Wachstumsarrest zu induzieren, aber die Fähigkeit verloren haben, Apoptose auszulösen (Ryan *et al.,* 1998).
Die Bedeutung der DNA Bindungsaktivität von P53 bei der Ausführung dieser Funktionen wird durch die Tatsache unterstrichen, dass in Tumoren die meisten Mutationen innerhalb des *p53* Gens in der für die DNA Bindungsdomäne (AA 110-286) kodierenden Region liegen. Allerdings werden einige Funktionen von wtp53 auch ohne diese DNA Bindungsaktivität ausgeführt (Kern *et al*., 1991, Bargonetti *et al*., 1993, Wang *et al*., 1993, Prives *et al*., 1994).

Nach genotoxischem Stress akkumuliert wtp53 im Zellkern und wird post-translational modifiziert („aktiviert“), um dann als Transkriptionsfaktor zu fungieren.

Dies geschieht durch Bindung an die P53 Konsensussequenz (El-Deiry *et al.,* 1992), die in der Promotorregion (oder Intron) des jeweiligen Zielgens lokalisiert ist.
Viele der isolierten P53 Zielgene besitzen Schlüsselfunktionen in der Regulation des Zellzyklus, der DNA Reparatur, der Angiogenese oder der Apoptose (Tabelle 1).

Tabelle 1:
Auswahl einiger P53 Zielgene und ihre Funktion.

Funktion	Genprodukt	Referenz
Wachstumsarrest		
	P21-waf1/cip1	(El-Deiry *et al*. 1993)
	B99	(Utrera *et al*. 1998)
	Cyclin G	(Okamoto *et al*. 1994)
	14-3-3-sigma	(Hermeking *et al*. 1997)
	GADD45	(Kastan *et al*. 1992)
Apoptose		
	Pig3	(Venot *et al*. 1998)
	Bax	(Miyashita *et al*. 1995)
	NOXA	(Oda *et al*. 2000)
	PUMA	(Yu *et al*. 2001)
	Igf-bp3	(Buckbinder *et al*. 1995)
	P53AIP	(Oda *et al*., 2000)
	Fas/Apo 1	(Munsch *et al*. 2000)
	PIDD	(Lin *et al*. 2000)
	Killer/DR5	(Sheikh *et al.* 1998)
	PERP	(Attardi *et al.* 2000)
P53 Abbau		
	MDM2	(Barak, *et al*. 1993)
DNA Reparatur		
	MSH-2	(Scherer *et al.* 1996)
	GADD45	(Kastan *et al*. 1992)
Andere Funktionen		
	EGF-R	(Sheikh *et al.* 1997)
	PA26	(Velasco-Miguel *et al*. 1999)
	c-Ha-Ras	(Deguin-Chambon *et al*. 2000)
	MCK	(Zambetti *et al*. 1992)

Die Tatsache, dass P53 eine große Anzahl von Genen induzieren kann, die Funktionen in sehr unterschiedlichen, konträr erscheinenden biologischen Prozessen ausüben (z.B. Wachstumsarrest und Proliferation, DNA Reparatur und Apoptose), erfordert eine selektive und temporär genau koordinierte Regulation der P53 Aktivität innerhalb der geschädigten Zelle.
P53 aktiviert endogene Zielgene oftmals in Abhängigkeit vom zellulären Hintergrund (Knippschild *et al*., 1995). So transaktiviert (exogen eingeführtes) wtp53 Protein in Saos-2 Zellen die Promotoren von *p21* und *bax*, wohingegen in MDA-MB-453 Zellen lediglich *p21*, nicht aber *bax* induziert wird (Thornborrow *et al.,* 1999). Eine wtp53-abhängige Hochregulation von *bax* findet nur in humanen nicht jedoch in murinen Zellen statt, obwohl die Promotoren beider Spezies drei konservierte P53 Bindungsstellen besitzen (Schmidt *et al*., 1999).

Eine wichtige und weitgehend ungeklärte Frage ist, wie es dem wtp53 Protein gelingt, die Expression selektiv, temporär abgestimmt und in Abhängigkeit vom jeweiligen DNA Schaden, so zu modulieren, dass biologische Konfliktsituationen in der Zelle vermieden werden.

1.1. Modulation der P53 Transaktivierungsaktivität auf DNA Ebene

Die Konsensussequenz der P53 Bindungsstelle besteht aus zwei Kopien der Sequenz 5´-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3´, die durch 0 bis 13 bp voneinander getrennt sind (El-Deiry *et al*., 1992). In Gelretardationsassays (EMSA) ist die Bindung des wtp53 Proteins an diese Konsensussequenz sehr gering („latentes“ P53) und muss erst durch Modifikation des P53 C-Terminus, z.B. durch die Bindung des monoklonalen mAb 421 Antikörpers aktiviert werden („aktiviertes“ P53) (Hupp *et al*. , 1995). Die vollständige Deletion des basischen P53 C-Terminus (AS 363-393) führt *in vitro* zu einem Protein mit konstitutiver sequenz-spezifischer DNA Bindungsaktivität (Hupp *et al.,* 1992). *In vivo* kann dieser Effekt durch Mikroinjektion des mAb421 Antikörpers in intakte Zellen ebenfalls ausgelöst werden (Hupp *et al*., 1995).
Aufgrund dieser Daten wurde postuliert, dass der basische P53 C-Terminus (AS 363 – 393) eine negative allosterische Wirkung auf die sequenz-spezifische DNA

Bindungsdomäne des wtp53 Proteins ausübt (Hupp *et al.,* 1992). Für eine effiziente sequenz-spezifische Bindung *in vivo* muss dieser durch kovalente (z.B. Phosphorylierung, Azetylierung, Sumoylierung) oder nicht-kovalente Modifikationen (Protein/Protein Interaktionen) neutralisiert werden (Hupp *et al*., 1992 und 1994, Wang *et al*., 1995, Waterman *et al*., 1995, Arrowsmith *et al*., 1996).
Zwischen den AS 298-325 des wtp53 Proteins befindet sich eine flexible Proteinregion, die die DNA Bindungsdomäne mit dem C-Terminus verbindet. Mutationen innerhalb dieser Region beeinflussen die Interaktion beider Domänen z.B. während der DNA Bindung. Die P53 Mutante R306P oder Mutanten, bei der die gesamte flexible Region deletiert wurde, besitzen im Vergleich zum wtp53 unterschiedliche Transaktivierungsaktivitäten für die *p21* und *bax* Promotoren (Kong *et al.,* 2001).
Neuere Daten lassen die postulierte Funktion des basischen P53 C-Terminus in einem anderen Licht erscheinen. So zeigen NMR Strukturanalysen, dass sich „latentes“ wtp53 Protein und das konstitutiv bindende, „aktivierte“ P53 (AS 1-360) Protein nicht in ihrer Proteinkonformation unterscheiden (Ayed *et al*., 2001). Espinosa *et al.* (2001) zeigten, dass “latentes” wtp53 Protein eine höhere Affinität für seine Bindungsstelle auf dem *p21* Promotor hatte, wenn diese als Chromatin vorlag. Für diese effiziente Bindung benötigte das wtp53 Protein den basischen C-Terminus.
P53 kontaktiert die DNA Bindungsstelle als Tetramer. Dafür benötigt es die C-terminale Oligomerisierungsdomäne (AS 320 - 363). Faktoren, die in den Prozess der Oligomerisierung eingreifen, besitzen daher ebenfalls einen Einfluss auf die Transaktivierungsaktivtät des wtp53 Proteins. So zeigten Nie *et al.* (2000), dass die Kinase c-Abl direkt an den basischen Teil des P53 C-Terminus binden konnte, wodurch die Bildung von Tetrameren gefördert wurde.

Die Beschaffenheit der P53 Konsensussequenz lässt theoretisch eine Vielzahl von potentiellen P53 Bindungsstellen zu. In der Tat weisen die funktionell relevanten P53 Bindungsstellen nativer Promotoren, eine große Sequenzheterogenität auf (Kim *et al.,* 1997). Dies spiegelt sich in unterschiedlichen Affinitäten des aktivierten wtp53 Proteins für verschiedene Bindungsstellen wider (Halazonetis *et al*., 1993, Chin *et al*., 1997). So besitzt der humane *p21* Promotor zwei P53 Bindungsstellen (5´- bzw. 3´), die beide für die wtp53-abhängige Transaktivierung *in vivo* erforderlich sind. *In vitro* ist jedoch die P53 Bindung nur für die 5´-Bindungsstelle mit dem mAb 421

aktivierbar, wohingegen die Bindung an die 3´-Bindungsstelle von mAb421 blockiert wird. Die Reversion eines einzigen Nukleotids innerhalb der 3´-Bindungsstelle verleiht diesem Element die mAb421-Aktivierbarkeit. Die funktionelle P53 Bindungsstelle des *cdc25C* Promotors besitzt vergleichbare Eigenschaften wie die 3´- Bindungsstelle des *p21* Promotors (Resnick-Silverman *et al.,* 1998).
Eine Reihe von funktionellen P53 Bindungsstellen nativer Promotoren zeigen multiple Abweichungen von der Konsensussequenz (z.B. *c-Ha-Ras, pig3, Fas/Apo1/CD*). Diese haben jedoch keine signifikanten Auswirkungen auf die P53-abhängige Transaktivierung der jeweiligen Gene (Gargonetti *et al*., 1991, Foord *et al*., 1993, DiComo *et al*., 1998). Die P53 Bindungsstellen vieler zellulärer Promotoren bestehen nicht nur aus zwei (*p21, gadd45, cyclin G, egf*), sondern aus mehreren Dekameren (*mck, mdm2, bax, igf-bp3*). Letztere ermöglichen aufgrund der Kombinationsmöglichkeiten synergistische Effekte während der Transaktivierung des jeweiligen Promotors (Stenger *et al*., 1994, Jackson *et al.,* 1998).

Für die differentielle Transaktivierung von P53 Zielgenen sind oftmals Bindungsstellen anderer wichtiger Transkriptionsfaktoren erforderlich. So benötigt P53 für die Transaktivierung des humanen *bax* Promoters neben der P53 Bindungsstelle eine benachbarte Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1. Für die eigentliche DNA Bindung von wtp53 ist letztere jedoch nicht erforderlich (Thornborrow *et al*., 2001).
Die Tatsache, dass für eine regulierte Transaktivierung oftmals multiple Faktoren notwendig sind, erklärt auch, warum nicht jede potentielle P53 Bindungsstelle, die in einem nativen Promotor gefunden wurde, tatsächlich funktionell ist. So enthält das erste Intron des Fas/Apo/CD95 Gens vier potentielle P53 Bindungsstellen, von denen jedoch nur eine einzige für die P53-abhängige Transaktivierung verantwortlich ist (Munsch *et al.,* 2000).
Ein anderer Faktor, der bei der Selektion funktionell relevanter P53 Bindungsstellen eine Rolle spielt, ist die Anordnung der Dekamere zueinander. So führt eine Insertion zwischen die beiden Halbseiten der P53 Konsensussequenz nur dann zu einer reduzierten DNA Bindung und Transkription, wenn beide Dekamere auf entgegengesetzten Seiten der DNA Helix lokalisiert sind, nicht aber wenn sie sich auf der selben Seite befinden (Anderson *et al*., 1997).

Ein wichtiges Charakteristikum der P53 Bindungsstelle ist deren interne Dyadensymmetrie. Diese palindrome Struktur versetzt sie in die Lage, auch nicht-B DNA Sekundärstrukturen auszubilden, die je nach Sequenz mehr oder weniger stabil sind (Kim *et al.,* 1997). Göhler *et al.* konnten *in vitro* zeigen, dass „latentes“ wtp53 auch ohne vorherige mAb421 Aktivierung in der Lage war, sequenz-spezifisch an die P53 Bindungsstelle zu binden, wenn diese in bestimmten nicht-B DNA Konformationen vorlag. Die Bindung an diese Sekundärstrukturen benötigte neben der DNA-Bindungsdomäne auch den P53 C-Terminus, da die Bindung des mAb421 Antikörper sowie die Deletion des basischen P53 C-Terminus die Aufhebung der spezifischen Bindung zur Folge hatte. Kim *et al.* (1997) schlugen vor, dass die große Sequenzheterogenität nativer P53 Bindungsstellen darin begründet liegt, dass während der Evolution weniger die Sequenz als vielmehr bestimmte strukturelle Eigenschaften konserviert wurden. In weiterführenden Experimenten zeigten Kim *et al.* (1998), dass die rechtsgängig verdrillte, superhelikale Struktur der DNA (negatives Supercoiling) selektiv die P53 Bindung an den *mdm2* Promotor inhibierte, wohingegen diese keinen Einfluss auf die Bindung an den *p21* Promotor und dessen Transaktivierung zeigte.

Ein funktioneller Zusammenhang zwischen P53 und Proteinen, die die DNA Topologie *in vivo* regulieren, konnte auf verschiedenen Ebenen nachgewiesen werden. So zeigten Arriola *et al.* (1999), dass die Behandlung von Zellen mit dem Topoisomerase II-Inhibitor Etoposid selektiv die Transaktivierung des *mdm2*, nicht jedoch des *p21* Gens inhibierte. Die Expression der Topoisomerase II, welche superhelikalen Stress im Chromatin relaxiert, wird u.a. von dem wtp53 Protein reguliert (Sandri *et al*., 1996), die Aktivität der Topoisomerase I durch direkte Bindung an P53 stimuliert (Gobert *et al*., 1996 und 1999). Superhelikaler Stress tritt *in vivo* beispielsweise während der Transkription oder Replikation auf (Delic *et al.,* 1991, Hanke *et al*., 1995, Iyer *et al*., 1995, Spiro *et al*., 1995, Michelotti *et al*., 1996).

Die Bedeutung des Chromatins bei der Regulation der P53-abhängigen Genexpression wird durch die Beobachtung bestärkt, dass sich Expressionsdaten, die mit Hilfe von episomalen Promotor-Reporterplasmiden in transienten Transfektionen erhalten wurden in der Regel nicht auf die Expression des entsprechenden chromosomalen Gens extrapolieren lassen.

Für die Aufrechterhaltung und Modulation der *in vivo* Chromatinstruktur spielen die hochkonservierten Proteine der HM Gruppe (High Mobility Group) eine wichtige

Rolle. *In vitro* wird die sequenz-spezifische DNA Bindung des wtp53 Proteins durch direkte Bindung an HMG Proteine stimuliert. Stros *et al.* (2001) zeigten, dass HMGB1 und HMGB2, abhängig vom zellulären Hintergrund, die wtp53-abhängige Transaktivierung differentiell modulieren konnten. So wurde die P53-abhängige Induktion des *bax* Gens in Saos-2 Zellen blockiert, wohingegen der Einfluss auf die Transaktivierung der p*21* und *mdm2* Gene marginal war. Im Vergleich dazu hatte die Ko-Expression von HMG 1/2 und wtp53 in H1299 Zellen eine stimulierende Wirkung auf die wtp53-abhängige Transaktvierung derselben Promotoren.

Während der Umstrukturierung des Chromatins werden Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren exponiert, die zuvor aufgrund der nukleosomalen Verpackung für diese unzugänglich waren und *vice versa*. Dies schließt auch die Formation von DNA Sekundärstrukturen mit ein, die erst unter bestimmten Bedingungen gebildet werden können. So führt die Überexpression von wtp53 in TR9-7 Zellen zu einer transkriptionellen Hochregulation der *mdm2* und *p21* Gene, nicht jedoch des *gadd45* Gens. Letzteres wird erst nach Behandlung der Zellen mit Camptothecin induziert. Xiao *et al.* (2000) zeigten, dass diese Behandlung eine Umstrukturierung des Chromatins innerhalb des *gadd45* Promotors induzierte, welche für die Aktivierung von *gadd45* verantwortlich war.

Desweiteren zeigten Espinosa *et al.* (2000), dass “latentes” wtp53 Protein mit einer hohen Affinität an seine Bindungsstelle innerhalb des *p21* Promotors im Chromatin bindet. Die stimulierende Wirkung der Histonazetyltransferase P300 auf die wtp53 Aktivität kam hierbei über die selektive Azetylierung von P53-gebundenen Nukleosomen zustande, was zu einer Umstrukturierung des Chromatins bis zur TATA Box führte, woraufhin die Transaktivierung *in vitro* verstärkt wurde. Die Azetylierung des P53 C-Terminus war für diesen Effekt nicht notwendig.

1.2. Modulation der wtp53 Transaktivierungsaktivität auf Proteinebene: Modifikationen, Protein/Protein Interaktionen

In normalen Zellen existieren nur sehr geringe Mengen des wtp53 Proteins, da es unmittelbar nach der Synthese wieder abgebaut wird (Review Kubbutat *et al.,* 1998).

Mdm2 ist eine zelluläre E3 Ligase, welche von wtp53 transkriptionell induziert wird, und den proteasomalen Abbau des P53 Proteins im Zytoplasma durch die

Ubiquitinierung von Lysin-Aminoresten am P53 C-Terminus einleitet (Abb. 1). Dies geschieht über die direkte Bindung von Mdm2 an den P53 N-Terminus (AA 17-27).

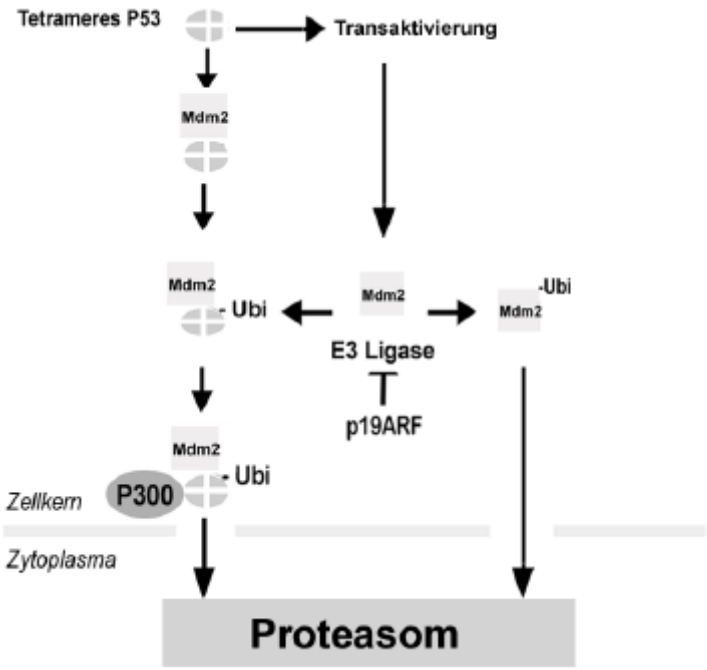


Abb. 1

Der negative Mdm2/P53 Rückkopplungsmechanismus.

Tetrameres wtp53 bindet an den Promotor des *mdm2* Gens und induziert dessen Expression. Mdm2 inaktiviert P53 durch die Bindung an P53 Tetramere und katalysiert deren Ubiquitinierung. Die Expression von P19ARF, die u.a. durch onkogenes Ras induziert wird, kann die E3 Ligaseaktivität von Mdm2 blockieren. Damit das Ubiquitin-konjugierte P53 von den zytoplasmatischen Proteasomen abgebaut werden kann, muss der Mdm2/Ubiqutin-P53 Komplex zunächst an die P300 Azetyltransferase binden. Nach DNA Schädigung wird der P53/Mdm2 Rückkopplungsmechanismus vorübergehend unterbrochen (z.B. durch Blockierung der P53/Mdm2 Bindung). Dies resultiert in der Stabilisierung von „aktiviertem“ P53, welches an die Promotoren der P53 Zielgene binden und die Transkription induzieren kann. Nach erfolgreicher Reparatur der DNA Schäden wird das „aktivierte“ P53 durch die Wiederherstellung des P53/Mdm2 Rückkopplungsmechanismus eliminiert.

Diese Bindungsstelle überlappt mit der Domäne auf dem P53 Protein, die während der Transaktivierung endogener Zielgene mit Komponenten des TFIID Komplexes (TATA-Boxbindungsprotein und TBP-assoziierte Faktoren) interagieren (Lu *et al*., 1995, Thut *et al*., 1995, Xiao *et al*., 1994, Buschmann *et al*., 2001). Mdm2 kann dadurch die Transaktivierungsaktivität von P53 auch durch Bindung an dessen N-Terminus blockieren.

Die Transaktivierungsaktivität und die Akkumulation des wtp53 Protein sind aufgrund dieser beiden, sich überlappenden Domänen funktionell miteinander verbunden.

Wtp53 kann seine Funktion als Transkriptionsfaktor nur innerhalb des Zeitfensters zwischen der „Aktivierung“ und dem proteolytischen Abbau durch Proteasomen ausführen (Kubbutat *et al*., 1997, Pariat *et al*., 1997, Zhang *et al*., 1997, Fuchs *et al*., 1998). Dies bedeutet, dass die Dauer einer wtp53-vermittelten Transaktivierung hauptsächlich durch Faktoren bestimmt wird, welche in die Mdm2/P53 Interaktion eingreifen können. Dies kann durch Phosphorylierungen beider Proteine durch zelluläre Kinasen, sowie durch Faktoren, die die E3 Ligaseaktivität des Mdm2 Proteins inhibieren, wie z.B. dem zellulären P19ARF, stattfinden (Sherr *et al*., 1998).

DNA Schäden induzieren eine Reihe von zellulären Proteinkinasen, deren Aktivitäten auf wtp53 als integrierendes Zielprotein zulaufen und dieses dadurch „aktivieren“. Dazu gehören die zur Familie der PIK-Familie gehörenden Kinasen DNA-PK, ATM (Ataxia telangiectasia) und ATR (Ataxia telangiectasia-related) sowie die Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) und Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) (Banin *et al.,* 1998, Canman *et al*., 1998, Kastan *et al*., 1992, Shieh *et al*., 1997, Siliciano *et al*., 1997, Tibbetts *et al*., 1999, Woo *et al*., 1998).
ATM und ATR, die nach Entstehung von Doppelstrang-DNA Brüchen aktiviert werden (Kastan *et al.,* 1992), phosphorylieren *in vivo* den P53 N-Terminus (Serin 15) (Khanna *et al*., 1998, Tibbets *et al*., 1999), welches zur reduzierten Bindung von Mdm2 an P53 und einer erhöhten Transaktivierungsaktivität führt (Shieh *et al*., 1997). Ähnliches wurde für die Tyrosinkinase c-Abl und p38 MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) beschrieben (Sionov *et al*., 1999, Sanchez-Prieto *et al.,* 2000). Andere P53 aktivierende Stresssituationen, wie Hitzeschock oder die Behandlung mit Aktinomyzin-D, induzieren eine Akkumulation des wtp53 Proteins allerdings ohne Phosphorylierung von Serin 15 (de Stanchina *et al*., 1998, Nakagawa *et al*., 1999).

Phosphorylierungen des P53 C-Terminus können ebenfalls einen Einfluss auf den negativen P53/Mdm2 Rückkopplungsmechanismus ausüben. So hat die Phosphorylierung der PKC Stelle am P53 C-Terminus die verstärkte Ubiquitinierung und Abbau des Proteins in normalen, ungestressten Zellen zur Folge (Chernov *et al.,* 2001).
Einige Literaturdaten zeigen jedoch, dass die P53 Stabilisierung und dessen Aktivierung *in vivo* durch unterschiedliche Modifikationen reguliert werden (Chernov *et al.,* 1998). So führte die Behandlung von Zellen mit Natriumsalizylat, einem

Inhibitor von Proteinkinasen, dazu, dass die wtp53 Aktivität blockiert wurde ohne dass dadurch die Stabilisierung des Tumorsuppressors betroffen war (Chernov *et al.*, 1997).

In den meisten Zellsystemen korreliert die durch genotoxischen Stress induzierte Akkumulation des wtp53 Proteins mit der Transaktivierung endogener Zielgene. Dies ist allerdings nicht immer der Fall. So führt die UV Bestrahlung von in verschiedenen Zellzyklusphasen synchronisierten Mausfibroblasten lediglich in G1/S und S-Phase Zellen zu einer Akkumulation des wtp53 Proteins. Demgegenüber steht eine UV-induzierte, wtp53-abhängige Transaktivierung der *p21* und *gadd45* Gene in G0 und G1 Zellen, in denen keine signifikanten Mengen von wtp53 Protein nachweisbar sind (Haapajarvi *et al*., 1997).
Die Überexpression von wtp53 in TR9-7 Zellen induziert die transkriptionelle Hochregulation des endogenen *mdm2* und *p21*, nicht jedoch des *gadd45* Gens. Letzteres wurde erst nach Behandlung der Zellen mit Camptothecin ohne einhergehende Stabilisierung des ektopischen wtp53 induziert (Xiao *et al*., 2000).
Zusammenfassend sprechen diese Daten dafür, dass die Akkumulation des wtp53 Proteins nicht der (alleinige) Grund für die Induktion endogener P53 Zielgene ist, sondern dass zusätzlich transiente qualitative Modifikationen des wtp53 Proteins (z.B. Protein/Protein Interaktionen, post-translationale Modifikationen) oder der Chromatinstruktur der Promotoren, erforderlich sind. Letztere sind aufgrund der vielfältigen Kombinationsmöglichkeiten besonders wichtig für die differentielle Transaktivierung (Jaks *et al.,* 2001, Xiao *et al*., 2000).
Die zelluläre wtp53 Konzentration kann erheblichen Einfluss auf die wtp53 Aktivität ausüben (Kristjuhan *et al.,* 1998). So wird die Transaktivierungsaktivität bei höheren Konzentrationen in der Zelle inhibiert. Für diesen Effekt ist ein intakter wtp53 C-Terminus erforderlich. Ähnliche Ergebnisse wurden mit UV-bestrahlten NIH3T3 Zellen erhalten (Lu *et al*., 1996). Konzentrationseffekte sind in der Regel auf das Austitrieren bestimmter limitierender zellulärer Faktoren bei hohen wtp53 Proteinlevel zurückzuführen.

1.2.1. P53 Modifikationen

Phosphorylierungen des wtp53 N-Terminus regulieren dessen Bindung an Mdm2 und Komponenten der Transkriptionsmaschinerie sowie die DNA Bindungsaffinität (Chain *et al*., 2000). *In vitro* wird der P53 N-Terminus von diversen Proteinkinasen phosphoryliert; dazu gehören die Kaseinkinase I (CK1) (Milne *et al.,* 1992), die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) (Lees-Miller *et al*., 1992, Shieh *et al*., 1997), die c-Jun Kinase (JNK)(Milne *et al*., 1995),die CDK-aktivierende Kinase (CAK) (Ko *et al.,* 1997, Ashcroft *et al*., 1999, Fiscella *et al*., 1993, Fuchs *et al*., 1995, Mayr *et al*., 1995) sowie die zuvor beschriebenen ATM und ATR Kinasen.

Dass die durch genotoxischen Stress verursachte P53 Phosphorylierung eine Rolle bei der Transaktivierung endogener Zielgene spielt, zeigt die Tatsache, dass zelluläres wtp53 Protein, welches durch Proteasomeninhibitoren stabilisiert wird, nicht die selbe Transaktivierungsaktivität besitzt wie wtp53, das nach Gammabestrahlung akkumuliert (Siliciano *et al*., 1997). Cain *et al.* (2000) zeigten außerdem, dass die *in vitro* Phosphorylierung des N-Terminus auch die Affinität des Proteins für seine Bindungsstelle über veränderte Dissoziationsraten des P53/DNA Komplexes modulieren konnte.
Eine Rolle der N-terminalen Phosphorylierung *in vivo* wurde u.a. bei der Transaktivierung von PAI-1 (p53 Ser-15) (Parra *et al*., 2001) oder von p53AIP (p53-regulated Apoptosis-Inducing Protein 1) (p53 Ser-46) (Oda *et al*., 2000) postuliert.
Den Ergebnissen von Lohrum *et al*. (1996) zufolge, spielt der Phosphorylierungsstatus des wtp53 Proteins auch eine Rolle bei der differentiellen Transaktivierung. Die Behandlung von Rattenfibroblasten mit Okadaikazid, die zuvor transient mit Promotor-Reporterplasmiden transfiziert wurden, zeigte eine erhöhte Transaktivierung der *mdm2, p21, bax* und *pig3* Gene, wohingegen die des *cyclin G* Gens reduziert wurde. In den selben Versuchen wurde die Transaktivierung der *mdm2, p21* und *cyclin G* Gene durch Mutationen verschiedener N-terminaler Phosphorylierungsstellen reduziert, wohingegen diese Mutanten eine erhöhte Aktivierung der *bax* und *pig3* Gene bewirkten.

C-terminale Modifikationen (Phosphorylierung, Azetylierung, Sumoylierung) sind ebenfalls in der Lage, die Transaktivierungsaktivität von wtp53 zu modulieren. Dies

geschieht über die Veränderung der regulatorischen Funktion des C-Terminus auf die DNA Bindungsdomäne, den Oligomerisierungsstatus, den nukleo-zytoplasmatischen Transport sowie die Ubiquitinierung von P53 (Review Appella *et al*., 2001). *In vitro* wird der C-Terminus von Cdc2 und Cdk2, den Proteinkinasen C und A, sowie der Caseinkinase II (Milczarek *et al*., 1997) phosphoryliert.
Modifikationen des P53 C-Terminus spielen auch eine Rolle bei der differentiellen Transaktivierung. Der murine P53 C-Terminus (AS 386) wird von der Proteinkinase CK2 phosphoryliert. Die Beta-Untereinheit von CK2 inhibiert die DNA Bindungsaktivität von wtp53 *in vitro*. Die transiente Ko-Expression der Beta-Untereinheit und wtp53 zeigte, dass die wtp53-abhängige Transaktivierung der *mdm2, p21* und *cyclin G* Gene inhibiert wurde. Der Einfluss von CK2 auf die wtp53-abhängige Transaktiverung des *bax* Gens war jedoch zelltypspezifisch. So hatte die Expression der CK2-Beta-Untereinheit keinen Einfluss in COS1 Zellen, wohingegen sie in MCO1 oder SaosS138V21 Zellen reduziert wurde (Schuster *et al.,* 1999).
Diesen Ergebnisse stehen die von Ashcroft *et al.* (1999) veröffentlichten Daten gegenüber, die zeigten, dass die Mutation putativer P53 Phosphorylierungsstellen keinen signifikanten Einfluss auf die Transaktivierungsaktivität der jeweiligen P53 Mutante hatte. Dies war vermutlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass hier lediglich einzelne Phosphorylierungsstellen mutiert wurden, wodurch der Einfluss synergistischer Effekte multipler Phosphorylierungen, die *in vivo* wahrscheinlich existieren, nivelliert wurde.

1.2.2. Protein/Protein Interaktionen

Eine Reihe zellulärer Proteine wurden beschrieben, die die sequenz-spezifische DNA Bindung bzw. Transaktivierungsaktivität von wtp53 durch direkte Protein/Protein Interaktionen aktivieren können. Dazu gehören das AMF1 Protein (G-protein pathway suppressor 2) (Peng *et al*., 2001), 53BP1 und 53BP2 (Iwabuchi *et al*., 1998), YB-1 (Y-Box Bindungsprotein)(Okamoto *et al*., 2000), Zac1 (Huang *et al*., 2001) und Ref-1, eine A/P Endonuklease, die wtp53 in abhängig vom Redoxzustand aktivieren kann (Gaiddon *et al*., 1999, Jayaraman *et al*., 1997).
Die transkriptionellen Koaktivatoren P300 und CBP (CREB Binding Protein) sind wichtige Regulatoren des Zellzyklus. Sie stellen Zielproteine einer Reihe von viralen

Onkoproteinen dar, werden Zellzyklus-spezifisch modifiziert und binden an CyklinE-Cdk2 Komplexe oder den Transkriptionsfaktor E2F (Gu *et al.,* 1997).
P300/CBP bindet direkt an das wtp53 Protein und katalysiert u.a. dessen Azetylierung nach DNA-Schadenssetzung. Dadurch wird die Transaktivierungsaktivität von wtp53 erhöht (Zhu *et al*., 2001). Die P300/P53 Bindung wird durch Phophorylierung des P53 N-Terminus (Serin 15) stimuliert (Dumaz *et al*., 1999). Virale Onkoproteine wie das Tax Protein des humanen T-Zellenleukämievirus Typ1 oder das adenovirale E1A, sowie zelluläre Proteine wie NF-kappaB, P33ING2 und BRCA1 modulieren die wtp53 Aktivität über eine Bindung an CBP/P300 (Suzuki *et al*., 1999, Chakravarti *et al*., 1999, Chai *et al*., 1999).

Die Bindung von Proteinen an P53 können auch inhibierend auf dessen DNA Bindungsaktivität wirken. Dazu gehört die Bindung an zelluläre Proteine wie PID, einer Komponente des Histondeazetylase-1 (HDAC1) Komplexes (Luo *et al.,* 2000), PIASy (Protein inhibitor of activated STAT) (Nelson *et al.,* 2001) und ELL, einem Elongationsfaktor der RNA Polymerase II (Shinobu *et al*., 1999), sowie virale Proteine, wie T-Antigen (SV40) oder E1B 55kd (Adenovirus). Die Bindung des wtp53 C-Terminus an P65, einer Untereinheit des aktiven NF-kappa-B Transkriptionsfaktorkomplexes, ist ein Beispiel dafür, wie das wtp53 Protein die Aktivität eines anderen wichtigen Transkriptionsfaktoren in seiner Aktivität beeinflussen kann und *vice versa*. Die P53/P65 Interaktion inhibiert die Transaktivierungsaktivität beider Proteine (Ikeda *et al.,* 2000). Zudem konkurrieren wtp53 und P65 um den limitierten zellulären Pool an P300/CBP. In der Zelle kann dieser antagonistische Effekt über die relativen Syntheseraten beider Transkriptionsfaktoren moduliert werden (Webster *et al*., 1999, Ravi *et al*., 1998).
Eine kovalente Proteinmodifikation des wtp53 Proteins stellt die Konjugation des C-Terminus mit SUMO-1, einem Ubiquitin-ähnlichen Molekül, dar. Diese Modifikation führt nicht wie im Falle der Ubiquitin-Konjugation zum proteasomalen Abbau, sondern zu einem veränderten Bindungsverhalten mit anderen zellulären Proteinen und der reduzierten Transaktivierungsaktivität des wtp53 Proteins (Rodriguez *et al*. , 1999, Muller *et al*., 2000, Gostissa *et al*., 1999).

Obwohl die bislang beschriebenen Protein/Protein Interaktionen in der Regel nicht hinsichtlich der differentiellen DNA Bindung von P53 untersucht wurden, so sind

dennoch zelluläre Proteine beschrieben worden, die die Transaktivierungsaktivität selektiv modulieren können. So bindet das RB18A Protein, welches bislang nicht näher charakterisiert wurde, *in vivo* direkt an das wtp53 Protein. Das für RB18A kodierende Gen ist auf dem chromosomalen Locus 17q12-q21.1 lokalisiert, welches mit einer Reihe von humanen Tumoren assoziiert ist. Diese Bindung bewirkt die wtp53-abhängige Aktivierung des *bax* Gens, wohingegen die Induktion der *p21* und *igf-bp3* Gene blockiert wird (Frade *et al.,* 2000).

Das *p53* Gen liegt in der Zelle in zwei Kopien vor. Die Mutation eines der beiden Allele führt dazu, dass mutantes P53 und wtp53 in der selben Zelle koexprimiert werden. Je nach Ort der Mutation kann die Transaktvierungsaktivität des wtp53 Proteins durch Heterooligomerisierung mit mutantem P53 moduliert werden. In den meisten Fällen führt dies zu einer Inaktivierung der wtp53 Aktivität (Atz *et al.,* 2000).
Einige P53 Mutanten sind jedoch in der Lage, die wtp53 Aktivität differentiell zu beeinflussen. So zeigten Aurelio *et al.* (2000), dass einige P53 Mutanten, welche transient mit wtp53 Protein in CaLu 6 Lungenkarzinomzellen oder Saos-2 Zellen ko-exprimiert wurden, rezessiv im Bezug auf die Aktivierung des *p21* Promotors wirkten, jedoch einen dominant-negativen Effekt bei der Transaktivierung des *bax* Gens besaßen. Ein anderes Beispiel ist die DNA bindungsinaktive P53 Mutante R273H, die zweithäufigste Mutation von *p53*. Die Koexpression von wtp53 mit R273H in H1299 Zellen führt dazu, dass die wtp53-induzierte Aktivierung des *mdm2* Promotors verstärkt (positiv-dominanter Effekt), die des *p21* und *bax* Promotors jedoch blockiert wird (negativ-dominanter Effekt) (Zacharatos *et al*., 1999).

Zusammenfassend verdeutlichen diese Daten, dass eine temporär und selektiv koordinierte Regulation der mannigfaltigen Transaktivierungsaktivität des wtp53 Proteins *in vivo* nur durch transiente Modifikationen, die auf DNA- oder Proteinebene stattfinden können, gewährleistet werden kann.

2. Problemstellung

P53 ist ein sequenz-spezifisch bindender Transkriptionsfaktor, der nach Aktivierung durch genotoxischen Stress eine Vielzahl von Genen induzieren kann, die Funktionen in unterschiedlichen zellulären Prozessen besitzen.
Die durch das wtp53 Protein vermittelte Induktion eines Wachstumsarrestes oder des programmierten Zelltodes gelten als die wichtigsten Funktionen von P53 in seiner Eigenschaft als Tumorsuppressor.
Die Kenntnis der Parameter, die für die wtp53-vermittelte differentielle Transaktivierung endogener Zielgene verantwortlich sind, legt die Basis für die Entwicklung therapeutischer Strategien, mit dem Ziel, eine gewünschte biologische Antwort durch Modulation der wtp53 Aktivität auszulösen. Im Falle der Tumortherapie wäre dies z.B. die wtp53-induzierte Apoptose.

Für die Untersuchung dieser Modulatoren wurde ein Rattenfibroblasten Zellsystem herangezogen, welches ein transgenes temperatursensitives P53 (tsp53*val135* A>V) sowie onkogenes Ha-Ras (EJ-Ras) exprimiert (Michalovitz *et al*., 1990). Das tsp53*val135* Protein nimmt eine mutante Konformation bei der restriktiven Temperatur (39°C) und kann seine Funktion als Transkriptionsfaktor nicht ausführen. Die Expression von aktiviertem Ras bewirkt die Transformation der primären embryonalen Rattenfibroblasten (REF), was sich in einer veränderten Morphologie, der fehlenden Kontaktinhibition, der Koloniebildung in Weichagar sowie der Bildung von Tumoren in syngenen Tieren zeigt (Parada *et al*., 1984, Eliyahu *et al*., 1984, Jenkins *et al*., 1984, Rovinski *et al*., 1988). Bei 30°C, der permissiven Temperatur, nimmt das tsp53*val135* Protein eine wt-ähnliche Konformation an, was zur Akkumulation des tsp53 Proteins im Zellkern führt und die transkriptionelle Hochregulation (Transaktivierung) von P53 Zielgenen wie *p21* oder *mdm2* auslöst. Der dadurch eingeleitete P21-vermittelte Wachstumsarrest wirkt dem transformierten Phänotyp der Zelle entgegen.
Zwei Subklone dieser etablierten EJ-Ras transformierten tsp53-REF Zellen (Cl6 und P160) zeigen genspezifische Unterschiede bei der tsp53-abhängigen Transaktivierung. Während die Induktion des *p21* Gens in beiden Subklonen ähnlich ist, zeigt die Aktivierung des *mdm2* Gens signifikante Unterschiede.

Mit Hilfe des Cl6/P160 Zellsystems sollte es möglich sein, in einem annähernd isogenen Hintergrund die Parameter zu definieren, die für die differentielle tsp53-abhängige Induktion des *mdm2* Gens verantwortlich sind, jedoch keine Wirkung auf die Transaktivierung des *p21* Gens besitzen. Die Aufklärung dieser Faktoren war Ziel der vorliegenden Doktorarbeit. Zudem sollte untersucht werden, welche Auswirkungen diese Unterschiede auf die tsp53 induzierte biologische Antwort (z.B. des Zellzyklus) haben.

3. Material und Methoden

3.1. Aufreinigung von Antikörpern

Der pH des Hybridomaüberstandes, das den Antikörper enthielt, wurde durch Zugabe von 1/10 Vol. 1 M Tris (pH 8,0) auf einen basischen pH eingestellt und für 2 – 3 h bzw. über Nacht mit 500 µl Protein A bzw. G Sepharose (Pharmacia) bei 4°C inkubiert. Der Antikörper/PAS Komplex wurde anschließend in ein G50-Chromatografieröhrchen (BioRad) überführt und die Säule mit 5 ml 100 mM Tris (pH 8,0) und anschließend mit dem selben Volumen 10 mM Tris (pH 8,0) gewaschen. Die Elution des Antikörpers erfolgte durch fünfmaliges Waschen der Säule mit jeweils 500 µl einer 100 mM Glyzin-Lösung (pH 3,0), die jeweils in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen mit vorgelegten 50 µl 1 M Tris (pH 8,0) aufgefangen wurde. Die Fraktionen wurden für 2 h bei 4°C gegen 1 x PBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4, pH 7,4) dialysiert. Die Konzentration des Antikörpers wurde durch photometrische Messung der Absorbanz bei 280 nm ermittelt. Dabei entspricht 1 O.D. 280 = 0,8 µg/µl IgG.

Tabelle 2.
Liste der verwendeten Antikörper

Antikörper	Epitop	Isotyp	Referenz/Hersteller
mAb421	Maus 371-380	IgG2a	Harlow *et al*. 1981, Wade-Evans *et al*. 1985, Stephen *et al*. 1995
mAb240	Maus 213 – 217	IgG1	Yewdell *et al*. 1986, Gannon *et al.* 1990, Stephen et al. 1992
mAb122	Maus 371 – 380	IgG2b	
mAb246	Maus ?	IgG1	Yewdell *et al*. 1986, Gannon *et al.* 1990, Lane *et al*. 1996
mAb242	Maus 18 – 27	IgG1	Yewdell *et al.* 1986, Lane *et al*. 1996
mAb248	Maus 43 – 52	IgG2b	Wade-Evans *et al*. 1985, Yewdell *et al*. 1986, Lane *et al*. 1996
mAb2A10	Human 280 – 340		Chen *et al*. 1993
mAb4B2	Human 19 – 50		Chen *et al*. 1993
mAb-P21	Human 145 – 164	IgG1	Pharmingen
mAb-Ha-ras	Human 1 – 190	IgG1	BD Biosciences
mAb-P19ARF (R562)	Maus 54 – 75	Poly	AbCam

3.2. Herstellung der Gesamtzellextrakte

Adhärente Zellen (60 – 80% Konfluenz) wurden zweimal mit 1 x PBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4, pH 7,4) gewaschen und mit einem Gummischaber abgekratzt. Nach Zentrifugation der Zellen bei 450 x g, 4°C wurde das Pellet in 2 Vol. Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 120 mM NaCl, 1% NP-40, 10% v/v Glyzerol, Proteaseinhibitoren) resuspendiert, 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend für 20 Minuten bei 14 000 rpm, 4°C zentrifugiert. Der Überstand (Extrakt) wurde abgenommen und die Proteinkonzentration kolorimetrisch (Bradford-Reagenz) bestimmt. Die Gesamtzellextrakte wurden bei –70°C gelagert. Proteaseinhibitoren : 1:100 Aprotinin (5mg/ml in PBS), 1:500 Leupeptin (5mg/ml in 50% Glyzerin), 1:200 Pefablok (25mg/ml in 50% Glyzerin), 1:100 EGTA (0,1 M), 1:200 Pepstatin A.

3.3. Immunpräzipitation

15 µl Protein A bzw. G Sepharose wurden für 2 h, 4°C mit dem jeweiligen Antikörper inkubiert und anschließend mit Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 120 mM NaCl, 1% NP-40, 10% v/v Glyzerol, Proteaseinhibitoren) gewaschen. Der PAS/Antikörper-Komplex wurde dann mit 50 – 150 µg des Zellextraktes in einem Volumen von 500 µl für 1 h bei 4°C unter ständigem Schütteln inkubiert, anschließend zweimal mit Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 120 mM NaCl, 1% NP-40, 10% v/v Glyzerol, Proteaseinhibitoren) gewaschen und in 20 µl 2 x SDS-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 20% Glyzerol, Bromphenolblau, 4 mM DTT) aufgenommen. Vor dem Beladen der Probe auf ein 6 – 15% SDS/Polyacrylamid-Proteingel wurde diese für 7 Minuten bei 100°C aufgekocht und kurz zentrifugiert, um die PAS von den immunpräzipitierten Proteinen zu trennen.

