

# MUTIERTES P53 ALS GLOBALER TRANSKRIPTIONELLER KO-FAKTOR

## Dissertation

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



vorgelegt von

**Dipl.-Biochem. Timo Quante**

geboren am 30.04.1981

in Buchholz i.d.N.

Hamburg 2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2007 bis Mai 2011 am Heinrich-Pette-Institut - Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie in der Abteilung Tumorstudiologie von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert angefertigt und von Herrn Dr. Genrich Tolstonog betreut.

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht, bzw. werden in Kürze veröffentlicht:

Brázdová M, Quante T, Tögel L, Walter K, Loscher C, Tichy V, Cincárová L, Deppert W, Tolstonog GV. (2009) Modulation of gene expression in U251 glioblastoma cells by binding of mutant p53 R273H to intronic and intergenic sequences. *Nucleic Acids Res.* 37, 1486-1500.

Quante T, Otto B., Deppert W, Tolstonog GV. (2011) Mutant p53 is a transcriptional co-factor involved in generating transcriptional plasticity. Manuskript in Arbeit.

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Deppert

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Brune

Tag der Disputation: 08.07.2011

## **Eidesstattliche Versicherung**

Hiermit erkläre ich, Timo Quante, an Eides statt, dass die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und allein von mir unter den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt wurde. Des Weiteren erkläre ich, dass vorher keine weiteren Promotionsversuche unternommen worden sind, oder an einer anderen Stelle vorgelegt wurden.

Hamburg, den 18.05.2011

---

Timo Quante

*für meine Eltern*



1.6.1	Tumorfördernde Eigenschaften von mutp53 ( <i>gain of function</i> ; GOF).....	24
1.6.2	Molekulare Grundlagen des mutp53-GOF .....	26
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>30</b>
2.1	Material .....	30
2.1.1	Zelllinien.....	30
2.1.1.1	Bakterienstämme .....	30
2.1.1.2	Eukaryontische Zellen.....	30
2.1.2	Plasmide .....	30
2.1.3	siRNA .....	31
2.1.4	Oligonukleotide .....	31
2.1.4.1	Sequenzierprimer .....	31
2.1.4.2	Primer für die Expressionsanalyse .....	31
2.1.4.3	ChIP-Primer .....	32
2.1.5	Molekulargewichtstandards.....	33
2.1.6	Enzyme .....	33
2.1.7	Antikörper.....	33
2.1.7.1	Primärantikörper .....	33
2.1.7.2	Sekundärantikörper, enzymgekoppelt.....	34
2.1.7.3	Sekundärantikörper, fluoreszenzmarkiert .....	34
2.1.8	Chemikalien und Reagenzien .....	34
2.1.9	Allgemeine Puffer und Lösungen.....	36
2.1.10	Nährmedien .....	39
2.1.11	Kits .....	39
2.1.12	Verbrauchsmaterialien.....	40
2.1.13	Geräte .....	40
2.2	Methoden .....	43
2.2.1	Arbeiten mit prokaryontischen Zellen.....	43
2.2.1.1	Bakterienkulturen .....	43

2.2.1.2	Herstellung kompetenter Bakterien.....	43
2.2.1.3	Transformation von Bakterien .....	44
2.2.1.4	Dauerkulturen von Bakterien .....	44
2.2.2	Arbeiten mit eukaryontischen Zellen .....	44
2.2.2.1	Kultivierung und Passagieren von Zellen .....	44
2.2.2.2	Zellzahlbestimmung und Vitalitätsbestimmung .....	45
2.2.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	45
2.2.2.4	Transfektion von Zellen .....	45
2.2.2.5	Transfektion von siRNAs.....	46
2.2.2.6	Stabile Transfektion mit shRNA-Expressionsplasmiden.....	46
2.2.2.7	Behandlung von Zellen mit Actinomycin D .....	47
2.2.2.8	Immunfluoreszenzfärbung .....	47
2.2.2.9	Präparation von Nuklei .....	49
2.2.3	Nukleinsäureanalytische Methoden.....	50
2.2.3.1	Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	50
2.2.3.2	Isolierung und Aufreinigung von RNA.....	51
2.2.3.3	Aufreinigung von DNA mittels Phenol/Chloroform Extraktion.....	51
2.2.3.4	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren .....	51
2.2.3.5	Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Agarosegelelektrophorese .....	52
2.2.3.6	Reverse Transkription von mRNA (RT).....	52
2.2.3.7	Expressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR) .....	53
2.2.3.8	Globale Expressionsanalyse mit Microarrays .....	55
2.2.3.9	Sequenzierung .....	56
2.2.3.10	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).....	57
2.2.3.11	Analyse von ChIP-DNA per qPCR.....	60
2.2.3.12	Analyse von ChIP-DNA auf einem Microarray (ChIP-chip).....	61
2.2.4	Proteinanalytische Methoden .....	65
2.2.4.1	Herstellung von Gesamtzelllysaten.....	65