3.4. SDS-PAGE und Western Blotting

20 – 150 µg des Zellextraktes in SDS-Probenpuffer (100 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS, 20% Glyzerol, Bromphenolblau, 4 mM DTT) wurde auf ein 6 – 15%

SDS/polyacrylamid-Proteingel (6- 15% Acrylamid, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,75% APS, 0,075% TEMED) parallel mit dem Proteinmarker 7 B (Sigma) aufgetragen. Nach dem Einlaufen der Proteine in das Sammelgel (4% Sammelgel : 4% Acrylamid, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,75% APS, 0,075% TEMED) bei 70 V, erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 100 – 130 V in 1 x Laufpuffer (200 mM Glyzin, 25mM Tris-Base, 1% SDS). Anschließend wurden die Proteine in dem Gel auf eine mit Methanol aktivierten Immobilon P-Membran (Millipore) transferiert (Blotting Apparatur). Der Transfer wurde in 1 x Tris-Glyzin Puffer (195 mM Glyzin, 50 mM Tris-Base) bei 100 V für 70 Minuten durchgeführt. Danach wurde die Membran unter einer Rotlichtlampe getrocknet, bevor die immobilisierten Proteine immundetektiert wurden.

3.4.1. Immundetektion immobilisierter Proteine

Die getrocknete Immobilon P Membran (Millipore) mit den immobilisierten Proteinen wurde mit dem primären Antigen-spezifischen IgG in Blocking-Lösung (5% w/v Milchpulver, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1% v/v Tween-20) für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit 1 x TBS (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl) gewaschen und für 1 h mit dem entsprechenden sekundären HRP-konjugierten Antikörper in Blocking-Lösung (siehe oben) inkubiert. Danach wurde die Membran mit 1 x TBS gewaschen. Der Immundetektion der Proteine erfolgte durch Inkubation der Membran in 100 mM Tris-HCl, pH 8,5, 1,25 mM 3-Aminophthalhydrazid (Luminol), 200 µM p-Coumarinsäure und 2,7 mM H_2O_2 für 1 Minute und anschließender Exposition auf einem X-Omat AR-Film (Kodak) für 5 Sekunden bis 10 Minuten in der Dunkelkammer.

Für den Nachweis von verschiedenen Antigenen ähnlicher Größe auf derselben Membran wurden die Antikörper der vorangegangenen Immundetektion von der Immobilon P Membran entfernt. Dies geschah durch Inkubation der Membran für jeweils 30 Minuten in Lösung A (8 M Harnstoff, 1% SDS, 0,5% v/v ß-Merkaptoethanol) und Lösung B (50% Ethanol, 10% Essigsäure). Danach wurde die Membran für 30 Minuten in 10% Ethanol und dann in absolutem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet, bevor die Membran für die nächste Immundetektion verwendet werden konnte.

3.5. *In vitro* Protein-Crosslinking

400 ng des rekombinanten P53 Proteins bzw. 50 µg des Zellkernextraktes wurden für 20 Minuten in 1 x Bindungspuffer (50 mM Tris, pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 2 mM DTT, 20% Glyzerol, 50 mM NaCl) in einem Endvolumen von 20 µl bei RT inkubiert. Danach erfolgte das Crosslinking der Proteine durch Zugabe von Glutaraldehyd (0,003 % Endkonzentration) und anschließender Inkubation auf Eis für 50 Minuten. Durch Aufkochen der Reaktionslösung bei 100°C für 6 Minuten in Gegenwart von 2% SDS wurde das Crosslinking (teilweise) rückgängig gemacht. Anschließend wurden die P53 Oligomere in einem 6%igen SDS-Polyacrylamid-Proteingel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Immobilon-P Membran (Millipore) transferiert und mit den Antikörpern mAb242/mAb240 immundetektiert. Der Oligomerisierungsstatus des jeweiligen P53 wurde anhand der Oligomer-Leiter (50 kD = Monomer, 100kD = Dimer, 150kD = Trimer, 200kD = Tetramer) bestimmt.

3.6. *In vivo* Markierung von P53

Adhärente Zellen (Konfluenz etwa 60 – 80%) wurden in einer 10 cm Petrischale kultiviert, zweimal mit equilibriertem Cys/Met/Glu-freiem DMEM (ICN, 5% CO_2) gewaschen und das Medium vollständig entfernt bevor 2 ml des „Mangelmediums“ (Cys/Met-freies DMEM, 10% dialysiertes FCS, 1 % v/v L-Glutamin, 5% CO_2) auf die Zellen pipettiert wurden. Nach Inkubation für 30 Minuten bei 30°C oder 39°C wurden 50 – 100 µl ^{35}S-Met (TransLabel) in das Medium pipettiert und für weitere 60 Minuten inkubiert. Danach wurden die ^{35}S-markierten Zellen dreimal mit 1 x PBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4, pH 7,4) gewaschen und mit einem Gummischaber von der Petrischale abgekratzt, zentrifugiert und in Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 120 mM NaCl, 1% NP-40, 10% v/v Glyzerol, Proteaseinhibitoren) extrahiert. Danach wurde die selbe Proteinmengen mit dem jeweiligen Antikörper/PAS Komplex immunpräzipitiert und das Immunpräzipitat in einem 10%igen SDS-Polyacrylamid-Proteingel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das getrocknete Gel wurde dann auf einem Phosphorimager für 1 – 3 Tage exponiert. Die Auswertung der Autoradiographien erfolgte mit Hilfe des Bas-Readers und der TINA 2.0 Software.

3.7. *in vitro* Transkription und Translation von P53

Die *in vitro* Transkription und Translation erfolgte mit Hilfe des TNT-T7 Reticulozytenlysat-Systems nach Anweisung des Herstellers (Promega). 12,5 µl des TNT Kaninchen Retikulozytenlysats (Promega) wurden in einem Volumen von 25 µl zusammen mit 1 x Reaktionspuffer (Promega), 1 µl der T7 RNA Polymerase (Promega), 1 mM des Aminosäuremix (ohne Cystein), 4 µl ^{35}S-Cystein (TransLabel), 30 U RNasin (Abcam) und 1 µg der Plasmid-DNA (Maus wtp53-cDNA in pBlueskriptII/T7-Polymerase Promotor) für 2 h bei 30°C inkubiert.
Durch Inkubation des Reaktionsmixes für 2 h bei 4°C mit 15 µl des Protein A Sepharose/Antikörperkomplexes in 300 µl Waschpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 120 mM NaCl, 1% NP-40, 10% v/v Glyzerol, Proteaseinhibitoren), wurde das *in vitro* translatierte wtp53 Protein anschließend immunpräzipitiert. Danach wurde der Komplex zweimal mit Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 120 mM NaCl, 1% NP-40, 10% v/v Glyzerol, Proteaseinhibitoren) gewaschen, in 30 µl 2 x SDS-Puffer resuspendiert und für 7 Minuten bei 100°C aufgekocht. Danach wurde der Überstand in einem 10%igen SDS/Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, welches dann auf einem Whatman Papier getrocknet und auf X-OMAT Kodak Film exponiert wurde.

3.8. DNA Bindungsassays

3.8.1. Herstellung der Zellkernextrakte für DNA Protektionsassay

Adhärente Zellen (60 – 80% konfluent) wurden zweimal mit 1 x PBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4, pH 7,4) gewaschen und in 50 ml Falconröhrchen überführt und für 10 Minuten zentrifugiert (450 x g, 4°C). Anschließend wurde das PCV (Packed Cell Volume) bestimmt. Das Zellpellet wurde daraufhin in 5 x PCV des Hypotonischen Puffer (10 mM Hepes, pH 7,9, 1,5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, Proteaseinhibitoren) resuspendiert, für 5 Minuten zentrifugiert (450 x g, 4°C), erneut in 3 x PCV des Hypotonischem Puffer aufgenommen und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension in einen vorgekühlten Homogenisator überführt und die Zellen mit einem Pistill B aufgebrochen. Die

Zellkerne wurde durch Zentrifugation der Suspension (15 Minuten, 3300 x g, 4°C) pelletiert. Das PNV (Packed Nuclear Volume) wurde bestimmt. Das Pellet wurde dann in 0.5 x Vol des PNV mit dem Puffer A (20 mM Hepes, pH 9, 25% Glyzerol, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,02 M KCl, Proteaseinhibitoren) resuspendiert und das selbe Volumen des Puffers B (20 mM Hepes pH 9, 25% Glyzerol, 1,5 mM $MgCl_2$, 1,2 M KCl, Proteaseinhibitoren) tropfenweise hinzupipettiert. Die Zellkerne wurden danach bei 4°C für 30 Minuten extrahiert und anschließend zentrifugiert (30 Minuten, 14 000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde gegen 50 Vol. des Puffers 1 (20 mM Hepes pH 7,9, 20% Glyzerol, 100 mM KCl bzw. 200 mM KCl, 0,2 mM EDTA) für 1 – 2h, 4°C dialysiert und anschließend für 20 Minuten bei 14 000 rpm, 4°C abzentrifugiert. Der Überstand (Zellkernextrakt) wurde abschließend aliquotiert und bei –70°C eingefroren.

3.8.2. DNA Protektionsassay

500 ng der Promotor-Plasmid DNA wurden zusammen mit 200 – 400 ng des rekombinanten P53 Proteins bzw. 150 µg des Zellkernextraktes in 1 x Bindungspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 20% Glyzerol, 50 mM NaCl, 4 mM EDTA, 2 mM DTT, 10 µg BSA) für 30 Minuten bei RT in einem Endvolumen von 50 – 100 µl inkubiert. Anschließend wurden 50 µl einer Mg/Ca-Lösung (5mM $MgCl_2$, 10 mM $CaCl_2$) hinzupipettiert und für exakt 1 Minute bei RT inkubiert bevor der partielle Verdau durch Zugabe von 0,15 U RQ-DNase I (Promega) für die selbe Dauer durchgeführt wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Stop-Lösung (0,3 M Natriumacetat, pH 5,2, 100 mM NaCl, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 1% SDS, 10 mM EDTA, 200µg/ml Proteinase K, 100µg/ml Hefe-tRNA) und anschließender Inkubation bei 37°C für 15 Minuten beendet. Danach wurden die Proteine durch Chloroform ausgewaschen und die DNA durch Zugabe von 2 – 3 Vol. Azeton oder absolutem Ethanol präzipitiert. Die ausgefällte DNA wurde abschließend bei 14 000 rpm, 4°C für 30 Minuten zentrifugiert und das Pellet getrocknet.

Das DNA Pellet wurde in 5 mM NaOH und 3 pMole des Promotor-spezifischen Oligonukleotids in einem Endvolumen von 50 µl gelöst. Die Hybridisierung des Oligonukleotids an den Promotor erfolgte durch Inkubation für 5 Minuten bei 82°C und anschließender Überführung auf Eis. Die Oligoextensionsreaktion wurde durch Zugabe von 10 µl des 10 x Primerextensionspuffers (500 mM Tris-HCl, pH 7,2, 100

mM Mg_2SO_4, 2 mM DTT), 50 µl einer dNTP-Lösung (je 2.5 mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP) und 2-4 U des Klenow-Fragmentes (MBI Fermentas) eingeleitet. Nach Inkubation von 6 Minuten bei 45°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 30 µl der Stop-Lösung (3 M Natriumazetat, pH 5,0, 10 mM EDTA) beendet und die DNA durch Zugabe von 400 µl absolutem Ethanol präzipitiert (30 Minuten, -70°C). Nach Zentrifugation (14 000 rpm, 30 Minuten, 4°C) wurde das getrocknete Pellet in Formamid-Beladungspuffers (98% v/v Formamid, 50 mM EDTA, Bromphenolblau) gelöst und die DNA durch Erhitzen für 5 Minuten bei 100°C denaturiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte in einem 6%igen Harnstoff/Polyacrylamid-Gel (8 M Harnstoff, Acrylamid/Bis 1:19, APS, TEMED, 89 mM Tris-HCl, pH 8,0, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA) mit 1 x TBE (90 mM Tris-HCl, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0) als Laufpuffer bei 75 – 90 W. Die selbe CPM wurde in die Geltaschen aufgetragen.

3.8.3. Chromatin Immunpräzipitation (ChIP)

Die adhärenten Zellen wurden bei 39°C bzw. 30°C in DMEM (5% FCS, 5% CO_2) kultiviert. Die Fixierung der Chromatin-gebundenen Proteine erfolgte durch Zugabe von 100 µl 37% Formaldehyd (Sigma) in 10 ml DMEM (5% FCS, 5% CO_2) und der Inkubation bei 30°C für 10 Minuten. Die Fixierungsreaktion wurde durch Zugabe von 1 ml 1,25 M Glyzin gestoppt. Nach Waschen der adhärenten Zellen mit 1 x PBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4, pH 7,4) wurden diese mit einem Gummischaber abgekratzt und 2 x 10^6 Zellen durch Zentrifugation (1400 x g, 5 Minuten) pelletiert. Die Zellen wurden anschließend in 200 µl SDS-Lysispuffers (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8,1, Proteaseinhibitoren) resuspendiert und zentrifugiert (14000 rpm, 4°C, 5 Minuten). Das Pellet wurde in 200 µl des SDS-Puffers resuspendiert und danach sonifiziert (30% der maximalen Leistung, 3 x 5 Sekunden auf Eis). Durch Zentrifugation bei 14000 rpm, 4°C für 10 Minuten wurden unlösliche Bestandteile pelletiert. Der Überstand wurde dann mit 4 Vol. des Lysispuffers (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 120 mM NaCl, 1% NP-40, 10% v/v Glyzerol, Proteaseinhibitoren) und 80 µl Heringssperma-DNA/PAS (Biozol) für 30 Minuten, 4°C inkubiert. Danach wurde die PAS durch Zentrifugation pelletiert und 1/3 Vol. des Überstands jeweils mit 60 µl Heringssperma-DNA (HSDNA, Biozol)/PAS, 60 µl HS-DNA/PAS+ mAb122 bzw. 60 µl HS-DNA/PAS+ mAb242 über Nacht bei 4°C

inkubiert. Nach der Immunpräzipitation wurden die Komplexe mit je 1ml der Lösung 1 (0,1 % SDS, 1% TritonX-100, 2mM EDTA, 20mM Tris, pH 8,1, 150 mM NaCl), Lösung 2 (0,1 % SDS, 1% TritonX-100, 2mM EDTA, 20mM Tris, pH 8,1, 500 mM NaCl), Lösung 3 (0,25M LiCl, 1% NP40, 1% Natriumdeoxycholat, 1mM EDTA, 10 mM Tris, pH 8,1), sowie zweimal mit Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) gewaschen. Der Immunkomplex wurde dann in 250 µl 1% SDS/0,1 M $NaHCO_3$ resuspendiert, für 15 Minuten inkubiert und zentrifugiert (14000 rpm, 1 Minute) und der Überstand aufbewahrt. Anschließend wurde diese Prozedur mit dem Pellet wiederholt und beide Überstände vereint. Das Crosslinking wurde durch Zugabe von 20 µl 5 M NaCl und Inkubation bei 65°C für 4 Stunden rückgängig gemacht. Danach wurden 10 µl 0,5M EDTA (pH 8,0), 20µl 1M Tris (pH 6,5) und 2 µl ProteinaseK (10mg/ml) in die Lösung pipettiert und für 1h bei 45 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine durch Ausschütteln in Phenol/Chloroform entfernt und die DNA durch Zugabe von 1/10 Vol. Natriumazetat, pH 5,2, 1 µl GenElute-LPA (5mg/ml) und 2,5 Vol. Ethanol präzipitiert. Nach Zentrifugation (14000rpm, 10 Minuten, RT) wurde das DNA Pellet luftgetrocknet, in dH_2O gelöst und in der PCR auf die Anwesenheit von P53-gebundener genomischer DNA untersucht. In der PCR (PCR-Programm: 1 x 95°C für 90 Sekunden, 30 x 95°C für 40 Sekunden, 62°C für 40 Sekunden, 72°C für 30 Sekunden, 1 x 72°C für 1 Minute) wurde die immunpräzipitierte DNA sequenz-spezifisch amplifiziert. Dies geschah in Gegenwart von jeweils 40 pM der Primer (*mdm2* Hin + Rück Primer und *p21* Hin und Rück Primer), 2,5 U der Taq-Polymerase (Eppendorf) und 100 µM dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP). Die PCR Produkte (p21S3 = 136 bp und mdm2 = 186 bp) wurden anschließend in einem 1,5%igen Agarosegel in 1 x TBE (89 mM Tris-HCl, pH 8,0, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA) als Laufpuffer aufgetrennt.

3.8.4. Oligonukleotide

Tabelle 3. DNA Oligonukelotide

DNA Oligonukleotid	Sequenz (5´- 3´Richtung)
DNA Protektionsassay	
p21-S3	ttc ttc tgt ctt tcc atc c
Mdm2	tgg tgg gac gtg gct tc
Sondenherstellung (Southern Blots)	
pLTRcg9-Hin	a aca acg ttg cgc aaa c
pLTRcg9-Rück	gtg atg tcg gcg ata tag g
Sondenherstellung (Northern Blots)	
Mdm2-Hin	gcc ttc tcg tcg ctc gag ctc t
Mdm2-Rück	gtc taa cca gag tct ctt gtt ccg a
P21-Rat-Hin	tca gag cca cag gca cca tg
P21-Rat-Rück	cgt ggg cac ttc agg gct tt
rRNA-Rat-Hin	ttc tag agc taa tac atg ccg ac
rRNA-Rat-Rück	ggt cct att cca tta ttc cta gc
14-3-3-s-Hin	tgc ctt tcc caa acc ctg aat gtt c
14-3-3-s-Rück	acc cag caa act ttt tcc ctc tca t
CycG-Rat-Hin	gga gaa gac gtg gct gtc aa
CycG-Rat-Rück	cca act aac cca tgg ttt cg
Bax-Rat-Hin	gag aca cct gag ctg acc ttg g
Bax-Rat-Rück	gcc cat ctt ctt cca gat ggt
Gadd45-Hin	gac gaa ccc aca ttc atc aca at
Gadd45-Rück	ggc tca cct ctc tct ccc tct g
B99-Hin	ctt gca cct tga gcc ctc tca ctg
B99-Rück	ctg tgc tgg gtt tgt cct gga gca c
PCR Amplifikation des *mdm2* Promotors	
Mdm2-Rat-Hin	ccg agc gaa atg gtc tct caa gtc
Mdm2-Rat-Rück	cag aag cac ggt ggt cga aga g
RT-PCR	
SV40-3´UTR-Rück	agc aag taa aac ctc tac ag
Ratp53-3´UTR-Rück	cgg ata gga ttt cgc tgg
Exon8-Hin	ggg aca gct ttg agg ttc g
Exon6-Hin	ccg agt atc tgg aag aca g
Chromatin IP	
p21S3-Hin	ccatccctggctgtccttc
p21S3-Rück	agcagccccacctcttcggttc
mdm2-Hin	gctgtgcctagttgactcag
mdm2-Rück	agcacggtggtcgaagagg

3.9. Aufreinigung von rekombinanten P53 Proteinen (Soussie)

Das Zellpellet wurde in 10 ml des Puffers A (10 mM Hepes, pH 7,4, 1,5 mM $MgCl_2$, 5 mM KCl, Proteaseinhibitoren) resuspendiert und für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach Aufbrechen der Zellen mit Hilfe eines Homogenisators (Pistill B) und anschließender Inkubation für 45 Minuten bei 4°C wurde das Lysat zentrifugiert (5000 rpm, 10 Minuten, 4°C) und der Überstand als Fraktion A bei –70°C eingefroren. Das Zellpellet wurde in 10 ml des Puffers B (10 mM Hepes pH9, 1,5 mM $MgCl_2$, 5 mM KCl, Proteaseinhibitoren) resuspendiert, für 45 Minuten bei 4°C inkubiert und die Suspension zentrifugiert (10 Minuten, 5000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde danach als Fraktion B bei –70°C eingefroren. Das Zellpellet wurde in 10 ml des Puffers C (10 mM Hepes pH 9, 1,5 mM $MgCl_2$, 200 mM KCl, Proteaseinhibitoren) resuspendiert und die Zellen für weitere 45 Minuten auf Eis extrahiert. Nach Zentrifugation (10 Minuten, 5000 rpm, 4°C) dieser Suspension wurde das Pellet in 10 ml des Puffers D (10 mM Hepes pH 9, 1,5 mM $MgCl_2$, 500 mM KCl, Proteaseinhibitoren) resuspendiert und für 45 Minuten auf Eis inkubiert und der Überstand als Fraktion C bei –70°C eingefroren. Die Zellsuspension wurde abschließend für 10 Minuten bei 5000 rpm, 4°C abzentrifugiert und der Überstand als Fraktion D eingefroren. Die Fraktionen A – D wurden jeweils gegen 1L des Puffers 1 (20 mM Hepes pH 7,9, 20% Glyzerol, 100 mM KCl bzw. 200 mM KCl, 0,2 mM EDTA) für 1 – 2 h dialysiert und für 30 Minuten bei 10 000 x g, 4°C in der Ultrazentrifuge (Beckmann) zentrifugiert. 20 µl des Überstandes der dialysierten Fraktion wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamid-Proteingel parallel einer BSA (NEB) Standardreihe (50 ng, 100 ng, 200 ng, 400 ng, 800 ng, 1000 ng) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Inkubation des Gels in Coumassie-Lösung (1,5 g Coomassie Brilliant-Blue R250, 450 ml Methanol, 100 ml Eisessig, 450 ml H_2O) und anschließender Entfärbung (10% Isopropanol, 10% Eisessig) sichtbar gemacht. Durch Vergleich der Proteinmenge in den jeweiligen Fraktionen mit der BSA-Standardreihe wurde die Konzentration des rekombinanten P53 Proteins ermittelt.

3.10. Klonierung

3.10.1. Isolierung von genomischer DNA

Etwa 5 x 10^7 adhärenter Zellen wurden zweimal mit 1 x PBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4, pH 7,4) gewaschen, mit einem Gummischaber abgekratzt, zentrifugiert und in 500 µl Tris-EDTA-Lösung (pH 8,0) aufgenommen. Anschließend wurden 5 ml des Extraktionspuffers (10 mM Tris-HCl, pH 8,0 100 mM EDTA, 60 µg/ml DNase-freie RNase A, 0,5% SDS) hinzupittiert und die Zellen durch Inkubation für 1 h bei 37°C lysiert. Danach wurden 200 µg/ml der Proteinase K hinzupipettiert und für 3 h bei 50°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine durch Waschen (6 Runden) mit 1 Vol. Tris (pH 8,0)-gepuffertem Phenol vollständig extrahiert. Die genomische DNA wurde durch Zugabe von 0,2 Vol 10 M Ammoniumazetat und 2 Vol. absolutem Ethanol präzipitiert und aus der Lösung auf eine Pasteurpipette gewickelt. Die DNA wurde abschließend in 70% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 1 bis 5 ml Tris-EDTA Lösung (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) gelöst.

3.10.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die PCR-Amplifikation definierter DNA Abschnitte von z.B. genomischer DNA wurden zunächst die zu amplifizierenden DNA (1 µg der genomischen DNA oder 10-100 ng Plasmid-DNA), 40 pMole der beiden Primer, 200µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,5 mM $MgCl_2$, 1 x Taq-Polymerase Puffer (Eppendorf) in ein dünnwandiges PCR-Gefäß pipettiert. Anschließend wurde die DNA in einem Thermocycler (MWG Biotech Primus 96 plus) für 2 Minuten bei 95°C denaturiert und 2 U der Taq-Polymerase (Eppendorf) nach Erreichen der Temperatur hinzupipettiert („Hot Start“). Die Amplifikation erfolgte in 25 – 40 Zyklen (95°C für 40 Sekunden, Hybridisierungstemperatur abhängig von T_m der eingesetzten Oligonukleotide für 40 Sekunden, 72°C für 30 – 120 Sekunden abhängig von der Länge des Amplikons) mit einem abschließenden 3-5 minütigen Schritt bei 72°C im Thermocycler. Ein Aliquot der amplifizierten DNA wurde in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

3.10.3.Isolierung des *mdm2* Promotors aus Rattenfibroblasten

Die Promoterregion des *mdm2* Gens, die die P53 Bindungsstelle enthält, wurde in der PCR mit Pfu-Polymerase (NEB) und spezifischen Primern (Mdm2-Hin: 5´-ccg agc gaa atg gtc tct caa gtc-3´, Mdm2-Rück: 5´-cag aag cac ggt ggt cga aga g-3´) von genomischer DNA aus Cl6 Rattenfibroblasten amplifiziert (siehe PCR). Die Identität des PCR Produktes (*mdm2*: 630 bp) wurde sequenziert, um seine Identität zu verifizieren. Anschließend wurde das PCR Produkt in einen mit dem Restriktionsenzym EcoRV geschnittenen pBluescriptSKII Vektor kloniert. Der Promotor des *p21* Gens wurde freundlicherweise von Prof. Bert Vogelstein zur Verfügung gestellt.

3.10.4. Restriktionsverdau von DNA

1 µg DNA wurde mit 5 – 10 U des Restriktionsenzymes in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer für 1 – 2 h bei 37°C in einem Endvolumen von 30 µl inkubiert. Anschließend wurde ein Aliquot des Verdaus im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert.

3.10.5. DNA Isolierung aus Agarosegelen

Die zu isolierende DNA Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel auf einem UV-Tisch herausgeschnitten, zerkleinert und in ein PCR Gefäß, das zuvor mit einem kleinen Loch am Boden versehen und mit etwas Glaswolle gefüllt wurde, überführt. Danach wurde das Gelstück bei – 20°C für etwa 20 Minuten „gefroren“. Das PCR Gefäß wurde anschließend in ein 2 ml Eppendorfgefäß eingeführt und für 20 Minuten bei 5500 rpm, RT zentrifugiert. Die DNA im Durchfluss wurde durch Zugabe von 1/10 Vol. 3M Natriumazetat, pH 5,2 und 2 Vol. absolutes Ethanol präzipitiert. Nach 20 Minuten bei –70°C erfolgte eine Zentrifugation bei 14000 rpm für 30 Minuten, 4°C. Die luftgetrocknete DNA wurde abschließend in dH_2O gelöst.

3.10.6. Prozessierung von DNA-Enden

3.10.6.1. „Auffüllen“ von überhängenden DNA-Enden

0,5 – 1 µg der DNA mit rezessiven Termini (z.B. mit Taq Polymerase amplifizierte PCR-Produkte) wurden zusammen mit 3 U der Pfu-Polymerase (Stratagene), 20 mM Tris-HCl, pH 8,8, 2 mM $MgSO_4$, 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0,1% TritonX-100, 0,1 mg/ml BSA und 100 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) in einem Volumen von 30 µl für 20 Minuten bei 72°C inkubiert. Alternativ dazu wurde für das Auffüllen von 5´-rezessiven Enden die DNA mit 2 U Klenow-Fragment (MBI Fermentas) in Gegenwart von 40 µM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 1 x Klenow-Puffer (MBI Fermentas) für 30 Minuten bei RT inkubiert und anschließend die DNA Polymerase hitzeinaktiviert (15 Minuten bei 70°C). Die Pfu-Polymerase oder Klenow Fragment wurde durch Ausschütteln der Reaktionslösung mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (25:1) entfernt und die DNA mit 2,5 Vol absolutem Ethanol präzipitiert. Nach Zentrifugation für 45 Minuten bei 14 000 rpm, 4°C wurde das Pellet getrocknet und in 10 – 20 µl H_2O gelöst.

3.10.6.2. Nicht-radioaktive Kinasierung von DNA-Enden

500 ng der PCR amplifizierten DNA, die mit nicht-phosphorylierten Oligonukleotiden hergestellt wurde, wurden zusammen mit 20 U T4 Polynukleotid Kinase (NEB), 70 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT und 1 mM dATP in einem Endvolumen von 30 µl für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die T4 PNK wurde durch Inkubation der Reaktionslösung bei 65°C für 20 Minuten hitzeinaktiviert.

3.10.6.3. Dephosphorylierung von DNA-Enden

10 pM der 5´-phosphorylierten doppelsträngigen DNA (z.B. geschnittener Vektor) wurde zusammen mit 10 – 50 U Alkalische SAP Phosphatase (Boehringer Mannheim), 0,1 M Tris-HCl, pH 8,5 und 5 mM $MgCl_2$ in einem Volumen von 100 µl bei 37°C für 1 h inkubiert. Die SAP wurde anschließend hitzeinaktiviert (15 Minuten bei 65°C) und durch Ausschütteln der Reaktionslösung mit 1 Vol.

Chloroform/Isoamylalkohol (25:1) entfernt. Die DNA wurde dann mit 2,5 Vol absolutem Ethanol und 0,3 M Natriumazetat, pH 5,2 präzipitiert. Nach Zentrifugation für 45 Minuten bei 14 000 rpm, 4°C wurde das DNA Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und in 10 – 20 µl dH_2O aufgenommen.

3.10.7. Ligation

Das zu klonierende DNA Fragment und die mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnittene Vektor DNA wurden in einem molaren Verhältnis von 5:1 in Gegenwart von 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 50 µg/ml BSA (NEB) und 400 U T4 DNA Ligase (NEB) in einem Volumen von 20 µl bei RT über Nacht inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Reaktionsansatz für die Transformation von kompetenten DH5a Zellen eingesetzt. Für die Ligation eines DNA Fragmentes mit glatten, phosphorylierten Enden in einen mit EcoRV (NEB) geschnittenen pBSKII Vektor wurde dieser zuvor mit der Alkalischen Phosphatase (Boehringer) dephosphoryliert.

3.10.8. Transformation

100 µl kompetenter DH5a Zellen wurden mit 50 – 100 ng zirkulärer Plasmid-DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Transformation der Zellen erfolgte durch Inkubation der Zellsuspension für 90 Sekunden bei 42°C mit sofortiger Überführung auf Eis. Danach wurden 800 µl Luria-Bertani Medium (10 mg/ml Bacto-Trypton, 5 mg/ml Hefeextrakt, 10 mg/ml NaCl, pH 7,0) in die Zellsuspension pipettiert. Nach Inkubation bei 37°C für 1 h wurden 100 µl der Suspension auf eine Agarplatte (15 mg/ml Agar-Agar, 10 mg/ml Bacto-Trypton, 5 mg/ml Hefeextrakt, 10 mg/ml NaCl, pH 7,0, 50-100 µg/ml Ampicillin) pipettiert und gleichmäßig ausgestrichen. Die Agarplatte wurde für 12 – 16 h in einen Brutschrank bei 37°C inkubiert.

3.10.9. Identifizierung von rekombinanten DH5a Klonen

3 ml Luria-Bertani Medium (10 mg/ml Bacto-Trypton, 5 mg/ml Hefeextrakt, 10 mg/ml NaCl, pH 7,0) in einem 15 ml Falconröhrchen wurden mit einem Zellklon beimpft und

über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 1 ml der Zellsuspension wurde dann in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt, für 1 Minute bei 14 000 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in 200 µl Lösung 1 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml DNase-freie RNase A) resuspendiert. Danach erfolgte die Zelllysis durch Zugabe von 200 µl Lösung 2 (0,2 N NaOH, 1% SDS) und anschließender Inkubation für 5 Minuten bei RT. Die Lysis wurde durch Zugabe von 200 µl Lösung 3 (3 M Kaliumazetat, 1,7 M Eisessigsäure) und Inkubation für 5 Minuten bei 4°C beendet. Danach wurde das Lysat für 15 Minuten bei 14 000 rpm, 4°c zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol präzipitiert, zentrifugiert (14 000 rpm, 20 Minuten, RT) und das Pellet luftgetrocknet bevor es in 50 µl dH_2O aufgenommen wurde. 10 µl dieser DNA Lösung wurde mit entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt, um die Identität des rekombinanten Klones zu verifizieren. Bei positivem Befund wurden 300 ml LB-Medium (mit Antibiotikum) mit 500 µl der Miniprep- Zellsuspension (siehe oben) inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.10.10. Maxipreparation von Plasmid DNA

300 ml Luria-Bertani Medium (10 mg/ml Bacto-Trypton, 5 mg/ml Hefeextrakt, 10 mg/ml NaCl, pH 7,0) wurden mit transformierten DH5a inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (5000 x g, 10 Minuten, 4°C) pelletiert und in 12 ml S1 Puffer (100 µg/ml RNase A, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert. Danach erfolgte die Lysis der Bakterien durch Zugabe von 12 ml S2 Puffer (0,2 M NaOH, 1% SDS) und Inkubation von 5 Minuten bei RT. Die Lysis wurde durch Zugabe von 12 ml S3 Puffer (2,8 M Kaliumazetat, pH 5,1) beendet. Nach anschließender Inkubation für 5 Minuten bei 4°C wurde das filtrierte Lysat auf eine mit Puffer N2 (100 mM Tris, 15 % Ethanol, 900 mM KCl, pH 6,3, 0,15% TritonX-100) equilibrierte AX-500 Säule (Nucleobond) geladen. Anschließend wurde die an die Matrix gebundene Plasmid DNA zweimal mit insgesamt 24 ml N3 Puffer (100 mM Tris, 15% Ethanol, 1,15 M KCl, pH 6,3) gewaschen bevor diese mit 12 ml N5 Puffer (100 mM Tris, 15% Ethnaol, 1 M KCl, pH 8,5) von der Säule eluiert wurde. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,8 Vol. Isopropanol präzipitiert und durch Zentrifugation (45 Minuten, 14 000 rpm, 4°C)

pelletiert. Abschließend wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 µl dH_2O aufgenommen.

3.11. DNA-Sequenzierung

Die manuelle DNA Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des T7 Sequenase Version 2.0 DNA Sequenzierungskits (Amersham). 5 µg der DNA wurde in 2 N NaOH, 2 mM EDTA denaturiert, durch Zugabe von 4 Vol. 5 M Ammoniumazetat und absolutem Ethanol präzipitiert, pelletiert (Zentrifugation: 30 Minuten, 14 000 rpm, + 4°C) und dann luftgetrocknet. Anschließend wurde die DNA in Gegenwart von 40 mM Tris-HCl, pH 7,5, 20 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl und 1,5 pMole des ^{32}P-markierten Sequenzier-Primers in einem Endvolumen von 10 µl für 2 Minuten bei 65°C inkubiert. Nach Abkühlen wurde die Polymerisierungsreaktion durch Zugabe von 1 µl 0,1 M DTT und 3 U Sequenase Polymerase (Amersham) eingeleitet. Nach 1 Minute bei 37°C wurden jeweils 3 µl der Reaktionslösung in 2,5 µl der Terminationslösungen ddG, ddA, ddT oder ddC (Amersham) pipettiert und für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Beendet wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 µl der Stop-Lösung (95% Formamid, 20 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol FF). Vor dem Beladen von 3 µl dieser Reaktion auf ein denaturierendes Harnstoff/Polyacrylamidgel (150 ml enthalten 24 ml 30% Acrylamid, 63 g Harnstoff, 15 ml 10 x TBE, 0,9 ml 10% APS, 75 µl TEMED) wurde die Probe für 2 Minuten bei 80°C erhitzt.

3.12. Southern Blotting

Die DNA wurde in einem Agarosegel (0,7% w/v Agarose, 0,5 x TBE, 0,5 µg Ethidiumbromid/ml) in 0,5 x TBE-Laufpuffer elektrophoretisch bei einer Spannung von 1 V/cm aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA im Gel in 1,5 M NaCl/0,5 N NaOH für 45 Minuten denaturiert und anschließend in 1 M Tris-HCl, pH 7,4/1,5 M NaCl für 30 Minuten neutralisiert. Der Transfer der DNA auf eine neutrale Nylonmembran (Schleicher&Schüll) erfolgte über Nacht mit Hilfe der in Abb. 2 dargestellten Apparatur. Die Membran wurde dann in 2 x SSC (17,5 mg/ml NaCl, 8,82 mg/ml Natriumcitrat, pH 7,0) enthält gewaschen und luftgetrocknet, bevor die DNA durch Bestrahlung mit 1200 kJoule UVC/cm2 (254 nm) kovalent an die Membran gebunden wurde.

Die Membran wurde für 1 h in 1 ml der Hybridisierungslösung (6 x SSC, 1 mg/ml Ficoll, 1 mg/ml Polyvinylpyrrolidon, 1 mg/ml BSA, 50% v/v Formamid, 0,5% SDS, 100 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA) pro 10 cm^2 Membran bei 42°C in einem Hybridisierungsofen inkubiert, bevor anschließend 1 x 10^6 CPM/ml Hybridisierungslösung der ^{32}P-markierten, denaturierten Sonden-DNA dazupipettiert wurden. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C. Danach wurde die unspezifisch gebundene Sonden-DNA durch Waschen der Membran für jeweils 10 Minuten mit 2 x SSC/0,1% SDS (RT), 0,1 x SSC/0,5% SDS (37°C), 0,1 x SSC/0,5% SDS (68°C) und abschließend mit 0,1 x SSC bei RT entfernt. Die Membran wurde in Frischhaltefolie eingewickelt und auf einem Phosphorimager-Screen bzw. Kodak X-OMAT Film (mit Amplifikationsfolien bei –70°C) für 1 – 3 Tage exponiert. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des Bas-Readers und der TINA 2.0 Software.

3.13. RNA

3.13.1. Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

3 – 10 µg zellulärer RNA wurden zusammen mit dem RNA-komplementären Oligonukleotid für 10 Minuten bei 70°C inkubiert und dann auf Eis überführt. Die cDNA Erststrangsynthese erfolgte durch Zugabe von 16 U der AMV-Reverse Transkriptase (Promega), 50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 0,5 mM Spermidin, 2,5 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 5U RNasin (Abcam) und der Inkubation bei 42° - 45°C für 90 Minuten. Die AMV-RT wurde anschließend hitzeinaktiviert (5 Minuten, 90°C). 1/6 Vol. der cDNA-Lösung wurde in der PCR als Ausgangsmaterial eingesetzt.

3.13.2. Markierung der Sonden DNA für Northern Blotting

50 – 100 ng der denaturierten Sonden-DNA (200 bp – 900 bp) wurden von 2U Klenow-Fragment (MBI Fermentas) mit je 50 – 100 µCi a-^{32}P-dCTP und a-^{32}P-dATP (ICN), 0,1 mM dTTP und 0,1 mM dGTP in Gegenwart von 250 mM Tris, pH 8,0, 25 mM MgCl2, ß-Mercaptoethanol, 1 M HEPES, pH 6,0, Hexadesoxyribonukleotide (0,27 O.D.) (Pharmacia) und 20 µg BSA (NEB) in einem Endvolumen von 50 µl für 1 h bei RT markiert. Die DNA wurde anschließend auf eine Nick-Sephadex G25 Säule

(Boehringer) pipettiert und die DNA durch Waschen der Säule mit 1 ml dH_2O in mehreren Fraktionen eluiert. Die Radioaktivität in den Fraktionen wurde mit Hilfe des Flüssigkeitsszintallationszähler (Beckman L5 5000TD) als Cherenkov-CPM quantifiziert.

3.13.3. Aufreinigung der zellulären RNA

Adhärente Zellen wurden trypsiniert, pelletiert, in 700 µl RNAWiz-Lösung (Ambion) resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 140 µl Chloroform wurde das Lysat für 10 Minuten bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (12 000 rpm, 4°C, 15 Minuten). Danach wurde die obere, wässrige Phase abgenommen, in ein neues 2 ml-Eppendorf Gefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 350 µl DEPC-behandeltes H_2O und 700 µl Isopropanol präzipitiert. Nach Zentrifugation (14 000 rpm, 4°C, 25 Minuten) wurde das Pellet mit 75% Ethanol gewaschen und kurz luftgetrocknet. Das RNA-Pellet wurde anschließend in Formamid bzw. DEPC-behandeltes H_2O (Fluka) gelöst und die Konzentration spektralphotometrisch ermittelt (DNA/Protein/Enzym Analyzer BioSpec 1601E, Shimadzu). Dabei entspricht 1 $O.D._{260}$ 40 µg einzelsträngige RNA/ml H_2O.

3.13.3. Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA

10 – 20 µg zellulärer RNA wurde in Beladungspuffers (0,02 M MOPS, pH 7,0, 8 mM Natriumazetat, 1 mM EDTA, pH 8,0, 2.2 M Formaldehyd, Formamid, 0,005% Bromphenolblau) in einem Endvolumen von maximal 50 µl aufgenommen und für 15 Minuten bei 65°C erwärmt, um RNA Sekundärstrukturen aufzuschmelzen. Anschließend wurde die RNA gelelektrophoretisch in einem Formaldehyd-Agarosegel (1% w/v Agarose, 2,2 M Formaldehyd, 0,02 M MOPS, pH 7,0, 8 mM Natriumazetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) bei einer Spannung von 5 V/cm mit Formaldehyd-Laufpuffer (0,02 M MOPS, pH 7,0, 8 mM Natriumazetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in DEPC-behandeltem H_2O (Fluka) gewaschen, für 30 Minuten in einer RNA-Denaturierungslösung (0,05 M NaOH, 1,5 M NaCl) geschwenkt und abschließend für 20 Minuten in der Neutralisierungslösung (0,5 M Tris-HCl pH 7,4, 1,5 M NaCl) behandelt.

3.13.4. Northern Blotting

Mit Hilfe der in Abb. 2 dargestellten Apparatur wurde die RNA, die zuvor in einem 1% Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt wurde, auf eine neutrale Nylonmembran (Schleicher & Schüll) über Nacht transferiert. Die Membran wurde anschließend in 2 x SSC gewaschen und luftgetrocknet bevor die Nukleinsäure durch Bestrahlung mit 1200 kJoule UVC/cm2 (254 nm) kovalent an die Nylonmembran gebunden wurde. Um die Integrität der RNA zu verifizieren wurde die Membran mit Methylenblau Lösung (0,03% w/v Methylenblau, 0,3 M Natriumazetat pH 5,2) für etwa 1 – 2 Minuten behandelt und überschüssiger Farbstoff durch mehrmaliges Waschen mit DEPC-behandeltem dH_2O (Fluka) entfernt. Das Methylenblau interagiert mit der RNA, wodurch letztere sichtbar gemacht werden kann.

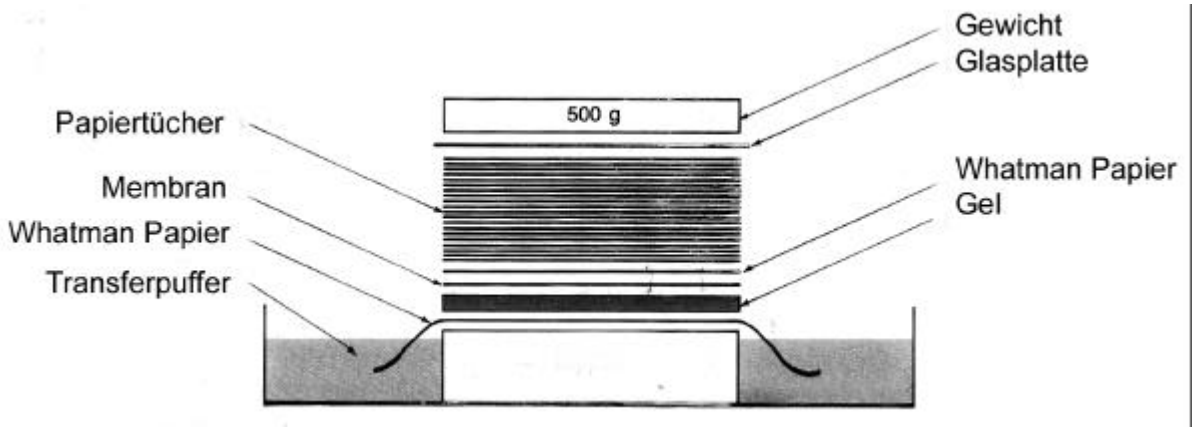


Abb. 2
Apparatur für den Transfer von Nukleinsäure (DNA oder RNA) auf eine neutrale Nylonmembran (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989, Erklärung siehe Text).

3.13.5. Hybridisierung der RNA mit einer 32P-markierten DNA-Probe

Die Membran mit der kovalent gebundenen RNA wurde für 15 Minuten in 1 ml der Hybridisierungslösung (5 x SSC, 1mg/ml Ficoll, 1 mg/ml Polyvinylpyrrolidon, 1 mg/ml BSA, 50% v/v Formamid, 1% SDS, 100 µg/ml denaturierte Heringssperma-DNA) pro 10 cm^2 Membran bei 42°C in einem Hybridisierungsofen inkubiert, bevor anschließend 1 x 10^6 CPM/ml Hybridiserungslösung der ^{32}P-markierten, denaturierten Sonden-DNA hinzupipettiert wurden. Die Hybridisierung erfolgte über

Nacht bei 42°C. Danach wurde unspezifisch gebundene Sonden-DNA durch Waschen der Membran mit 2 x SSC/0,1% SDS bei RT, 0,2 x SSC/0,1 SDS zunächst bei RT dann erneut bei 42°C und abschließend mit 2 x SSC (17,5 mg/ml NaCl, 8,82 mg/ml Natriumcitrat, pH 7,0) bei RT entfernt. Die Membran wurde in Frischhaltefolie eingewickelt und auf einem Phosphorimager-Screen exponiert. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des Bas-Readers und der TINA 2.0 Auswertungssoftware.

3.14. Zelllinien

In Tabelle 4. sind die Zelllinien benannt, die in der vorliegenden Doktorarbeit verwendet wurden. Die Zellen wurden in DMEM (5% Fötales Kälberserum) bei 39°C bzw. 37°C und 5% CO_2 (Heraeus Hera Cell Brutschrank) kultiviert.

Tabelle 4.

Zelllinie	Spezies/Zelltyp	Bemerkung	Referenz
10(1)tsp53	Maus/Fibroblasten	pLTRcg9	Ziegler, 1998
MethA-wtp53	Maus/Fibroblasten	pLTRwtp53 + MethA p53 Mutante	Otto *et al*., 1993
REF52	Ratte/Fibroblasten	Endogenes wtp53	Bauer *et al*., 1987
P47 (REF)	Ratte/Fibroblasten	pLTRcg9 + pEJ6.6	Michalovitz *et al*., 1991
Cl6 (REF)	Ratte/Fibroblasten	pLTRcg9 + pEJ6.6	Michalovitz *et al*., 1991
P160 (REF)	Ratte/Fibroblasten	pLTRcg9 + pEJ6.6	Michalovitz *et al*., 1991
P164 (REF)	Ratte/Fibroblasten	pLTRcg9 + pEJ6.6	Michalovitz *et al.,* 1991
SV40-Cl6	Ratte/Fibroblasten	pLTRcg9 + pEJ6.6 + SV40	Knippschild *et al.*
C6D8tsp53	Ratte/Glioma	pLTRcg9	Klotsche *et al.,* 1998
F111	Ratte/Fibroblasten	endogenes wtP53	Freeman *et al*., 1975
F111cg9	Ratte/Fibroblasten	pLTRcg9	Zerrahn, 1993

3.15. Pharmakologische Substanzen

In Tabelle 5. sind die Inhibitoren, die in der vorliegenden Doktorarbeit eingesetzt wurden, benannt.

Tabelle 5.

Droge	Lösungsmittel	Wirkung
Lactacystin (Calbiochem)	DMSO	Proteasominhibitor
Leptomycin B (Calbiochem)	DMSO	Zellkernexportinhibitor

3.16. *In situ* - Immunfluoreszenz

In eine mit sterilen Deckgläschen belegten 10 cm Petrischale (Nunc-Surface) wurden die Zellen zunächst bis zu einer Konfluenz von 60 – 80% kultiviert. Anschließend wurden die Deckgläschen, auf denen die Zellen angewachsen sind, einmal mit 1 x PBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4, pH 7,4) gewaschen und für mindestens 5 h in Azeton (-20°C) fixiert. Danach erfolgte die Rehydrierung der fixierten Zellen durch Inkubation der Deckgläschen in 1 x PBS für 10 Minuten bei RT. Unspezifische Bindungspartner des sekundären Antikörpers wurden durch Inkubation der Zellen mit dem jeweiligen Serum für 30 Minuten bei RT blockiert. Danach erfolgte eine 45 minütige Inkubation mit dem Primärantikörper mit anschließendem Waschen der Zellen in 1 x PBS für 20 Minuten. Darauf folgte die Inkubation mit dem jeweiligen Sekundärantikörper für weitere 45 Minuten bei RT und anschließendem Waschen der Zellen in 1 x PBS. Abschließend wurden etwa 50 µl Mountingmedium auf einen Objektträger pipettiert und das Deckgläschen mit der Zellseite daraufgelegt, leicht angedrückt und über Nacht bei RT im Dunkeln luftgetrocknet. Die Auswertung der Immunfluoreszenzen erfolgte am konfokalen Mikroskop (Leica DMRA).

3.17. BrdU/Propidiumiodid-Markierung und Durchflusszytometrie

Adhärente Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von etwa 70% in einer 10cm Petrischale (Nunc-Surface) kultiviert bevor 10 µM 5-Bromo-2´-desoxyuridin (Boehringer) in das Medium (DMEM mit 5% FCS) pipettiert und für 30 Minuten bei 39°C bzw. 30°C inkubiert. Anschließend wurden die trypsinierten Zellen sowie die mitotischen Zellen im Medium in ein 15 ml Falconröhrchen überführt und für 6 Minuten bei 250 x g, RT zentrifugiert (Hettich Rotanta 96R Zentrifuge). Danach wurde das Pellet in 5 ml PBS-EDTA-Lösung (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4, pH 7,4, 2,5 mM EDTA) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet (1×10^6 – 1×10^7 Zellen) wurde dann in 1 ml eiskaltem PBS/EDTA-Lösung resuspendiert bevor diese durch tropfenweise Zugabe von 80% Ethanol (-20°C) fixiert wurden. Die Ethanolfixierung erfolgte für mindestens 4

Stunden bei –20°C. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten aufgrund der Lichtsensitivität des eingebauten BrdU im Dunkeln.

Die fixierten Zellen wurden in 1 x PBS (140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4, pH 7,4) gewaschen und für 6 Minuten bei 250 x g, RT zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 175 µl dH_2O vollständig resuspendiert bevor 700 µl der Denaturierungslösung (2 N HCl, 2 mg Pepsin/ml) hinzupipettiert wurden. Nach Inkubation für etwa 20 Minuten bei 37°C wurde die partielle Säuredenaturierung der zellulären DNA durch Zugabe von 1,875 ml 1M Tris, pH 11 durch Neutralisierung beendet. Nach Zentrifugation der Resuspension für 5 Minuten bei 250 x g, RT wurde das Pellet in 100 µl der anti-BrdU-IgG-Lösung (0,2 – 0,5 µg anti-BrdU-Antikörper (DAKO)/ml 1 x PBS, 1% v/v Ziegenserum, 0,2% Tween-20) resuspendiert und für 30 Minuten im Dunkeln, RT inkubiert. Danach wurden die Zellen in PBS/EDTA-Lösung gewaschen und zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 100 µl der FITC-Sekundärantikörper-Lösung (0,5 – 1 µg FITC-Ziege-anti-Maus IgG-Antikörper/ml, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4, pH 7,4, 1% v/v Ziegenserum, 0,2% Tween-20) resuspendiert und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit PBS/EDTA-Lösung erfolgte die Färbung der doppelsträngigen zellulären DNA durch Resuspendieren des Zellpellets in 500 µl DNA-Färbelösung (50 µg Propidiumiodid/ml, 1 mg DNase-freie Rnase A/ml, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4, pH 7,4) und Inkubation für 30 Minuten bei RT. Die Zellen wurden wiederum mit PBS/EDTA-Lösung gewaschen, zentrifugiert und in 0,5 – 1 ml PBS/EDTA-Lösung resuspendiert. Die Auswertung wurde innerhalb der folgenden 2 h an einem Durchflusszytometer nach den Angaben des Herstellers (Beckton Dickinson) durchgeführt. Das eingebaute FITC-BrdU wurde mit dem grünen FL1 Kanal (530 nm), das Propidiumiodid mit dem roten FL3 Kanal (611 nm) gemessen.

Die BrdU-negativen G1 und G2/M Zellen wurden von den BrdU-positiven S-Phase Zellen aufgrund des DNA Gehalts (Propidiummarkierung) getrennt und quantifiziert (CellQuest Software).

4. Ergebnisse

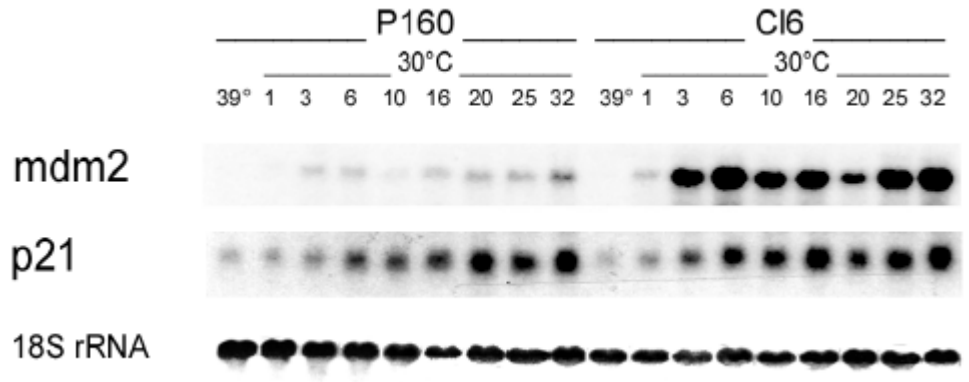
4.1.1. tsp53*val135*-abhängige differentielle Transaktivierung der *p21* und *mdm2* Gene in EJ-Ras transformierten embryonalen Rattenfibroblasten P160 und Cl6

Der Tumorsuppressor P53 ist ein sequenz-spezifisch bindender Transkriptionsfaktor, der nach „Aktivierung“ durch genotoxischen Stress eine große Anzahl von Genen induzieren (transaktivieren) kann, die Funktionen in unterschiedlichen zellulären Prozessen (Wachstumsarrest, Apoptose etc.) besitzen.
Die Kenntnis der Parameter, die für die wtp53-vermittelte differentielle Transaktivierung endogener Zielgene verantwortlich sind, ist Vorausetzung für die Entwicklung therapeutischer Strategien, mit dem Ziel, eine gewünschte biologische P53- Antwort durch Modulation der wtp53 Aktivität auszulösen.

Für die Untersuchung dieser Parameter wurden zwei Subklone der EJ-Ras transformierten tsp53*val135*-exprimierenden REF Zellen (Cl6 und P160 Zellen) herangezogen (Michalovitz *et al*., 1990), die Unterschiede in der Transaktivierung der P53 Zielgene *p21* und *mdm2* durch das funktionelle tsp53*val135* Protein (30°C) zeigten.

Die durch den Temperaturshift von 39°C auf 30°C induzierte transkriptionelle Regulation des *p21* Gens war in beiden Subklonen (ab etwa 6 h nach dem Temperaturshift) vergleichbar (Abb 3 A). Im Vergleich mit den P160 Zellen, war die Induktion der *mdm2* Transkription in Cl6 Zellen hingegen signifikant erhöht (Abb. 3 A), was in entsprechend unterschiedlichen Mdm2 Proteinlevel bei 30°C resultierte (Abb. 3 B).

A.



B.

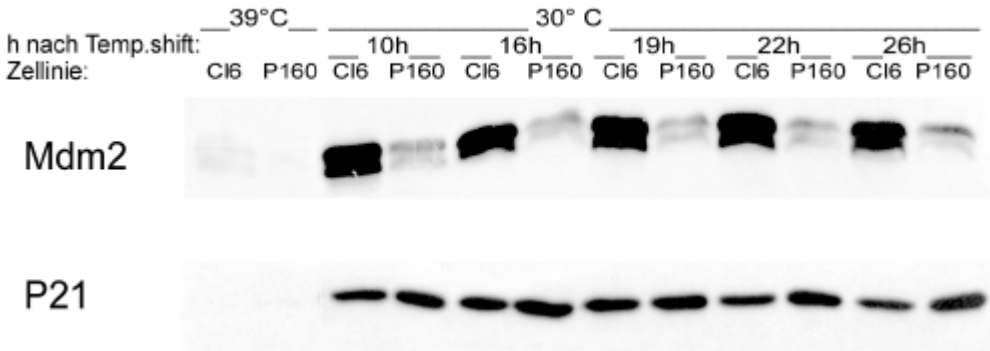


Abb. 3

Induktion der *mdm2* und *p21* Genexpression in den EJ-Ras transformierten REF Subklonen P160 und Cl6 vor (39°C) und nach Induktion (30°C) durch das funktionelle tsp53*val135* Protein.

A. Northern Blots: Cl6 bzw. P160 Zellen wurden bei 39°C bzw. 30°C (1-32h) kultiviert und die zelluläre RNA isoliert. Jeweils 20 µg der RNA wurden in einem 1%igen Formaldehydgel aufgetrennt, auf eine neutrale Nylonmembran geblottet und mit einer radioaktiv-markierten *mdm2* bzw. *p21* DNA Sonde hybridisiert, die dann durch Exposition auf einem Röntgenfilm nachgewiesen wurden. Anschließend wurden die Sonden vollständig von der Membran entfernt und die RNA erneut mit einer spezifischen *18S-rRNA* Sonde hybridisiert, um die Beladung des Gels und den RNA Transfer auf die Membran verifizieren zu können.

B. Western Blot: Cl6 und P160 Zellen wurden bei der restriktiven (39°C) bzw. der permissiven Temperatur (30°C) kultiviert und anschließend in NP40 Lysispuffer extrahiert. 80 µg des Extraktes wurden in einem 12.5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, geblottet und das Mdm2 (etwa 90 kD) bzw. P21 Protein (21 kD) auf der selben Membran immundetektiert. Mdm2: mAb2A10, P21: mAbP21 (Pharmingen).

Das Cl6/P160 Zellsystem stellt daher ein Modellsystem dar, mit dem es möglich sein sollte, in einem annähernd isogenen Hintergrund Parameter zu definieren, die für die differentielle Induktion des endogenen *mdm2* Gens verantwortlich sind. Die Aufklärung dieser Faktoren war das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit.

4.1.2. Promotorspezifität der selektiven *mdm2* Transaktivierung im P160/Cl6 Zellsystem

Es sollte untersucht werden, ob die Faktoren, die für die differentielle Transaktivierung des *mdm2* Gens in den P160 und Cl6 Subklonen verantwortlich waren, spezifisch auf den Promotor des *mdm2* Gens wirkten oder auch die Induktion anderer P53 Zielgene (mit Ausnahme des *p21* Gens) modulierten.

Zur Klärung dieser Frage wurde in beiden Zelllinien die tsp53-induzierte Transkription weiterer P53 Zielgene im Northern Blot analysiert. Untersucht wurde die Expression der Gene *14-3-3-sigma, gadd45, b99* und *cyclin G*, welche Funktionen innerhalb des wtp53-abhängigen G2/M-Wachstumsarrestes besitzen, sowie *bax*, das eine Rolle während der wtp53-induzierten Apoptose spielt (Friedlander *et al*., 1996, Ludwig *et al*. , 1996).

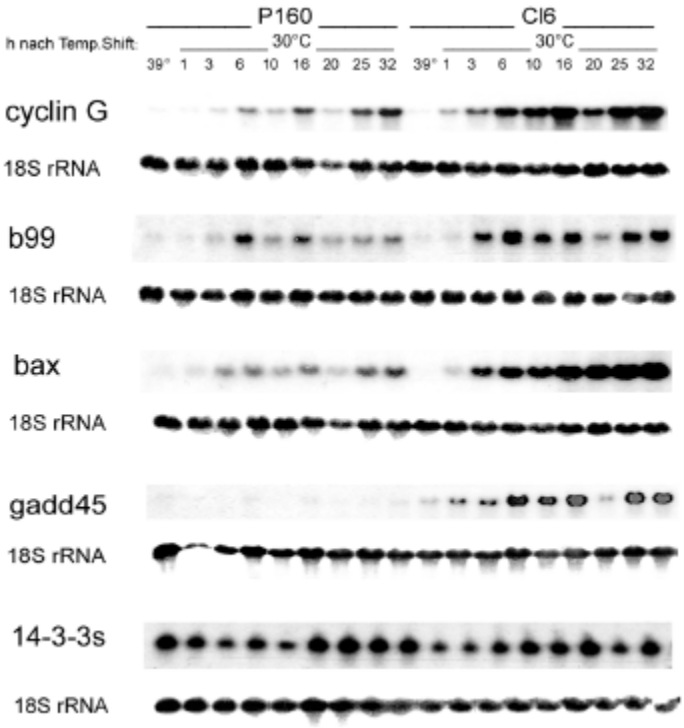


Abb. 4

Expression von P53 Zielgenen in den P160 und Cl6 Zellen nach Induktion von funktionellem tsp53*val135* Protein.

Northern Blots: Jeweils 20 µg der zellulären RNA aus Cl6 und P160 Zellen (39°C bzw. 30°C) wurden in einem 1%igen Formaldehydgel aufgetrennt, geblottet und mit radioaktiv-markierten *cyclin G, b99, bax, gadd45* bzw. *14-3-3 sigma* spezifischen DNA Sonden hybridisiert (pro Sonde ein Gel), die durch Exposition auf einem Röntgenfilm detektiert wurden. Anschließend wurde die jeweilige Sonde von der Membran entfernt und die RNA erneut mit einer spezifischen *18S-rRNA* DNA Sonde hybridisiert, um die Beladung zu verifizieren.

Wie die in Abb. 4 dargestellten Ergebnisse der Northern Blots zeigen, wurde in P160 und Cl6 Zellen ein Anstieg der Transkription der *cyclin G, b99* und *bax* Gene nach Induktion von funktionellem tsp53 Protein (39°C zu 30°C) nachgewiesen. Eine signifikante Transaktivierung des *gadd45* Gens wurde in Cl6 Zellen, nicht aber in P160 Zellen, beobachtet.

Um sicherzustellen, dass der durch den Temperaturshift von 39°C auf 30°C induzierte Anstieg der RNA Level in der Aktivität von funktionellem tsp53 Protein und nicht in der geringeren Temperatur (30°C) begründet war, wurden die RNA Level auch in nicht-transfizierten embryonalen Rattenfibroblasten der Linie REF52 bei 39°C und 30°C analysiert (siehe Abb. 5). Diese Untersuchung zeigte, dass ein (temperaturabhängiger) Anstieg der *mdm2, p21, cyclin G, bax* und *b99* RNA Level in diesen Zellen nicht beobachtet werden konnte.

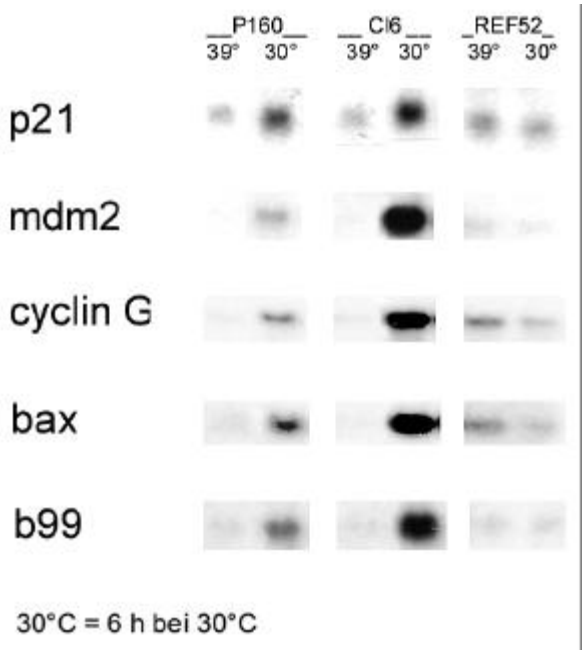


Abb. 5

Transkriptionelle Regulation der P53 Zielgene nach Temperaturshift von 39°C auf 30°C in tsp53*val135* exprimierenden P160 und Cl6 Zellen im Vergleich mit nicht transfizierten REF52 Zellen.

Northern Blots: Jeweils 20 µg der zellulären RNA aus P160, Cl6 Zellen und den nicht transfizierten embryonalen Rattenfibroblasten der Linie REF52 (39°C bzw. 30°C) wurden in einem 1%igen Formaldehydgel aufgetrennt, geblottet und mit spezifischen radioaktiv-markierten DNA Sonden gegen *p21, mdm2*, *cyclin G, bax* bzw. *b99* hybridisiert, die durch Exposition auf einem Röntgenfilm detektiert wurden.

Die Expression der *gadd45, cyclin G, b99* und *bax* Gene war in Cl6 Zellen im Vergleich mit P160 Zellen bei 30°C signifikant erhöht (Abb. 4). Die Radioaktivität der an die *14-3-3 sigma* RNA hybridisierten DNA Sonde wurde mit Hilfe des

Phosphorimagers quantifiziert (Daten nicht gezeigt). Diese Auswertung ergab, dass die Transkription des *14-3-3 sigma* Gens in Cl6 Zellen um den Faktor 2 nach dem Temperaturshift auf 30°C anstieg. Diese Erhöhung wurde als nicht signifikant eingestuft. Das *14-3-3 sigma* Gen, das beim wtp53-induzierten G2/M Wachstumsarrest eine Rolle spielt, steht wahrscheinlich im P160/Cl6 Zellsystem nicht unter der transkriptionellen P53 Regulation. Die P53-abhängige Transkription dieses Gens wurde bislang nur in humanen Zellinien beschrieben (Hermeking *et al*. , 1997).

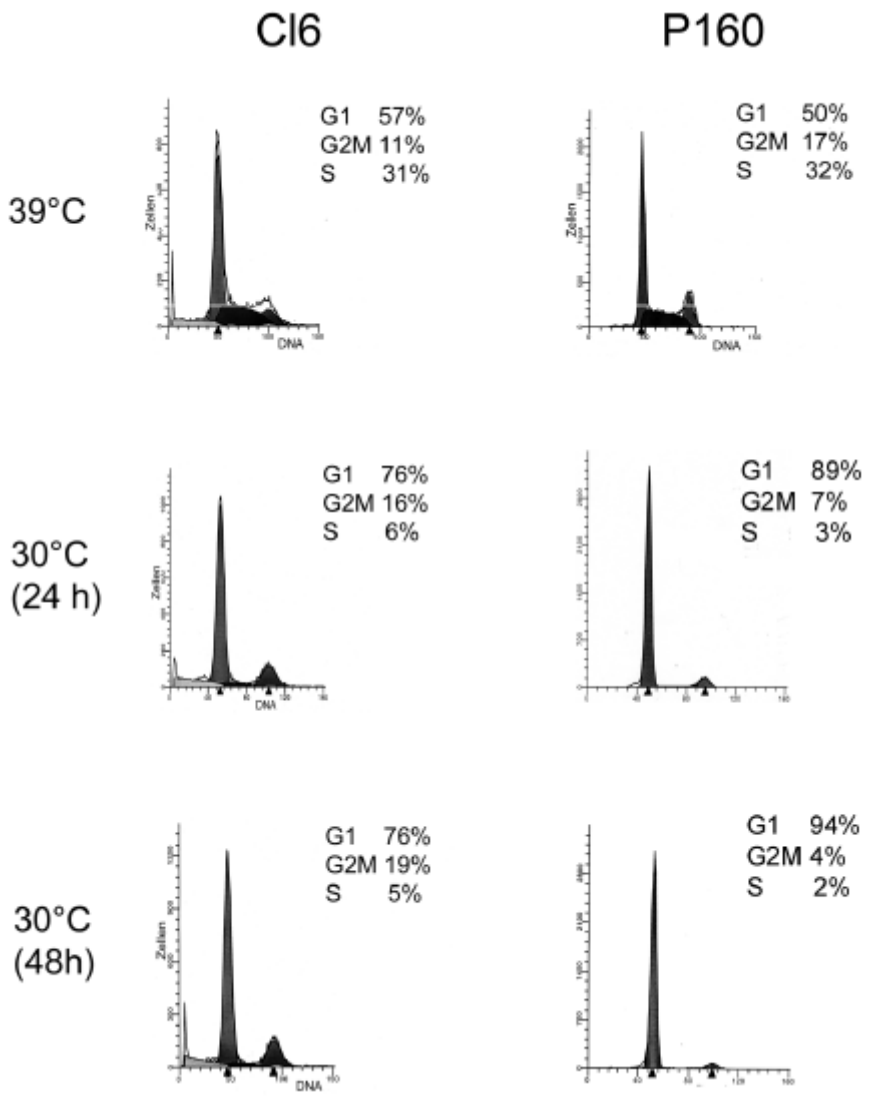
Die tsp53-abhängige Regulation der *mdm2, cyclin G, bax* und *b99* Gene erfolgte in beiden Subklonen in zwei „Aktivierungswellen" (Abb. 3 und Abb. 4). Die erste Transaktivierungswelle erreichte ihr Maximum etwa 6 – 10 h nach dem Temperaturshift auf 30°C. Die zweite Aktivierungswelle begann nach etwa 20 h.
Zusammenfassend zeigen die vergleichenden Expressionsanalysen in Cl6 und P160 Zellen, dass die zellulären Faktoren, die für die erhöhte Induktion des *mdm2* Gens in Cl6 im Vergleich mit P160 Zellen verantwortlich sind, auch die Induktion einer Reihe anderer P53 Zielgene (*b99, cyclin G, bax, gadd45*) positiv modulieren. Eine Ausnahme stellt die Induktion des *p21* Gens dar.

4.1.3. P160 und Cl6 Zellen zeigen unterschiedliches tsp53-abhängiges Zellzyklusverhalten bei 30°C

Das tsp53*val135* Protein in Cl6 und P160 Zellen zeigte unterschiedliche Aktivitäten bezüglich der Transaktivierung von Genen mit Funktionen im G2/M-Arrest (*b99, gadd45, cyclin G*). Demgegenüber war die Induktion des für den P53-abhängigen G1/S-Wachstumsarrest verantwortlichen *p21* Gens in beiden Subklonen vergleichbar. Untersucht werden sollte der Einfluss dieser differentiellen Expression auf das Zellzyklusverhalten nach Induktion von funktionellem tsp53 mit Hilfe der BrdU/Propidiumiodid-Doppelmarkierungsmethode (siehe 3.17.).
Die Zellen werden in Gegenwart von Bromodesoxyuridin (BrdU), einem Thymidin-Analogon, kultiviert. Die Zellen, die sich während der Inkubationszeit in der S-Phase des Zellzyklus (DNA Replikation) befinden, inkorporieren das aufgenommene BrdU in die genomische DNA. Nach Fixierung der Zellen wird die genomische DNA mit Säure behandelt, was zu einer partiellen Denaturierung der DNA führt. Das inkorporierte

BrdU wird dadurch in den einzelsträngigen DNA Bereichen exponiert. Dies ermöglicht die Andockung eines gegen das BrdU-gerichteten Primärantikörpers, der wiederum über einen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper detektiert wird. Anschließend werden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt, das in die doppelsträngigen Bereiche der genomischen DNA interkaliert und so den DNA Gehalt der jeweiligen Zelle markiert. Mit Hilfe eines Durchflusszytometers können die BrdU-negativen G1 und G2/M Zellen von den BrdU-positiven S-Phase Zellen aufgrund des DNA Gehalts (Propidiummarkierung) getrennt und quantifiziert werden.

A.



B.

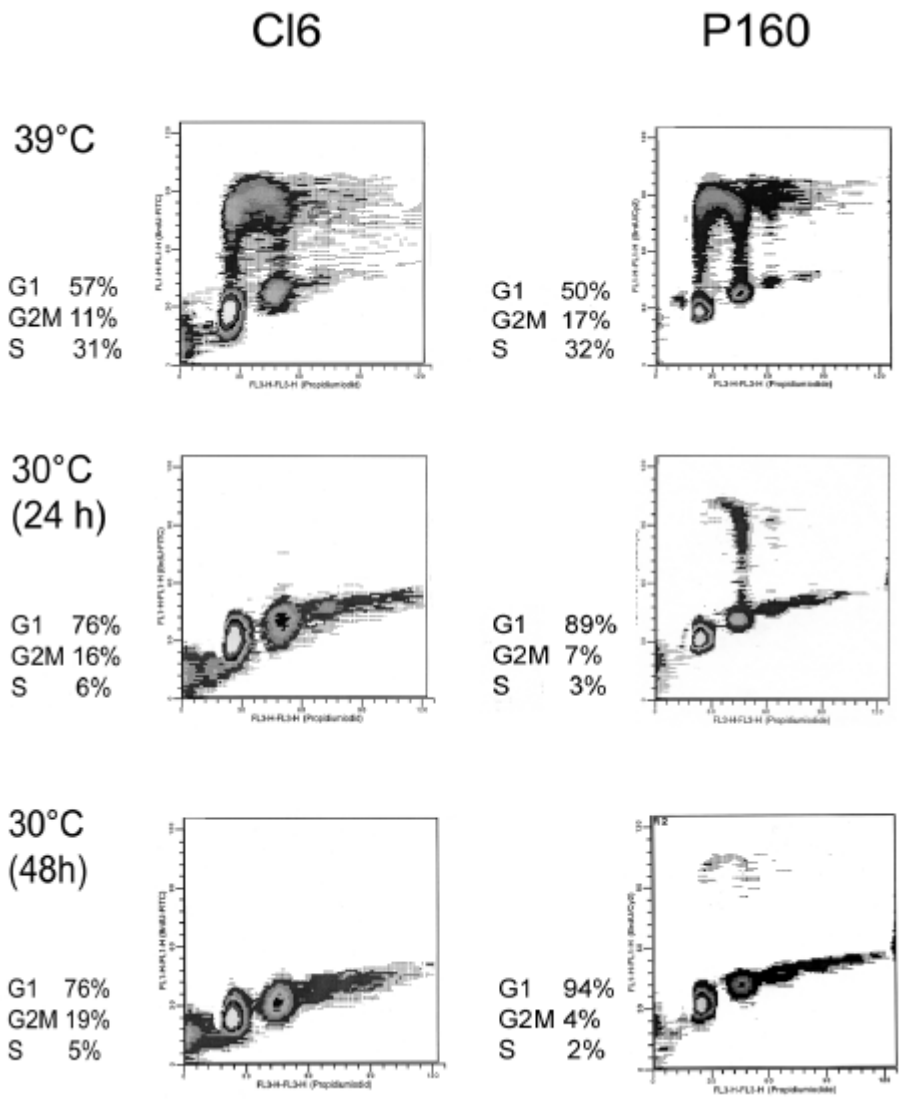


Abb. 6

Zellzyklusanalyse von Cl6 und P160 Zellen bei der restriktiven (39°C) bzw. permissiven Temperatur (30°C).

Cl6 und P160 Zellen wurden für 30 Minuten in 10µM BrdU für 30 Minuten bei 39°C bzw. 30°C inkubiert und in Ethanol fixiert. Anschließend wurde die DNA der fixierten Zellen für 20 Minuten mit 2N HCl denaturiert. Nach Neutralisierung erfolgte die *in situ* Immundetektion des inkorporierten BrdU (Grün) sowie die Färbung der genomischen DNA mit Propidiumiodid (Rot). Die G1-, S- bzw. G2/M Subpopulationen wurden mit Hilfe des Durchflusszytometers mit den entsprechenden Filtern (BrdU: FL-1 grün, Propidiumiodid: FL-3 rot) in einem Histogramm (Propiumiodid/Zellzahl) **(A)** oder in einem Dot-Plot Diagramm (BrdU / Propidiumiodid) **(B)** dargestellt und mit der CellQuest Software quantifiziert.

Abb. 6 stellt die Verteilung der bei 39°C bzw. 30°C markierten Cl6 und P160 Zellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus (G1-, S-, G2/M) in Form eines Histogramms (DNA Gehalt/Zellzahl) (Abb. 6 A) und als Dot Plot Diagramm (DNA Gehalt/BrdU) (Abb. 6 B) dar.

Eine vergleichbare Verteilung der Cl6 und P160 Zellen in den G1-, S- bzw. G2/M Phasen des Zellzyklus wurde bei der restriktiven Temperatur beobachtet (S-Phase ~ 32%, G1-Phase ~ 54% und G2/M-Phase ~ 14%). Die Induktion von funktionellem tsp53 (30°C) löste in beiden Subklonen einen Wachstumsarrest aus, der durch den stark erniedrigten Anteil von S-Phase Zellen (~ 2-5%) gekennzeichnet war (Abb. 6 A und 6 B).

Obgleich beide Zelllinien bei 30°C arretierten, konnten Unterschiede zwischen den Anteilen der in G1 und G2/M arretierten Subpopulationen festgestellt werden; etwa 94% der P160 Zellen arretierten in der G1 Phase des Zellzyklus, bei den Cl6 Zellen waren dies etwa 76%. In der G2/M Phase arretierten nach Induktion von funktionellem tsp53 etwa 19% der Cl6, jedoch nur 4% der P160 Zellen (Abb. 6 A, 48 h bei 30°C).

Das funktionelle temperatursensitive P53 war in beiden Subklonen in der Lage, in einem Teil der Zellen einen G1/S Wachstumsarrest zu induzieren. Im Gegensatz zu den P160 Zellen arretierten die Cl6 Zellen bei der permissiven Temperatur auch in der G2/M Phase (biphasischer Wachstumsarrest) (Abb. 6 A).

Die Entstehung eines P53-abhängigen G2/M Arrests in Cl6 Zellen korrelierte mit der, im Vergleich zu P160 Zellen, erhöhten Expression von G2/M Wachstumsarrest-Genen bei 30°C (Abb. 4).

4.1.4. Cl6 und P160 Zellen exprimieren zwei tsp53*val135* Proteine

Das tsp53 Protein induzierte in P160 und Cl6 Zellen eine differentielle Transaktivierung von P53 Zielgenen, die eine Arretierung dieser Zellen zur Folge hat, mit unterschiedlichen Anteilen von G1/S und G2/M Zellen in beiden Subklonen. Es konnte deshalb vermutet werden, dass die differentielle Transaktivierung und der daraus resultierende biologische Unterschied in P160 und Cl6 Zellen auf unterschiedliche biochemische und/oder biologische Eigenschaften des in diesen Zellen exprimierten tsp53 Proteins zurückgeführt werden kann. In einem ersten Schritt wurde das tsp53 Protein dieser Zellen bei 39°C und 30°C charakterisiert.

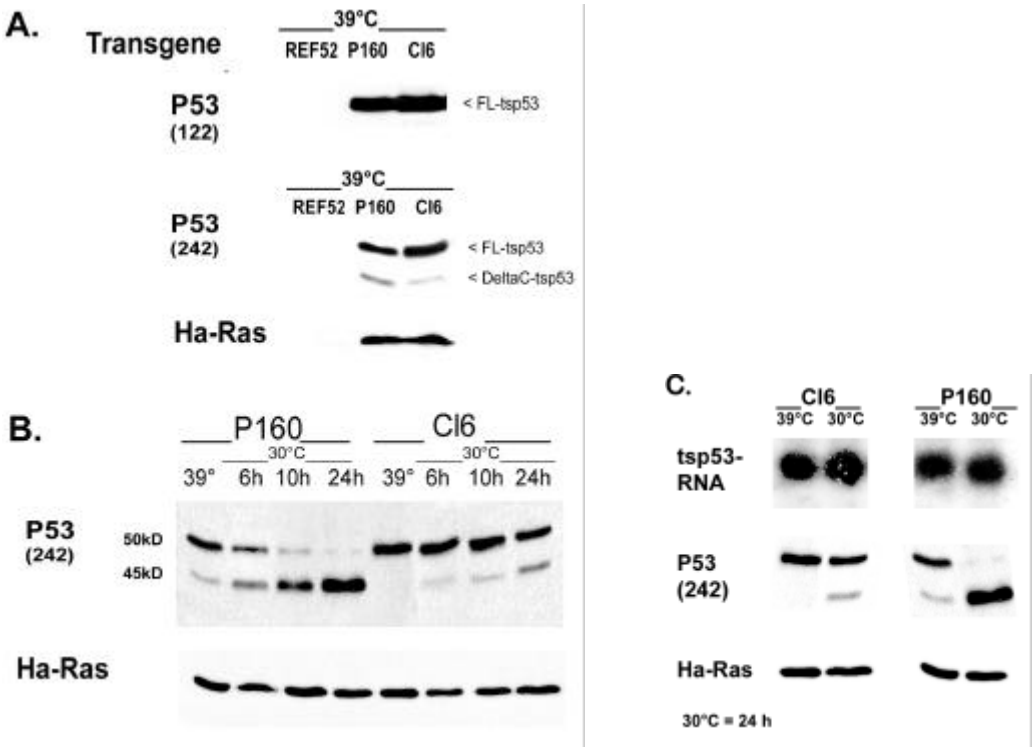


Abb. 7

Expression des transgenen temperatursensitiven P53*val135* und des EJ-Ras im Cl6/P160 Zellsystem bei 39°C (A+C) und 30°C (B+C).

A + B: Western Blots: 60 µg der Gesamtzellextrakte aus Cl6, P160 Zellen sowie den nicht transfizierten Rattenfibroblasten der Linie REF52 wurden in einem 12.5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, geblottet und das P53 bzw. Ha-ras immundetektiert. Monoklonale P53 Antikörper: 122 (C-terminales P53 Epitop), 242 (N-terminales P53 Epitop), Ha-Ras : anti-Ras (Calbiochem). Die Expression der Gene für *tsp53val135* und *EJ-Ras* wird durch einen vom Cytomegalovirus (CMV) abgeleiteten Promotor getrieben (Michalovitz *et al*., 1992).

C: Vergleich der *tsp53val135* Transkription und den P53 Proteinlevel in Cl6 und P160 Zellen bei 39°C und 30°C (24h). Northern Blot: 15 µg der zellulären RNA aus Cl6 und P160 Zellen (39°C und 30°C) wurden in einem 1%igen Formaldehydgel aufgetrennt, geblottet und mit einer radioaktiv-markierten DNA Sonde gegen *tsp53val135* RNA (3´-UTR des pLTRcg9 Vektors) hybridisiert, die durch Exposition auf einem Röntgenfilm detektiert wurden.

In Zellextrakten von Cl6 und P160 Zellen wurde im Western Blot neben dem regulären tsp53 Protein, das in der SDS-PAGE als 53 kD großes Protein wandert („full-length“ tsp53 Protein = FL-tsp53), ein kürzeres P53 (etwa 45 kD) nachgewiesen (Abb. 7 A). Letzteres wurde im Western Blot von monoklonalen Antikörpern, die gegen ein N-terminales P53 Epitop gerichtet sind, wie dem mAb242 (AS 18-27) oder mAb248 (AS 43-52, nicht gezeigt) erkannt, nicht aber von dem Antikörper mAb122, welches an den P53 C-Terminus bindet (AS 371-380) (Abb. 7 A). Demzufolge handelte es sich bei dieser P53 Variante um ein am C-Terminus verkürztes P53 (DeltaC-tsp53), welches nur in den transgenen EJ-Ras/tsp53 REF Zellen nachgewiesen werden konnte, nicht aber in den nicht-transfizierten embryonalen

Rattenfibroblasten der Linie REF 52 (Abb. 7 A). Dasselbe DeltaC-tsp53 wurde in drei weiteren, unterschiedlichen durch EJ-Ras transformierten tsp53*val135* REF Zellinien (P47, P164, P175, nicht gezeigt) exprimiert (Abb. 9). Daher konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Expression des DeltaC-tsp53 Proteins wahrscheinlich nicht um ein klonal auftretendes Ereignis (z.B. Trunkierung des *tsp53val135* Transgens) handelte.

In Cl6 und P160 Zellen konnte eine vergleichbare Transkription des transgenen *tsp53val135* Expressionsvektors (pLTRcg9) bei 39°C und 30°C (24h) beobachtet werden (Abb. 7 C, tsp53 RNA).
Der Temperaturshift von 39°C auf 30°C führte in beiden Subklonen zu einer Abnahme der FL-tsp53 und der Zunahme der DeltaC-tsp53 Steady State Proteinlevel (Abb. 7 B). Diese Verschiebung war in P160 Zellen deutlich stärker vorhanden (Abb. 7 B, 39°C und 30°C, 24h). Die *tsp53val135* RNA Level veränderten sich durch diesen Temperaturshift in beiden Subklonen nicht signifikant (Abb. 7 C).
Diese Daten zeigten, dass sich die Cl6 und P160 Subklone bei der permissiven Temperatur in den Proteinspiegeln des regulären FL-tsp53 Proteins und eines C-terminal verkürzten tsp53 Proteins unterschieden.

4.1.6. Produktion von murinem, C-terminal verkürztem P53 *in vitro*

Bei der gekoppelten *in vitro* Transkription/Translation von P53 in Retikulozytenlysaten, bei der eine Maus-wt P53 cDNA als Transkriptionssubstrat verwendet wurde, entstand neben dem FL-p53 ebenfalls ein C-terminal verkürztes P53 (Abb. 8). Diese P53 Form entsteht durch einen vorzeitigen Abbruch der Translation, verursacht durch RNA Sekundärstrukturen im *p53* Transkript (Mosner *et al*., 1995).
In vitro translatiertes und das in Cl6 Zellen produzierte DeltaC-tsp53 Protein wurde ^{35}S-radioaktiv markiert, mit dem N-terminalen P53 Antikörper mAb242 immunpräzipitiert und in einem 10%igen SDS-Polyacrylamid-Proteingel elektrophoretisch aufgetrennt.
Der Größenvergleich der verkürzten P53 Proteine zeigte, dass das *in vitro* und *in vivo* produzierte DeltaC-p53 Protein, nicht aber das reguläre P53 Protein, im SDS-Polyacrylamidgel unterschiedlich wanderte (Abb. 8). Post-translationale

Modifikationen führen in der Regel nicht zu einem veränderten Laufverhalten unter SDS-PAGE Bedingungen.

Aufgrund dieses Ergebnisses konnte vermutet werden, dass beide DeltaC-p53 Proteine durch unterschiedliche Mechanismen entstanden sind, d.h. das DeltaC-tsp53 Protein in Cl6 und P160 Zellen nicht mit einem vorzeitigen Translationsabbruch zu erklären ist.

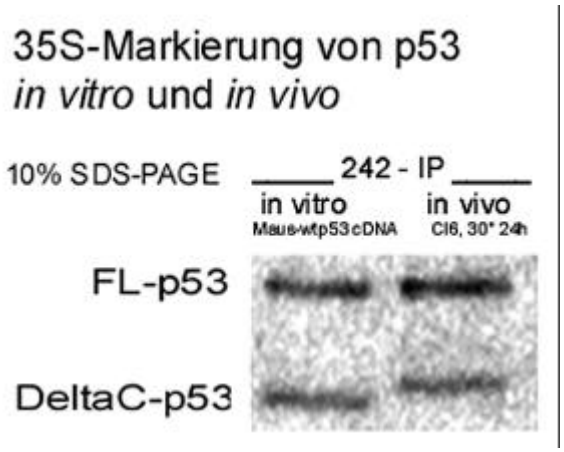


Abb. 8

Produktion von murinem, C-terminal verkürztem P53 *in vitro* und *in vivo*.

Cl6 Zellen wurden mit radioaktivem ^{35}S-Methionin/Cystein bei 30°C inkubiert, lysiert und das tsp53val135 Protein mit dem mAb242 Antikörper immunpräzipitiert. Murines wtp53 Protein wurde von einem P53 cDNA-Plasmid in Retikulozytenlysaten in Gegenwart von radioaktivem ^{35}S-Cystein *in vitro* translatiert und das P53 ebenfalls mit dem mAb242 Antikörper präzipitiert. *In vitro* und *in vivo* produziertes P53 Protein wurde in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und das Gel anschließend auf einen Kodak Röntgenfilm über Nacht exponiert.

4.1.5. Produktion von DeltaC-tsp53 *in vivo*

Es sollte die Frage beantwortet werden, ob es sich bei der Expression des DeltaC-tsp53 Proteins um ein pLTRcg9-Vektor bzw. die tsp53*val135* Mutanten spezifisches Phänomen handelte oder diese vielmehr vom zellulären Hintergrund abhängig war.

Um diese Frage zu beantworten, wurde der P53 Status in verschiedenen tsp53*val135* exprimierender Zellinien aus der Maus (Fibroblasten: 10(1), MethA) sowie der Ratte (Fibroblasten: F111, primäre REF +/- SV40, Glioma: C6) untersucht. Einige der Rattenfibroblasten enthielten neben dem *tsp53 val135* ein integriertes *SV40* oder das onkogene *EJ-Ras*.