2.2.4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) .....	66
2.2.4.3	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	66
2.2.4.4	Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western Blot; WB) und Immunodetektion mittels ECL-Reaktion .....	68
2.2.4.5	Ko-Immunopräzipitation (Ko-IP) .....	69
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>72</b>
3.1	U251 Glioblastom-Zelllinie .....	72
3.2	Depletion von mutp53 in U251 Zellen .....	73
3.3	Globale Analyse der Genexpression in U251 Zellen nach mutp53-Depletion .....	75
3.4	Validierung von mutp53-regulierten Genen durch quantitative Real-Time PCR .....	77
3.5	Molekulare Grundlagen der Genregulation durch mutp53 in U251 Zellen .....	84
3.5.1	Mutp53 reguliert Gene auf transkriptioneller Ebene .....	84
3.5.2	Ebenen der transkriptionellen Regulation durch mutp53 in U251 Zellen .....	85
3.5.3	Mutp53 moduliert die Transkription von aktiven Genen .....	86
3.5.4	Verteilung von mutp53-Bindestellen in U251 Zellen .....	96
3.5.5	Mutp53 bindet G/C-reiche Regionen mit strukturellen Besonderheiten .....	105
3.5.6	Protein-Protein-Interaktionen von mutp53 .....	109
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>113</b>
4.1	Identifikation mutp53-regulierter Gene in U251 Zellen .....	115
4.2	Transkriptioneller Status mutp53-regulierter Gene .....	117
4.3	Identifikation von mutp53-Bindestellen in U251 Zellen .....	119
4.4	Charakterisierung der mutp53-Bindestellen und der Art der mutp53-Bindung .....	120
4.5	Mechanistische Überlegungen zur transkriptionellen Regulation durch mutp53 .....	121
4.6	Biologische Konsequenzen der postulierten transkriptionellen Regulation durch mutp53 .....	126
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>128</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>145</b>



6.1	Abkürzungsverzeichnis.....	145
6.2	Abbildungsverzeichnis.....	150
6.3	Sicherheitstechnische Daten .....	152
6.3.1	Gefahrstoffe .....	152
6.3.2	Liste der GHS-Kodierungen und der zugehörigen Piktogramme .....	154
6.3.3	Verzeichnis der H- und P-Sätze.....	155
6.3.3.1	H-Sätze ( <i>hazard statements</i> ) .....	155
6.3.3.2	P-Sätze ( <i>precautionary statements</i> ) .....	156
	<b>Danksagung.....</b>	<b>158</b>

## Zusammenfassung

Tumorentstehung und Progression folgen einem mehrstufigen Evolutionsprozess, in dessen Verlauf Zellklone selektioniert werden, die einen Wachstumsvorteil gegenüber benachbarten, normalen Zellen besitzen. Dabei kommt es zu einer Akkumulation genetischer und epigenetischer Veränderungen, in deren Folge sich Transkriptionsmuster ausbilden, die einen für den Tumor vorteilhaften Phänotyp generieren. Der Tumorsuppressor p53 ist entscheidend an der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität beteiligt. Im Mittelpunkt eines Netzwerkes von Schadenssignalwegen wirkt p53 als Detektor für DNA-Schäden und Bedingungen, die eine Gefahr für DNA-Schäden bergen. Durch Induktion von Zellzyklusarrest und Reparatur der Schäden oder Eliminierung der Zelle aus dem Zellverband verhindert p53 die Ausbildung eines „Tumorzell-Transkriptoms“. Die Tatsache, dass ein Großteil von Tumoren p53-Mutationen oder Defekte innerhalb des p53-Netzwerkes aufweist, unterstreicht die große Bedeutung von p53 als Tumorsuppressor. Im Gegensatz zu anderen Tumorsuppressoren, die häufig durch Deletionen und *nonsense*-Mutationen deaktiviert werden, treten bei p53 überwiegend *missense*-Mutationen auf, die die Expression eines vollständigen mutp53-Proteins mit einem Aminosäureaustausch zur Folge haben, das die sequenzspezifische DNA-Bindung von wtp53 verloren hat. Neben dem Verlust der Schutzfunktion durch wtp53 sind für mutp53 zahlreiche tumorfördernde Eigenschaften (GOF) wie eine verstärkte Proliferation, unbegrenztes Replikationspotential, erhöhte Resistenz gegen Chemotherapeutika und Apoptose, Störung der Differenzierung, Förderung der Angiogenese, größere Motilität und Invasion, sowie erhöhte Metastasierung beschrieben. Viele der GOF-Effekte beruhen auf transkriptioneller Regulation durch mutp53 und für verschiedenste Gene konnte eine Assoziation von mutp53 mit deren Promotorregionen nachgewiesen werden. Allerdings sind die mutp53-regulierten Gene in unterschiedlichen Zelllinien und Tumoren sehr heterogen, und aufgrund der fehlenden sequenzspezifischen DNA-Bindung sind die genauen molekularen Grundlagen der transkriptionellen Regulation durch mutp53 trotz zahlreicher Studien bisher nur wenig verstanden. Zurzeit herrschen zwei Modelle vor, die transkriptionelle Regulation durch mutp53 beschreiben. Einerseits kann mutp53 durch Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren an die Promotoren von deren Zielgenen rekrutiert werden und die Transkription dieser Gene beeinflussen. Andererseits hat mutp53 die Eigenschaft, strukturabhängig an DNA zu binden, die in nicht-B-Konformation vorliegt und häufig in repetitiven Bereichen zu finden ist. Über diese Bindung könnte mutp53 kontextabhängig die Genexpression modulieren. Während das erste Modell einem

deterministischen Ansatz entspricht, demnach mutp53 durch Interaktionen mit einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren ein definiertes Set von Zielgenen reguliert, bietet das Modell der direkten DNA-Bindung an repetitive Bereiche einen Mechanismus für eine globale transkriptionelle Regulation durch mutp53, die der beobachteten Heterogenität und Zelltyp-Abhängigkeit der mutp53-Zielgene Rechnung trägt. In dieser Arbeit wurde das Modell untersucht, das von mutp53 als einem globalen, kontextabhängigen transkriptionellen Modulator ausgeht. Zunächst wurden die Effekte eines transienten mutp53-*knockdowns* auf die Transkription in einem Tumorzellsystem (U251) mit endogenem mutp53 analysiert. Dabei zeigte sich bereits innerhalb eines Zellsystems eine hohe Variabilität der transkriptionellen Regulation durch mutp53. Chromatin-Immunopräzipitations-Experimente zeigten, dass sich nahezu alle mutp53-regulierten Gene in U251 Zellen in einem aktiven Grundstatus befinden. Mutp53 assoziiert mit einer Vielzahl von Promotorregionen, sowohl regulierter als auch unregulierter Gene. Die mutp53-Bindestellen sind G/C-reich, überlappen zu einem großen Teil mit CpG-Inseln und können mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht-B-DNA-Konformationen annehmen. Basierend auf diesen Daten wird ein Modell vorgeschlagen, in dem mutp53 durch Bindung an G/C-reiche regulatorische Regionen die Transkription einer Vielzahl von Genen stimulus- und zelltypspezifisch modulieren kann. Als globaler Ko-Faktor hält mutp53 die transkriptionelle Kompetenz dieser Gene aufrecht und schafft transkriptionelle Plastizität, die die Anpassungsfähigkeit von Tumorzellen erhöht.