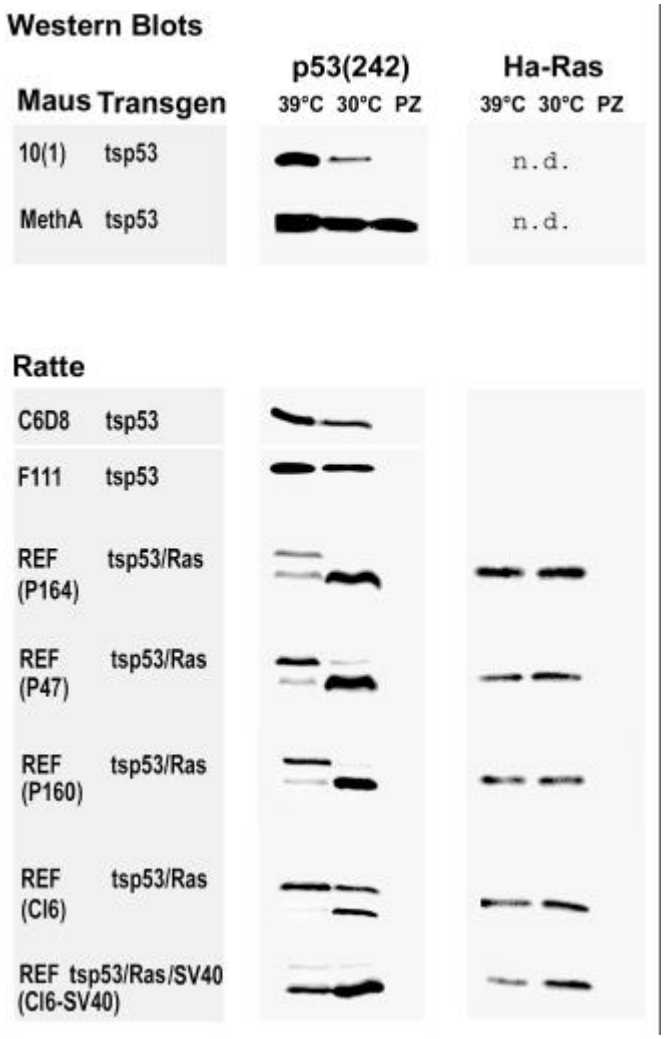


Abb. 9

Expression des transgenen tsp53*val135* Proteins in etablierten Zellinien aus der Maus und der Ratte.

Western Blots: 80µg der Gesamtzellextrakte aus bei 39°C oder 30°C (24h) kultivierten Zellen wurden in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, geblottet und P53 sowie Ha-ras mit den Antikörpern 242 bzw. Ha-Ras immundetektiert.
PZ = Parentale Zellinie, n.d. = nicht detektiert, tsp53 = tsp53*val135*, REF = Rattenembryofibroblasten.
C6D8: Neuroblastomazelline, F111 und REF: Fibroblasten.

DeltaC-tsp53 konnte lediglich in den EJ-Ras-transformierten, embryonalen Rattenfibroblasten P164, P47, P160, Cl6 detektiert werden (Abb. 9).

In Cl6 Zellen, die neben *tsp53val135* und *EJ-Ras* ein stabil im Genom integriertes SV40 enthalten (SV40-Cl6 Zellen), wurde eine Verschiebung des FL-tsp53/DeltaC-tsp53 Verhältnisses auf die Seite des verkürzten P53 bei 39°C und 30°C beobachtet (Abb. 9). In C57SV Zellen, einer SV40 transformierten Mausfibroblastenzellinie der

Linie C57BL/6, wurde dasselbe C-terminal verkürzte P53 beschrieben (Knowles *et al.,* 1979, Henning, 1998).
Diese vergleichenden Studien zeigten, dass die Expression von DeltaC-tsp53 kein pLTRcg9- bzw. tsp53val135 inhärentes Phänomen darstellt, sondern in Abhängigkeit vom zellulären Hintergrund stattfindet.

4.1.7. Alternative Prozessierung des *tsp53val135* RNA Primärtranskripts ist nicht für die Entstehung von DeltaC-tsp53 verantwortlich

Die alternative Prozessierung des RNA Primärtranskripts ermöglicht die Herstellung verschiedener mRNAs, die sich durch das Vorhandensein oder Fehlen bestimmter Exons unterscheiden. Sie kodieren somit für verschiedene, aber verwandte Proteine, die sich durch An- oder Abwesenheit von Blöcken von Aminosäuren unterscheiden. Auf diese Weise wird durch den Vorgang der alternativen RNA Prozessierung die Kodierungskapazität eines Gens um das Vielfache gesteigert (Review Knippers *et al*., 1999).

Die alternative Prozessierung des murinen *p53* RNA Primärtranskripts wurde u.a. von Arai *et al.* (1986) beschrieben. Dieses alternativ prozessierte Transkript enthält nach dem Exon10 96 zusätzliche Nukleotide, die von der genomischer DNA zwischen Exon10 und 11 (Intron 10) kodiert werden. Der 3´ UTR (Untranslated Region) bleibt in dem alternativ prozessierten Transkript erhalten. Der 3´UTR enthält u.a. die für die Polyadenylierung der RNA notwendige DNA-Signalsequenz. Die Polyadenylierung ist u.a. für die Stabilität der prozessierten RNA (mRNA) verantwortlich.
Das von dem alternativ prozessierten Transkript kodierte P53 Protein (P53AS) hat eine Länge von 381 Aminosäuren. Die 26 C-terminalen Aminosäuren des regulären P53 Proteins sind im P53AS Protein durch die von Intron 10 kodierten 17 Aminosäuren ersetzt. Das Epitop des mAb421 Antikörpers ist auf P53AS nicht vorhanden (Arai *et al*., 1986).
Das für die Produktion des alternativ prozessierten *p53* Transkripts notwendige Intron 10 ist in dem pLTRcg9 Expressionsvektor, der das tsp53*val135* Protein kodiert, nicht enthalten. Dadurch kann die von Arai *et al*. (1986) beschriebene alternative

Prozessierung des *tsp53val135* RNA Primärtranskripts in Cl6 und P160 Zellen nicht stattfinden.

DeltaC-tsp53 enthält das Epitop des monoklonalen Antikörpers mAb240 (AS 213-217), das vom Exon 6 des *tsp53val135* Gens kodiert wird, nicht jedoch das des C-terminalen mAb122 Antikörpers (AS 371-380). Das mAb122 Epitop wird von dem Exon 11 kodiert (Abb. 10). Es sollte die Frage beantwortet werden, ob die Produktion von DeltaC-tsp53 auf eine, innerhalb des C-terminalen Teils des *tsp53val135* Primärtranskripts (zwischen Exon 6 und Exon 11) stattfindende alternative Prozessierung zurückgeführt werden konnte.

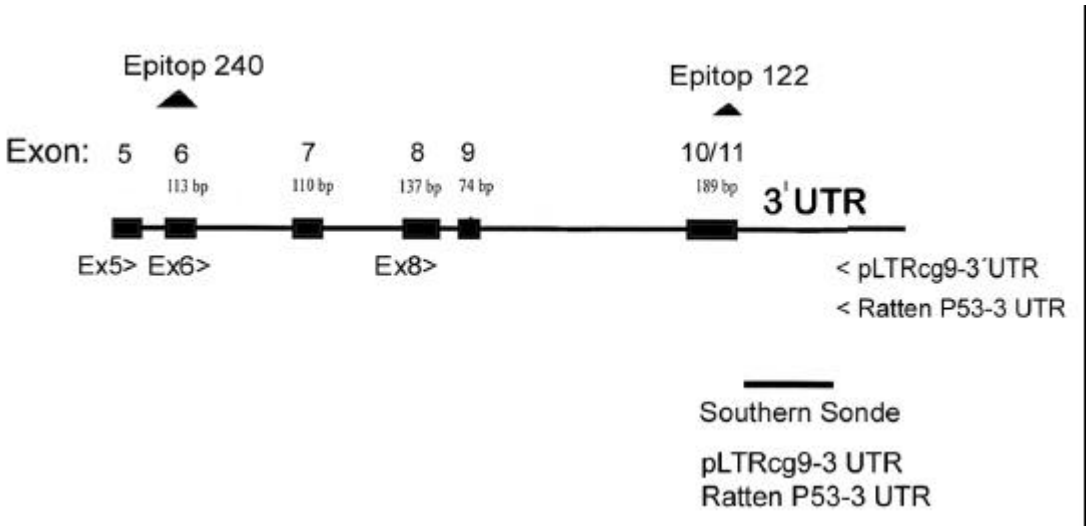


Abb. 10

Karte des *tsp53val135* Gens im pLTRcg9 Expressionsvektor, der in den Cl6 und P160 Zellen stabil im Genom integriert ist.

Bei dem mRNA Transkript werden die Intronbereiche durch alternative Prozessierung des Primärtranskripts entfernt.
> und < = Position des Primers auf dem Vektor, UTR = Untranslated Region, Ex = Exon.

Die RNA aus Cl6 Zellen (30°C, 24h) und den nicht-transfizierten Rattenfibroblasten der Linie F111 (37°C) wurde zunächst isoliert und die P53 mRNA mit Hilfe von P53 Exon-spezifischen Primern in einzelsträngige cDNA umgeschrieben (siehe 3.13.1.). In der Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde diese cDNA mit den selben P53 Exon-Primern sowie pLTRcg9- bzw. Ratten *p53*-3´ UTR spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert. Mit Hilfe der spezifischen 3´ UTR Primer konnte zwischen der endogenen P53 und der tsp53*val135* cDNA diskriminiert werden. Die

PCR Produkte wurden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Die Identität der Amplikons wurde durch Hybridisierung radioaktiv mit ^{32}P markierten pLTRcg9- bzw. Ratten *p53* 3´UTR spezifischen DNA Sonden verifiziert.

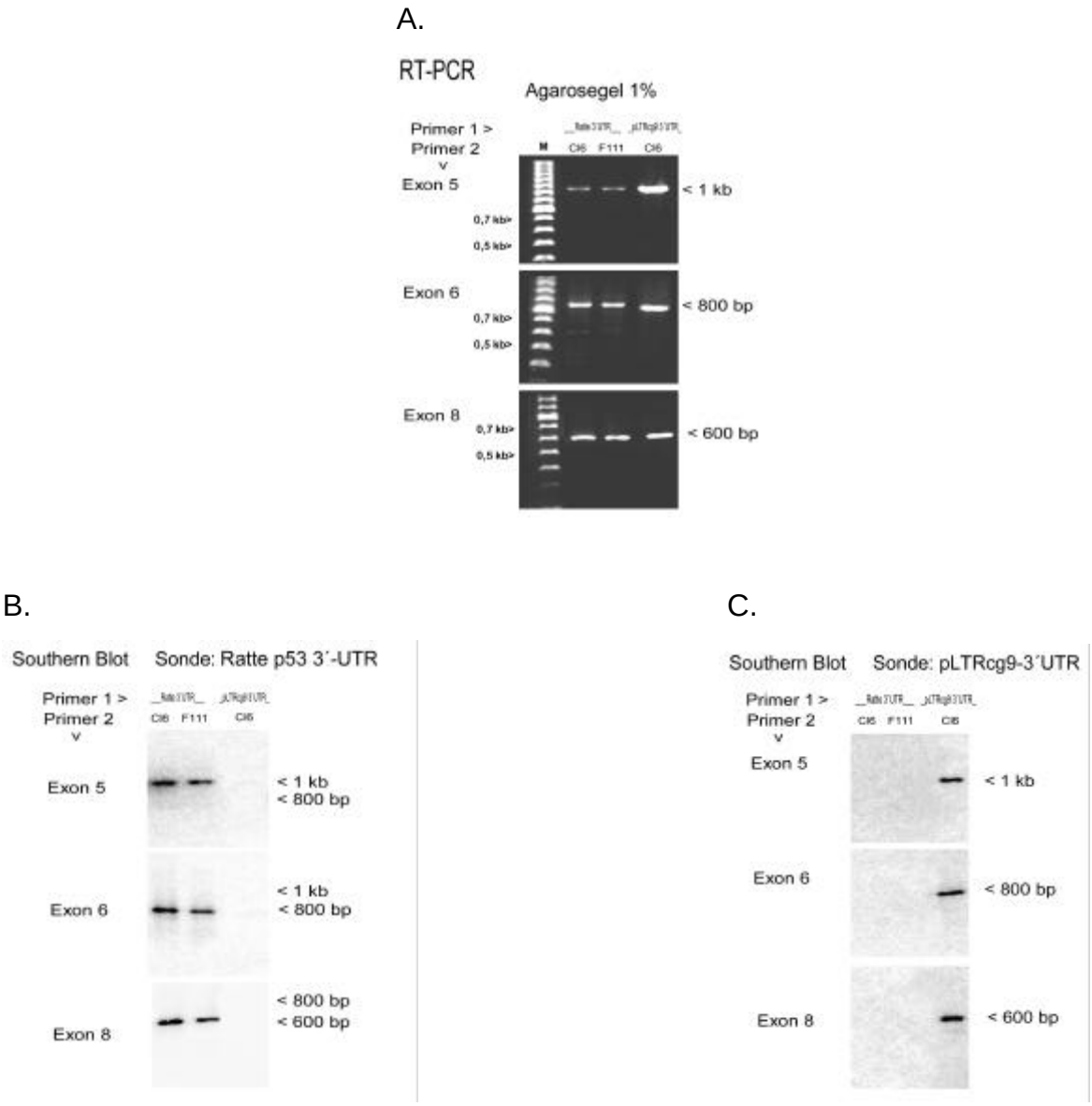


Abb. 11

Analyse des C-Terminus der P53 mRNA aus Cl6 Zellen und den Rattenfibroblasten F111 mit Hilfe der RT-PCR.

Zelluläre RNA wurde aus Cl6 Zellen (24h bei 30°C) bzw. der Rattenfibroblastenzellinie F111 isoliert und die P53 spezifische RNA mit P53 Exon5-, Exon6- bzw. Exon8-spezifischen Oligonukleotiden und der Reversen Transkriptase in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die cDNA in der PCR mit den selben Exon-spezifischen und pLTRcg9 bzw. Ratten P53 3´ UTR-spezifischen Primern amplifiziert. Der pLTRcg9 3´UTR ist von dem SV40 abgeleitet und enthält das virale Polyadenylierungssignal (Michalovitz *et al.,* 1992). Nach Auftrennung der Amplikons in einem 1%igen Agarosegel **(A)**, wurde die DNA auf eine neutrale Nylonmembran transferiert und mit radioaktiv-markierten Ratten P53 **(B)** bzw. pLTRcg9 **(C)** 3´UTR Sonden hybridisiert, um zwischen tsp53*val135* und endogenem Ratten P53 DNA diskriminieren zu können. M = 100 bp DNA Leiter.

Mit Exon- und pLTRcg9-3´ UTR-spezifischen Primern konnte in der PCR Amplifikation der P53 cDNA lediglich das Fragment, welches exakt dem des nicht-prozessierten *tsp53val135* mRNA Transkripts entsprach, amplifiziert werden (Abb. 11 A und C). Dasselbe traf auch für das endogene Ratten *p53* mRNA Transkript der F111 und Cl6 Zellen zu (Abb. 11 A und B). Ein zwischen Exon 6 und Exon 11 alternativ prozessiertes P53 Transkript hätte parallel mit dem nicht-prozessierten P53 Transkript bzw. cDNA in der PCR amplifiziert werden müssen.
Eine alternative Prozessierung des *tsp53val135* Primärtranskripts konnte demnach als Ursache für die Entstehung des DeltaC-tsp53 Proteins ausgeschlossen werden.

4.1.8. DeltaC-tsp53 ist im Zellkern lokalisiert und besitzt eine ausschließlich wt-ähnliche Proteinkonformation

Damit das tsp53 Protein an die P53 Bindungsstelle des Zielgen Promotors binden und dessen Expression induzieren kann, ist zum einen die nukleäre Lokalisierung, zum anderen eine wt-ähnliche Proteinkonformation erforderlich.
Für die Translokation in den Nukleus ist das Zellkernimportsignal NLS1 (NLS = Nuclear Localization Signals) verantwortlich. Dies ist am P53 C-Terminus (AS 305 – 322) lokalisiert und bindet an den Importrezeptor des Zellkerns (Shaulsky *et al*. , 1990). Es sollte untersucht werden, ob DeltaC-tsp53 in der Lage war, in den Zellkern zu translozieren.

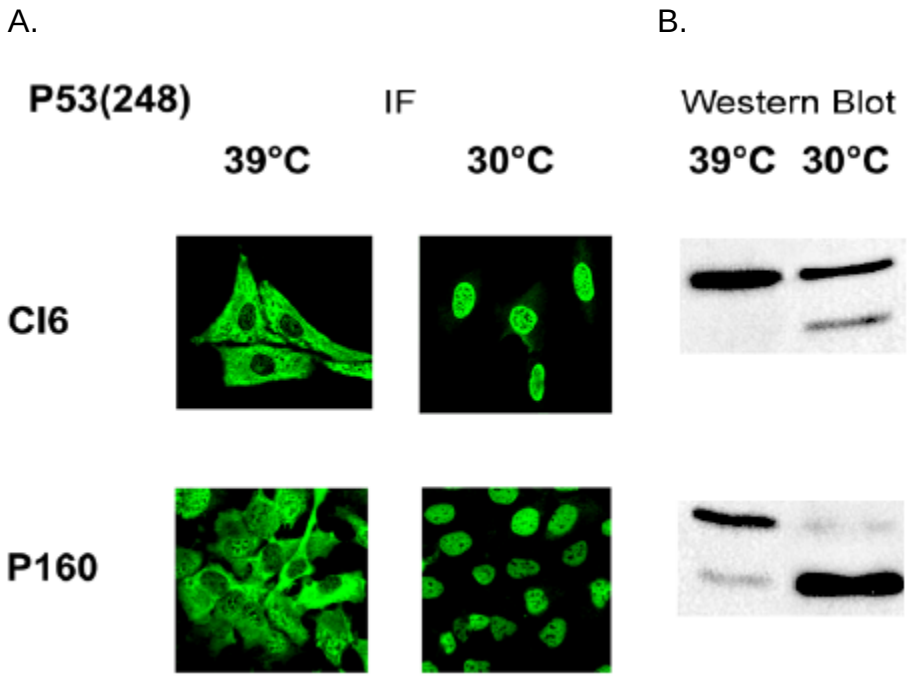


Abb. 12

Subzelluläre Lokalisierung des temperatursensitiven P53 Proteins in Cl6 und P160 Zellen.

Cl6 und P160 wurden bei 39°C bzw. für 24h bei 30°C inkubiert.

A. Immunfluoreszenz: Nach Fixierung der Zellen in Ethanol erfolgte die Inkubation mit dem P53 spezifischen mAb248 Antikörper. Der Primärantikörper wurde anschließend durch Bindung eines Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundärantikörpern detektiert.

B. Western Blots: 60 µg des Gesamtzellextraktes aus Cl6 bzw. P160 Zellen wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, geblottet und P53 mit dem mAb248 Antikörper immundetektiert. Bei der hier dargestellten Exposition ist das DeltaC-tsp53 in den Cl6 Zellen bei 39°C nicht zu erkennen.

Abb. 12 A stellt eine *in situ* Immunfluoreszenzdetektion (IF) von tsp53 in Cl6 und P160 Zellen bei 39°C bzw. 30°C dar. Die fixierten Zellen wurden mit dem monoklonalen mAb248 Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper bindet an den N-Terminus von P53 und erkennt das FL-tsp53 und DeltaC-tsp53 Protein (Abb. 12 B). Das endogene wtp53 Protein der Rattenfibroblasten kann aufgrund der sehr geringen Konzentration unter den gegebenen Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Der gebundene mAb248 Primärantikörper wurde anschließend durch Bindung eines Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundärantikörpern detektiert.

Das tsp53 Protein der Cl6 und P160 Zellen war bei der restriktiven Temperatur fast ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert (Abb. 12 A). Bei 30°C akkumulierten die über den mAb248 Antikörper detektierten tsp53 Proteine (FL- und DeltaC-tsp53) *vollständig* im Zellkern. DeltaC-tsp53 konnte demnach, wie FL-tsp53, bei 30°C in den

Zellkern translozieren. Die C-terminale Verkürzung des DeltaC-tsp53 muss demzufolge zwischen dem Zellkernimportsignal NLS1 (AS 322) und dem mAb122 Epitop (AS 371) stattfinden.

Die Proteinkonformation von DeltaC-tsp53 wurde mit Hilfe der monoklonalen P53 Antikörper mAb246 und mAb240 analysiert. Das sequenzielle Epitop des Antikörpers mAb240 (AS 213 - 217) wird nicht von dem wtp53 Protein, sondern nur auf denaturiertem Protein exponiert (Yewdell *et al*., 1986, Gannon *et al.,* 1990, Stephen *et al.,* 1992). Das Epitop des mAb246 Antikörpers ist hingegen ein Konformationsepitop, das nur von P53 mit einer wt-Konformation gebildet wird (Yewdell *et al*., 1986, Gannon *et al.*, 1990, Lane *et al*., 1996).
Das tsp53 Protein aus Extrakten von Cl6 Zellen (39°C und 30°C) wurde mit Hilfe von an Protein A Sepharose (PAS) gekoppeltem mAb246 bzw. mAb240 Antikörper immunpräzipitiert, in der SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Das präzipitierte P53 wurde mit einem polyklonalen P53 Antikörper detektiert.

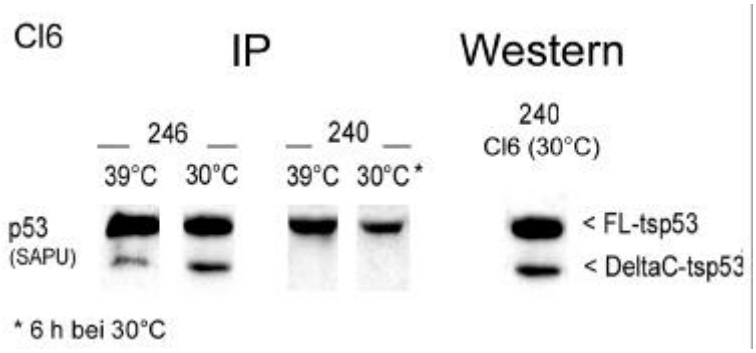


Abb. 13

Proteinkonformation des tsp53 Proteins in Cl6 Zellen.

IP-Western: Natives P53 wurde mit an PAS-gebundenem konformationsspezifischen Antikörper mAb246 (wt) bzw. mAb240 (mt) aus 80 µg des Cl6 Gesamtzellextrakts (39°C bzw. 30°C) präzipitiert und in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. P53 wurde mit einem polyklonalen P53 Antikörper (SAPU) detektiert. Für den Western wurden 80µg des Extraktes in Natriumdodecylsulfat denaturiert, im SDS-PAGE aufgetrennt und das P53 mit dem mAb240 immundetektiert.

Diese Immunpräzipitationen zeigten, dass DeltaC-tsp53 von dem wt-konformationsspezifischen mAb246, nicht aber von dem mAb240 Antikörper, erkannt wird (Abb. 13). Der mAb240 Antikörper konnte DeltaC-tsp53 nur dann binden, wenn es zunächst in Natriumdodecylsulfat (SDS)-Puffer denaturiert wurde (Abb. 13, Western). DeltaC-tsp53 besitzt demnach eine wt-ähnliche Konformation und ist bei

30°C, wie das FL-tsp53 Protein, im Zellkern lokalisiert und könnte prinzipiell als potentieller Transkriptionsfaktor in Cl6 und P160 Zellen fungieren.

4.1.9. DeltaC-tsp53 besitzt keine sequenz-spezifische DNA Bindungsaktivität *in vitro* und *in vivo*

Die Bindung des wtp53 Proteins an die P53 Bindungsstelle (2x PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy mit 0 - 13 bp Spacer, Pu = Purin, Py = Pyrimidin) innerhalb des Promotors eines Zielgens, ist Voraussetzung für seine Funktion als Transkriptionsfaktor (El-Deiry *et al*., 1992). Es sollte die Frage beantwortet werden, ob DeltaC-tsp53 an die P53 Bindungsstelle des *p21* (5´-gaacatgtct tgacttgttc-3´) bzw. des *mdm2* Promotors (5´-ggtcaagttaggacacgttc – 17 bp – gagctaagtcctgacatgtct-3´) *in vivo* (4.1.10) bzw. *in vitro* (4.1.11.) binden kann.

4.1.10. Bindung der tsp53*val135* Proteine an die chromosomalen *p21* und *mdm2* Promotoren: Chromatin-Immunpräzipitation

Mit der Methode der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) ist es möglich, die Bindung eines Proteins an einen definierten Bereich der genomischen DNA (z.B. Promotor) unter *in vivo* Bedingungen zu analysieren.

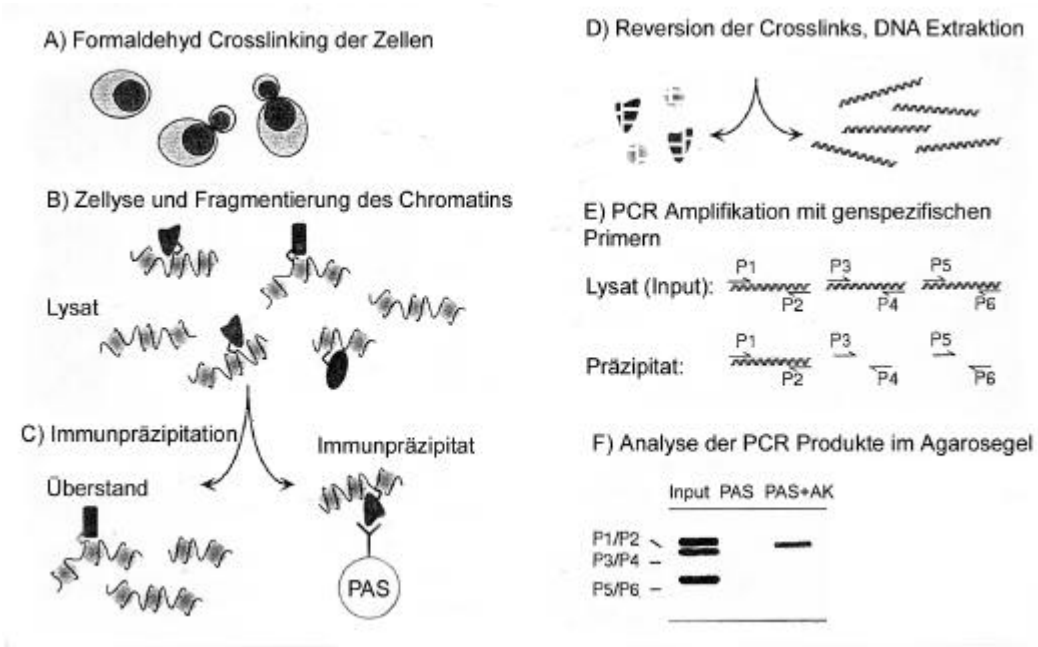


Abb. 14

Chromatin-Immunpräzipitation. Erklärung siehe Text (modifiziert nach Grange, T. *et al*., 1999).

Im ChIP Assay werden an genomische DNA gebundene Proteine durch Behandlung der Zellen mit Formaldehyd fixiert (Abb. 14 A). Anschließend wird die DNA durch Ultraschall-Behandlung fragmentiert (Abb. 14 B). Das gewünschte Protein X wird mit Hilfe eines an PAS gekoppelten, spezifischen Antikörpers, der gegen das Protein X gerichtet ist, aus dem Chromatinlysat präzipitiert (Abb. 14 C). Danach wird die durch das Formaldehyd fixierte Bindung zwischen dem Protein X und der genomischen DNA aufgebrochen und die DNA präzipitiert (Abb. 14 D). Um die Bindung eines definierten DNA Abschnitts der genomischen DNA an das Protein X quantifizieren zu können, wird die präzipitierte DNA in einer semi-quantitativen PCR mit spezifischen Primern amplifiziert (Abb. 14 E) und gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 14 F). Die Menge der amplifizierten DNA gibt Hinweise über die *in vivo* Bindung des Proteins X an den jeweiligen DNA Abschnitt (Szak *et al*., 2001).
Mit dem ChIP Assay sollte es daher möglich sein, die Bindung von DeltaC-tsp53 an die P53 Bindungsstelle des *p21* bzw. *mdm2* Promotors relativ zum FL-tsp53 im Kontext des Chromatins zu analysieren.

Cl6 bzw. P160 Zellen wurden bei 39°C sowie 30°C mit Formaldehyd fixiert. Das Chromatin der Zellen wurde isoliert, fragmentiert und die tsp53/DNA Komplexe durch Immunpräzipitation mit dem mAb122 bzw. mAb242 Antikörper aus dem Lysat isoliert. Als Negativ-Kontrolle für die IP wurde das Chromatinlysat nur mit PAS präzipitiert. Nach Reversion der Crosslinks wurde die tsp53-gebundene DNA mit *p21* sowie *mdm2* Promotor-spezifischen Primern in der PCR amplifiziert und die DNA (*mdm2* = 186 bp, *p21* = 136 bp) gelelektrophoretisch aufgetrennt und analysiert (Abb. 15).

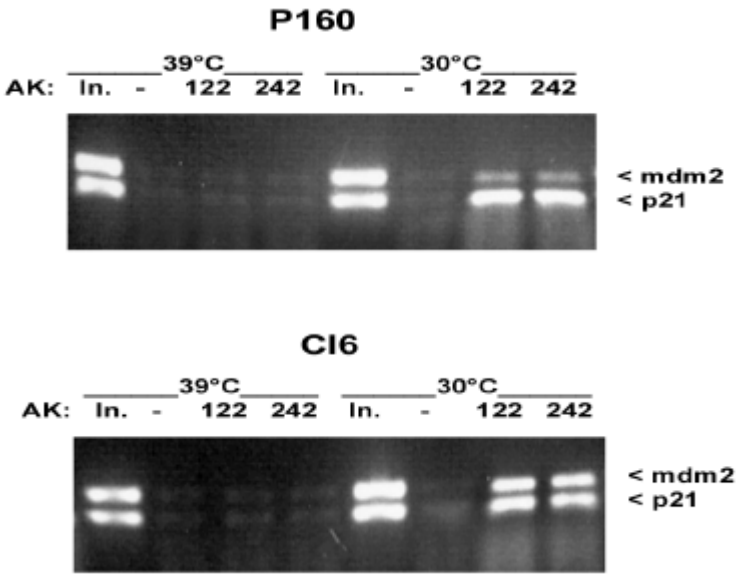


Abb. 15

Bindung der tsp53*val135* Proteine an die chromosomalen *p21* und *mdm2* Promotoren in P160 und Cl6 Zellen.

Chromatin-Immunpräzipitation: Auftrennung der PCR amplifizierten mAb122 bzw. mAb242–immunpräzipitierten *p21* und *mdm2* Promotor-DNA in einem 1,5%igen Agarosegel. Erklärung siehe Text. In. = PCR-amplifizierte genomische Input-DNA, AK = Antikörper, der in der IP eingesetzt wurde, (-) = IP mit PAS ohne AK.

In den mAb122- bzw. mAb242-präzipitierten Immunkomplexen aus Zellen ohne funktionelles tsp53 Protein (39°C), konnte mit Hilfe der semi-quantitativen PCR keine *p21* und *mdm2* spezifische Promotor DNA amplifiziert werden. Dasselbe galt auch für die IP, die lediglich mit PAS (ohne P53 Antikörper) durchgeführt wurde (Negativ-Kontrollen) (Abb. 15).

In den mAb122-präzipitierten FL-tsp53 Immunkomplexen aus Cl6 und P160 Zellen mit funktionellem tsp53 Protein (30°C) wurde *p21* und *mdm2* spezifische Promotor DNA amplifiziert (Abb. 15, 30°C). Für die Beantwortung der Frage nach der *in vivo* DNA Bindung von DeltaC-tsp53 war wichtig, dass keine quantitativen Unterschiede zwischen mAb242- und mAb122-präzipitierter *p21* und *mdm2* spezifischer Promotor DNA nachgewiesen wurden (Abb. 15). Eine Bindung von DeltaC-tsp53 an den *p21* und/oder den *mdm2* Promotor wäre dadurch angezeigt, dass mit dem mAb242 Antikörper, der die FL-tsp53 und DeltaC-tsp53 Proteine erkennt, quantitativ mehr von der jeweiligen Promotor-DNA aus dem Lysat präzipitiert hätte werden müssen als mit dem mAb122 Antikörper, der lediglich das FL-tsp53 Protein bindet.

Eine Bindung des verkürzten tsp53 Proteins an die *p21* bzw. *mdm2* Promotoren findet *in vivo* demnach nicht statt.
Während die Promotoren des *p21* und *mdm2* Gens in den Cl6 Zellen (30°C) mit FL-tsp53 Protein vergleichbar beladen waren, war in P160 Zellen die Beladung des *mdm2* Promotors mit FL-tsp53 im Vergleich zum *p21* Promotor signifikant reduziert (Abb. 15, 30°C, mAb122 IP). Die DNA Bindung des FL-tsp53 Proteins korrelierte direkt mit der in Cl6 und P160 Zellen beobachteten differentiellen tsp53-abhängigen Transaktivierung beider Gene (Abb. 3).

4.1.11. DeltaC-tsp53 DNA Bindung im DNA Protektionsassay

Mit Hilfe des DNA Protektionsassays sollte die DNA Bindungsaktivität von DeltaC-tsp53 *in vitro* direkt analysiert werden. Mit dieser Methode kann die Bindung eines Proteins an eine spezifische DNA Bindungsstelle, z.B. innerhalb eines klonierten Promotors, *in vitro* analysiert werden.
Nach Bindung des Proteins an seine DNA Bindungsstelle wird die DNA partiell mit DNase I verdaut. Das gebundene Protein verhindert den Verdau des protektierten DNA Bereiches. Anschließend wird ein am 5´-Ende radioaktiv markiertes Oligonukleotid (das in der Nähe der Bindungsstelle hybridisiert) an die fragmentierte DNA hybridisiert und von einer DNA Polymerase verlängert. Die protektierten DNA Bereiche werden nach Auftrennung der synthetisierten DNA in einem denaturierenden Polyacrylamidgel und anschließender Autoradiografie, als „Lücken“ innerhalb der DNA Fragmentleiter sichtbar. Die genaue Position der Bindungsstelle des Proteins kann durch direkten Vergleich mit der parallel im Gel aufgetrennten Sequenzierungsreaktion, für die das selbe Oligonukleotid und Plasmid eingesetzt wurde, in der Fragmentleiter lokalisiert werden.

Für den DNA Protektionsassay wurde der Teil des *mdm2* Promotors, der die P53 Bindungsstelle enthält, aus der genomischen DNA von Cl6 Zellen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und in ein Plasmid kloniert (siehe Material und Methoden). Der Promotor des Ratten *p21* Gens wurde freundlicherweise von Prof. Bert Vogelstein zur Verfügung gestellt.
Die DNA Bindungsaktivität des DeltaC-tsp53 Proteins sollte im DNA Protektionsassay mit einem Zellkernextrakt der EJ-Ras transformierten tsp53 REF

Zellen untersucht werden. Im Gegensatz zu aufgereinigtem DeltaC-tsp53 hat die Verwendung eines Zellkernextrakts den Vorteil, dass die DNA Bindung des verkürzten tsp53 Proteins in Gegenwart zellulärer Protein-Kofaktoren, die *in vivo* die DNA Bindung modulieren, untersucht werden kann.
Zellkernextrakte wurden aus Cl6 Zellen hergestellt, die für 5 h bei 30°C kultiviert wurden. Um sicher zu stellen, dass equimolare Mengen von Mdm2-freiem, aktivem FL-tsp53 und DeltaC-tsp53 Protein in dem Zellkernextrakt vorhanden waren, wurde aus einem Aliquot dieses Extrakts das Mdm2 Protein vollständig immundepletiert, die ungebundenen tsp53 Proteine mit dem mAb246 Antikörper präzipitiert und die Immunkomplexe in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb. 14 A).

Da beide P53 Formen (FL-tsp53 und DeltaC-tsp53) in dem Zellkernextrakt vorhanden waren, musste eine Strategie entwickelt werden, die es ermöglichte, die im DNA Protektionsassay gemessenen DNA Bindungsaktivitäten der dafür verantwortlichen P53 Form zuordnen zu können.
Das FL-tsp53 Protein wurde durch sequentielle Immunpräzipitation mit dem an Protein A-Sepharose gekoppelten mAb421 Antikörper (C-terminales P53 Epitop) vollständig aus einem Aliquot des Zellkernextraktes entfernt. Dieser Extrakt wurde im DNA Protektionsassay als „DeltaC-tsp53 Extrakt“ eingesetzt (Abb. 16 B, 421). Ein „P53-negativer Extrakt“ wurde parallel durch Immunpräzipitation des Extrakts mit dem N-terminalen mAb242 Antikörper hergestellt (Abb. 16 B, 242). Für den Positiv-Kontrollextrakt, welcher beide P53 Formen enthielt, wurde der Cl6 Zellextrakt lediglich mit Protein A-Sepharose behandelt („mock-depletierter Extrakt“) (Abb. 16B, (-).

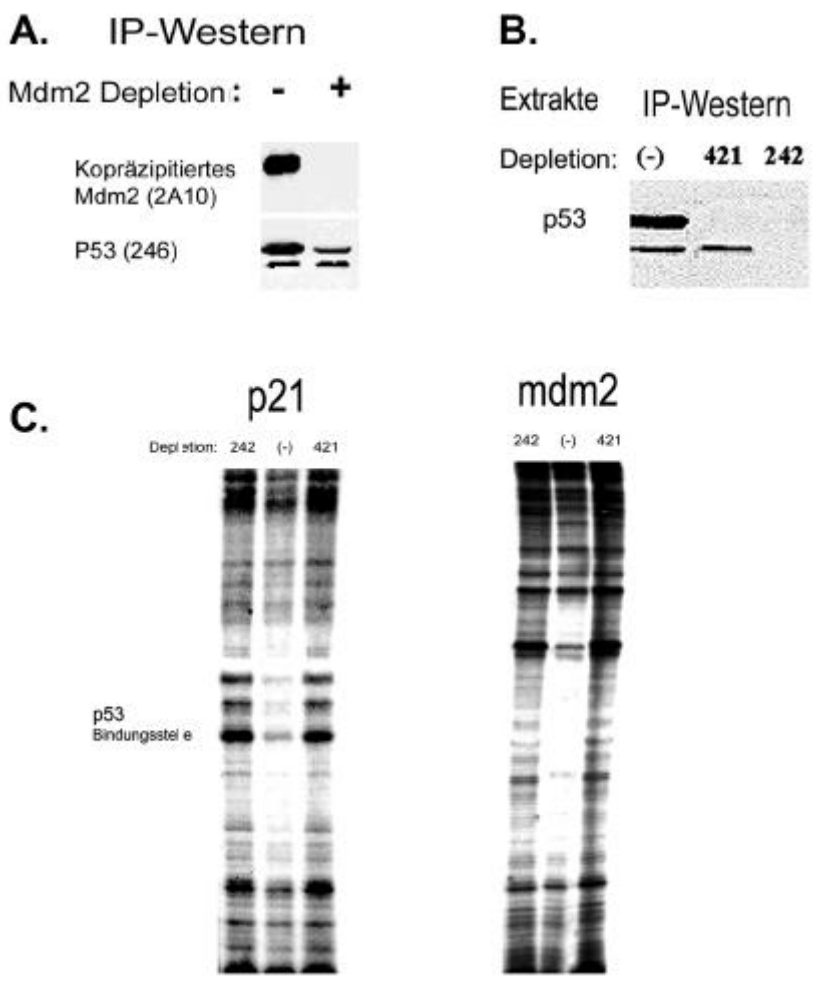


Abb. 16

Sequenz-spezifische DNA Bindung der tsp53*val135* Proteine in Cl6 Zellextrakten an die P53 Bindungsstelle des *p21* bzw. *mdm2* Promotors im DNA Protektionsassay.

A. IP-Western: Das Mdm2 wurde durch die sequentielle mAb2A10-Immunpräzipitation aus unbehandeltem Zellkernextrakt (Cl6, 5h bei 30°C) vollständig entfernt und das tsp53 Protein in wt-Proteinkonformation mit dem mAb246 Antikörper präzipitiert. Der Immunkomplex wurde in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, geblottet und das P53 bzw. kopräzipitierte Mdm2 detektiert.

B. IP-Western: Zellkernextrakte wurden aus Cl6 (30°C, 5h) hergestellt und tsp53 durch Immunpräzipitation mit an Protein A-Sepharose (PAS) gekoppeltem mAb242 (242) bzw. mAb421 (421) depletiert. (-) = Immunpräzipitation mit PAS ohne Antikörper. 60 µg dieser Extrakte wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, geblottet und das P53 mit einem polyklonalen P53 Antikörper (SAPU) detektiert.

C. DNA Protektionsassay: 150 µg des mAb242 (242), nicht-behandelten (-) bzw. mAb421-immundepletierten Zellkernextraktes (Cl6, 30°C für 5h) wurden mit 500 ng des Promotorplasmids inkubiert und die DNA partiell mit DNase I verdaut. Anschließend erfolgte die Hybridisierung eines radioaktiv-markierten promotorspezifischen Oligonukleotids und dessen Verlängerung durch eine DNA Polymerase. Die DNA wurde dann in einem 6%igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und das Gel auf einem Kodak Film exponiert.

Abb. 16 C zeigt die Ergebnisse der DNA Protektionsversuche, die mit den depletierten Cl6 Zellkernextrakten (Abb. 16 B) durchgeführt wurden.

Der mit dem mAb242-depletierten Extrakt (242) durchgeführte Versuchsansatz zeigt den Zustand der P53 Bindungsstelle innerhalb des *p21* bzw. *mdm2* Promotors, wenn

kein P53 gebunden ist. Eine Protektion dieser P53 Bindungsstelle konnte mit dem „mock“-depletierten Zellkernextrakt (-), welcher FL-tsp53 und DeltaC-tsp53 enthielt, nachgewiesen werden (Abb. 16 C). Eine Protektion der P53 Bindungsstelle konnte mit dem „DeltaC-tsp53 Extrakt“ (421) weder in dem *p21* noch dem *mdm2* Promotor beobachtet werden.
Dieses Ergebnis zeigt, dass DeltaC-tsp53 im DNA Protektionsassay keine sequenz-spezifische DNA Bindungsaktivität besitzt.

Parallel mit den Zellkernextrakten aus Cl6 Zellen wurden DNA Protektionsversuche mit rekombinanten P53 Proteinen durchgeführt, die definierte C-terminale Deletionen enthielten (Abb. 17 B). In diesen Experimenten konnte eine spezifische Bindung an die Bindungsstellen des *p21* und *mdm2* Promotors für das wtp53 Protein und das C-terminal verkürzte P53 (AS 1-360) detektiert werden (Abb. 17 A, wt und 360). Eine Bindung des oligomerisierungsinaktiven P53 (AS 1-320) Proteins konnte für keinen der verwendeten Promotoren nachgewiesen werden (Abb. 17 A, 320).