## Summary

Tumor initiation and progression is a multistage process of clonal evolution selecting for cell clones equipped with a growth advantage. Accumulated genetic and epigenetic changes generate transcription profiles that result in a phenotype favorable for tumor growth. The tumor suppressor p53 plays a crucial role in maintaining genomic integrity. As a central effector of a network of damage response pathways p53 serves as a detector of DNA-damage and various stress signals. By inducing cell cycle arrest and repair processes or by eliminating the damaged cell, p53 prevents the creation of a “tumor cell transcriptome”. Underscoring the importance of its functions, p53 itself or components of the p53 network are mutated in a large number of tumors. In contrast to other tumor suppressors that are commonly inactivated by deletions or nonsense mutations, the majority of p53-mutations are missense point mutations that result in the expression of a full-length protein with an amino acid exchange (mutp53) that has lost sequence specific DNA-binding. In addition to the loss of wtp53 functions, expression of mutp53 confers several oncogenic functions like increased proliferation, unlimited replication potential, enhanced resistance to chemotherapy and apoptosis, impaired differentiation, promotion of angiogenesis and enhanced motility, invasion and metastasis to tumor cells, summarized under the term “gain of function” (GOF). Many GOF effects rely on the ability of mutp53 to regulate transcription and an association of mutp53 with numerous target gene promoters has been demonstrated. However, there is considerable heterogeneity among mutp53 target genes between cell lines and tumors, and, owing to the loss of sequence specific DNA-binding, the exact molecular mechanisms of transcriptional regulation by mutp53 are still poorly understood despite numerous studies. Two models of transcriptional regulation by mutp53 are currently considered. First, mutp53 can be recruited to and regulate transcription of genes by interacting with several transcription factors. Secondly, mutp53 can influence transcription by binding, in a structure selective manner, to DNA that adopts non-B-conformation, a feature that can be found mostly in repetitive regions. The first model reflects a deterministic approach according to which mutp53 has a defined set of target genes resulting from interactions with distinct transcription factors. In contrast, direct DNA-binding of mutp53 to repetitive regions suggests a global mechanism of transcriptional regulation that can account for the observed heterogeneity and cell type dependency of mutp53 effects.

In this study the model of mutp53 as a global, context-dependent transcriptional modulator was investigated. The effects of transient mutp53-depletion on transcription were analyzed in

a tumor cell system with endogenous mutp53 expression (U251). Global expression analysis displayed large variability of transcriptional regulation by mutp53 already in this cellular system. Chromatin-immunoprecipitation experiments revealed that most promoters of mutp53-regulated genes in U251 cells exhibit characteristics of active promoters. Furthermore mutp53 is associated with a large number of promoter regions including promoters of those genes that are regulated by mutp53 and others that are not regulated. Mutp53 binding sites are G/C-rich, a large number coincides with CpG-islands, and the bound regions are prone to adopt non-B-DNA-conformations. This data provides the basis for a model according to which mutp53 can modulate transcription of a large number of genes in a cell type- and stimulus-specific manner by binding to G/C-rich regulatory regions. As a global co-factor mutp53 maintains transcriptional competence and generates transcriptional plasticity that increases the adaptability of tumor cells.