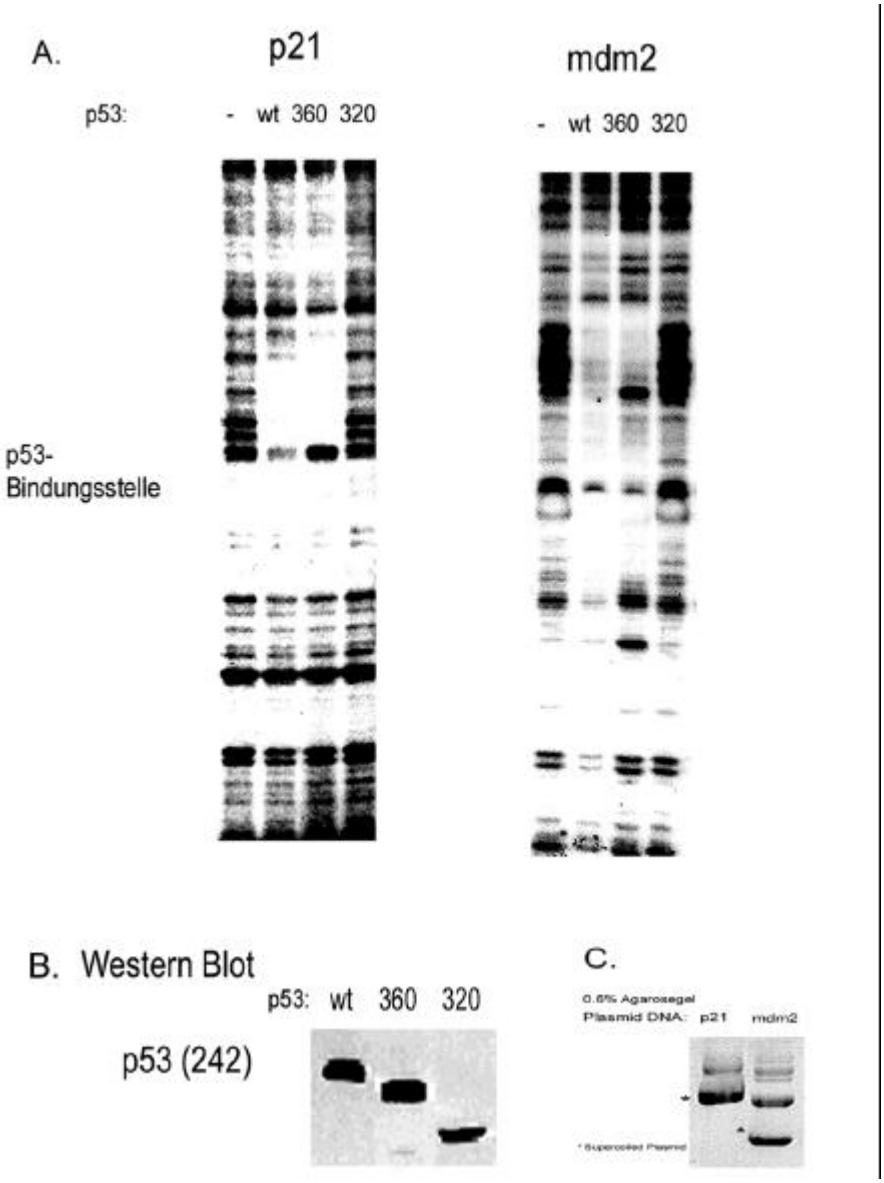


Abb. 17

Sequenz-spezifische DNA Bindung von rekombinantem P53 Protein mit definierten C-terminalen Deletionen an die P53 Bindungsstelle des *p21* bzw. *mdm2* Promotors im DNA Protektionsassay.

A. DNA Protektionsassay: 400 ng des rekombinanten P53 (siehe B) wurden mit 500 ng des Promotorplasmids inkubiert und die DNA partiell mit DNase I verdaut. Anschließend erfolgte die Hybridisierung eines radioaktiv-markierten promotorspezifischen Oligonukleotids und die Extension mit dem Klenow-Fragment. Die endmarkierte DNA wurde dann in einem 6%igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und das Gel auf einem Kodak Film exponiert.

B. Western Blot: 400 ng des rekombinanten P53 (wtp53, P53 (AS1-360), P53 (AS1-320)), das im DNA Protektionsversuch eingesetzt wurde, wurde in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, geblottet und mit dem mAb242 Antikörper detektiert.

C. Agarosegelelektrophorese: 1 µg der im Footprinting eingesetzten Promotor-Plasmid DNA wurde in einem 0,5%igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend durch Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

4.1. tsp53-abhängige Transaktivierung in SV40-Cl6 Zellen

In SV40-Cl6 Zellen, die neben dem transgenen *EJ-Ras* und dem *tsp53val135* ein im Genom integriertes SV40 enthalten, wird das FL-tsp53 Protein von dem SV40-kodierten T-Antigen komplexiert (Henning, 1998). Die Bindung des T-Antigens an P53 inaktiviert die DNA Bindungsaktivität von P53 und dadurch die Transaktivierung der P53 Zielgene (Bargonetti *et al.,* 1992, Farmer *et al*., 1992, Jiang *et al.,* 1993). Das DeltaC-tsp53 Protein wird von dem viralen Onkoprotein nicht gebunden (Henning, 1998).

Trotz der inaktivierenden Wirkung des T-Antigens auf die Aktivität des FL-tsp53 Proteins, konnte eine tsp53-abhängige Transaktivierung des *p21* und *mdm2* Gens im Northern Blot nachgewiesen werden (Abb. 18), was auf die Aktivität des verkürzten tsp53 Proteins zurückgeführt wurde (Henning, 1998). Die Transkription des *p21* Gens wurde in den SV40-Cl6 Zellen nach dem Temperaturshift auf 30°C ähnlich stark induziert wie in den parentalen Cl6 Zellen. Die *mdm2* Induktion war hingegen vergleichsweise reduziert in SV40-Cl6 Zellen. Die Halbwertszeit des Mdm2 Proteins in SV40-Cl6 Zellen ist im Vergleich mit den parentalen Zellen erhöht (Henning, 1998). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass trotz der detektierten Unterschiede in der *mdm2* Transkription vergleichbare Mengen des Mdm2 Proteins in SV40-Cl6 Zellen und der parentalen Zellinie vorhanden sind (Abb. 18).

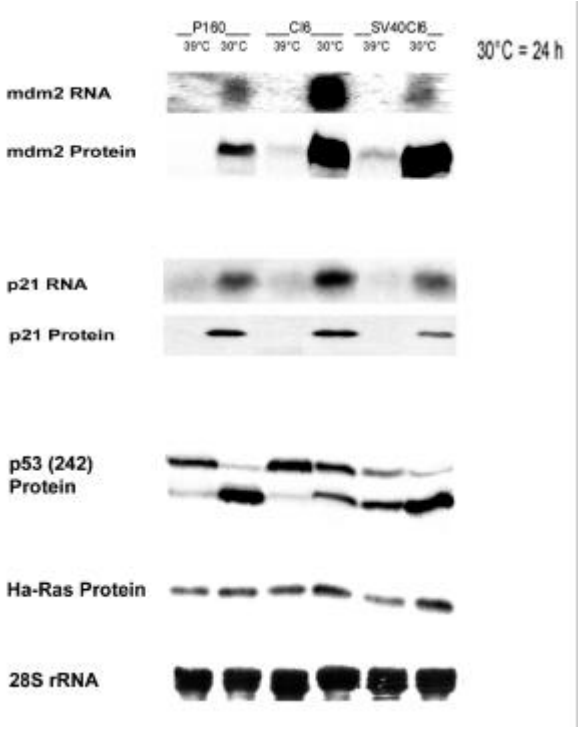


Abb. 18

Expression der *p21* und *mdm2* Gene in P160, Cl6 und SV40-Cl6 Zellen vor (39°C) und nach Induktion (30°C) des funktionellen tsp53*val135* Proteins.

Western Blots: Jeweils 80 µg des Gesamtzellextrakts wurden in einem 12,5%igen (P21, Ha-ras) bzw. 10% igen SDS-PAGE (P53, Mdm2) aufgetrennt, geblottet und P53, P21 bzw. Mdm2 mit den Antikörpern mAb242, mAb-p21 (Pharmingen) bzw. mAb4B2 dektiert. Für die Analyse der transkriptionellen Hochregulation wurden 15 µg zellulärer RNA in einem 1%igen Formaldehydgel aufgetrennt, geblottet und die P21 bzw. Mdm2 RNA mit spezifischen, radioaktiv-markierten DNA Sonden hybridisiert. Die 28SrRNA wurde durch Färbung der geblotteten RNA mit Methylenblau nachgewiesen.

Es sollte mit Hilfe des ChIP Assays untersucht werden, welche der beiden P53 Variante, d.h. FL-tsp53 oder DeltaC-tsp53, in den SV40-Cl6 Zellen an die P53 Bindungsstelle des *p21* bzw. *mdm2* Promotors bindet, um eine Transaktivierung zu initiieren.

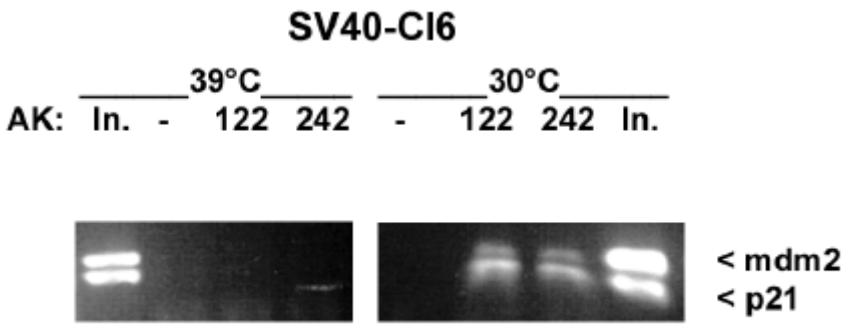


Abb. 19

Bindung der tsp53*val135* Proteine an die chromosomalen *p21* und *mdm2* Promotoren in SV40-Cl6 Zellen.

Chromatin-Immunpräzipitation mit SV40-Cl6 Zellen bei 39°C und 30°C: Auftrennung der PCR amplifizierten mAb122 bzw. mAb242–immunpräzipitierten *p21* und *mdm2* Promotor-DNA in einem 1,5%igen Agarosegel. Erklärung siehe Text. In. = PCR-amplifizierte genomische Input-DNA, AK = Antikörper, der in der IP eingesetzt wurde, (-) = IP mit PAS ohne AK.

In der semi-quantitativen PCR konnte in den mAb122-präzipitierten Immunkomplexen aus SV40-Cl6 Zellen (30°C) *p21* und *mdm2* spezifische Promotor DNA nachgewiesen werden (Abb. 19). Dies zeigt, dass FL-tsp53 bei 30°C in der Lage war, sequenz-spezifisch an den *p21* und *mdm2* Promotor zu binden (Abb. 19, 30°C, mAb122 IP).

Diese Bindung könnte für die in SV40-Cl6 Zellen detektierte tsp53-abhängige Induktion beider Gene (Abb. 18) verantwortlich sein. Es zeigt zudem, dass T-Antigen in SV40-Cl6 Zellen das FL-tsp53 Protein nicht vollständig sequestrieren und dessen sequenz-spezifische DNA Bindung inaktivieren kann.

4.1.12. Warum zeigt DeltaC-tsp53 keine DNA-Bindungsaktivität? Kann DeltaC-tsp53 die Aktivität von FL-tsp53 durch direkte Bindung beeinflussen?

Eine wichtige Voraussetzung für eine effiziente sequenz-spezifische DNA Bindung von wtp53 ist die Tetramerisierung. Dafür ist die Oligomerisierungsdomäne (AS 326 und 355) erforderlich (Stenger *et al*., 1992, Sturzbecher *et al*., 1992, Subler *et al.,* 1993, Friedman *et al.,* 1993, Hupp *et al*., 1994, Pietenpol *et al*., 1994, Halazonetis *et al.,* 1998, Review Chene, 2001). Die fehlende sequenz-spezifische DNA Bindungsaktivität des C-terminal verkürzten tsp53 Proteins *in vitro* und *in vivo* könnte

demnach mit dessen Unfähigkeit, Oligomere ausbilden zu können, erklärt werden. Mit Hilfe eines Protein-Crosslinking Assays sollte die Frage beantwortet werden, ob DeltaC-tsp53 *in vitro* Homooligomere, d.h. DeltaC-tsp53/DeltaC-tsp53 Komplexe, ausbilden kann.

In diesem Assay wird das P53 Protein zunächst mit niedrigen Konzentrationen von Glutaraldehyd behandelt. Dies führt zur Bildung reversibler, kovalenter Bindungen zwischen direkt aneinander gebundenen Proteinen. Die behandelten P53 Komplexe werden dann in Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgekocht, wodurch die Bindungen partiell wieder aufgebrochen werden. Nach Auftrennung der Komplexe in einer 6%igen SDS-PAGE wird das P53 Protein im Western mit spezifischen Antikörpern (hier: mAb240 und mAb248) detektiert. P53 Oligomere werden in Form einer „Leiter“ sichtbar, bei der die Größe der Proteinbande den Oligomerisierungsstatus (Monomer = 53 kD, Dimer = 106 kD, Trimer = 159 kD, Tetramer = 212 kD) des jeweiligen Komplexes anzeigt.

Aus P160 Zellen (30°C für 5h bzw. 25h) wurde ein Zellkernextrakt hergestellt und das FL-tsp53 Protein durch die sequentielle Immunpräzipitation mit dem mAb421 Antikörper vollständig entfernt (Abb. 20, Extrakte, 421). Dieser „DeltaC-tsp53 Extrakt“ (421) wurde parallel mit dem unbehandelten Zellkernextrakt (-), welcher neben dem verkürzten auch das FL-tsp53 Protein enthielt, in dem Assay eingesetzt. Als Positivkontrollen für oligomerisierungsaktives P53 diente rekombinantes wtp53 und P53 (AS 1-360), als Negativkontrolle das rekombinante P53 (AS 1-320) Protein, bei dem die gesamte Oligomerisierungsdomäne entfernt wurde (Abb. 20, Baculo-P53).

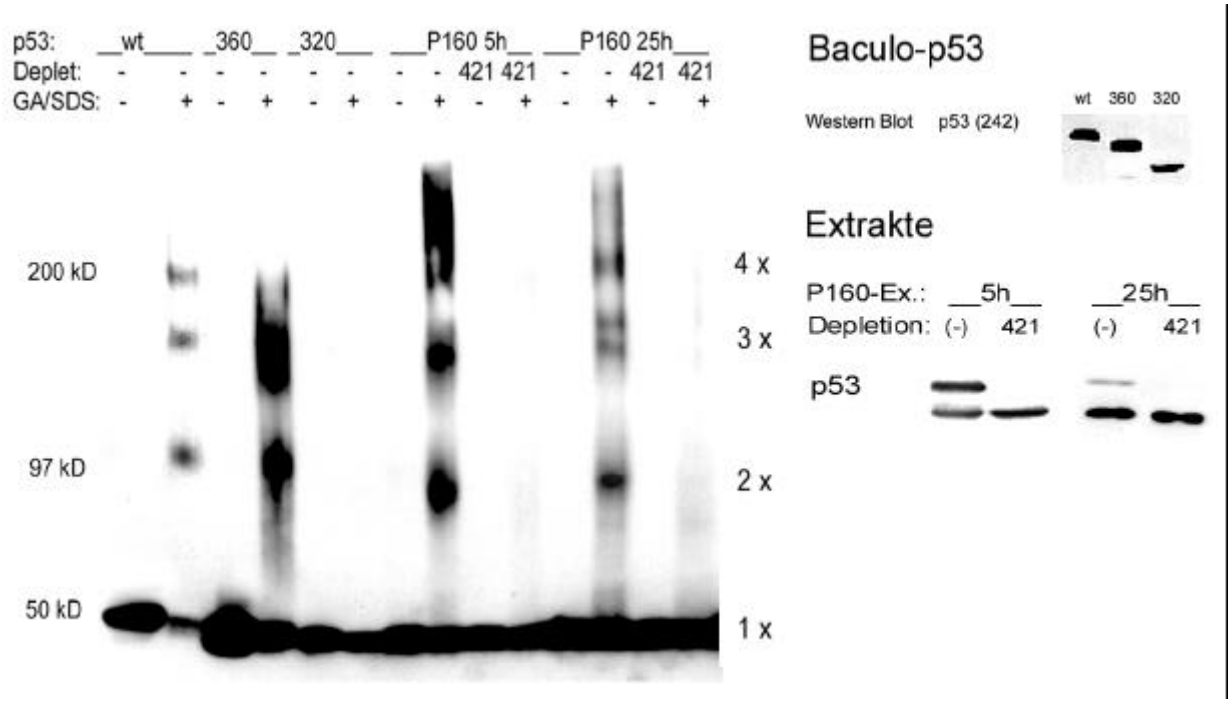


Abb. 20

***In vitro* Proteincrosslinking mit rekombinantem P53 und tsp53*val135* Protein aus P160 Zellen.**

Western: 50 µg des unbehandelten (-) bzw. mAb421-immundepletierten (421) Zellkernextrakts aus P160 Zellen (5h bzw. 25h bei 30°C) sowie 200 ng des rekombinanten P53 Proteins (wtp53, P53(AS1-360), P53(AS1-320)) wurden mit 0,003% Glutaraldehyd behandelt. Nach partieller Reversion der Crosslinks durch Aufkochen der Komplexe in 2% Natriumdodecylsulfat (SDS) wurden diese zusammen mit dem unbehandelten Extrakt in einem 6%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und P53 mit den Antikörpern mAb240/mAb248 immundetektiert. Eine adequate Auftrennung der verschiedenen P53 Varianten ist in einem 6%igen SDS-Polyacrylamidgel nicht möglich. Ex = Extrakt, GA/SDS = Glutaraldehyd/Natriumdodecylsulfat-Behandlung.

In den nicht-depletierten Zellkernextrakten (-) konnte oligomerisierungskompetentes P53 nachgewiesen werden, was an der Bildung einer „P53-Leiter“ zu erkennen ist (Abb. 20). In dem „DeltaC-tsp53 Extrakt“ (421) konnte diese nicht detektiert werden. Das verkürzte tsp53 Protein ist demzufolge nicht in der Lage, Homooligomere auszubilden.

Die Frage nach einer möglichen Bindung von DeltaC-tsp53 an FL-tsp53 (Heterooligomerisierung), konnte mit dem Crosslinking Assay nicht direkt beantwortet werden. Um solche DeltaC-tsp53/FL-tsp53 Komplexe nachweisen zu können, wurde FL-tsp53 selektiv mit dem mAb421 Antikörper aus Cl6 und P160 Zellextrakten präzipitiert. Dieser P53 Komplex wurde anschließend im Western Blot auf die Anwesenheit von kopräzipitiertem DeltaC-tsp53 mit einem polyklonalen P53 Antikörper untersucht (Abb. 21).

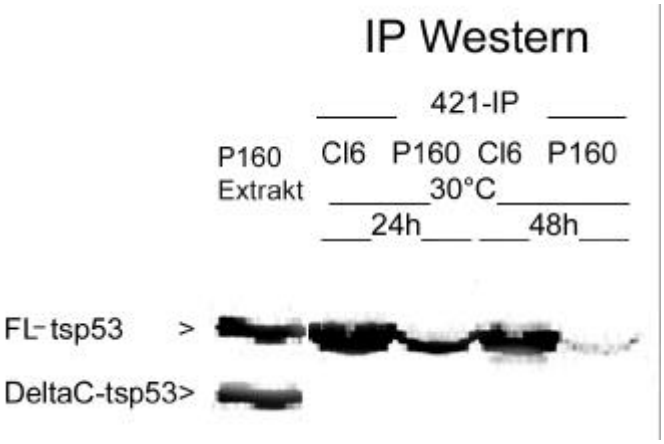


Abb. 21

Analyse der FL-tsp53/DeltaC-tsp53 Komplexbildung in Cl6 und P160 Zellen.

IP-Western: Zellen wurden bei 30°C (24h und 48 h) kultiviert und anschließend lysiert. Das native FL-tsp53 Protein wurde aus 80 µg des Extrakts mit dem an PAS gebundenen mAb421 Antikörper (C-terminales P53 Epitop) präzipitiert, in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und P53 mit einem polyklonalen P53 Antikörper (SAPU) detektiert.

DeltaC-tsp53 konnte in den mAb421-präzipitierten FL-tsp53 Immunkomplexen nicht nachgewiesen werden (Abb. 21, 30°C).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass DeltaC-tsp53 weder Homooligomere noch Heterooligomere mit FL-tsp53 ausbilden kann. Die Unfähigkeit des verkürzten tsp53 Proteins Tetramere auszubilden, kann dessen fehlende sequenz-spezifische DNA Bindungsaktivität erklären. Dieses Ergebniss schließt auch aus, dass DeltaC-tsp53 die Transaktivierungsaktivität des FL-tsp53 Proteins (oder des endogenen Ratten wtp53 Proteins) *in vivo* durch direkte Bindung beeinflussen kann.

4.1.13. P160 und Cl6 Zellen enthalten unterschiedliche Konzentrationen von aktivem wt- FL-tsp53 bei 30°C

Mit Hilfe des ChIP Assays konnte gezeigt werden, dass eine Beladung der Promotoren des *p21* und *mdm2* Gens mit dem DeltaC-tsp53 Protein *in vivo* nicht vorhanden ist. Die in beiden Subklonen beobachtete differentielle *p21/mdm2* Transaktivierung erfolgte ausschließlich über die Bindungsaktivität des FL-tsp53 Proteins an die Promotoren. Es sollte daher zunächst die zelluläre Konzentration an aktivem FL-tsp53, d.h. die Population des Mdm2-ungebundenen FL-tsp53 bei 30°C,

in beiden Subklonen quantifiziert werden. Dies war erforderlich, da beide Subklone signifikant unterschiedliche Mengen an Mdm2 bei 30°C exprimieren (Abb. 3).

Gesamtzellextrakte wurden aus Cl6 und P160 Zellen nach Induktion des funktionellen tsp53 Proteins hergestellt und das Mdm2 Protein mit einem an PAS-gebundenen Mdm2 Antikörper (mAb2A10) vollständig aus den Extrakten immundepletiert. Anschließend wurde das aktive wt-tsp53 Protein von dem an PAS-gekoppelten mAb246 Antikörper aus dem unbehandelten bzw. dem Mdm2-depletierten Extrakt präzipitiert und in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Im Western Blot wurde P53 sowie das ko-präzipitierte Mdm2 immundetektiert (Abb. 22).

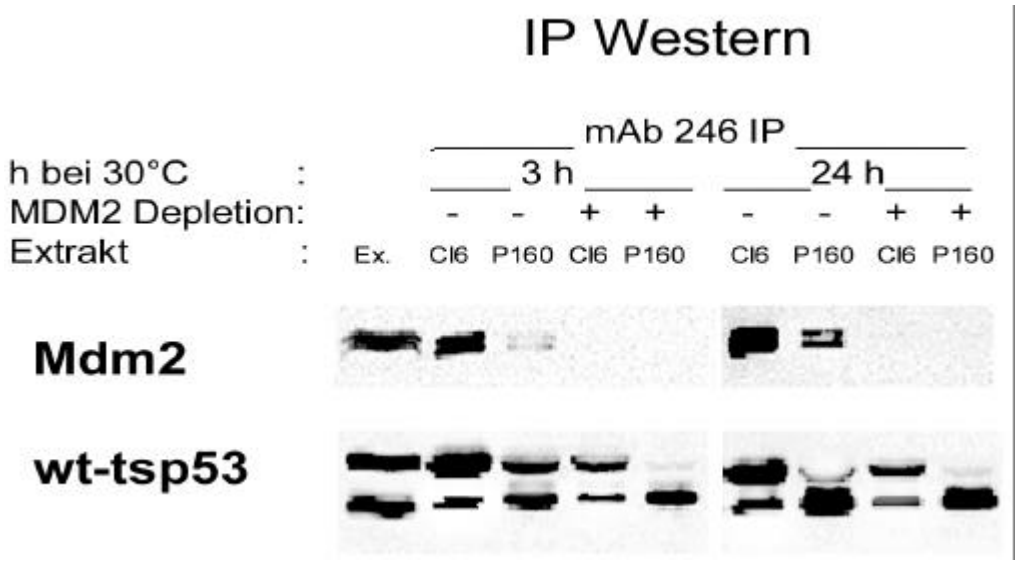


Abb. 22

Zelluläre Konzentration von Mdm2-freiem wt-tsp53*val135* Protein in Cl6 und P160 Zellen bei 30°C.

IP-Western: Gesamtzellextrakte wurden von Cl6 und P160 Zellen (30°C) hergestellt. Mdm2 wurde aus 80 µg des jeweiligen Extrakts mit dem an PAS gekoppelten mAb2A10 Antikörper immundepletiert. P53 aus dem nicht-behandelten (-) und dem Mdm2-depletierten Extrakt (+) wurde mit dem an PAS gebundenen wt-konformationsspezifischen Antikörper mAb246 präzipitiert und die Komplexe in einem 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt. P53 bzw. kopräzipitiertes Mdm2 wurde mit einem polyklonalen P53 (SAPU) bzw. mAb2A10 immundetektiert. Ex. = Extrakt aus Cl6 Zellen (30°C, 24h).

Die Ergebnisse dieser Analysen zeigen, dass die Konzentration des transaktivierungsaktiven FL-tsp53 (Mdm2-freies wt-tsp53 Protein) bei 30°C in den Cl6 Zellen deutlich höher als in P160 Zellen ist (Abb. 22, mAb246-IP nach Mdm2 Depletion).

Die Konzentration von DeltaC-tsp53 wurde durch die vollständige Depletion des Mdm2 Proteins aus dem Extrakt nicht verändert (Abb. 22, mAb246 IP +/- Mdm2 Depletion). Dies zeigt indirekt, dass Mdm2 nicht an das verkürzte tsp53 Protein bindet.

Um die fehlende Mdm2/DeltaC-tsp53 Interaktion zu bestätigen, wurde Mdm2 aus Extrakten der Cl6 bzw. P160 Zellen immunpräzipitiert, der Immunkomplex in einer SDS-PAGE aufgetrennt und Mdm2 mit dem mAb2A10 Antikörper sowie ko-präzipitiertes FL- und DeltaC-tsp53 mit einem polyklonalen P53 Antikörper detektiert. Mdm2 konnte lediglich das FL-tsp53, nicht aber das verkürzte tsp53 Protein ko-präzipitieren (Abb. 23, 30°C). Aufgrund der fehlenden Bindung der E3 Ligase Mdm2 an DeltaC-tsp53 kann vermutet werden, dass DeltaC-tsp53 im Gegensatz zum FL-tsp53 nicht von Mdm2 ubiquitiniert und so in den proteasomalen Abbauweg eingeleitet werden kann.

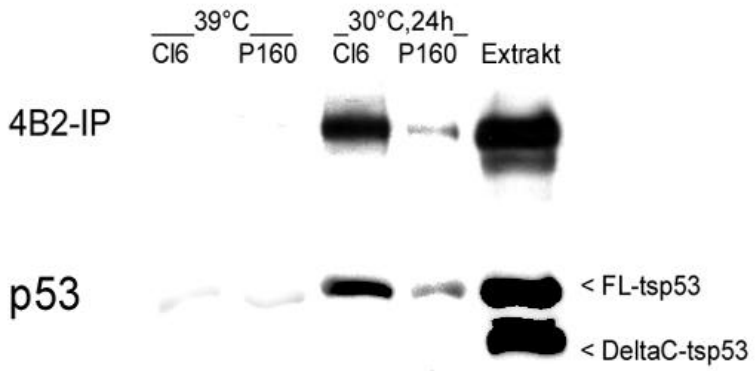


Abb. 23

Analyse der Mdm2/tsp53*val135* Protein Interaktion in Cl6 und P160 Zellen bei 39°C und 30°C.

IP-Western: Mdm2 wurde mit dem Antikörper mAb4B2 aus 1x10 ^{6} Zellen der Subklone Cl6 und P160 (39°C bzw. 30°C) immunpräzipitiert. Die Komplexe wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und das Mdm2 mit dem mAb2A10 Antikörper sowie kopräzipitiertes P53 mit einem polyklonalen P53 Antikörper immundetektiert. Extrakt = Cl6 Zellen (30°C, 24 h).

4.1.14. Akkumulation von FL-tsp53 in P160 Zellen durch Blockierung des proteasomalen Abbaus führt zur erhöhten Transkription des *mdm2*, nicht jedoch des *p21* Gens

In der Zelle ist die Induktion von P53 Zielgenen nach genotoxischem Stress oftmals mit einer signifikanten Akkumulation des wtp53 Proteins assoziiert. Cl6 und P160 Zellen enthalten deutlich unterschiedliche Konzentrationen an aktivem FL-tsp53 (Mdm2-freies wt-tsp53 Protein) bei 30°C (Abb. 22). Es war daher möglich, dass die P53 Konzentration ein Parameter darstellt, der für die unterschiedliche *mdm2* Induktion in beiden Subklonen verantwortlich war.

Um diese Frage zu beantworten, sollte über eine Erhöhung der FL-tsp53 Konzentration in P160 Zellen der Einfluss der P53 Dosis auf die *mdm2* und *p21* Transaktivierung untersucht werden. Die Akkumulation des FL-tsp53 Proteins sollte in der Zelle zunächst durch genotoxischen Stress (Gammabestrahlung) ausgelöst werden.

P160 (und Cl6) Zellen wurden bei 39°C und 30°C mit hochdosierter Gammastrahlung behandelt, lysiert und das FL-tsp53 Protein mit dem C-terminalen mAb122 Antikörper im Western Blot detektiert, um eine Akkumulation des P53 Proteins zu verifizieren.

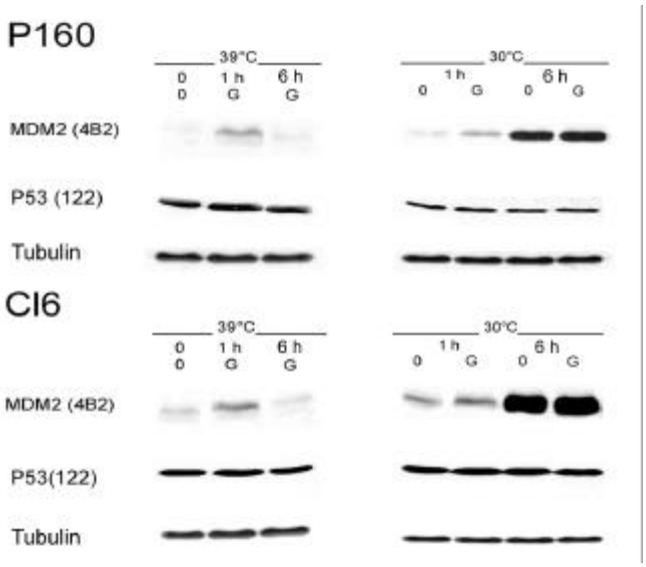


Abb. 24

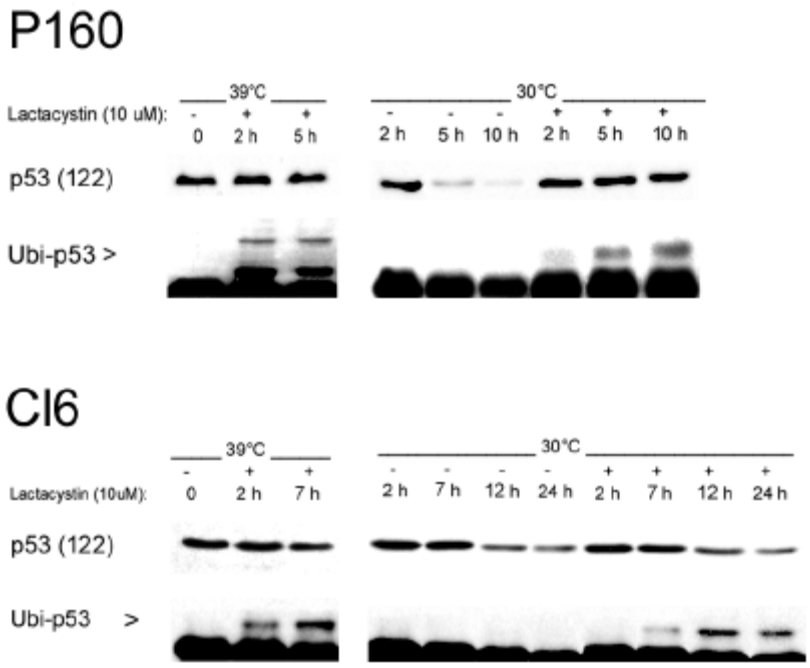
Einfluss der Gammastrahlung auf die Akkumulation von FL-tsp53 und die Mdm2 Expression in P160 und Cl6 Zellen.

Cl6 und P160 Zellen wurden bei 39°C und 30°C mit Gammastrahlung (7 Gy) behandelt und anschließend lysiert. 80 µg des jeweiligen Extraktes wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und das FL-tsp53 Protein mit dem mAb122 Antikörper, sowie Mdm2 mit mAb4B2 immundetektiert. G = Gammabestrahlung, 0 = unbehandelte Zellen.

In P160 (und Cl6 Zellen) führte die Gammabestrahlung zu keiner signifikanten FL-tsp53 Akkumulation in den behandelten Zellen, weder bei 39°C noch bei 30°C (Abb. 24).
Bei 39°C konnte etwa 1 h nach Bestrahlung eine sehr geringe Induktion von Mdm2 in beiden Subklonen nachgewiesen werden. Da diese in Abwesenheit von funktionellem P53 stattfand, könnte es sich hierbei um eine P53-unabhängige Induktion durch Gammastrahlung handeln. Alternativ dazu könnte das wt-tsp53 Protein, welches auch bei 39°C in bestrahlten Zellen vorhanden ist, post-translational modifiziert worden sein, wodurch dieses für die Transaktivierung induziert wurde.
Bei 30°C wurde die wt-tsp53 abhängige Expression von Mdm2 durch die Bestrahlung nicht wesentlich beeinflusst (Abb. 24).

Da die Behandlung von P160 (und Cl6) Zellen mit Gammastrahlung nicht zu einer Akkumulation von FL-tsp53 führte, sollte dies über eine Blockierung des proteasomalen P53 Abbaus induziert werden.
Lactacystin ist ein Stoffwechselprodukt aus *Streptomyces* und wird in der Zelle in das biologisch aktive clasto-Lactacystin-ß-Lacton umgewandelt, welches als hochspezifischer Inhibitor der trypsin- und chymotrypsinähnlichen Aktivitäten der 20S Proteasomen wirkt.

A.



B.

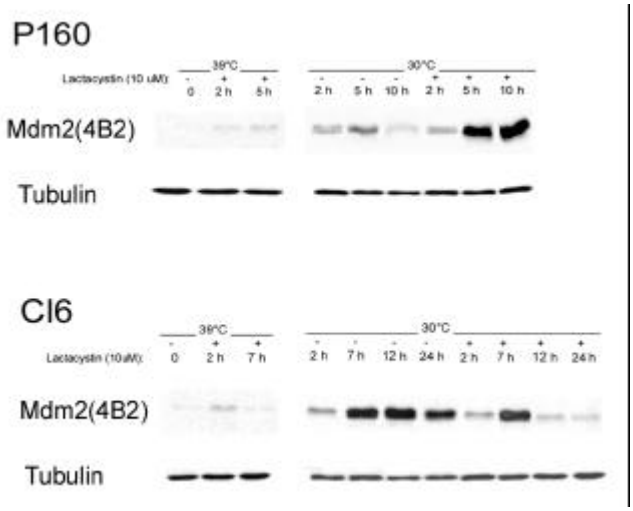


Abb. 25

Einfluss der Lactacystinbehandlung auf die zelluläre Konzentration von FL-tsp53 (A) und die Mdm2 Expression (B) in P160 und Cl6 Zellen bei 39°C und 30°C.

Western Blots: P160 und Cl6 Zellen wurden bei 39°C und 30°C ohne (-) bzw. mit 10 µM Lactacystin (+) behandelt und anschließend lysiert. 80 µg des jeweiligen Extraktes wurden in einem 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und das FL-tsp53 mit dem mAb122 Antikörper (A) bzw. Mdm2 mit dem mAb4B2 Antikörper (B) immundetektiert. In A) wurde lediglich die dominanteste Ubiquitin-konjugierte P53 (Ubi-P53) Spezies (etwa 62 kD) abgebildet und stellt eine längere Exposition der darüberliegenden P53 Bande dar. 0 und (-) = unbehandelte Zellen.

In P160 Zellen bewirkte Lactacystin bei 30°C, nicht aber bei 39°C, die Akkumulation von (nicht-ubiquitiniertem) FL-tsp53 (Abb. 25 A). Die Akkumulation von FL-tsp53 in den behandelten Zellen resultierte in deutlich erhöhten Mdm2 Proteinlevel (etwa nach 5 h) im Vergleich mit den unbehandelten Zellen (Abb. 25 B).
In Cl6 Zellen hatte die Behandlung mit Lactacystin weder bei 39°C noch bei 30°C einen signifikanten Einfluss auf die Akkumulation von (nicht-ubiquitiniertem) FL-tsp53 (Abb. 25 A). Im Vergleich mit den unbehandelten Cl6 Zellen wurden deutlich reduzierte Mdm2 Proteinspiegel in Lactacystin-behandelten Zellen (etwa nach 7 – 12 h) bei 30°C nachgewiesen.

Eine längere Exposition des immundetektiertes FL-tsp53 Proteins in behandelten Zellen zeigte, dass in P160 und Cl6 Zellen bei 39°C und 30°C Ubiquitin-konjugierte FL-tsp53 Spezies (vorwiegend mono-ubiquitiniertes P53) akkumulierten, die als definierte mAb122-positive Proteinbanden (> 53 kD) im SDS-PAGE migrierten (Abb. 25 A, Ubi-P53). Diese akkumulierten bei 39°C (ab 2 h) und 30°C (ab 5 h) in beiden Zellinien (Abb. 25 A). Die längere Inkubationszeit, die für die Wirkung des

Lactacystins bei 30°C notwendig war, kann mit dem Temperaturunterschied (39°C zu 30°C) erklärt werden.

4.1.15. Einfluss der Lactacystin-induzierten FL-tsp53 Akkumulation auf die Regulation der *mdm2* und *p21* Gene in P160 Zellen

Es sollte untersucht werden, ob die durch die Behandlung mit Lactacystin induzierte Erhöhung der zellulären FL-tsp53 Konzentration in einer selektiven Erhöhung der *mdm2* Transkription in P160 Zellen resultierte. Dafür wurden P160 (und Cl6 Zellen) bei 30°C mit dem Proteasomeninhibitor behandelt und die *p21* und *mdm2* Transkription im Vergleich mit unbehandelten Zellen im Northern Blot verglichen. Mit dem ChIP Assay wurde die Bindung von FL-tsp53 an die Promotoren des *p21* und *mdm2* Gens analysiert (Abb. 26 B, mAb122 IP). Parallel wurde das funktionelle tsp53 Protein mit dem wt-konformationsspezifischen Antikörper mAb246 immunpräzipitiert, in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot detektiert (Abb. 26 A).

A. B.

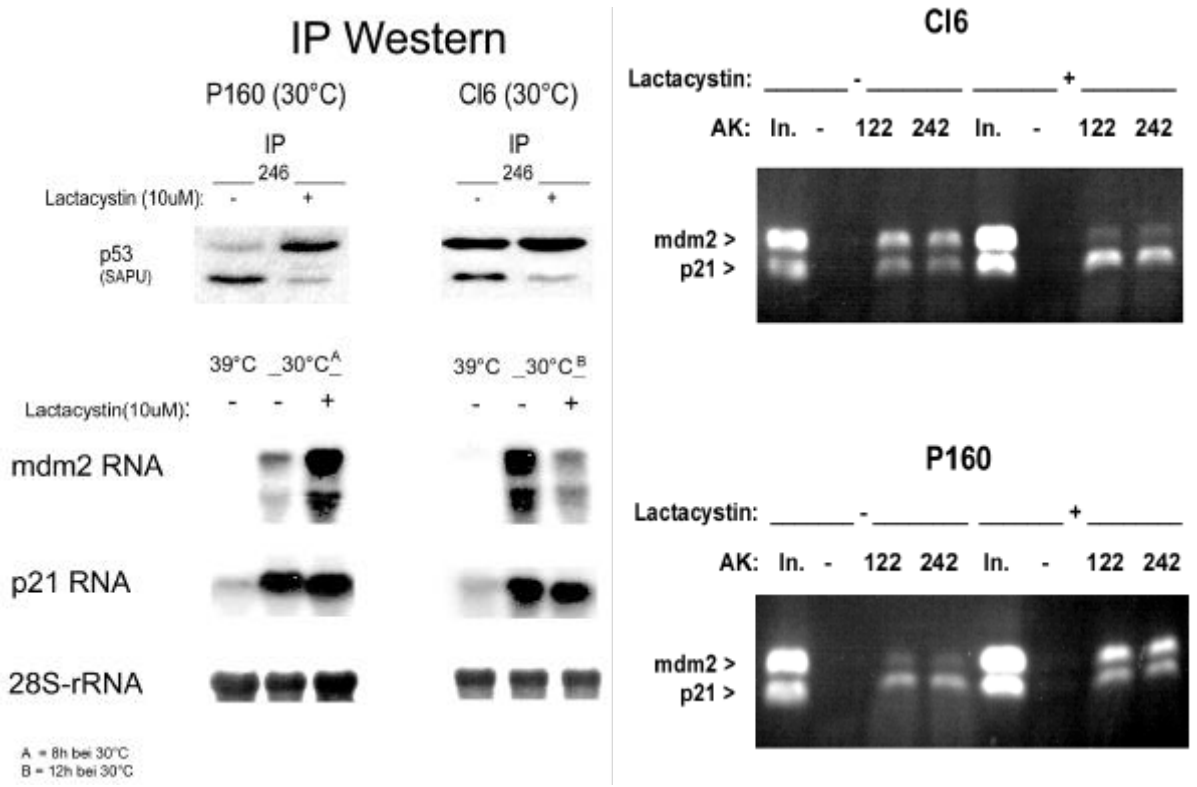


Abb. 26

Einfluss der Lactacystinbehandlung auf die Transkription der *mdm2* und *p21* Gene (A) und die *in vivo* Bindung von tsp53*val135* (B) in Cl6 und P160 Zellen.

Cl6 und P160 wurden ohne (-) bzw. in Gegenwart (+) von 10 µM Lactacystin bei der permissiven Temperatur inkubiert:

A. Northern Blots: 20 µg zellulärer RNA aus unbehandelten (-) und behandelten (+) P160 und Cl6 Zellen wurden in einem 1%igen Formaldehydgel aufgetrennt und geblottet. Der Nachweis von *p21* und *mdm2* RNA erfolgte über die Hybridisierung der RNA mit genspezifischen, radioaktiv-markierten DNA Sonden. Die 28S-rRNA wurde durch Färbung der auf die Membran transferierten RNA mit Methylenblau nachgewiesen. IP-Western: Unbehandelte (-) und Lactacystin behandelte (+) P160 und Cl6 Zellen wurden lysiert und das tsp53 Protein aus 60 µg des Extrakts mit dem wt-konformationsspezifschen mAb246 Antikörper präzipitiert. Nach Auftrennung des Komplexes in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel wurde P53 mit einem polyklonalen P53 Antikörper immundetektiert.

B. Chromatin-Immunpräzipitation: Auftrennung der PCR amplifizierten mAb122 (122) bzw. mAb242(242) – immunpräzipitierten *p21* und *mdm2* Promotor-DNA in einem 1,5%igen Agarosegel. Erklärung siehe Text. In. = PCR-amplifizierte genomische Input-DNA, AK = Antikörper, der in der IP eingesetzt wurde, (-) = IP mit PAS ohne AK.

Im Vergleich mit unbehandelten Zellen hatte die durch Lactacystin induzierte Erhöhung der FL-tsp53 Proteinlevel in P160 Zellen keinen Einfluss auf die tsp53-abhängige Transaktivierung des *p21* Gens. Demgegenüber stand eine deutlich erhöhte Transkription des *mdm2* Gens in den behandelten Zellen (Abb. 26 A,

Northern Blots). Im ChIP Assay konnte eine verstärkte Beladung des *mdm2*, nicht jedoch des *p21* Promotors, mit dem FL-tsp53 Protein beobachtet werden (Abb. 26 B, mAb122 IP).
Diese Daten zeigen, dass die Transaktivierung des *mdm2* Gens, im Gegensatz zum *p21* Gen, in Abhängigkeit von der zellulären Konzentration des FL-tsp53 Proteins stattfindet (P53 Dosisabhängige Induktion).

In Cl6 Zellen hatte die Lactacystinbehandlung eine entgegengesetzte Wirkung auf die tsp53-abhängige *mdm2* Transkription; während die Expression des *p21* Gens, wie in P160 Zellen, nicht durch die Lactacystinbehandlung beeinflusst wurde, bewirkte sie eine reduzierte Transaktivierung des *mdm2* Gens (Abb. 26 A). Die verringerte Transkription des *mdm2* Gens in den behandelten Zellen korrelierte mit einer geringeren FL-tsp53 Beladung des m*dm2* Promotors, wie mit Hilfe des ChIP Assays nachgewiesen werden konnte (Abb. 26 B, mAb122 IP). In der mAb246-Immunpräzipitation wurden nur sehr geringe Unterschiede in der zellulären FL-tsp53 Konzentration in unbehandelten und behandelten Cl6 Zellen festgestellt (Abb. 26 A, mAb246-IP). Die verminderte Okkupation des *mdm2* Promotors mit FL-tsp53 in behandelten Zellen konnte demzufolge nicht mit einer Abnahme der zellulären FL-tsp53 Konzentration erklärt werden (Erklärung siehe Diskussion).

Interessant war die Beobachtung, dass die Behandlung mit Lactacystin zu verringerten DeltaC-tsp53 Proteinlevel bei 30°C führte (Abb. 26 A, mAb246-IP). Dies deutete auf eine direkte Beteiligung der proteolytischen Aktivität der 20S Proteasomen bei der Produktion des verkürzten tsp53 Proteins im Cl6/P160 Zellsystem hin.

4.1.16. Differentielle Regulation der wtp53-abhängigen Expression von Mdm2 und P21 in bestrahlten MethA-wtp53 Zellen

In P160 Zellen konnte eine von der FL-tsp53 Konzentration abhängige Regulation der *mdm2* (nicht jedoch der *p21*) Expression beobachtet werden. Es sollte untersucht werden, ob die Akkumulation von wtp53 Protein in Zellen, bei denen diese durch genotoxischen Stress induziert werden kann, einen differentiellen Einfluss auf die Expression von Mdm2 und P21 hat.

Eine solche differentielle Regulation der wtp53-abhängigen P21 und Mdm2 Expression wurde in murinen Methylcolanthren-induzierten MethA Tumorzellen, die ein stabil ins Genom integriertes murines wtp53 exprimieren (Otto *et al*., 1993), nach Behandlung mit hochdosierter Gammastrahlung beobachtet (Abb. 27). MethA-wtp53 Zellen exprimieren neben dem transgenen wtp53 auch endogenes Mutanten MethA P53 (Otto *et al*., 1993).

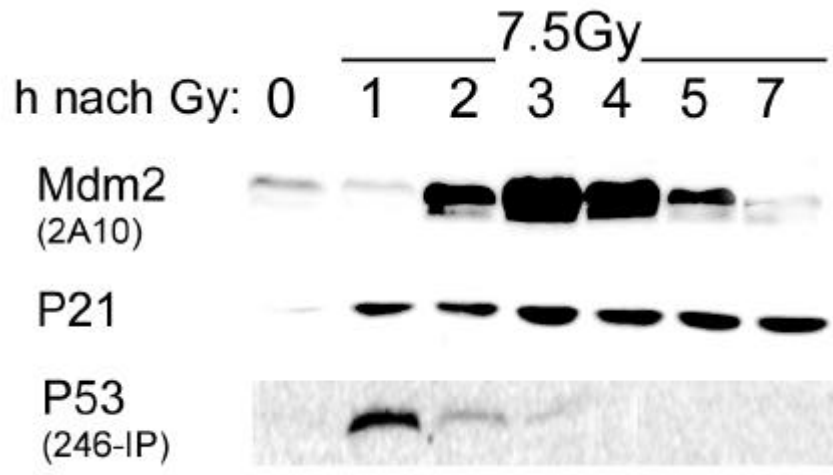


Abb. 27

Induktion der Mdm2 und P21 Expression nach Gammabestrahlung (7 Gy) von MethA Zellen*, die ein transgenes murines wtp53 exprimieren.

Western Blots: MethA-wtp53 Zellen wurden mit 7.5 Gy Gammastrahlung behandelt und nach verschiedenen Zeitintervallen in NP40-Lysispuffer extrahiert. 80 µg des jeweiligen Extrakts wurden in einem 12.5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, geblottet und Mdm2 bzw. P21 mit den Antikörpern mAb2A10 bzw. P21 (Pharmingen) immundetektiert. Um das wtp53 Protein von dem endogenen MethA P53 diskriminieren zu können, wurde P53 mit einer wt-Konformation aus 80 µg des Extrakts mit dem mAb246 Antikörper immunpräzipitiert, in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, geblottet und mit einem polyklonalen P53 Antikörper (SAPU) detektiert.
* = MethA Zellen exprimieren zusätzlich mutiertes, transaktivierungsinaktives P53.

Die Bestrahlung induzierte eine Erhöhung der wtp53 Proteinspiegel in der Zelle (nach 1 h). Das exogen exprimierte wtp53 Protein wurde über die Immunpräzipitation mit dem wt-konformationsspezifischen mAb246 Antikörper detektiert.
Die Transaktivierung von P21 sowie von Mdm2 erfolgte etwa 2 h nach Akkumulation von wtp53 (Abb. 27). Parallel mit der Induktion von Mdm2 nahmen die wtp53 Proteinspiegel wieder ab, was vermutlich auf den durch Mdm2 eingeleiteten proteasomalen P53 Abbau zurückgeführt werden kann. Die Reduktion der wtp53 Proteinlevel korrelierte mit einer Abnahme der Mdm2 Expression. Die Expression von P21 wurde dadurch nicht terminiert.

Aufgrund dieser Daten konnte vermutet werden, dass der (Mdm2 vermittelte) proteasomale Abbau des „aktivierten“ wtp53 Proteins nach Beendigung des genotoxischen Stresses in MethA-wtp53 Zellen die wtp53-abhängige Expression von Mdm2, nicht jedoch von P21 terminieren kann.

4.2.4. Inhibierung der proteasomalen Aktivität reduziert DeltaC-tsp53 Proteinlevel *in vivo*

Die proteolytische P53 Spaltung wird *in vivo* vorwiegend über den proteasomalen Abbauweg eingeleitet, zum anderen aber auch von zellulären Proteasen, wie den Calpainen, katalysiert (Kubbutat *et al.*, 1998).
Es sollte geklärt werden, ob eine proteolytische Prozessierung von FL-tsp53 durch Proteasomen für die Produktion von DeltaC-tsp53 verantwortlich war.
Cl6 Zellen wurden bei 39°C und 30°C mit einem hochspezifischen Inhibitor der 20S-Proteasomen (Lactacystin) behandelt, lysiert und die Extrakte in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurde P53 mit dem N-terminalen mAb242 Antikörper im Western Blot immundetektiert.

A. B.

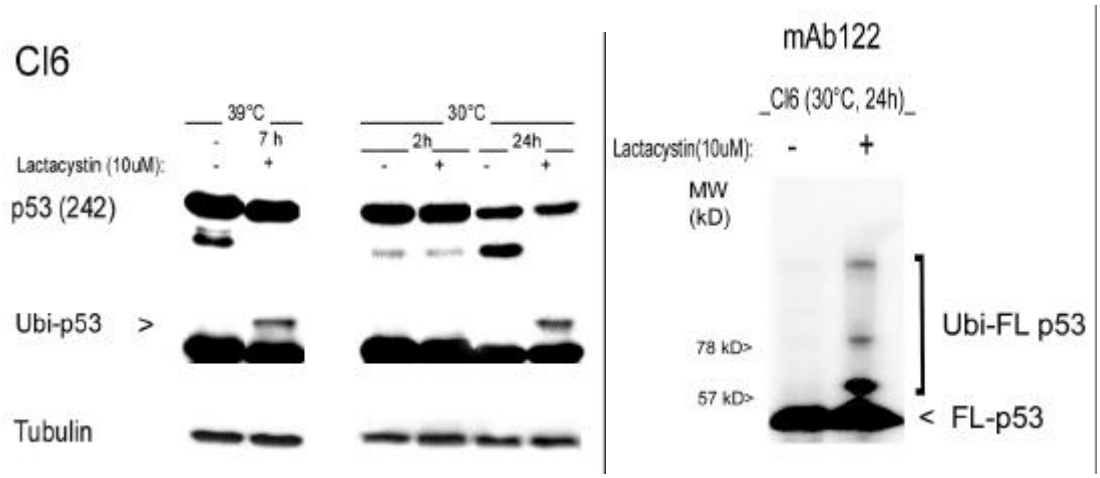


Abb. 28

Einfluß der Inhibierung von Proteasomen auf die DeltaC-tsp53 Proteinlevel in Cl6 Zellen.

Western: Cl6 Zellen wurden bei 39°C und 30°C ohne (-) sowie in Gegenwart (+) von Lactacystein (10 µM) für die angegebene Zeit behandelt und anschließend lysiert. 80 µg des jeweiligen Extrakts wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und P53 mit dem N-terminalen mAB242 **(A)** bzw. dem C-terminalen mAb122 Antikörper **(B)** immundetektiert. In A) ist lediglich die dominanteste Ubiquitin-konjugierte P53 Spezies (etwa 62 kD, entspricht Konjugation eines Ubiquitinmoleküls an P53) abgebildet und stellt eine längere Expositionszeit des darüberliegenden P53 dar.

Die Behandlung von Cl6 Zellen mit Lactacystin führte bei 39°C und 30°C, d.h. unabhängig von der Funktionalität des tsp53 Proteins, zu deutlich verringerten DeltaC-tsp53 Proteinlevel (Abb. 28 A). Diese ging einher mit der Akkumulation von (vorwiegend mono)ubiquitin-konjugierten tsp53 Spezies. Diese Konjugate konnten von dem mAb122 Antikörper, der gegen ein C-terminales Epitop von P53 gerichtet ist, erkannt werden (Abb. 28 B). Dies bedeutet, dass es sich bei den Ubiquitin-konjugierten P53 Spezies in den behandelten Cl6 Zellen um modifiziertes FL-tsp53 handelt.
Diese Ergebnisse deuteten auf eine direkte Beteiligung der proteolytischen Aktivität der 20S-Proteasomen bei der Produktion von DeltaC-tsp53 hin. Dabei wird vermutlich der (ubiquitinierte) C-Terminus von FL-tsp53 abgespalten. Dieser (ubiquitin-modifizierte) C-Terminus konnte im Western Blot von dem C-terminalen mAb122 Antikörper nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung ist, dass dieses Proteinfragment in der Zelle sofort abgebaut wird.

Eine limitierte Prozessierung von Proteinen durch Proteasomen wurde für die Produktion der P50 Untereinheit des aktiven NF-kappaB Transkriptionsfaktors bereits beschrieben (Palombella *et al*., 1993). P50 entsteht durch die von Proteasomen katalysierte Abspaltung des C-Terminus des ubiquitinierten Vorläuferproteins P105. Der C-Terminus wird bei diesem Vorgang vollständig abgebaut und der aktive N-terminale Teil (P50) freigesetzt.

4.2.4.1. Inhibierung des Zellkernexports reduziert DeltaC-tsp53 Proteinlevel *in vivo*

Die Daten der Lactacystinexperimente zeigten, dass die 26S Proteasomen bei der Produktion von DeltaC-tsp53 direkt beteiligt waren. Der proteasomale P53 Abbau findet in der Zelle primär im Zytoplasma statt *(*Maki *et al*., 1996, Freedman *et al.,* 1997*)*. Um die Ergebnisse der Lactacystinexperimente zu untermauern, sollte untersucht werden, ob die Akkumulation des FL-tsp53 Proteins im Zellkern eine verringerte Produktion von DeltaC-tsp53 zur Folge hatte.
Zur Klärung dieser Frage wurden Cl6 Zellen bei 39°C und 30°C mit dem spezifischen Zellkernexportinhibitor Leptomycin B behandelt und dessen Wirkung auf die DeltaC-tsp53 Proteinlevel im Western Blot analysiert (Abb. 29). Leptomycin B ist eine

ungesättigte Fettsäure, die u.a. die nukleo-zytoplasmatische Translokation von Proteinen, die das nukleäre Exportsignal NES (Nuclear Export Signal) enthalten, durch direkte Bindung an den Exportrezeptor CRM1 blockiert. Dadurch wird eine Bindung des NES an den CRM1 Rezeptor unterbunden. Das NES des P53 befindet sich am C-Terminus (AS 340 – 351) (Stommel *et al*. 1999).

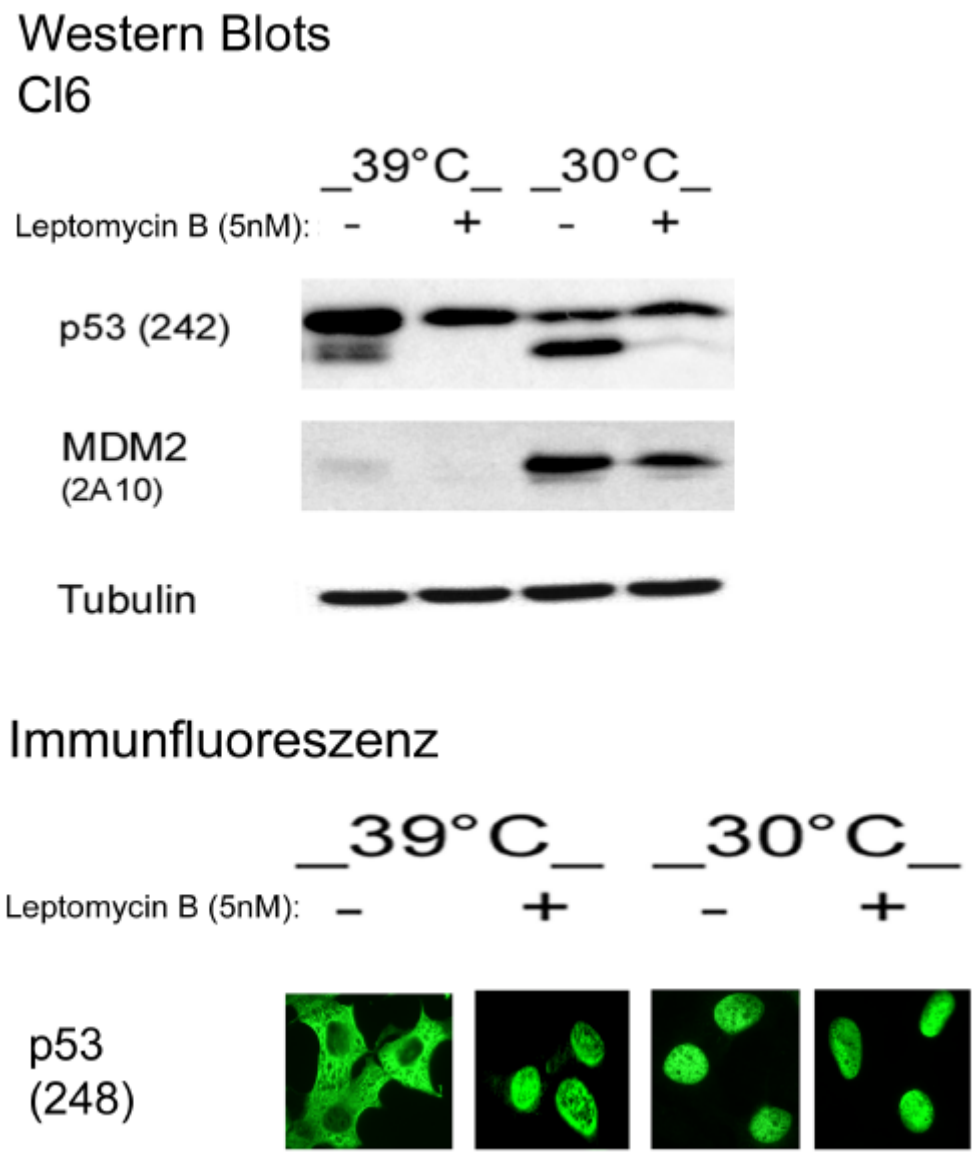


Abb. 29

Einfluss des Zellkernexports auf die DeltaC-tsp53 Proteinlevel in Cl6 Zellen.

Cl6 Zellen wurden bei 39°C und 30°C für 24 h in Gegenwart von 5 nM Leptomycin B inkubiert und anschließend lysiert. 60 µg des Extrakts wurden in einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und P53 bzw. Mdm2 mit den Antikörpern mAb242 bzw. mAb2A10 immundetektiert. Die inhibierende Wirkung des Leptomycin B auf den Zellkernexport wurde in der Immunfluoreszenz, die parallel durchgeführt wurde, verifiziert. Nach Fixierung der Cl6 Zellen in Ethanol wurden diese mit dem P53 spezifischen mAb248 Antikörper inkubiert. Der Primärantikörper wurde anschließend durch Bindung eines Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundärantikörpern (FITC) detektiert.

In Gegenwart des Zellkerninhibitors Leptomycin B wurden die DeltaC-tsp53 Proteinlevel bei 39°C und 30°C deutlich verringert (Abb. 29, Western). Die in behandelten Zellen bei 39°C beobachtete Akkumulation des tsp53 Proteins im Zellkern ist auf die negative Wirkung des Leptomycin B auf den Zellkernexport zurückzuführen (Abb. 29, P53-IF bei 39°C).
Bei 30°C zeigte das tsp53 Protein in Leptomycin B behandelten Cl6 Zellen dieselbe nukleäre Lokalisation wie das der unbehandelten Zellen (Abb. 29, P53-IF). Die Leptomycin B Behandlung führte zu deutlich verringerten DeltaC-tsp53 Proteinlevel. Diese Ergebnisse zeigen, dass die limitierte proteolytische Spaltung des FL-tsp53 Proteins in unbehandelten Cl6 Zellen nicht im Nukleus stattfindet, sondern dass dafür der aktive Export des tsp53 Proteins aus dem Zellkern notwendig war. Diese Daten zeigen, dass DeltaC-tsp53 im Zytoplasma produziert wird.

4.1.9. Appendix: Unterschiedlicher P19ARF Status in P160 und Cl6 Zellen

Die E3 Ligase Mdm2 katalysiert die Ubiquitinierung von P53, wodurch dieses in den proteasomalen Abbau eingeschleust wird (Kubbutat *et al.,* 1998). Ein zelluläres Protein, das negativ in den Mdm2-vermittelten proteasomalen P53 Abbau eingreift, ist P19ARF. Die Expression von P19ARF wird durch onkogenes Ha-ras induziert, welches als transgenes EJ-Ras in Cl6 und P160 Zellen exprimiert wird (Bates *et al*., 1998, Palmero *et al.,* 1998).

P19ARF kann zum einen die E3 Ligaseaktivität von Mdm2 inhibieren, zum anderen blockiert es den Export von Mdm2/P53 Komplexen aus dem Zellkern, was dazu führt, dass P53 von den zytoplasmatischen Proteasomen nicht mehr abgebaut werden kann (Roth *et al.,* 1998). P19ARF wird zusammen mit P16(INK4a) von einem alternativ prozessierten Primärtranskript exprimiert, welches vom INK4a-ARF Gen kodiert wird. P16(INK4) induziert einen G1/S Arrest durch die Inhibierung der Cdk4 und Cdk6 vermittelten Phosphorylierung von Rb (Kamijo *et al.,* 1998).

Die Expression von P19ARF wurde in den EJ-Ras transformierten Cl6 und P160 Zellen im Western Blot analysiert. Als Referenzzelllinie wurden die nicht transfizierten REF52 Zellen herangezogen (Abb. 30).
Diese Analysen zeigen, dass die P19ARF Expression in Cl6 Zellen (und SV40-Cl6 Zellen) im Vergleich mit REF52 Zellen deutlich erhöht ist (Abb. 30). Dagegen wurde

eine signifikante P19ARF Expression in P160 Zellen nicht nachgewiesen, obgleich das transgene EJ-Ras Protein in vergleichbarer Stärke exprimiert wurde. Die Expression von P19ARF in Cl6 Zellen könnte demnach eine negative Wirkung auf den Mdm2-vermittelten proteasomalen FL-tsp53 Abbau in diesem Subklon ausüben.

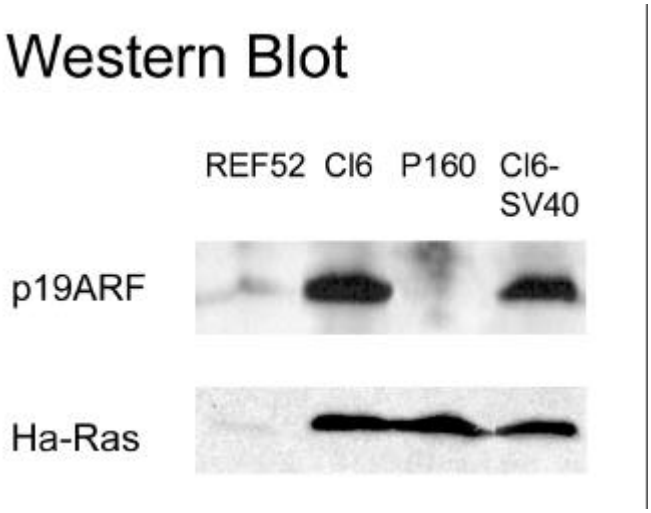


Abb. 30

P19ARF Expression in Cl6, P160 und SV40-Cl6 Zellen bei 39°C.

REF52, Cl6, P160 und SV40-Cl6 Zellen (39°C) wurden lysiert und 150 µg des jeweiligen Extrakts in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. P19ARF bzw. Ha-ras wurden mit den entsprechenden Antikörpern immundetektiert.

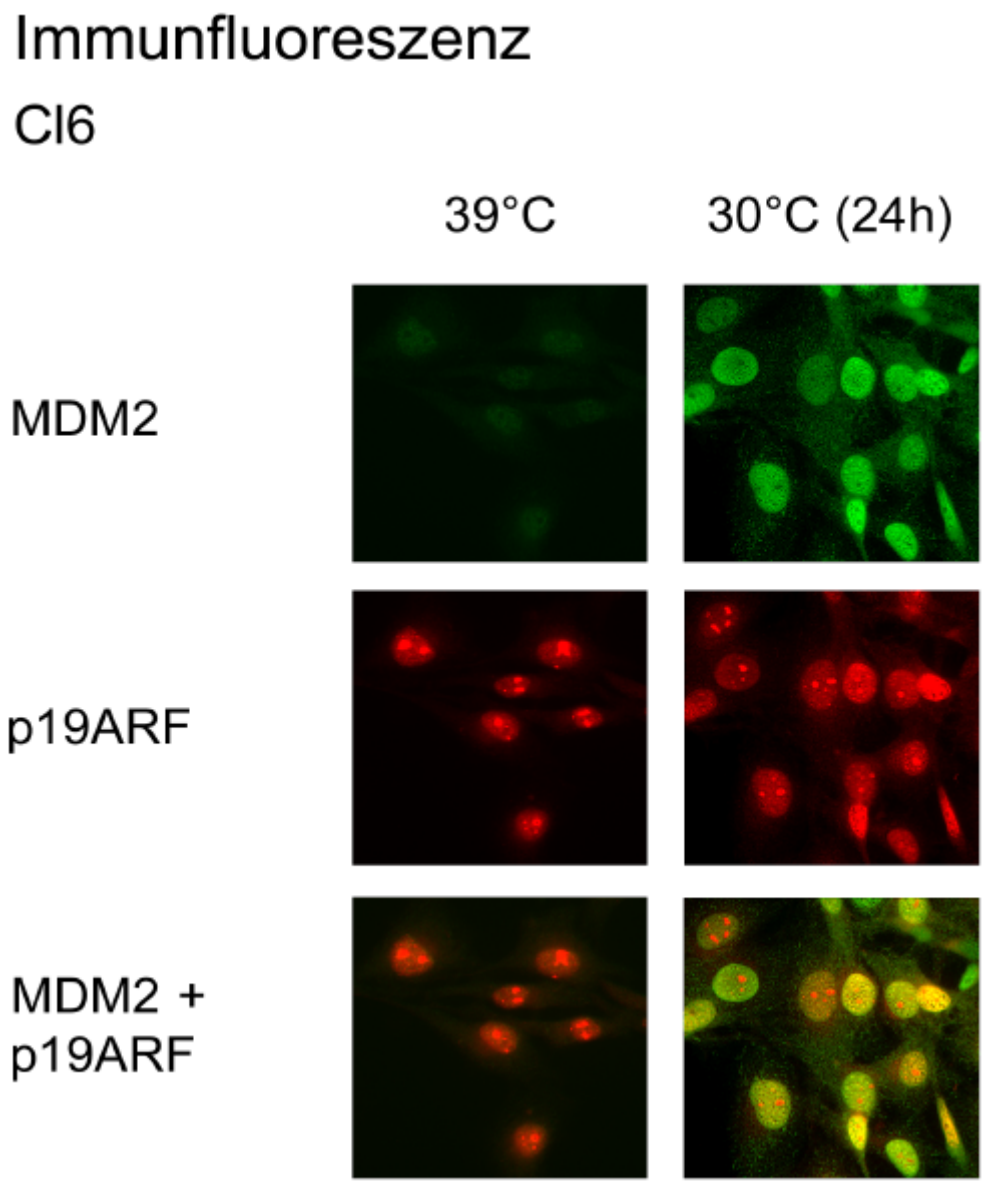
4.1.9.1. P19ARF kolokalisiert mit Mdm2 im Nukleoplasma

Es sollte untersucht werden, ob die P19ARF und Mdm2 Proteine in Cl6 Zellen kolokalisieren. Cl6 Zellen (und P160 Zellen als P19ARF Negativkontrolle) wurden in Ethanol fixiert und mit gegen Mdm2 bzw. P19ARF gerichteten Antikörpern inkubiert. Diese Antikörper wurden in unterschiedlichen Spezies hergestellt. Dadurch konnten spezies-gerichtete Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sekundärantikörper eingesetzt werden, die die *in situ* Detektion beider Proteine innerhalb der selben Zelle ermöglichte.

Wie die in Abb. 31 A dargestellten Ergebnisse einer Immunfluoreszenz zeigen, lokalisierte das P19ARF Protein in den Cl6 Zellen überwiegend in den Nukleoli. Es wurden keine qualitativen Unterschiede bezüglich der subzellulären Kompartimentierung dieses Proteins bei 39°C und 30°C nachgewiesen. Das tsp53-

induzierte Mdm2 (30°C) kolokalisierte mit P19ARF ausschließlich im Nukleoplasma (Abb. 31 A).

A.



B.

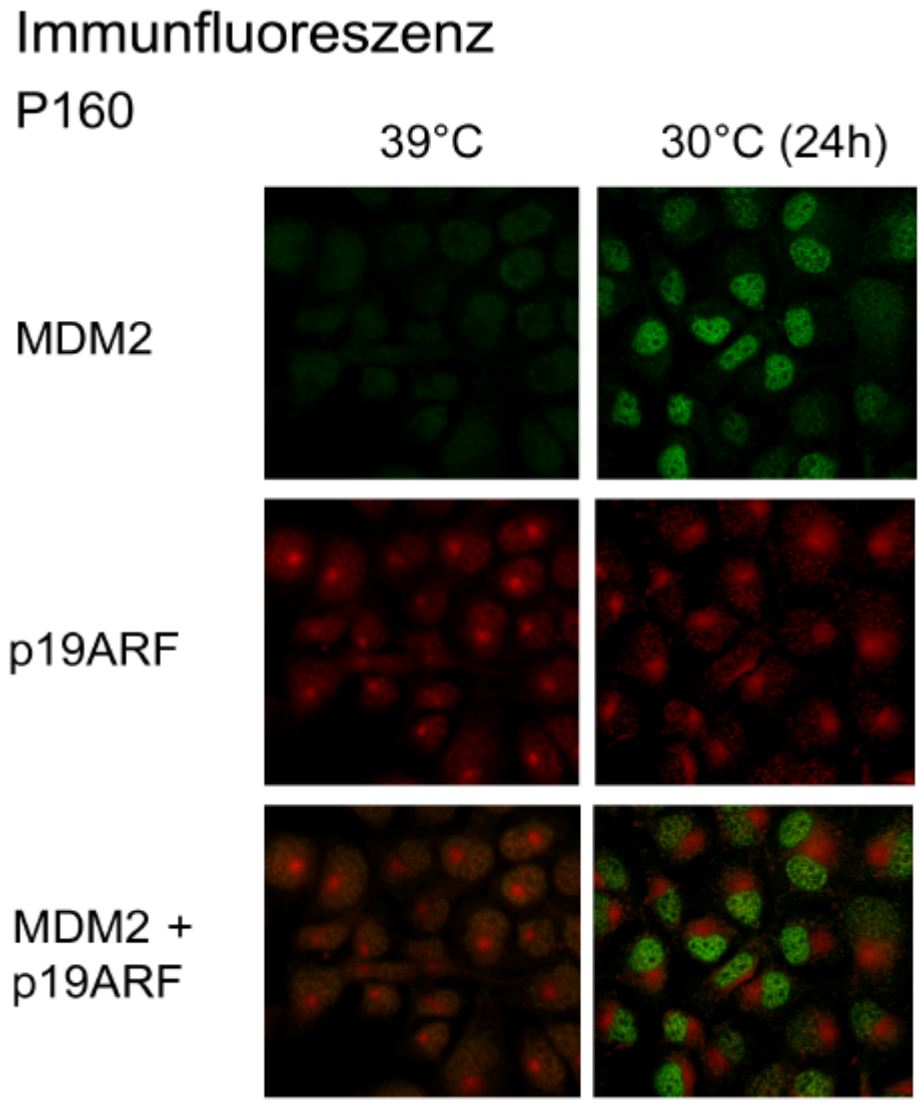


Abb. 31

Subzelluläre Lokalisierung von P19ARF und Mdm2 in Cl6 (A) und P160 Zellen (B).

Cl6 und P160 Zellen wurden bei 39°C bzw. 30°C (24h) kultiviert. Nach Fixierung der Zellen in Ethanol wurden diese mit dem Mdm2-spezifischen Antikörper mAb2A10 (Maus) und einem P19ARF Antikörper (Kaninchen) inkubiert. Die Primärantikörper wurden anschließend durch Bindung von speziesspezifischen Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Sekundärantikörpern detektiert (Mdm2 = FITC, grün , P19ARF = Rhodamin, rot).

Die sehr schwache zytoplasmatische Färbung in P160 Zellen stellt wahrscheinlich ein unspezifisches Signal dar, da P19ARF im Western Blot in diesem Subklon nicht nachweisbar war (Abb. 31B).

5. Diskussion

5.1. Einleitung

Die wichtigste Funktion des Tumorsuppressors P53 ist die eines Transkriptionsfaktor, der nach genotoxischem Stress die Expression von Genen mit Funktionen innerhalb der Apoptose, des Wachstumsarrests oder der DNA-Reparatur induziert (Kastan *et al*., 1991, Zhan *et al*., 1993, Maltzman *et al*., 1984, Lu *et al*., 1993, Fritsche *et al*., 1993). Der erste Schritt dabei ist die Bindung des wtp53 Proteins an die P53 DNA Konsensussequenz, die in der Promotor- oder Intronregion des jeweiligen Zielgens lokalisiert ist und sich aus mindestens zwei Kopien der Sequenz 5´-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3´ zusammensetzt (0 bis 13 bp Spacerregion) (El-Deiry *et al.,* 1992, Ko *et al.*, 1996, Levine *et al.,* 1997).
Da wtp53 über seine Funktion als Transkriptionsfaktor in sehr unterschiedliche, teilweise konträr erscheinende biologische Prozesse eingreift, muss diese Aktivität in der Zelle temporär und selektiv koordiniert werden, damit es nicht zu biologischen Konfliktsituationen kommt. Eine wichtige und weitgehend ungeklärte Frage ist, welche Parameter die Transaktivierungsaktivität des wtp53 Proteins so modulieren, dass eine differentielle, d.h. promotor-selektive Regulation von P53 Zielgenen möglich ist.

Die Zusammensetzung der P53 Konsensussequenz deutet darauf hin, dass es eine große Anzahl von funktionellen P53 Bindungsstellen gibt (El-Deiry *et al*., 1992). In der Tat zeichnen sich die P53 Bindungsstellen nativer Promotoren durch eine enorme Sequenzheterogenität aus. Funktionelle P53 Bindungsstellen weichen zudem oftmals stark von der Konsensussequenz ab und/oder setzen sich aus mehreren Dekameren zusammen (Gargonetti *et al*., 1991, Foord *et al*., 1993, DiComo *et al*., 1998, Stenger *et al*., 1994, Jackson *et al.,* 1998).
Die Variabilität der P53 Bindungsstellen resultiert in unterschiedlichen Bindungsaffinitäten des wtp53 Proteins (Halazonetis *et al*., 1993, Chin *et al*., 1997), welche auch die unterschiedlich aktivierte Transkription des jeweiligen Zielgens bewirken könnte (Szak *et al.,* 2002). Die differentielle, temporär abgestimmte

Regulation von P53 Zielgenen kann allerdings nicht allein mit den unterschiedlichen Bindungsaffinitäten von wtp53 für verschiedene Bindungsstellen erklärt werden.
Die differentielle Transaktivierung erfordert vielmehr transiente Modifikationen, die entweder auf Ebene der DNA bzw. des Chromatins oder aber des wtp53 Proteins stattfinden. Dies zeigt sich z.B. daran, dass (exogen eingeführtes) wtp53 in Zellinien der selben Spezies verschiedene Zielgene oftmals in Abhängigkeit vom jeweiligen zellulären Hintergrund transaktiviert (Thornborrow et al., 1999, Schmidt et al., 1999).

Die P53 Konsensussequenz ist aufgrund seiner palindromen Komposition prinzipiell in der Lage, transient nicht-B DNA Strukturen auszubilden (Kim *et al*., 1997). Diese DNA Sekundärstrukturen sind, abhängig von der jeweiligen Sequenz der P53 Bindungsstelle und der nukleosomalen Verpackung, mehr oder weniger stabil (Espinosa *et al*., 2001, Göhler *et al*., 2002). Das wtp53 Protein zeigt *in vitro* eine hohe Bindungsaffinität für solche DNA Sekundärstrukturen (Kim *et al.,* 1997, Göhler *et al.,* 2002). Die transiente Bildung dieser Strukturen in Promotoren bestimmter P53 Zielgene könnte die Bindung von wtp53 und die Transkription beeinflussen. So zeigten Kim *et al*. (1998), dass die DNA Topologie einen Einfluss auf die Bindung von wtp53 an den Promotor des *mdm2* Gens, nicht aber des *p21* Gens *in vitro* zeigt.
Transiente kovalente oder nicht-kovalente Modifikationen von wtp53 (z.B. Phosphorylierungen oder Protein/Protein-Interaktionen) können nicht nur seine Bindungsaffinität für bestimmte P53 Zielgen-Promotoren, sondern auch die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, die für eine Induktion des jeweiligen Zielgens erforderlich sind, beeinflussen (Siliciano *et al*., 1997, Meek, 1999, Jimenez *et al.,* 1999, Agarwal *et al.,* 1998). Lohrum *et al*. (1996) zeigten, dass der Phosphorylierungsstatus des wtp53 Proteins eine Rolle bei der differentiellen Transaktivierung spielen kann. So hatte die C-terminale CDK-Phosphorylierungsmutante A313 im Vergleich zu wtp53 eine verringerte Transaktivierungsaktivität für das *p21* und *mdm2* Gen, wohingegen die Induktion des *cyclin G* Gens erhöht war. Die P53 Phosphorylierungsmutante A390 zeigte eine erhöhte Aktivierung der *p21* und *bax* Transaktivierung, jedoch eine verringerte Induktion des *cyclin G* Gens.
Eine Reihe von Proteinen wurden beschrieben, die die DNA Bindungsaktivität des wtp53 Proteins *in vitro* negativ (Luo *et al.,* 2000, Nelson *et al.,* 2001, Shinobu *et al*., 1999) oder positiv (Jayaraman *et al*., 1997, Iwabuchi *et al*., 1998, Gaiddon *et al*.,

1999 , Ueno *et al*., 1999, Okamoto *et al*., 2000, Peng *et al*., 2001) beeinflussen. Eine differentielle Regulation der DNA Bindung durch diese Protein-Interaktionen wurde in den meisten Fällen nicht untersucht. Ein Protein, welches die Transaktivierungsaktivität des wtp53 Proteins *in vivo* differentiell modulieren kann, ist das RB18A Protein. Die Bindung von RB18A an wtp53 aktiviert die wtp53-abhängige Expression des *bax* Gens, wohingegen die Aktivierung der *p21* und *igf-bp3* Gene durch diese Interaktion blockiert wird (Frade *et al.,* 2000).

Diese Daten verdeutlichen, dass eine temporär und selektiv koordinierte Regulation der mannigfaltigen Transaktivierungsaktivität des wtp53 Proteins nur durch transiente Modifikationen, die auf DNA- oder Proteinebene stattfinden können, gewährleistet werden kann. Die Analyse von Parametern, die die Funktion von wtp53 als Transkriptionsfaktor selektiv modulieren, war Ziel der vorliegenden Doktorarbeit.

5.2. Differentielle tsp53*val135*-abhängige Transaktivierung von P53 Zielgenen im P160/Cl6 Zellsystem: Zwei Expressionsgruppen

Als Modellsystem für die Untersuchung von Parametern, die die Transaktivierungsaktivität des wtp53 Proteins selektiv modulieren können, wurde ein Zellsystem verwendet, in dem funktionelles P53 induziert werden kann. Der Einsatz solcher induzierbaren Zellsysteme ermöglicht es, zwischen wtp53-abhängigen und wtp53-unabhängigen Einflüssen auf die Expression von P53 Zielgenen diskriminieren zu können.

Bei diesem wtp53-induzierbaren Zellsystem handelte es sich um primäre embryonale Rattenfibroblasten (REF), die durch Kotransfektion von Expressionsvektoren, die für ein onkogenes Ras (EJ-Ras) und die temperatursensitive P53 Mutante tsp53*val135 (*A135>V) kodieren, transformiert und als stabile transgene Zellinien etabliert wurden (Michalovitz *et al.*, 1990). Bei 39°C, der restriktiven Temperatur, kann das temperatursensitive P53 Protein aufgrund seiner Mutantenkonformation, seine Funktion als Transkriptionsfaktor nicht ausüben (Abb. 4, 39°C). Die Kultivierung der transgenen REF Zellen bei 30°C, der permissiven Temperatur, führt zur Stabilisierung der wt-ähnlichen Konformation des tsp53 Proteins, dessen Akkumulation im Zellkern und der Transaktivierung von P53 Zielgenen (Abb. 3 und Abb. 4).

Das tsp53 Protein in zwei Subklonen dieser EJ-Ras transformierten tsp53-REF Zellen (Cl6 und P160 Zellen) zeigte differentielle Unterschiede bezüglich der Induktion (39°C > 30°C) ausgewählter P53 Zielgene (Abb. 3 und Abb. 4).

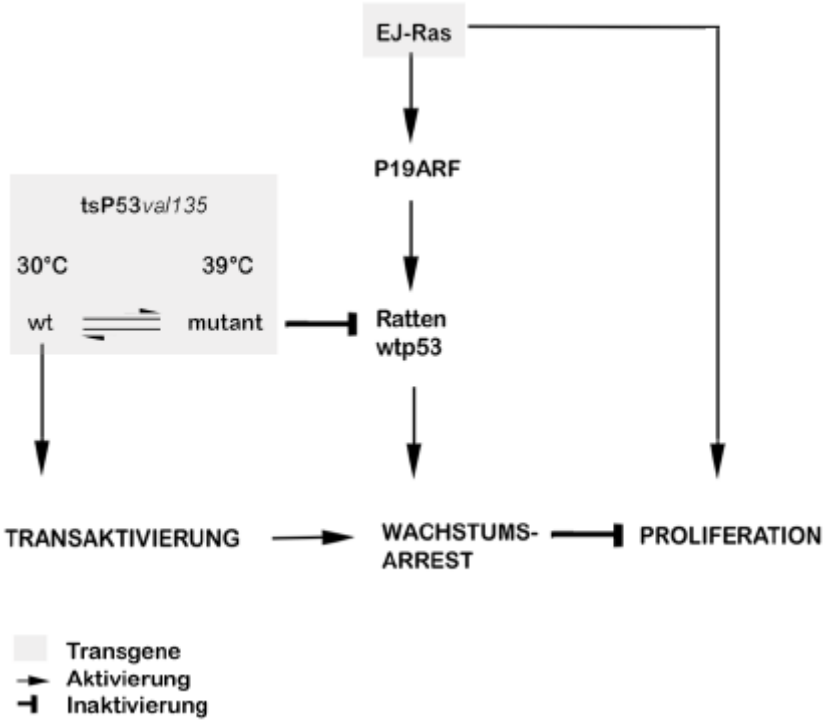


Abb. 32

Aktivität des transgenen tsp53*val135* Proteins in EJ-Ras transformierten REF Zellen.

Die Expression von onkogenem EJ-Ras in primären Zellen induziert Signaltransduktionskaskaden (z.B. MAP Kinase, PI3 Kinase) und die Expression von P19ARF. P19ARF blockiert den negativen Mdm2/P53 Rückkopplungsmechanismus (Abb. 1). Dies hat zur Folge, dass wtp53 in der Zelle akkumuliert und von den induzierten Proteinkinasen post-translational modifiziert, d.h. „aktiviert" wird. Die Transkription von P53-Wachstumsarrest- Genen führt dazu, dass die Zelle arretiert. Für die Etablierung des EJ-Ras induzierten transformierten Phänotyps, muss wtp53 oder P19ARF zuvor inaktiviert werden.

In den EJ-Ras transformierten Cl6 bzw. P160 Subklonen wird das endogene Ratten wtp53 Protein bei 39°C von dem mutanten tsp53*val135* Protein (tsp53*val135* A>V) gebunden und dadurch inaktiviert (Michalovitz *et al*., 1990, Zambetti *et al*., 1992, deStanchina *et al.,* 1998, Zindy *et al.,* 1998, Parada *et al*., 1984, Eliyahu *et al*., 1984, Jenkins *et al*., 1984, Rovinski *et al*., 1988). Dadurch kann der EJ-Ras transformierte Phänotyp etabliert werden.
Bei 30°C nimmt das tsp53*val135* Protein eine wt-ähnliche Konformation an. Dies führt dazu, dass das tsp53 Protein im Zellkern akkumuliert und die Transkription der P53 Zielgene (Transaktivierung) auslöst. Dadurch wird ein wtp53-abhängiger Wachstumsarrest eingeleitet, der dem transformierten Phänotyp der REF Zellen entgegenwirkt.

Während das funktionelle tsp53 Protein in Cl6 und P160 Zellen eine vergleichbare Expression des *p21* Gens initiierte (Gruppe I), konnte es in dem zellulären Hintergrund des Cl6 Subklons eine deutlich stärkere Transkription der *mdm2, b99,*

gadd45, cyclinG und *bax* Gene bei 30°C auslösen (Gruppe II) (Abb. 3 und Abb. 4). Die Transaktivierungsaktivität des tsp53 Protein wurde demnach in einem annähernd isogenen Hintergrund (Cl6 und P160 Subklon) differentiell moduliert.

P53 Zielgen	Funktion	
Gruppe I		
p21	G1/S Arrest	> Bindung an CyclinD/Cdk4 Komplexe
Gruppe II		
mdm2	P53 Inaktivierung	> Ubiquitinierung von P53 > Bindung an die Transaktivierungsdomäne von P53
b99	G2/M Arrest	> Blockierung der Mikrotubuli-Umstrukturierung in Mitose
gadd45	G2/M Arrest	> Blockiert Cdc2/CyclinB1 Komplexbildung
cyclin G	G2/M Arrest Apoptose	? ?
bax	Apoptose	> Bindung an Bcl-2

Abb. 33

Differentielle Transaktivierung von P53 Zielgenen im P160/Cl6 Zellsystem.

Das tsp53val135 Protein induziert in Cl6 und P160 Zellen das *p21* Gen in vergleichbarer Stärke (Gruppe1).

P21 bindet an den CyclinD/Cdk4 Komplex und verhindert die Phosphorylierung des Retinoblastomaproteins (Rb). Dies führt über die Bildung von Rb/E2F Komplexen zu einer Sequestrierung des E2F-Transkriptionsfaktors. Dadurch wird die E2F-abhängige Expression von Genen unterbunden, die für den Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus notwendig ist (Review Agarwal *et al.,* 1998). P21 inaktiviert zudem PCNA, eine Untereinheit der DNA Polymerase-Gamma (Chen *et al*., 1995).

Das tsp53val135 Protein der Cl6 Zellen ist in der Lage, die Expression des *mdm2* Gens, sowie von Genen mit Funktionen innerhalb des G2/M Wachstumsarrestes und der Apoptose, bei 30°C stärker als das der P160 Zellen zu transaktivieren (Gruppe 2).

Mdm2 blockiert die Aktivität des wtp53 Proteins durch Bindung an die N-terminale Transaktivierungsdomäne. Außerdem katalysiert Mdm2 die Ubiquitinierung von P53. Diese Modifikation ist Voraussetzung für den proteasomalen Abbau von P53.
Der P53 abhängige G2/M Wachstumsarrest findet u.a. über die Inhibierung der Cyclin-abhängigen Kinase Cdc2 statt. Die Cdc2 Aktivität ist für den Eintritt der Zelle in die Mitose notwendig (Nurse *et al*., 1990).
Die Aktivierung von Cdc2 erfolgt über die Bindung an Cyclin B1 und der Phosphorylierung durch die CDK-aktivierende Kinase (CAK) (Pines *et al*., 1995). Die Cdc2/Cyclin B1 Bindung kann durch **Gadd45** blockiert werden, wodurch ein G2/M Wachstumsarrest ausgelöst wird (Jin *et al*., 2000, Zhan *et al*., 1999). Gadd45 spielt auch eine Rolle bei der Induktion des G1/S Arrestes, indem es durch Bindung an PCNA den Eintritt in die S Phase blockiert (Chen *et al*., 1995). Cdc2 kann auch durch Bindung an das 14-3-3-sigma Protein zytoplasmatisch sequestriert und so inaktiviert werden. Eine signifikante tsp53-abhängige Regulation (> 3 fach) des *14-3-3 sigma* Gens konnte in Cl6 und P160 Zellen nicht nachgewiesen werden.
B99, dem eine Rolle bei der Induktion des P53-abhängigen G2/M Wachstumsarrestes zugeschrieben wird, ist mit dem Mikrotubuli-Netzwerk der Zelle assoziiert und blockiert bei höheren zellulären Konzentrationen die Umstrukturierung der Mikrotubuli während der Mitose (Utrera *et al.,* 1998).
Das P53-induzierte **Cyclin G** spielt eine Rolle während des G2/M Arrestes und der Apoptose, obgleich seine Funktionsweise bislang ungeklärt ist (Shimizu *et al*., 1998, Okamoto *et al*., 1999). Das proapoptotische **Bax** alpha Protein bindet an Bcl-2, einem Inhibitor der Apoptose. Das Equilibrium zwischen Bax und Bcl-2 ist ein Parameter, der festgelegt, ob die Zelle in den programmierten Zelltod geht (Miyashita *et al*., 1995, Salomons *et al*, 1997).

Das tsp53-Protein in Cl6 und P160 Zellen benötigt für die Induktion der P53 Zielgene keine „Aktivierung“ durch genotoxischen Stress, wie dies in normalen Zellen der Fall ist (Abb. 4) (Agarwal *et al*., 1998). Daraus kann gefolgert werden, dass „aktiviertes“ tsp53 Protein in diesen Zelllinien bereits vorhanden ist.
Wie entsteht dieses „aktivierte“ tsp53 Protein? Wahrscheinlich ist, dass in den transformierten Cl6 und P160 Zellen aufgrund der transgenen Expression des onkogenen EJ-Ras diverse Signaltransduktionskaskaden konstitutiv „aktiviert“ sind (z.B. PI3- und MAP Kinasen), die in normalen Zellen erst durch genotoxischen Stress induziert werden. Dies erklärt, warum die Transaktivierungsaktivität des funktionellen tsp53 Proteins durch Gammabestrahlung beider Subklone, nicht moduliert werden konnte (Abb. 24).

5.2.1. Korrelation zwischen der erhöhter tsp53-abhängigen Expression von G2/M Wachstumsarrestgenen und der Entstehung eines G2/M Checkpoints in Cl6 Zellen

Die differentiell modulierte Transaktivierungsaktivität des transgenen tsp53 Proteins in Cl6 und P160 Zellen resultierte in der differentiellen Expression von G1/S- und G2/M Wachstumsarrest Genen bei der permissiven Temperatur. Diese spiegelte sich auch in einem unterschiedlichen Zellzyklusverhalten beider Subklone nach Induktion von funktionellem tsp53 wider.
In Abwesenheit des funktionellen tsp53 Proteins (39°C) konnte in Cl6 und P160 Zellen eine vergleichbare Verteilung der Zellen in der G1-, S- und G2/M Phase des Zellzyklus beobachtet werden (Abb. 6).
Nach Induktion des funktionellen tsp53 Proteins (30°C) verringerte sich in beiden Subklonen die Proliferationsrate deutlich (S-Phasezellen: 39°C ~ 53%, 30°C ~ 2-5%)(Abb. 6). Dies ist vor allem auf die Einleitung eines G1/S Wachstumsarrests zurückzuführen, der durch die tsp53-induzierte Expression von P21 induziert wurde (Abb. 3B).
Im Gegensatz zu P160 Zellen, arretierte ein Teil der Cl6 Zellen in der G2/M Phase des Zellzyklus (4% in P160 und 19% in Cl6) (Abb. 6). Dieser tsp53-induzierte G2/M Checkpoint in Cl6 Zellen korrelierte mit der in diesem Subklon erhöhten Expression von G2/M Wachstumsarrest Genen, wie *gadd45, b99* und *cyclin G* (Abb. 4, Abb. 33).

In dem P160 Subklon reichte die tsp53-induzierte Expression dieser Gene vermutlich nicht aus, um einen Teil der Zellen in der G2/M Zellzyklusphase zu arretieren. Die erhöhten Mdm2 Proteinlevel in Cl6 Zellen könnten zudem über die Mdm2-vermittelte Induktion von E2F1 den Eintritt der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus auch in Gegenwart von P21 ermöglichen. Dadurch erklärt sich der höhere Anteil von in der G1/S Phase des Zellzyklus arretierter Zellen in P160 (G1: 94%) im Vergleich zu Cl6 Zellen (G1: 76%) bei 30°C (Abb. 6).
Die Parameter, die eine gerichtete Wirkung auf die Transaktivierungsaktivität des tsp53 Proteins im Cl6/P160 Zellsystem besitzen, modulieren demnach die Funktionen von wt-tsp53 innerhalb des G2/M Wachstumsarrests (und der Apoptose?) und nicht die des G1/S Wachstumsarrestes. Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass der G1/S Wachstumsarrest wahrscheinlich eine Grundfunktion des wtp53 Proteins darstellt und dass für die Entstehung eines wtp53-abhängigen G2/M Arrestes zusätzliche Ereignisse notwendig werden.

5.3. P160 und Cl6 Zellen exprimieren neben dem regulären tsp53 ein C-terminal verkürztes tsp53 Protein (DeltaC-tsp53)

Das tsp53 Protein induzierte in Cl6 Zellen im Vergleich zu P160 Zellen die selektive Transaktivierung von G2/M Wachstumsarrest Genen mit dem Resultat eines G2/M Checkpoints in diesem Subklon. Es konnte vermutet werden, dass die differentielle Transaktivierung in P160 und Cl6 Zellen auf unterschiedliche biochemische und/oder biologische Eigenschaften des in diesen Zellen exprimierten tsp53 Proteins zurückgeführt werden kann.
Cl6 und P160 Zellen exprimieren bei 39°C und 30°C neben dem regulären 53 kD großen tsp53 Protein (FL-tsp53) auch ein C-terminal verkürztes tsp53 Protein (DeltaC-tsp53). Dieses hatte in der SDS-PAGE eine Größe von 45 kD (Abb. 7 A+B).

Der wtp53 C-Terminus (AS 320-393) enthält Proteindomänen, die direkten Einfluss auf die sequenz-spezifische DNA Bindung und damit die Funktion des wtp53 Proteins als Transkriptionsfaktor ausüben (Chene, 2001). Die letzten 30 C-terminalen, basischen Aminosäuren besitzen *in vitro* eine negative Wirkung auf die sequenz-spezifische DNA Bindungsaktivität des wtp53 Proteins (Hupp *et al*., 1995). Die vollständige Deletion des basischen P53 C-Terminus (AS 363-393) führt *in vitro*

zu einem Protein mit konstitutiver sequenz-spezifischer DNA Bindungsaktivität (Hupp *et al.,* 1992).

In vivo und unter den Versuchsbedingungen des *in vitro* DNA Protektionsassays kann diese negative Wirkung des basischen P53 C-Terminus allerdings nicht beobachtet werden (Abb. 17). So zeigten Espinosa *et al.* (2001), dass der basische P53 C-Terminus vielmehr für eine effiziente Bindung von wtp53 an die Konsensussequenz im Chromatin notwendig war. Göhler *et al*. (2002) ergänzten diese Beobachtung, indem sie zeigten, dass der basische P53 C-Terminus für die Erkennung von DNA Sekundärstrukturen innerhalb der P53 Bindungsstelle benötigt wird.

Der wtp53 C-Terminus enthält neben der regulatorischen, basischen Region außerdem eine Tetramerisierungsdomäne (AS 320 - 363) (Review Chene *et al.,* 2001). Die Tetramerisierung des wtp53 Proteins ist Voraussetzung für eine effiziente sequenz-spezifische DNA Bindung (Stenger *et al*., 1992, Sturzbecher *et al*., 1992, Subler *et al.,* 1993, Friedman *et al.,* 1993, Hupp *et al*., 1994, Pietenpol *et al*., 1994, Halazonetis *et al.,* 1998). Faktoren, die in den Prozess der Oligomerisierung eingreifen (z.B. Modifikationen von wtp53, Protein/Protein Interaktionen), beeinflussen somit auch indirekt die Transaktivierungsaktivität von wtp53 (Chene *et al.*, 2001).

Aufgrund dieser regulatorischen Funktion des wtp53 C-Terminus, konnte vermutet werden, dass sich die DNA Bindungsaktivität eines C-terminal verkürztes P53, wie DeltaC-tsp53, von der des FL-tsp53 unterscheiden sollte.

Wichtige Hinweise, die prinzipiell für eine Aktivität von DeltaC-tsp53 als Transkriptionsfaktor sprachen, lieferten Expressionsstudien in Cl6 Zellen, die neben dem transgenen *EJ-Ras* und *tsp53val135* ein im Genom integriertes SV40 enthalten (SV40-Cl6 Zellen) (Abb. 18). Das SV40-kodierte T-Antigen Protein bindet in SV40-Cl6 Zellen selektiv an FL-tsp53 (Henning, 1998). Die Bindung von wtp53 an T-Antigen inaktiviert die Funktion von P53 als Transkriptionsfaktor (Bargonetti *et al.,* 1992, Farmer *et al*., 1992, Jiang *et al.,* 1993). Das DeltaC-tsp53 Protein wird hingegen nicht von dem T-Antigen Protein gebunden und könnte daher als potentieller Transkriptionsfaktor bei der permissiven Temperatur fungieren (Henning, 1998). Im Einklang mit dieser Annahme konnte trotz der inaktivierenden Wirkung von T-Antigen auf die FL-tsp53 Aktivität eine tsp53-abhängige Transaktivierung des *p21*

und *mdm2* Gens im Northern Blot nachgewiesen werden (Abb. 18), was auf die Aktivität von DeltaC-tsp53 hindeutete.
In Cl6 und P160 Zellen konnten bei der permissiven Temperatur erhebliche Unterschiede in den FL-tsp53 und DeltaC-tsp53 Proteinspiegeln beobachtet werden (Abb. 7), die möglicherweise in einer unterschiedlichen Gewichtung der tsp53-abhängigen Transaktivierung von P53 Zielgenen resultierten.

5.3.1. DeltaC-tsp53 ist kein DNA-bindender Transkriptionsfaktor

Voraussetzung für die Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie und Initiierung der Expression eines P53 Zielgens ist die Bindung von wtp53 an die P53 Bindungsstelle innerhalb des Promotors (El-Deiry *et al.,* 1992). Um eine Funktion von DeltaC-tsp53 als Transkriptionsfaktor postulieren zu können, musste eine sequenz-spezifische DNA Bindung dieses Proteins *in vivo* nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) war es möglich, die Bindung der tsp53 Proteine (FL-tsp53 und DeltaC-tsp53) an die Promotoren der *p21* und *mdm2* Gene in Cl6 und P160 Zellen genauer zu untersuchen (Abb. 14).
Die „maximale“ Beladung der jeweiligen Promotoren mit tsp53 Proteinen (FL-tsp53 und DeltaC-tsp53) wurde in einer ChIP-Analyse semi-quantitativ bestimmt.
Die Ergebnisse dieser ChIP Experimente zeigten, dass die bei 30°C beobachtete Beladung der *p21* und *mdm2* Promotoren mit tsp53 Protein ausschließlich auf die Bindung von funktionellem FL-tsp53 zurückgeführt werden konnte (Abb. 15). Eine Bindung des verkürzten tsp53 Proteins wurde unter diesen Versuchsbedingungen nicht nachgewiesen.
Außerdem korrelierte in Cl6 und P160 Zellen die Beladung des *p21* und *mdm2* Promotors mit funktionellem FL-tsp53 (Abb. 15, mAb122) direkt mit der in beiden Subklonen beobachteten differentiellen Transkription beider Gene (Abb. 3). Die Parameter, die die Transaktivierungsaktivität des transgenen FL-tsp53 Proteins in P160 und Cl6 Zellen selektiv modulierten, wirkten demzufolge auf Ebene der sequenz-spezifischen DNA Bindung von FL-tsp53.

Da *in vivo* die Messung der DNA Bindungsaktivität von DeltaC-tsp53 im ChIP Assay lediglich indirekt möglich war, sollte diese Aktivität *in vitro* direkt analysiert werden.

Das FL-tsp53 Protein wurde aus Cl6 Zellkernextrakten selektiv mit einem gegen den P53 C-Terminus gerichteten Antikörper immundepletiert (Abb. 16 B, 421). Die Bindung des DeltaC-tsp53 Proteins in diesem behandelten Extrakt an die klonierten Promotoren des *p21* und *mdm2* Gens wurde dann im DNA Protektionsassay untersucht.
Während das FL-tsp53 Protein im nicht-depletierten Zellkernextrakt eine Protektion der P53 Bindungsstelle des p*21* bzw. *mdm2* Promotors bewirkte, konnte eine Protektion im mAb421-depletierten Extrakt, welcher nur das DeltaC-tsp53 Protein enthielt, nicht beobachtet werden (Abb. 16 C). Eine sequenz-spezifische DNA Bindungsaktivität von DeltaC-tsp53 ist demzufolge *in vitro* nicht vorhanden. Dieses Ergebnis verifizierte die Daten, die zuvor mit dem ChIP Assay erhalten wurden.
Aufgrund der fehlenden sequenz-spezifischen DNA Bindung von DeltaC-tsp53 konnte ausgeschlossen werden, dass dieses Protein als Transkriptionsfaktor fungieren kann und über diese Funktion an der in Cl6 und P160 Zellen beobachteten differentiellen Transaktivierung beteiligt war.

Warum ist das verkürzte tsp53 Protein nicht in der Lage, an die P53 Bindungsstelle zu binden? In *in vitro* Protein-Crosslinking Experimenten konnte gezeigt werden, dass DeltaC-tsp53 keine (Homo)-oligomere ausbilden kann (Abb. 20). Diese Beobachtung stellt eine wahrscheinliche Erklärung für die fehlende DNA Bindungsaktivität von DeltaC-tsp53 dar, weil die Tetramerisierung für eine effiziente sequenz-spezifische DNA Bindung des wtp53 Proteins notwendig ist (Stenger *et al*., 1992, Sturzbecher *et al*., 1992, Subler *et al.,* 1993, Friedman *et al.,* 1993, Hupp *et al*., 1994, Pietenpol *et al*., 1994, Halazonetis *et al.,* 1998). Zwar ist auch monomeres P53 bei höheren Konzentrationen in der Lage, kooperativ an P53 relevante Promotoren zu binden und diese in transienten Transfektionen zu induzieren, eine Transaktivierung der chromosomalen Gene kann dieses allerdings in der Regel nicht auslösen (Shaulian *et al*., 1993, Tarunini *et al*., 1993 und 1996, Balagurumoorthy *et al.,* 1995, Bargonetti *et al.,* 1993, McLure *et al*., 1998, Nagaich *et al.,* 1999, Pavletich *et al.,* 1993, Sang *et al*., 1994, Shaulian *et al.,* 1993 und 1995, Stenger *et al.,* 1994, Subler *et al*., 1994, Tarunini *et al.,* 1993 und 1996, Wang *et al*., 1993, Zhang *et al*., 1994, Aoyama *et al*., 1992, Reed *et al*., 1993).

5.3.2. DeltaC-tsp53 kann die Aktivität von FL-tsp53 nicht über direkte Bindung beeinflussen

Cl6 und P160 Zellen enthalten bei der permissiven Temperatur signifikante Konzentrationen an verkürztem tsp53 Protein (Abb. 7 B). Obgleich ausgeschlossen werden konnte, dass DeltaC-tsp53 sequenz-spezifisch DNA binden und dadurch die Induktion der Transkription auslösen kann (Abb. 15 und Abb. 16 C), bestand dennoch die Möglichkeit, dass es über eine Bindung an FL-tsp53 indirekt an der Regulation der differentiellen Transaktivierung beteiligt war.

In FL-tsp53 Immunkomplexen, die mit einem gegen den P53 C-Terminus gerichteten Antikörper aus Extrakten von Cl6 und P160 Zellen präzipitiert wurden, konnte allerdings kein DeltaC-tsp53 Protein nachgewiesen werden (Abb. 21). Eine durch das verkürzte tsp53 Protein vermittelte Modulation der FL-tsp53 Aktivität ist demnach nicht möglich.

Zusammenfassend zeigten die mit DeltaC-tsp53 durchgeführten funktionellen Studien, dass ein direkter Einfluss dieser tsp53 Form auf die differentielle Transaktivierung im Cl6/P160 Zellsystem nicht existiert, weder auf Ebene der sequenz-spezifischen DNA Bindung, noch auf der Ebene einer FL-tsp53 Heterooligomerisierung.

5.3.3. DeltaC-tsp53 entsteht *in vivo* vermutlich während des proteasomalen Abbaus von ubiquitiniertem FL-tsp53

C-terminal verkürzte P53 Proteine entstehen *in vitro* aufgrund eines vorzeitigen Translationsabbruchs, verursacht durch stabile RNA Sekundärstrukturen im *p53* Transkript (Mosner *et al*., 1995), sowie *in vivo* als Produkt der alternativen Prozessierung des *p53* Primärtranskripts (Arai *et al*., 1986). Beide Mechanismen konnten für die Produktion von DeltaC-tsp53 in Cl6 und P160 Zellen ausgeschlossen werden (Abb. 8 und Abb. 11).

DeltaC-tsp53 wurde in insgesamt fünf unterschiedlichen EJRas-transformierten tsp53val135-exprimierenden REF Zelllinien nachgewiesen (Michalovitz *et al.,* 1990) (Abb. 9). Bei der Expression von DeltaC-tsp53 handelt es sich demnach nicht um einen zufälligen, klonal auftretenden Artefakt (z.B. Trunkierung des tsp53val135 Transgens).

Eine alternative Möglichkeit war, dass DeltaC-tsp53 *in vivo* auf proteolytischem Weg, d.h. durch eine spezifische proteolytische Abspaltung des FL-tsp53 C-Terminus, entsteht.
Die Blockierung der proteolytischen Aktivität der 20S Proteasomen führte in Cl6 Zellen zu einer Akkumulation von ubiquitin-konjugierten FL-tsp53 Proteinen und einer deutlichen Reduktion der DeltaC-tsp53 Level (Abb. 28 A + B). Daraus wurde gefolgert, dass DeltaC-tsp53 *in vivo* vermutlich während des proteasomalen Abbaus von ubiquitiniertem FL-tsp53 Protein entsteht.
Eukaryontische 26S Proteasomen setzen sich zusammen aus einem 20S-Komplex (28 Untereinheiten), der chymotrypsin-, trypsin- und postglutamin-ähnliche Proteolyseaktivitäten enthält und dem PA700 Komplex, welcher die ubiquitin-konjugierten Proteine bindet und deren tertiäre Proteinstruktur ATP-abhängig entfaltet. Diese Entfaltung ist notwendig, damit das Protein anschließend in den ringförmig aufgebauten 20S-Komplex eingeführt werden kann (Review DeMartino *et al.,* 1999). Denkbar wäre, dass während des proteasomalen Abbaus von FL-tsp53 der N-terminale Teil des Proteins (DeltaC-tsp53) vorzeitig freigesetzt wurde.

Der reguläre Abbau von P53 findet vorwiegend an den 26S Proteasomen im Zytoplasma statt (Maki *et al.,* 1996, Freedman *et al.,* 1997). Die Blockierung des Zellkernexports (Leptomycin B) in Cl6 Zellen führte dazu, dass das FL-tsp53 Protein im Zellkern akkumulierte, was in deutlich verringerten DeltaC-tsp53 Proteinspiegeln resultierte (Abb. 29). Diesen Daten zufolge, wird das verkürzte tsp53 Protein vorwiegend an zytoplasmatischen Proteasomen produziert.

DeltaC-tsp53 wandert in der SDS-PAGE auf Höhe von tsp53 (AS 1-320)(Daten nicht gezeigt). Es ist wahrscheinlich, dass die meisten Lysin-Aminosäuren des C-Terminus, an die das Ubiquitinmolekül (~ 8 kD) kovalent gebunden wird (für humanes wtp53 = AS 370, 372, 373, 381, 382, 386) (Rodriguez *et al*., 2000), auf dem DeltaC-tsp53 Protein nicht vorhanden sind. Demnach stellt DeltaC-tsp53 kein Substrat für den proteasomalen Ubiquitin-Abbauweg mehr dar. Untermauert wird dies durch die Beobachtung, dass DeltaC-tsp53 nicht von der E3 Ligase Mdm2, welche die für die Einschleusung des FL-tsp53 Proteins in den proteasomalen Abbau notwendige Ubiquitinierung katalysiert, gebunden wird (Abb. 23). Maki *et al*. (1999) zeigten, dass die Deletion der P53 Oligomerisierungsdomäne dazu führt, dass eine

Bindung von Mdm2 und die Ubiquitinierung des P53 Proteins nicht mehr stattfinden kann. Auch der von Inoue *et al.* (2001) beschriebene Fall, dass oligomerisierungs-inkompetentes P53 über eine Bindung an wtp53 indirekt von Mdm2 ubiquitiniert und so in den proteasomalen Abbau geführt wird, kann aufgrund der fehlenden Heterooligomerisierung zwischen DeltaC-tsp53 und FL-tsp53 (Abb. 21) ausgeschlossen werden.
Da DeltaC-tsp53 weder direkt noch indirekt von Mdm2 gebunden wird, muss DeltaC-tsp53 wahrscheinlich über einen nicht-proteasomalen Abbauweg, z.B. durch zelluläre Proteasen, in der Zelle entfernt werden.
Bei dem C-terminal verkürzten tsp53 Protein in Cl6 und P160 Zellen handelt es sich möglicherweise um das End- und nicht um ein Zwischenprodukt eines aberranten proteasomalen Abbaus von FL-tsp53. Ungeklärt bleibt, ob der vollständige FL-tsp53 Abbau neben dem limitierten Abbau in Cl6 und P160 Zellen stattfindet.

Die limitierte proteasomale Spaltung von Proteinen wurde für die Produktion von P50, einer Untereinheit des dimeren NF-KB Transkriptionsfaktors, in Säugetier- und Hefezellen beschrieben (Palombella *et al*., 1994, Heusch *et al*., 1999). Dabei wird der C-Terminus des P105 Vorläuferproteins von den Proteasomen abgespalten und der N-terminale Teil des Proteins (P50) freigesetzt. Damit P105 proteasomal gespalten werden kann, muss dieses von der IKB Kinase phosphoryliert und von der E3 Ligase SCFß-TrCP (poly)ubiquitiniert werden (Orian *et al*., 2000). Der Proteasomeninhibitor Lactacystin kann die limitierte Spaltung des P105 Proteins *in vivo* blockieren (Palombella *et al.* , 1994).
Für die limitierte proteasomale Prozessierung von P105 ist zum einen die Bindungsstelle für die E3 Ligase (Orian *et al*., 1999), zum anderen eine Glyzin-reiche Region (GRR) notwendig, die als Stop-Signal während des proteasomalen Abbaus funktionieren soll (Lin *et al*., 1996). Die von Lin *et al.* (1996) postulierte Funktion dieser Glyzin-reichen Region stand im Widerspruch mit der Tatsache, dass der Transfer dieser Region in andere Proteine nicht zu einer limitierten proteasomalen Prozessierung dieser heterologen Proteine führte (Orian *et al*., 1999, Huxford *et al.* , 1998, Jacobs *et al*., 1998). Neuere Literaturdaten zeigten (Lee *et al*., 2001), dass nicht bestimmte Aminosäuresequenzen, sondern dass die Stabilität der globulären Domänen im Multidomänenprotein ausschlaggebend dafür ist, inwieweit die ATP-abhängige Entfaltung der ubiquitinierten Proteine vorgenommen und der vollständige

Abbau durchgeführt werden kann. Lee *et al.* (2001) zeigten, dass die Proteasomen das P105 Vorläuferprotein von der Ubiquitinierungsstelle des C-Terminus in COOH>NH2-terminaler Richtung sukzessive abbauten bis eine stabile Proteindomäne erreicht wurde. Diese Domäne verhinderte eine weitere Prozessierung. Punktmutationen, die eine Destabilisierung dieser Proteindomäne verursachten, führten zum vollständigen Abbau des P105 Vorläuferproteins.

5.3.4. Induktion und Modulation des limitierten FL-tsp53 Abbaus in Cl6 und P160 Zellen

Die hier postulierte Produktion eines C-terminal verkürzten tsp53 Proteins ist ein aberranter Vorgang, der während des regulären proteasomalen P53 Abbaus nicht stattfindet (Haupt *et al*., 1997, Fang et al., 2000, Lai *et al*., 2001). So wurde DeltaC-tsp53 lediglich in verschiedenen transgenen EJ-Ras transformierten embryonalen Rattenfibroblasten nachgewiesen, nicht aber z.B. in den tsp53val135-transgenen immortalisierten Rattenfibroblasten Fcg9 (Abb. 9).
Eine mögliche Erklärung für eine Selektion auf einen zusätzlichen, zu DeltaC-tsp53 führenden Abbauweg ist, dass der limitierte proteasomale FL-tsp53 Abbau primär eine Konsequenz der *Überexpression* des transgenen tsp53 Proteins in embryonalen REF Zellen darstellt. So wird z.B. in den eingangs erwähnten Fcg9 Rattenfibroblasten kein DeltaC-tsp53 beobachtet (Abb. 9). Fcg9 Zellen exprimieren deutlich weniger transgenes tsp53 Protein als Cl6 bzw. P160 Zellen.
Alternativ könnten aber auch spezifische, EJ-Ras induzierte Modifikationen des FL-tsp53 Proteins in EJ-Ras transformierten REF Zellen dazu führen, dass (ein Teil) dieser Proteine während des proteasomalen Abbaus vorzeitig freigesetzt wird. Diese Annahme wäre kompatibel mit der von Henning (1998) beschriebenen Beobachtung, dass das DeltaC-tsp53 Protein der Cl6 Zellen bestimmte C-terminale Modifikationen (Phosphorylierungen) aufweist, die bei FL-tsp53 nicht nachweisbar sind. Weitergehende Studien sind notwendig, um festzustellen, warum und wodurch der postulierte limitierte FL-tsp53 Abbau induziert werden kann.

Wie der reguläre, d.h. vollständige proteasomale Abbau von P53, bewirkt der postulierte limitierte FL-tsp53 Abbau, dass 1.) dessen sequenz-spezifische DNA Bindungsaktivität inaktiviert wird (Abb. 15, Abb. 16 C), 2.) das P53 Protein aus dem

negativen Mdm2/P53 Rückkopplungsmechanismus entfernt wird (Abb. 23), 3.) und nicht mehr über Heterooligomerisierung mit intaktem FL-tsp53 dessen Aktivität (z.B. DNA Bindung) beeinflussen kann (Abb. 21). Diese Daten sprechen dem limitierten proteasomalen FL-tsp53 Abbau primär eine Inaktivierungsfunktion zu. Danach könnte der limitierte Abbau ein Mechanismus darstellen, um überexprimiertes wtp53 Protein in seiner Funktion zu inaktivieren. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass N-terminale Funktionen von wtp53 auch noch von DeltaC-tsp53 ausgeübt werden.

Der limitierte FL-tsp53 Abbau kann in Cl6 und P160 Zellen durch den Temperaturshift von 39°C auf 30°C (Abb. 7 B), sowie durch SV40 (SV40-Cl6 Zellen) verstärkt werden (Abb. 18). In beiden Fällen steigen die DeltaC-tsp53 Proteinlevel in der Zelle, während die Konzentration an FL-tsp53 abnimmt (Abb. 7 B und Abb. 18).
Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass (ubiquitiniertes) FL-tsp53 selektiv in einer wt-ähnlichen Proteinkonformation über den alternativen proteasomalen Abbauweg prozessiert wird, denn durch den Temperaturshift auf 30°C wird die wt-Konformation von FL-tsp53 stabilisiert und der Anteil an wt-FL-tsp53 erhöht. In SV40-Cl6 Zellen geschieht dasselbe über die Bindung des viralen T-Antigens an das FL-tsp53 Protein, auch bei der restriktiven Temperatur (Henning, 1998). Aus dieser Beobachtung könnte man ableiten, dass der alternative, zu DeltaC-tsp53 führende proteasomale Abbau von FL-tsp53 nicht über den normalen, Mdm2-vermittelten P53 Abbauweg führt, da Mdm2 normalerweise wt p53 und Mutanten P53 mit gleicher Effizienz in den proteasomalen Abbauweg einschleust (Midgeley *et al*., 1997).
Noch ist vollkommen unbekannt, ob der alternative, zu DeltaC-tsp53 führende proteasomale Abbauweg über eine modifizierte Mdm2-E3 Ligaseaktivität erfolgt, oder ob ein alternativer, nicht Mdm2-abhängiger Ubiquitinierungsweg (z.B. über die c-Jun N-terminale Kinase) Voraussetzung für eine alternative Prozessierung von wtp53 ist (Fuchs *et al*., 1998). Unklar ist auch, inwieweit der zwischen beiden Subklonen beobachtete Unterschied in der P19ARF Expression für die unterschiedliche Prozessierung von FL-tsp53 in Cl6 und P160 Zellen (mit-) verantwortlich ist.

Cl6 und P160 Zellen zeigen deutliche klonale Unterschiede hinsichtlich der Aktivität des limitierten proteasomalen FL-tsp53 Abbaus, da sich das FL-tsp53/DeltaC-tsp53

Verhältniss in P160 Zellen nach dem Temperaturshift von 39°C auf 30°C deutlich stärker auf die Seite des verkürzten tsp53 Proteins verschiebt als in Cl6 Zellen (Abb. 7 B). Dies führt dazu, dass P160 Zellen bei 30°C deutlich geringere FL-tsp53 Proteinlevel enthalten als Cl6 Zellen (Abb. 7 B, Abb. 22). In P160 Zellen, die in Gegenwart des spezifischen Proteasomeninhibitors Lactacystin von 39°C auf 30°C transferiert wurden, konnte die in den unbehandelten Zellen beobachtete Reduktion der FL-tsp53 Steady State Level nicht mehr beobachtet werden (Abb. 25 A).
Bei 39°C liegt FL-tsp53 in beiden Subklonen überwiegend in seiner Mutantenkonformation vor. Aufgrund der postulierten wt-Konformationsselektivität des limitierten proteasomalen Abbaus werden deshalb die klonalen Unterschiede in den P53 Abbauwegen zwischen beiden Subklonen bei 39°C nicht in dem Maße wie bei 30° evident (Abb. 7 C). Dies könnte erklären, warum P160 und Cl6 Zellen bei der restriktiven Temperatur vergleichbare FL-tsp53 Proteinlevel enthalten (Abb. 7 A).

5.4. Der proteasomale Abbau von FL-tsp53 reduziert in P160 Zellen die tsp53-abhängige Transkription des *mdm2,* nicht aber die des *p21* Gens

Die klonalen Unterschiede der FL-tsp53 Proteinspiegel bei 30°C, die vermutlich auf quantitative Unterschiede des limitierten proteasomalen Abbaus von (wt) FL-tsp53 Protein zu DeltaC-tsp53 zurückzuführen sind, sind nach den hier gezeigten Untersuchungen ursächlich für die differentielle Transaktivierung des *mdm2* Gens in Cl6 und P160 Zellen verantwortlich.
Die differentielle Transaktivierung der P53 Zielgene erfolgt in Cl6 und P160 Zellen ausschließlich über die Beladung der Promotoren mit funktionellem FL-tsp53 Protein (Abb. 15 und Abb. 26 B). Analysen der FL-tsp53 Steady State Level in beiden Subklonen zeigten, dass der P160 Subklon bei 30°C deutlich geringere FL-tsp53 Proteinspiegel enthielt als der Cl6 Subklon (siehe 5.3.4.). Da in normalen Zellen die Akkumulation von „aktiviertem“ wtp53 Protein oftmals einhergeht mit der Transaktivierung der P53 Zielgene, wurde untersucht, inwieweit die zelluläre Konzentration des FL-tsp53 Proteins Einfluss auf die *in vivo* Beladung und Transkription der *p21* und *mdm2* Promotoren hat.
Durch die Behandlung von P160 Zellen mit Lactacystin, einem Inhibitor des proteasomalen Abbaus, akkumuliert das FL-tsp53 Protein, welches in den unbehandelten Zellen von den 26S Proteasomen (limitiert und/oder vollständig)

abgebaut wird. Diese Lactacystin-induzierte Erhöhung der Proteinlevel von funktionellem FL-tsp53 führte in P160 Zellen zu einer verstärkten Beladung des *mdm2* Promotors mit FL-tsp53 und der erhöhten *mdm2* Transkription, vergleichbar mit der in unbehandelten Cl6 Zellen (Abb. 26 A, IPs und Northern Blots). Die FL-tsp53 Beladung und Transkription des *p21* Promotors wurde von der deutlich erhöhten FL-tsp53 Konzentration in behandelten P160 Zellen nicht beeinflusst (Abb. 26 A).
Eine differentielle Bindung von wtp53 an die Promotoren des *mdm2* und *p21* Gens wurde auch in anderen Zellsystemen beobachtet. So konnten Szak *et al.* (2002) in humanen RKO Zellen eine biphasische *in vivo* Bindungskinetik von „aktiviertem“ wtp53 Proteins an die intronische Bindungsstelle des *mdm2* Promotors nach genotoxischem Stress beobachten. Die wtp53 Bindung an den *p21* Promotor zeigte diese Kinetik hingegen nicht.

Die Expression der *mdm2* und *p21* Gene durch funktionelles FL-tsp53 wird demnach in P160 Zellen unterschiedlich stark von Veränderungen der zellulären wt-FL-tsp53 Konzentration beeinflusst. Demnach kann über die einfache Regulation der zellulären Konzentration von („aktiviertem“) wt-FL-tsp53 die Expression des *p21* Gens und die von *mdm2* (sowie wahrscheinlich auch von G2/M Wachstumsarrest- und Apoptosegenen) differentiell moduliert werden. Ein Regulativ der zellulären FL-tsp53 Proteinlevel in P160 Zellen ist der (hier: limitierte) proteasomale Abbau.

Die unterschiedliche Abhängigkeit der Transaktivierung des *p21* und *mdm2* Promotors von der Konzentration des FL-tsp53 Proteins, könnte in einer höheren Affinität des „aktivierten“ FL-tsp53 Proteins für die Bindungsstelle des *p21* Promotors begründet sein.
Diese Annahme stützt sich auf Ergebnisse von Espinosa *et al.* (2001), die zeigten, dass die Bindungsaffinität des wtp53 Proteins für einen Promotor u.a. von der Chromatinstruktur abhängig ist. Diese beeinflusst die Bindungsaffinität sowie die Bindungskinetik des wtp53 Proteins. Espinosa *et al.* (2001) zeigten *in vitro*, dass das wtp53 Protein mit einer höheren Affinität an die Bindungsstelle des humanen *p21* Promotors bindet, wenn dieser in Chromatin verpackt vorliegt. Dies wurde u.a. auf die Stabilisierung von DNA Sekundärstrukturen zurückgeführt, an die das wtp53 Protein mit höherer Affinität binden kann. Diese Chromatinverpackung hatte

signifikanten Einfluss auf die Bindungskinetik von wtp53. wtp53 band an die Chromatin-verpackte Bindungsstelle fast logarithmisch linear mit der wtp53 Proteinkonzentration. Wenn die selbe P53 Bindungsstelle als „nackte“ DNA vorlag, band das wtp53 Protein erst nach Überschreiten eines bestimmten Schwellenwerts (fast) vollständig an die Bindungsstelle (kooperative DNA Bindung). Die Autoren schlugen vor, dass die Chromatinstruktur eines P53 Zielgenpromotors festlegen könnte, bei welchen zellulären wtp53 Konzentrationen dessen Expression induziert wird (Espinosa *et al*., 2001).

Demnach könnte eine unterschiedliche nukleosomale Verpackung der *p21* und *mdm2* Promotoren ursächlich für die unterschiedliche Abhängigkeit der Transkription von der zellulären FL-tsp53 Konzentration verantwortlich sein. In Übereinstimmung mit dieser Annahme sind Daten von Xiao *et al*. (1998), die zeigten, dass der *mdm2* Promotor *in vivo* nukleosomen-frei ist, was in einem kooperativen DNA Bindungsverhalten resultieren könnte.

5.4.1. In Cl6 Zellen verringert die Blockierung des proteasomalen Abbaus die Transkription des *mdm2*, nicht jedoch des *p21* Gens

Die Blockierung des proteasomalen Abbaus hatte in P160 und Cl6 Zellen eine gegenteilige Wirkung auf die Transkription des *mdm2* Gens (Abb. 26A).

In Cl6 Zellen führte die Blockierung des proteasomalen Abbaus bei 30°C zu einer geringeren Beladung des chromosomalen *mdm2* Promotors mit FL-tsp53 und einer verringerten *mdm2* Transkription (Abb. 26 A + B).

Im Gegensatz zu P160 Zellen akkumulierte in behandelten Cl6 Zellen jedoch kein nicht-ubiquitiniertes FL-tsp53 Protein, sondern hauptsächlich ubiquitin-konjugiertes FL-tsp53 Protein (Abb. 25 A).

Eine mögliche Erklärung wäre, dass Ubiquitin-konjugierte FL-tsp53 Proteine mit dem ebenfalls in der Zelle vorhandenen aktiven, nicht-ubiquitinierten FL-tsp53 Protein Tetramere bildet, die DNA-bindungsinaktiv sind. Dadurch würde sich die Konzentration aktiver FL-tsp53 Tetramere in Cl6 Zellen verringern, was aufgrund der zuvor in P160 Zellen beobachteten FL-tsp53 dosisabhängigen *mdm2* Expression in einer selektiv reduzierten Transkription dieses Gens resultieren würde. In Lactacystin-behandelten P160 Zellen wird dagegen das Ubiquitin-konjugierte FL-tsp53 Protein bei 30°C (Abb. 25 A) wahrscheinlich von dem deutlich akkumulierten

nicht-ubiquitinierten FL-tsp53 „austitriert“, mit dem Resultat, dass ein negativer Einfluss auf die *mdm2* Expression unter diesen Bedingungen nicht nachgewiesen werden kann.

5.4.2. In bestrahlten MethA-wtp53 Zellen terminiert der reguläre proteasomale wtp53 Abbau selektiv die Expression von Mdm2, nicht aber von P21

In P160 Zellen konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der zellulären FL-tsp53 Konzentration und der differentiellen Transaktivierung der *p21* und *mdm2* Gene beobachtet werden (siehe 5.4.).

In normalen Zellen, die z.B. durch Gammastrahlung gestresst werden, wird über den proteasomalen Abbau nach Beendigung der P53 Antwort das „aktivierte“ wtp53 Protein irreversibel aus der Zelle entfernt. In einem Zellsystem, in dem eine „Aktivierung“ von wtp53 durch genotoxischen Stress induziert werden kann, wurde der Einfluss des regulären (Mdm2-vermittelten) proteasomalen wtp53 Abbaus auf die Expression von Mdm2 und P21 analysiert, um festzustellen, ob das in P160 Zellen aufgestellte Modell auch in anderen Zellsystemen verifiziert werden kann.

In Methylcolanthren-induzierten MethA Tumorzellen, die neben dem endogenen Mutanten P53 (MethA) ein transgenes murines wtp53 Protein exprimieren (Otto *et al.,* 1993), induzierte die Gammabestrahlung zunächst eine signifikante Akkumulation des transgenen wtp53 Proteins und die Induktion der P21 Expression (Abb. 27). Mit einsetzender Expression von Mdm2 verringerten sich die wtp53 Steady State Level wieder. Diese Abnahme deutete auf die Aktivität des (Mdm2-vermittelten) proteasomalen P53 Abbaus hin. Interessant war, dass nach Einsatz dieses wtp53 Abbaus auch die Expression von Mdm2, nicht aber die von P21, terminiert wurde.

Demnach konnte in MethA-wtp53 Zellen, wie zuvor in P160 Zellen gezeigt, eine Korrelation zwischen der, über den regulären (MethAwtp53 Zellen) bzw. den limitierten (P160 Zellen) proteasomalen Abbau regulierten wtp53 Proteinkonzentration und einer selektiv reduzierten Mdm2 Expression beobachtet werden.

5.5. Modell: Funktionen von „aktiviertem“ wtp53 Protein innerhalb des G2/M Wachstumsarrestes und der Apoptose können über den proteasomalen Abbau von wtp53 selektiv moduliert werden

Im P160/Cl6 Zellsystem hat die zelluläre Konzentration von „aktiviertem“ wt-FL-tsp53 Protein, welche in beiden Subklonen vermutlich über einen alternativen proteasomalen Abbau des FL-tsp53 Proteins reguliert wird, vor allem Auswirkung auf die Induktion von *mdm2*, sowie von Genen mit Funktionen innerhalb eines G2/M Wachstumsarrests (*gadd45, b99, cyclinG*) und der Apoptose (*bax*), nicht aber auf die des *p21* Gens, welches eine Rolle innerhalb des G1/S Arrests spielt. Die vollständige Induktion des *p21* Gens findet, wahrscheinlich aufgrund einer höheren Affinität des FL-tsp53 Proteins für die Bindungsstelle des *p21* Promotors, bereits bei deutlich geringeren FL-tsp53 Konzentrationen statt.

Dem proteasomalen wtp53 Abbau könnte demnach über seinen Einfluss auf die wtp53 Konzentration eine wichtige Funktion bei der zellulären wtp53-abhängigen „Entscheidung“ G1/S- vs. G2/M- Arrest bzw. Apoptose nach „Aktivierung“ von wtp53 durch genotoxischen Stress zukommen. Faktoren, welche in diesen Prozess eingreifen, könnten eine differentielle P53 Antwort induzieren.

6. Zusammenfassung

Nach genotoxischem Stress werden in der Zelle eine Reihe von Signaltransduktionskaskaden aktiviert (Review Agarwal *et al.,* 1998, Meek, 1999). Als integrierendes Protein dient u.a. der Tumorsuppressor P53, welcher dadurch post-translational modifiziert und in seiner Eigenschaft als Transkriptionsfaktor „aktiviert“ wird. Das wtp53 Protein ist in der Lage, eine große Anzahl von Genen zu induzieren, die Funktionen in zellulären Prozessen, wie der Regulation der Proliferation, der Apoptose oder der DNA-Reparatur besitzen. Um biologische Konfliktsituationen in der geschädigten Zelle zu vermeiden, muss eine koordinierte Transaktivierung gewährleistet sein. Eine wichtige Frage ist, welche Parameter die Transaktivierungsaktivität von „aktiviertem“ wtp53 differentiell, d.h. promotor-selektiv, modulieren.

Für die Untersuchung dieser Parameter wurden zwei Subklone der EJ-Ras transformierten tsp53*val135*-exprimierenden REF Zellen (P160 und Cl6 Zellen) herangezogen, deren temperatursensitives P53 Protein differentielle Unterschiede in der Transaktivierung von P53 Zielgenen bei der permissiven Temperatur zeigte. Während das *p21* Gen in beiden Subklonen von dem tsp53 Protein ähnlich induziert wurde, konnte in dem Cl6 Subklon eine deutlich erhöhte Induktion des *mdm2* Gens, sowie Genen mit Funktionen innerhalb des wtp53-abhängigen G2/M Wachstumsarrestes (*gadd45, b99, cyclin G*) und der Apoptose (*bax*) beobachtet werden. Während beide Subklone bei 30°C in einem G1/M Wachstumsarrest stoppten, entstand in Cl6 Zellen aufgrund der höheren Expression von G2/M Wachstumsarrest Genen ein zusätzlicher G2/M Arrest.

Neben dem regulären tsp53 Protein (FL-tsp53) exprimieren beide Subklone ein C-terminal verkürztes tsp53 Protein (DeltaC-tsp53). Dieses entsteht in dem P160/Cl6 Zellsystem vermutlich als Endprodukt eines alternativen proteasomalen Abbaus von (ubiquitiniertem) FL-tsp53.

DeltaC-tsp53 zeigt *in vitro* und *in vivo* keine sequenz-spezifische DNA Bindungsaktivität, ist oligomerisierungsinaktiv und kann die Aktivität von FL-tsp53 nicht durch direkte Protein/Protein Interaktion beeinflussen.

Cl6 und P160 Zellen zeigten klonale Unterschiede hinsichtlich der Aktivität dieses limitierten FL-tsp53 Abbaus bei 30°C. Dies führt dazu, dass P160 Zellen, in denen

der limitierte FL-tsp53 Abbau aktiver ist, bei der permissiven Temperatur deutlich geringere FL-tsp53 Proteinlevel enthalten als Cl6 Zellen.

Diese klonalen FL-tsp53 Konzentrationsunterschiede waren ursächlich für die differentielle Transaktivierung der Gene *p21* und *mdm2* (sowie G2/M Wachstumsarrest- und Apoptosegenen) in dem P160/Cl6 Zellsystem bei der permissiven Temperatur verantwortlich. Die Blockierung des proteasomalen Abbaus in P160 Zellen bewirkte, dass funktionelles FL-tsp53 akkumulierte und dadurch eine selektive Erhöhung der Transkription des *mdm2* Gens induziert wurde, die mit der in Cl6 Zellen vergleichbar war. Diese erhöhte Transkription ging einher mit einer stärkeren *in vivo* Beladung des *mdm2* Promotors mit funktionellem FL-tsp53 Protein. Die Transkription des *p21* Gens und dessen Beladung mit FL-tsp53 wurde durch die erhöhten FL-tsp53 Proteinlevel nicht beeinflusst.

In dem Cl6/P160 Zellsystem konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der zellulären Konzentration von „aktiviertem“ wt-tsp53 Protein und der differentiellen Transaktivierung des G1/S Wachstumsarrestgens *p21* und der von G2/M – und proapototischer Gene beobachtet werden. Modulator der wtp53 Konzentration ist der proteasomale Abbauweg, dem aufgrund dieses Zusammenhangs eine wichtige Funktion bei der zellulären, wtp53-abhängigen „Entscheidung“ G1/S vs. G2/M-Arrest bzw. Apoptose nach Aktivierung von wtp53 zukommen könnte.

7. Literatur

Adler, V., Pincus, P.W., Brandt-Rauf, Ronai, Z. (1995), PNAS 92, 10585-10589.

Adler, V., Pincus, M.R., Minamoto, S., Fuchs, S., Bluth, PW, Brandt-Rauf, FK, Friedman, RC, Robinson, JM, Chen, XW, Wang, CC, Harris, Z, Ronai, Z. (1997), PNAS 94, 1686-1691.

Agarwal, M.L., Taylor, W.R., Chernov, M.V., Chernova, O.B., Stark, G.R. (1998), JBC 273, 1-4.

Agarwal, ML, Ramana, CV, Hamilton, M, Taylor, WR, DePrimo, SE, Bean, LJ, Agarwal, A., Agarwal, MK., Wolfman, A., Stark, GR. (2001), Oncogene 20, 2527-2536.

Anderson, M.E., Woelker, B., Reed, M., Wang, P., Tegtmeyer, P. (1997) Mol Cell Biol 17(11), 6255-6264.

Appella, E., Anderson, C.W. (2001), 268(10), 2764-2772.

Arai, N., Nomura, D., Yokota, K., Wolf, D., Brill, E., Shohat, O., Rotter, V. (1986), Mol Cell Biol 6, 3232-3239.

Arrowsmith, C.H., Morin, P. (1996), Oncogene 12, 1379-1385.

Arriola, E.L., Lopez, A.R., Chresta, C.M. (1999), Oncogene 18, 1081-1091.

Ashcroft, M., Kubbutat, M.H., Vousden, K.H. (1999), Mol Cell Biol 19, 1751-1758.

Atz, J., Wagner, P., Roemer, K. (2000), J Cell Biochem 76(4), 572-584.

Aurelio, O.N., Kong, X.T., Gupta, S., Stanbridge, E.J. (2000), Mol Cell Biol 20(3), 770-778.

Ayed, A., Mulder, F.A., Yi, G.S., Lu, Y., Kay, L. E., Arrowsmith, C.H. (2001), Nat Struct Biol 8(9), 756-760.

Aoyama, N. et al. (1992), PNAS 89, 5403-5407.

Balagurumoorthy, P., Sakamoto, H., Lewis, M.S., Zambrano, N., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Appella, E., Harrington, R.E. (1995), PNAS 92, 8591-8595.

Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., Ziv, Y. (1998), Science 281, 1674-1677.

Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., Oren, M. (1993), EMBO 12, 461-468.

Bargonetti, J., Friedman, P.N., Kern, S.E., Vogelstein, B., Prives, C. (1991), Cell 65, 1083-1091.

Bargonetti, J., Reynisdottir, P., Friedman, P., Prives, C. (1992). Genes Dev 6, 1886-1898.

Bargonetti, J., Manfredi, J.J., Chen, X., Marshak, D.R., Prives, C. (1993), Genes Dev 7, 2565-2574.

Bates, S., Phillips, A.C., Clarke, P., Stott, F., Peters, , G., Ludwig, R.L., Vousden, KH (1998), Nature 395, 124-125.

Bentires-Alj, M., Dejardin, E., Viatour, P., Van Lint, C., Froesch, B., Reed, J.C., Merville, M.P., Bours, V. (2001) Oncogene 20(22), 2805-2813.

Bian, J., Sun, Y. (1997), PNAS 94(26), 14753-14758.

Blaydes, JP, Gire, V., Rowson, JM, Wynford-Thomas, D. (1997), Oncogene 14, 1859-1868.

Bonifacino, J.S., Weissman, A.M. (1998), Annu Rev Cell Dev Bio 14, 19-57.

Bootger, A., Bottger, V., Sparks, A., Liu, WL, Howard, SF, Lane, DP (1997), Curr Biol 7, 860-869.

Braun, B.C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.M. (1999), Nature Cell Biol 221-226.

Buckbinder, L., Talbott, R., Velasco-Miguel, S., Takenaka, I., Faha, B., Seizinger, B.R., Kley, N. (1995), Nature 377, 646-649.

Budhram-Mahadeo, V., Morris, P.J., Smith, M.D., Midgeley, C.A., Boxer, L.M., Latchman, D.S. (1999), JBC 274(21), 15237-15244.

Buschmann, T., Lin, Y., Aithmitti, N., Fuchs, S.Y., Lu, H., Resnick-Silverman, L., Manfredi, J.J., Ronai, Z., Wu, X. (2001), JBC 276(17), 13852-13857.

Cain, C., Miller, S., Ahn, J., Prives, C.(2000), JBC (275), 39944-39953.

Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B., Siliciano, J.D. (1998) Science 281, 1677-1679.

Chai, Y.L., Cui, J., Shao, N., Shyam, E., Reddy, P., Rao, V.N. (1999), Oncogene 18(1), 263-268.

Chakravartis, D., Ogryzko, V., Kao, H.Y., Nash, A., Chen, H., Nakatani, Y., Evans, R.M. (1999), Cell 96(3), 393-403.

Chen et al. (1993), MCB 7, 4107 – 4114.

Chen, JD, Lin, JY, Levine, AJ (1995), Mol Med 1, 141-142.

Chen, L., Agradwal, S., Zhou, W., Zhang, R., Chen, J (1998), PNAS 95, 195-200.

Chen, IT, Smith, ML, O´Connor, PM, Fornace, AJ (1995), Oncogene 16, 1931-1937.

Chernov, M.V., Stark, G.R. (1997), Oncogene 14, 2503-2510.

Chernov, M.V., Ramana, C.V., Adler, V.V., Stark, G.R. (1998), PNAS 95(5), 2284-2289.

Chernov, M.V., Bean, L.J., Lerner, N., Stark, G.R. (2001), JBC 276(34), 31819-31824.

Chin, P.L., Momand, J., Pfeifer, G.P. (1997), Oncogene, 15, 87-99.

Deguin-Chambon, V., Vacher, M., Jullien, M., May, E., Bourdon, J.C. (2000) Oncogene 19(51), 5831-5841.

Delic, J., Onclerco, R., Moisan-Coppey, M. (1991), Biochem Biophys Re Commun 181, 818-826.

DeMartino, G.N., Slaughter, C.A. (1999), JBC 274, 22123-22126.

De Stanchina, E., McCurrach, M.E., Zindy, F., Shieh, S.Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A.V., Prives, C., Roussel, M.F., Sherr, C.J., Lowe, S.W. (1998), Genes Dev 12, 2245-2262.

DiComo, C.J., Prives, C. (1998), Oncogene 16, 2527-2539.

Dumaz, N., Meek, D.W. (1999), EMBO 18(24), 7002-7010.

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., Vogelstein, B. (1993), Cell 75, 817-825.

El-Deiry, W.S., Kern, S., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1992), Nature Genet 1, 45-49.

Elkeles, A., Juven-Gershon, T., Oren, M. (1999), Mol Cell Biol 19 (4), 2594-2600.

Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D., Oren, M. (1984) Nature 312, 646-649.

Espinosa, J.M., Emerson, B.M. (2001), Mol Cell 8(1), 57-69.

Eymin, Karayan, Seite, Brambilla, Brambilla, E., Larsen, CJ, Gazzeri, S (2001), Oncogene 20, 1033-1041.

Fan, C.M., Maniatis, T. (1991), Nature 354, 395-398.

Fanger, GR, Gerwins, P., Widmann, C., Jarpe, MB, Johnson, GL (1997), Curr Opin Genet Dev 7, 67-74.

Farmer, G., Bargonetti, H., Zhu, P., Friedman, R. Prywes, R., Prives, C. (1992), Nature 358, 83-86.

Fiscella, M., Ullrich, S.J., Zambrano, N., Shields, M.T., Lin, D., Lees, M.S., Anderson, C.W., Mercer, W.E., Appella, E. (1993), Oncogene 8, 1519-1528.

Fleischhaker, M., Strohmeyer, T., Imai, Y., Slamon, DJ, Koeffler, HP (1994), Mod Pathol 7, 435-439.

Fogal, V., Gostissa, M., Sandy, P., Zacchi, P., Sternsdorf, T., Jensen, K., Pandolfi, P.P., will, H., Schneider, C., Del Sal, G. (2000) EMBO 19(22), 6185-6195.

Foo, S.Y., Nolan, G.P. (1999), Trends Genetics 15, 229-235.

Foord, O., Navot, N., Rotter, V. (1993), Mol Cell Biol 13, 1378-1384.

Frade, R., Balbo, M., Barel, M. (2000), Cancer Res 60(23), 6585-6589.

Friedman, P.N., Chen, X.B., Bargonetti, J., Prives, C. (1993), PNAS 90, 3319-3323.

Freedman, D.A., Levine, A.J., (1998), Mol Cell Biol 18, 7288-7293.

Fuchs, B., O´Connor, D., Fallis, L., Scheidtmann, K.H., Lu, X. (1995), Oncogene 10, 789-793.

Fuchs, S.Y., Adler, V., Bushmann, T., Yin, Z., Wu, X., Jones, S.N., Ronai, Z. (1998), Genes Dev 12, 2658-2663.

Gaczynska, M., Goldberg, A.L., Tanaka, K., Hendil, K.B., Rock, K.L. (1996), JBC 271, 17275-17280.

Gaiddon, C., Moorthy, N.C., Prives, C. (1999), EMBO 18(20), 5609-5621.

Gannon, JV, Greaves, R, Iggo, R, Lane, DP (1990), EMBO J. 9, 1595-1602.

Garcia, J.F., Piris, M.A. Lloret, E., Orradre, J.L., Murillo, P.G., Martinez, J. (1997), Histopathology 30, 120-125.

Gobert, C., Bracco, L., Rossi, F., Olivier, M., Tazi, J., Lavelle, F., Larsen, A.K., Riou, J.F. (1996), Biochemistry 35, 5778-5786.

Gobert, C., Skladanowski, A., Larsen, A.K. (1999), PNAS 96(18), 10355-10360.

Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S.E., Scheffner, M., Del Sal, G. (1999), EMBO 18(22), 6462-6471.

Gottfredi, V., Shieh, S.Y., Taya, Y., Prives, C. (2001), PNAS (98) 1036-1041.

Grange, T., Hecht, A., Orlando, V., Thomassin, H. , EMBO Kurs über *in vivo* DNA-Protein Interaktion, Paris, September 6-16, 1999.

Grigoriev, M., Peuth, D., Robin, P., Hemar, A., Saison-Behmoa, T., Dautry-Varsat, A., Thuong, N.T., Helene, C., Harel-Bellan, A. (1992), JBC 267, 3389-3395.

Gu, W., Shi, X.L., Roeder, R.G. (1997), Nature 387(6635), 819-823.

Haapajarvi, T., Pitkanen, K., Tsubari, M., Laiho, M. (1997), 17(6), 3074-3080.

Halazonetis, T.D., Kandil, A.N. (1993), EMBO 12, 5057-5064.

Hanke, J.H., Hambor, J.E., Kavanthas, P. (1995), J Mol Biol 246, 63-73.

Harlow, E., Crawford, LV, Pim, DC, Williamson, NM (1981), J. Virol. 861-869.

Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., Oren, M (1997), Nature 387, 296-299.

Heiss,, M.M., Allgayer, K.U., Grützner, I., Funke, R., Schildberg, F.W. (1995), Nat Med 1, 1035.

Heissmeyer, V., Krappmann, D., Wulczyn, F.G., Scheidereit, C. (1999), EMBO 18, 4766-4778.

Henning, W. (1998), Doktorarbeit bei Prof. Dr. W. Deppert, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg

Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B. (1997) Mol Cell Dec;1(1):3-11

Heusch, M., Lin, L., Geleziunas, R., Greene, W.C. (1999), Oncogene 18, 6201-6208.

Hirano, Y., Yamato, K., Tsuchida, N. (1995), Oncogene 10, 1879-1885.

Hollander, MC, Sheik, MS, Bulavin, DV, Lundgren, K., Augeri-Henmuller, L., Shehee, R., Molinaro, TA, Kim, KE., Tolosa, E., Ashwell, JD., Rosenberg, MP., Zhan, Q., Fernandez-Salguero, PM., Morgan, WF., Deng., CX., Fornace, AJ (1999), Nat Genet 23, 176-184.

Hong, T.M., Chen, J.J., Peck, K., Yang, P.C., Wu, C.W. (2000) JBC 276(2), 1510-1515.

Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Jentsch, S. (2000), Cell 102, 577-586.

Hu, C.H., McStay, B., Jeong, S.W., Reeder, R.H. (1994), Mol Cell Biol 14, 2871-2882.

Huang, S.M., Schonthal, A.H., Stallcup, M.R. (2001) Oncogene 20(17), 2134-2143.

Hupp, T.R., Meek, D.W., Midgley, C.A., Lane, D.P. (1992), Cell 71, 875-886.

Hupp, T.R., Lane, D.P. (1994), Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol 59, 195-206.

Hupp, T.R., Sparks, A., Lane, D.P. (1995), Cell 83, 237-245.

Ikeda, A., Sun, X., Li, Y., Zhang, Y., Eckner, R., Doi, T.S., Takahashi, T., Obata, Y., Yoshioka, K., Yamamoto, K. (2000), Biochem Biophys Res Commun 272(2), 375-379.

Inoue, T., Geyer, R., Howard, D., Yu, Z., Maki, C. (2001), JBC 276, 45255-45260.

Isaacs, J.S., Barrett, J.C., Weissman, BE (1999), Mol Carcinogen 24, 70-77.

Iwabuchi, K., Li, B., Massa, H.F., Trask, B.J., Date, T., Fields, S. (1998) JBC 273(40), 26061-26068.

Iyer, V., Struhl, K. (1995), EMBO 14, 2570-2579.

Jackson, P., Mastrangelo, I., Reed, M., Tegtmeyer, P., Yardley, G., Barret, J. (1998), Oncogene 16(2), 283-292.

Jaks, V., Joers, A., Kristjuhan, A., Maimets, T. (2001) Oncogene 20(10), 1212-1219.

Jayaraman, L., Murthy, K.G., Zhu, C., Curran, T., Xanthoudakis, S., Prives, C. (1997), Genes Dev 11(5), 558-570.

Jayaraman, L., Moorthy, N.C., Murthy, K.G., Manley, J.L., Bustin, M., Prives, C. (1998) Genes Dev 12(4), 462-472.

Jenkins, JR, Rudge, K., Currie, GA (1984), Nature 312, 651-654.

Jenkins, J.R., Rudge, K., Chumakov, P., Currie, G.A. (1985), Nature 317, 816-818.

Jiang, J., Struhl, G. (1998), Nature 391, 493-496.

Jiang, D., Srinivasan, GA, Lozano, GA, Robbins, PD (1993), Oncogene 8, 2805-2812.

Jimenez, G.S., Bryntesson, F., Torri-Arzayus, M.I., Priestley, A., Beeche, M., Saito, S., Sakaguchi, K., Appella, E., Jeggo, P.A., Taccioli, G.E., Wahl, G.M., Hubank, M. (1999), Nature 400, 81-83.

Jimenez, G.S., Khan, S.H., Stommel, J.M., Wahl, G.M. (1999), Oncogene 18, 7656-7665.

Jin, S., Antinore, M.J., Lung, F.D., Dong, X., Zhao, H., Fan, F., Colchagie, A.B., Blanck, P., Roller, P.P., Fornace, A.J., Zhan, Q. (2000), JBC 275, 16602-16608.

Joers, A., Kristjuhan, A., Kadaja, L., Maimets, T. (1998) Oncogene 17, 2351-2358.

Johnson-Pais, T. (2001), PNAS 98, 2211-2216.

Kaeser, M.D., Iggo, R.D. (2001), PNAS 99, 95-100.

Karayan, L., Riou, JF, Seite, P, Migeon, J., Cantereau, A., Larsen, CJ (2001) Oncogene 20, 836-848.

Korgaonkar, C., Zhao, L., Modestou, M., Quelle, DE (2002), MCB 22, 196-206.

Kardassis, D., Papakosta, P., Pardali, K., Moustakas, A. (1999), JBC 274(41), 29572-29581.

Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., Craig, R.W. (1991), Cancer Res 51, 6304-6311.

Kastan, M.B., Zhan, Q., El-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B., Fornace, A.J. (1992), Cell 71, 587-597.

Kawai, H., Nie, L., Wiederschain, D., Yuan, ZM: (2001), JBC 276, 45928-45932.

Kern, S.A., Kinzler, K.W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C., Vogelstein, B. (1991), Science 252, 1708-1711.

Khanna, K.K., Keating, K.E., Kozlav, S., Scott, S., Gatei, M., Hobsen, K., Taya, Y., Gabrielli, B., Chan, D., Lees-Miller, S.P., Lavin, M.F. (1998), Nat Genet 20, 398-400.

Kim, E., Albrechtsen, N., Deppert, W. (1997), Oncogene 15, 857-869.

Kim, E., Rohaly, G., Heinrichs, S., Gimnopoulos, D., Meißner, H., Deppert, W. (1998), Oncogene 18, 7310-7318.

Knippschild, U., Kolzau, T., Deppert, W. (1995), Oncogene 11(4), 683-690.

Ko, L.J., Shieh, S.Y., Chen, X., Jayaraman, L., Tamai, K., Taya, Y., Prives, C., Pan, Z.Q. (1997), Mol Cell Biol 17, 7220-7229.

Kong, X.T., Gao, H., Stanbridge, E.J. (2001), JBC 276(35), 32990-33000.

Korgaonkar, C., Zhao, L., Modestou, M., Quelle, D. (2002), Moll Cell Biol 22, 196-206.

Koziczak, M., Muller, H., Helin, K., Nagamine, Y. (2001), Eur J Biochem 268(18), 4969-4978.

Kristjuhan, A., Maimets, T. (1995), Eur J Biochem 234(3), 827-831.

Kristjuhan, A., Jaks, V., Rimm, I., Tooming, T., Maimets, T. (1998), Oncogene 16(18), 2413-2418.

Kubbutat, M.H.G., Ludwig, R.L., Ashcroft, M., Vousden, K.H. (1998), Mol Cell Biol 18, 5690-5698.

Kubbutat, M.H.G., Vousden, K.H. (1998), Mol Cell Biol 17, 460-468.

Landers, JE, Cassei, SL, George, DL (1997), Cancer Res. 57, 3562-3568.

Land, H., Parada, Weinberg (1983), Nature 304, 596-602.

Lane, DP, Stephen, CW, Midgley, CA, Sparks, A, Hupp, TR, Daniels, DA, Greaves, R, Reid, A, Vojtesek, B, Picksley, SM (1996), Oncogene 12, 2461-2466.

Lee, J.S., Burkholder, G.D., Latimer, L.J.P., Haug, B., Braun, R.P. (1987) Nucl Acids Res 15, 1047-1061.

Lees-Miller, S.P., Sakagucchi, K., Ullrich, S.J., Appella, E., Anderson, C.W. (1992), Mol Cell Biol 12, 5041-5049.

Lianes, P., Orlow, I., Zhang, ZF, Olvia, MR, Sarkins, AS, Reuter, VE, Cordon-Cardo, C. (1994), J. Natl. Cancer Inst. 86, 1325-1330.

Li, R., Sutphin, P.D., Schwartz, D., Matas, D., Almog, N., Wolkowicz, R., Goldfinger, N., Pei, H., Prokocimer, M., Rotter, V. (1998), Oncogene 16, 3269-3277.

Lin, L., Ghosh, S (1996), Mol Cell Biol 16, 2248-2254.

Lin, L., De Martino, G.N., Greene, W.C. (1998), Cell 92, 819-828.

Lin, AW, Lowe, SW. (2001), PNAS 98, 5025-5030.

Liu, Y., Colosimo, A.L., Yang, X.J., Liao, D. (2000) Mol Cell Biol 20(15), 5540-5553.

Llanos, S., Clark, PA, Rowe, J., Peters, G. (2001), Nat Cell Biol 3, 445-452.

Lohrum, M., Scheidtmann, K.H. (1996) Oncogene 13 (12), 2527-2539.

Lu, X., Lane, D.P. (1993), Cell 75, 765-778.

Lu, H., Levine, A.J. (1995), PNAS 92, 5154-5158.

Lu, X., Burbidge, S.A., Griffin, S., Smith, H.M. (1996), Oncogene 13, 413-418.

Luna, R.M.D., Amelse, L.L., Chavez-Reyes, A., Evans, S.C., Brugarolas, J., Jacks, T., Lozano, G. (1997), Nature Genet 16, 336-337.

Luo, J., Su, F., Chen, D., Shiloh, A., Gu, W. (2000) Nature 408(6810), 377-381.

Macleod, K.F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B., Jacks, T. (1995), Genes Dev 9, 935-944.

Maki, C.G. (1999), JBC 274, 16531-16535.

Maki, CG, Howley, PM (1997), Mol Cell Biol 17, 355-363.

Maltzman, W., Czyzyk, L. (1984), Mol Cell Biol 4, 1689-1694.

Maroney, AC, Finn, JP, Connors, T., Durkin, J et al. (2001), JBC 276, 25302-25308.

Martelli, F., Hamilton, T., Silver, DP, Sharpless, NE, Bardeesy, N., Rokas, M., DePinho, RA, Livingston, DM, Grossman, SR (2001), PNAS 98, 4455-4460.

Martinez, J.D., Craven, M.T., Joseloff, E., Milczarak, G., Bowden, G.T. (1997), Oncogene 14, 2511-2520.

Mayfield, C., Miller, D. (1994), Nucleic Acids Res 22, 1909-1916.

Mayo, L., Donner (2001), PNAS 20, 11598-11603.

Mayr, G.A., Reed, M., Wang, P., Wang, Y., Schweds, J.F., Tegtmeyer, P. (1995), Cancer Res. 55, 2410-2417.

McLure, K.G., Lee, P.W. (1998), EMBO 17, 3342-3350.

Mendrysa, S.M., Perry, M.E. (2000), Moll Cell Biol 20(6), 2023-2030.

Michalovitz, D., Halevy, O., Oren, M. (1990), Cell 671-679

Michelotti, G.A., Michelotti, E.F., Pulinar, A., Duncan, R.C., Eick, D., Levens, D. (1996), Mol Cell Biol 16, 2656-2669.

Middeler, G., Zerf, K., Jenovai, S., Thulig, A., Tschodrich-Rotter, M., Kubitschek, U., Peters, R. (1997), Oncogene 14, 1407-1417.

Midgeley, C.A., Desterro, J.M.P., Saville, M.K., Howard, A., Sparks, R.T., Hay, Lane, D.P. (2002), Oncogene 19, 2312-2323.

Midgeley, CA., Lane, DP. (1997), Oncogene 15(10), 1179-1189.

Milczarak, G.J., Martinez, J., Bowden, G.T. (1997), Life Sci 60, 1-11.

Miller, S.J., Suthiphongchai, T., Zambetti, G.P., Ewen, M.E. (2000) Mol Cell Biol 20(22), 8420-8431.

Milner, J., Medcalf, E.A. (1991), Cell 65, 765-774.

Milne, D.M., Campbell, L.E., Campbell, D.G., Meek, D.W. (1995), JBC 270, 5511-5518.

Milne, D.M., Palmer, R.H., Meek, D. W. (1992), Nucl Acids Res 20, 5565-5570.

Mitsuuchi, Y., Johnson, SW, Selvakumaran, M., Williams, SJ, Hamilston, TC, Testa, JR (2000), Cancer Res 60, 5390-5394.

Miyashita, T., Reed, J.C. (1995), Cell 80, 293-299.

Moll, UM, LaQuaglia, M., Bernard, J., Riou, G. (1995), PNAS 92, 4407-4411.

Moll, UM, Ostermeyer, AG, Haladay, R., Winkfield, B., Frazier, M, Zambetti, G. (1996), Mol Cell Biol 16, 1126-137.

Momand, J., Zambetti, GP, Olson, DC, George, D., Levine, AJ (1992), Cell 69, 1237-1245.

Mosner, J., Mummenbrauer, T., Bauer, C., Szakiel, G., Grosse, F., Deppert, W. (1995), EMBO 14, 4442-4449.

Muller, S., Berger, M., Lehembre, F., Seeler, J.S., Haupt, Y., Dejean, A. (2000), JBC 275(18), 13321-13329.

Munsch, D., Watanaba-Fukunaga, R., Bourdon, J.C., Nagata, S., May, E., Yonish-Rouach, E., Reisdorf, P. (2000), JBC (275), 3867-3872.

Nagaich, A.K., Zhurkin, V.B., Durell, S.R., Jernigan, R.L., Appella, E., Harrington, R.E. (1999), PNAS 96, 1875-1880.

Nakagawa, K., Taya, Y., Tamai, K., Yamaizumi, M. (1999), Mol Cell Biol 19, 2828-2834.

Nakano, K., Vousden, K.H. (2001) Mol Cell (7), 683-694.

Nelson, V., Davis, G.E., Maxwell, S.A. (2001). Apoptosis 6(3), 221-234.

Nie, Y., Li, H.H., Bula, C.M., Liu, X. (2000), Mol Cell Biol 20(3), 741-748.

Nurse, P. (1990), Nature 344, 503-508.

Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y., Taya, Y. (2000) Cell 102(6), 849-862.

Okamoto, K., Beach, D. (1994), EMBO 13(20), 4816-4822.

Okamoto, T., Izumi, H., Imamura, T., Takano, H., Ise, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., Kohno, K. (2000), Oncogene 19(54), 6194-6202.

Oliner, JD, Pietenpol, JA, Thiagalingam, S., Gyuris, J, Kinzler, KW, Vogelstein, B. (1993), Nature 362, 857-860.

Orian, A., Schwartz, A.L., Israel, A., Whiteside, S., Kahana, C., Ciechanover, A. (1999), Mol Cell Biol 19, 3664-3673.

Orian, A., Gonen, H., Bercovich, B., Fajerman, I., Eytan, E., Israel, A., Mercurio, F., Iwai, K., Schwartz, A. Ciechanover, A. (2000), EMBO 19, 2580-2591.

Otto, A., Deppert, W. (1993), Oncogene 8(9), 2591-2603.

Palmero, L., Pantoja, C., Serrano, M. (1998), Nature 395, 125-126.

Pan, Y., Haines, D.S. (2000) Oncogene 19(27), 3095-3100.

Parada, LF, Land, H., Weinberg, RA, Wolf, D., Rotter, V. (1984), Nature 312, 649-651.

Pariat, M., Carillo, S., Molinari, M., Salvat, C., Debussche, L., Bracco, L., Milner, J., Piechaczyk, M. (1997), Mol Cell Biol 17, 2806-2815.

Parra, M., Jardi, M., Koziczak, M., Nagamine, Y., Munoz-Canoves, P. (2001), JBC 276(39), 36303-36310.

Pastorcic, M., Das, H.K. (2000), JBC 275(45), 34938-34945.

Pavletich, N.P., Chambers, K.A., Pabo, C.O. (1993), Genes Dev 7, 2556-2564.

Peng, Y.C., Kuo, F., Breiding, D.E., Wang, Y.F., Mansur, C.P. Androphy, E.J. (2001) Mol Cell Biol 21(17), 5913-5924.

Pietenpol, J.A., et al. (1994), PNAS 91, 1998-2002.

Pines, J. (1995), Biochem. J. 308, 697-711.

Plemper, R.K., Wolf, D.H. (1999), Trends Biochem Soc. 24, 266-270.

Prisco, M. et al. (1997), Mol Cel Biol 17, 1084-1092.

Prives, C., Bargonetti, J., Farmer, G., Ferrari, E., Friedlander, P., Wang, Y., Jayaraman, L., Pavletich, N., Hubscher, U. (1994), Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 59, 207-213.

Ramaswamy, NT, Pelling, JC (1999), Mol Carcinogen 25, 262-272.

Ravi, R., Mookerjee, B., van Hensbergen, Y., Bedi, G.C., Giordano, A., El-Deiry, W.S., Fuchs, E.J., Bedi, A. (1998), Cancer Res 58(20), 4531-4536.

Reed, M., et al. (1993), Gene Exp 3, 95-106.

Resnick-Silverman, L., St Clair, S., Maurer, M., Zhao, K., Manfredi, J.J. (1998) Genes Dev 12(14), 2102-2107.

Riou, G., Barrios, M., Prost, S., Terrier, MJ, Theodore, C., Levine, AJ (1995), Mol. Carcinog. 12, 124-131.

Robles, A.I., Bemmels, N.A., Foraker, A.B., Harris, C.C. (2001) Cancer Res 61(18), 6660-6664.

Rodriguez, M.S., Desterro, J.M., Lain, S., Midgeley, C.A., Lane, D.P., Hay, R.T. (1999) EMBO, 18(22), 6455-6461.

Roth, J., Dobbelstein, M., Freedman, DA, Shenk, T., Levine, AJ (1998), EMBO 17, 554-564.

Rovinski, B, Benchimol, S (1988), Oncogene 2, 445-452.

Ryan, K.M., Vousden, K.H. (1998), Mol Cell Biol 18(7), 3692-3698.

Ryan, M.K., Phillips, A.C., Vousden, K.H. (2001), Curr Opin Cell Biol 13, 332-337.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989), Molecular Cloning – A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanchez-Prieto, R., Rojas, J.M., Taya, Y., Gutkind, J.S. (2000), Cancer Res 60(9), 2464-2472.

Sandri, M.I., Isaacs, R.J., Ongkeko, W.M., Harris, A.L., Hickson, I.D., Broggini, M., Vikhanskaya, F. (1996), Nucleic Acids Res 24, 4464-4470.

Sang, B.C., Chen, J.Y., Minna, J., Barbosa, M.S. (1994), Oncogene 9, 853-859.

Scherer SJ, Welter C, Zang KD, Dooley S. (1996) Biochem Biophys Res Commun 25;221(3):722-8

Schmidt, T., Korner, K., Karsunky, H., Korsmexer, S., Muller, R., Moroy, T. (1999), Cell death Differ 6(9), 873-882.

Schreiber, Matthias, Müller, Schaffner, Nucl. Acids Res. 17 (1989), (15), 6419

Schuster, N., Prowald, A., Schneider, E., Scheidtmann, K.H., Montenarh, M. (1999) FEBS Lett 447(2-3), 160-166.

Sen, D., Gilbert, W. (1988), Nature 334, 364-366.

Seto, E., Usheva, A., Zambetti, G.P., Momand, J., Horikoshi, N., Neinmann, R., Levine, A.J., Shenk, T. (1992), PNAS 89, 12028-12032.

Shaulian, E., Zauberman, A., Milner, J., Davies, E.A., Oren, M. (1993), EMBO 12, 2789-2797.

Shaulian, E., Haviv, I., Shaul, Y., Oren, M. (1995), Oncogene 10, 671-680.

Shaulsky, G., Ben-Zeev, A., Rotter, V. (1990), Oncogene 5, 1707-1711.

Sheikh MS, Carrier F, Johnson AC, Ogdon SE, Fornace AJ Jr. (1997) Oncogene 28;15(9):1095-101

Sheikh MS, Burns TF, Huang Y, Wu GS, Amundson S, Brooks KS, Fornace AJ Jr, El-Deiry WS. (1998) Cancer Res 15;58(8):1593-8.

Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y., Prives, C. (1997), Cell 91, 325-334.

Shim, J., Park, H.S., Kim, M.J., Park, J., Park, E., Cho, S.G., Eom, S.J., Lee, H.W., Joe, CO, Choi, EJ (2000), JBC 275, 14107-14111.

Shimizu, A., Nishida, J., Ueoka, Y., Kato, K., Hachiya, T., Kuriaki, Y., Wake, N. (1998), Biochem Biophys Res Commun 242, 529-533.

Shinobu, N., Maeda, T., Aso, T., Ito, T., Kondo, T., Koike, T., Hatakeyama, M. (1999), JBC 274(24), 17003-17010.

Shirangi, TR, Zaika, A., Moll, U. (2002), FASEB 16, 420-422.

Siliciano, J.D., Canman, C.E., Taya, Y., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B. (1997), Genes Dev 11, 3471-3481.

Sionov, R.V., Moallem, E., Berger, M., Kazaz, A., Gerlitz, O., Ben-Neriah, Y., Oren, M., Haupt, Y. (1999) JBC 274(13), 8371-8374.

Smith, G.C., Jackson, S.P. (1999), Genes Dev 13, 916-934.

Spiro, C., Richards, J.P., Chandraserakan, S., Brennan, R.J., McMurray, C.T. (1993), PNAS 90, 4606-4610.

Stenger, J.E., Mayr, G.A., Mann, K., Tegtmeyer, P. (1992), Mol Carcinogen 5, 102-106.

Stenger, J.E., Tegtmeyer, P., Mayr, G.A., Reed, M., Wang, Y., Wang, P., Hough, P.V., Mastrangelo, I.A. (1994), EMBO 13(24), 6011-6020.

Stephen, CW, Lane, DP (1992), J Mol Biol 225, 577-583.

Stephen, CW, Helminen, P., Lane, DP (1995), J Mol Biol 248, 58-78.

Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J., Wahl, G.M. (1999), EMBO 18, 1660-1672.

Stros, M., Ozaki, T., Bacikova, A., Kageyama, H., Nakagawara, A. (2001), JBC 17 (in press).

Sturzbecher, H.W., et al. (1992), Oncogene 7, 1513-1523.

Subler, M.A., Martin, D.W., Deb, S. (1994), Oncogene 9, 1351-1359.

Subler, M.A., Martin, D.W,., Deb, S. (1992), J. Virol 66, 4757-4762.

Sugiharat, T., Kaul, S., Kato, J., Reddel, R., Nomura, H., Wadhwa, R. (2001), JBC 276, 18649-18652.

Suzuki, T., Uchida-Toita, M., Yoshida, M. (1999), Oncogene 18(28), 4137-4143.

Szak, ST., Mays, D., Pietenpol, J.A. (2001), Moll Cell Biol 21, 3375-3386.

Tao, W., Levine, AJ (1999), PNAS 96, 3077-3080.

Tarunina, M., Jenkins, J.R. (1993), Oncogene 8, 3165-3173.

Tarunina, M., Grimaldi, M., Ruaro, E., Pavlenko, M., Schneider, C., Jenkins,J.R. (1996), Oncogene 13, 589-598.

Taylor, W.R., Stark, G.R. (2001), Oncogene 20, 1803-1815.

Thornborrow, E.C., Manfredi, J.J. (2001), JBC 276(19), 15598-15608.

Thut, C.J., Chen, J.L., Klemm, R., Tijan, R. (1995), Science 267, 100-104.

Tibbets, R.S., Brumbaugh, K.M., Williams, J.M., Sarkaraia, J.N., Cliby, W.A., Shieh, S.Y., Taya, Y., Prives, C., Abraham, R.T. (1999), Genes Dev. 13, 152-157.

Andrew S. Turnell, Roger J.A. Grand, Carlos Gorbea, Xian Zhang, Wenlan Wang, Joe S. Mymryk and Phillip H. Gallimore (2000), EMBO 19, 4759-4773.

Ueno, M., Masutani, H., Arai, R.J., Yamauchi, A., Hirota, K., Sakai, T., Inamoto, T., Yamaoka, Y., Yodoi, J., Nikaido, T. (1999), JBC 274(50), 35809-35815.

Utrera R, Collavin L, Lazarevic D, Delia D, Schneider C.Utrera et al. (1998) EMBO J. 1998 Sep 1;17(17):5015-25

Velasco-Miguel S, Buckbinder L, Jean P, Gelbert L, Talbott R, Laidlaw J, Seizinger B, Kley N. (1999) Oncogene 7;18(1):127-37

Venot, C., Maratrat, M., Dureuil, C., Conseiller, E., Bracco, L., Debusssche, L. (1998) EMBO 17(16), 4668-4679.

Wade-Evans, A, Jenkins, JR (1985), EMBO J. 4, 699-706.

Wang, Y., Reed, M., Wang, P., Stenger, J.E., Mayr, G., Anderson, M.E., Schwedes, J.F., Tegtmeyer, P. (1993), Genes Dev 7, 2575-2586.

Wang, Y., Schwedes, J.F., Parks, D., Mann, K., Tegtmeyer, P. (1995), Mol Cell Biol 15(4), 2157-2165.

Ward, G.K., Shihab-el-Deen, A., Zannis-Handjopoulos, M., Price, G.B. (1991), Exper Cell Res 195, 92-98.

Wasylyk, C., Wasylyk, B. (2000), Moll Cell Biol 20, 5554-5570.

Waterman, J.L.F., Shenk, J.L., Halazonetis, T.D., (1995), EMBO 14, 512-519.

Webster, G.A., Perkins, N.D. (1999), Mol Cell Biol 19(5), 3485-3495.

Werner, H., Karniele, E., Rauscher, F.J., LeRoith, D. (1996), PNAS 93, 8318-8323.

Wittig, B., Dorbic, T., Rich, A. (1989), JCB 108, 755-764.

Woo, R.A., McLure, K.G., Lees-Miller, S.P., Rancourt, D.E., Lee, P.W. (1998), Nature 394, 700-704.

Xiang, J., Sheppard, H., Corneillie, S., Liu, X. (2001), Moll Cell Biol 3652-3661.

Xiao, G., White, D., Bargonetti, J. (1998), Oncogene 16, 1171-1181.

Xiao, G., Chicas, A., Olivier, M., Taya, Y., Tyagi, S., Kramer, F.R., Gargonetti, J. (2000), Cancer Res 60(6), 1711-1719.

Xiao, H., Pearson, A., Coulombe, B., Truant, R., Zhang, S., Regier, J.L., Triezenberg, S.J., Reinberg, D., Flores, O., Ingles, C.J. (1994), Mol Cell Biol 14, 7013-7024.

Xiao, H., Hasegawa, T., Isobe, K. (1999), J Cell Biochem 73(3), 291-302.

Xirodimas, D., Saville, M.K., Edling, C., Lane, D.P., Lain, S. (2001), Oncogene 20 (36), 4972-4983.

Xu, D., Wang, Q., Gruber, A., Bjorkholm, M., Chen, Z., Zaid, A., Selivanova, G., Peterson, C., Wiman, K.G., Pisa, P. (2000), Oncogene 19(45), 5123-5133.

Yakovleva, T., Pramanik, A., Kawasaki, T., Tan-No, K., Gileva, I., Lindegren, H., Langel, U., Ekstrom, T.J., Rigler, R., Terenius, L., Bakalkin, G. (2001), JBC 276(19), 15650-15658.

Yang, X., Pater, A., Tang, S.C. (1999) Oncogene 18(32), 4546-4553.

Yap, D.B.S., Hsieh, J.K., Chan, F.S.G., Lu, X. (1999), Oncogene 18, 7681-7689.

Yewdell, JW, Gannon, JV., Lane, DP (1986), J. Virol. 59, 444-452.

Youmell, M., Park, S.J., Basu, S., Price, B.D. (1998), Biochem Biophys Res Commun 245(2), 514-518.

Yun, J., Chae, H.D., Choy, H.E., Chung, J., Yoo, H.S., Han, M.H., Shin, D.Y. (1999), JBC 274(42), 29677-29682.

Zacharatos, P.V., Gorgoulis, V.G., Kotsinas, A., Manolis, E.N., Liloglou, T., Rassidakis, A.N., Kanavaros, P., Field, J.D., Halazonetis, T., Kittas, C. (1999), Anticancer Res 19(1A), 579-587.

Zambetti, GP., Olsen, D., Labow, M., Levine, A.J. (1992), PNAS (89), 3952-3959.

Zambetti GP, Bargonetti J, Walker K, Prives C, Levine AJ. (1992) Genes Dev 6(7):1143-52

Zhan, Q., Carrier, F., Fornace, A.J. Jr (1993), Mol Cell Biol 13, 4242-4250.

Zhan, Q., Antinore, M.J., Wang, X.W., Carrier, F., Smith, M.L., Harris, C.C., Fornace, A.J. (1999), Oncogene 18, 2892-2900.

Zhang, W., Guo, X.Y., Deisseroth, A.B. (1994), Oncogene 9, 2513-2121.

Zhang, W., Lu, Q., Xie, Z.J., Mellgren, R.L. (1997), Oncogene 14, 255-263.

Zhang, W., Geiman, D.E., Shields, J.M., Dang, D.T., Mahatan, C.S., Kastner, K.H., Biggs, J.R., Kraft, A.S., Yang, V.W. (2000), JBC 275(24), 18391-18398.

Zhu, J., Jiang, J., Zhou, W., Zhu, K., Chen, X. (1999), Oncogene (18), 2149-2155.

Zhu, Q., Yao, J., Wani, G., Wani, M.A., Wani, A.A. (2001), JBC 276(32), 29695-29701.

Zhung, Q., Yao, J., Wani, G., Wani, M., Wani, A. (2001), JBC 276, 29695-29701.

Zilfou, J.T., Hoffman, W.H., Sank, M., George, L., Murphy, M. (2001) MCB, 21, 3974-3985.

Zindy, F., Eischen, Randle, Kamijo, Cleveland, Sherr, Roussel (1998), Genes Dev 12, 2424-2434.

8. Danksagung

Danken möchte ich besonders Herrn Professor Dr. Wolfgang Deppert für die Betreuung des Projektes und für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seinem Labor durchführen zu dürfen.
Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Ella Kim für ihre Diskussionsbereitschaft und Ihre Freundschaft. Desweiteren möchte ich Gisa Boehden, Gabi Warnecke, Dr. Heukeshoven und Nuray Akyüz sowie Korden Walter und Thomas Göhler für die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

9. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.
Ferner versichere ich, dass ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.

Maurice Reimann Hamburg, den

10. Lebenslauf

Name:	**Maurice Reimann**
geboren:	**18. Oktober 1970 (Herzberg/Harz)**

Ausbildung

Ende 1997 – Juni 2002	**Promotion** **Heinrich-Pette-Institut, Hamburg** Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Wolfgang Deppert
1995 – 1997	**Studium der Biologie und Diplomarbeit** **Universität Bremen** Diplomarbeit: „Das Glukose-regulierte Gen grp78 von *Neurospora crassa*- Isolierung und Sequenzierung eines Genfragments“ Arbeitsgruppe: Prof. Dr. Ludger Rensing
1993 – 1995	**Studium der Molekularbiologie** **Glasgow University**, **U.K.**
1990 – 1993	**Grundstudium der Biologie** **Universität Bremen**
1990	**Abitur**