## 1 Einleitung und Problemstellung

Die Entstehung und Progression von Tumoren ist ein mehrstufiger Evolutionsprozess. In seinem Verlauf werden Zellklone selektioniert, die infolge einer Akkumulation von phänotypischen Veränderungen einen Selektionsvorteil innerhalb des normalen Gewebeumfeldes erfahren und schließlich als Tumor auswachsen (Nowell 1976; Weinberg 1989). Die Veränderungen, die es Zellen erlauben die regulatorischen Barrieren der normalen Wachstumskontrolle zu durchbrechen und einen Tumor zu bilden, fallen in acht grundlegende Kategorien (Hanahan and Weinberg 2011). Die Zellen werden unabhängig von externen Wachstumssignalen, verlieren ihre Sensitivität gegenüber Differenzierungs- und wachstumshemmenden Signalen sowie dem programmierten Zelltod und erwerben ein unbegrenztes Replikationspotential. Außerdem können die Zellen einer Zerstörung durch das Immunsystem entkommen, der Stoffwechsel wird umgestellt, sie sind in der Lage, die Angiogenese zu stimulieren, um den wachsenden Tumor zu versorgen, und die Zellen zeichnen sich durch Invasion ins umliegende Gewebe und schließlich Metastasierung in entfernte Gewebe aus. All diese Eigenschaften beruhen auf genetischen und epigenetischen Veränderungen, die eine Expression von mutierten Proteinen mit veränderten Eigenschaften und/oder ein verändertes Genexpressionsprofil im Vergleich zu normalen Zellen nach sich ziehen. Infolge genetischer Veränderungen wie Chromosomenaberrationen, Deletionen, Amplifikationen und Punktmutationen kommt es beispielsweise zur Expression von aktiven Onkogenen, verstärkter Expression von Protoonkogenen oder zum Verlust von Tumorsuppressoren. Epigenetische Prozesse führen durch Veränderungen der Chromatinstruktur, der Histonmodifikationen und der DNA-Methylierung zu einer Deregulierung dieser Gene. So werden beispielsweise Tumorsuppressorgene häufig durch DNA-Methylierung in der Promotorregion transkriptionell inaktiviert (Esteller 2008). Außerdem wird mit der Differenzierung ein weiterer wichtiger Prozess durch epigenetische Mechanismen gesteuert, dessen Fehlregulation eine Tumorentwicklung nach sich ziehen kann. Im Laufe der Entwicklung von differenzierten Zellen aus Stamm- und Vorläuferzellen kommt es Schritt für Schritt zu einer Aktivierung spezifischer Transkriptionsprogramme, während Transkriptionsprogramme der Vorläuferzellen und anderer Differenzierungslinien abgeschaltet werden (Berdasco and Esteller 2010). Störungen der epigenetischen Mechanismen können dazu führen, dass Zellen eine „Reprogrammierung“ oder „Fehlprogrammierung“ erfahren, d.h. sie behalten oder erwerben veränderte transkriptionelle Programme, die beispielsweise ein unbegrenztes Replikationspotential der Vorläuferzelle

beinhalten. Globale Veränderungen der DNA-Methylierung, von Histonmodifikationen und der Chromatinstruktur können außerdem zu erhöhter genetischer Instabilität führen und so wiederum die schrittweise Akkumulation von Mutationen fördern. Die Aufrechterhaltung der genomischen und auch der epigenetischen Integrität der Zelle ist somit die zentrale Barriere gegen die Tumorentstehung. Tumorsuppressorproteine erfüllen diese Funktion, indem sie Schädigungen der DNA, aberrante Signalprozesse und auch metabolische Veränderungen erkennen, die Zelle im Zellzyklus arretieren und die Reparatur der Schäden oder gegebenenfalls die Eliminierung der Zelle einleiten. Der prominenteste Vertreter der Tumorsuppressoren ist p53. Als zentraler Effektor steht es im Mittelpunkt diverser stressaktivierter Signalwege, die direkte Schädigungen des Genoms oder Bedingungen, die die Integrität des Genoms bedrohen, signalisieren (Abb. 1). Aufgrund dieser Tatsache erhielt p53 bereits im Jahr 1992 den Beinamen „Wächter des Genoms“ (Lane 1992).

In den folgenden Kapiteln werden zunächst Wildtyp-p53 und seine Tumorsuppressorfunktionen vorgestellt, mit einem besonderen Fokus auf seiner Rolle als Transkriptionsfaktor. Diese Daten dienen als Grundlage für die Betrachtung von mutiertem p53 und dessen tumorfördernden Wirkungen, wobei wiederum die transkriptionelle Regulation im Vordergrund steht.

## 1.1 Der Tumorsuppressor p53

P53 wurde 1979 von mehreren Forschergruppen unabhängig voneinander als Interaktionspartner des Onkoproteins *large T-antigen* (LT) des Simian Virus 40 (SV40) entdeckt. (Kress et al. 1979; Lane and Crawford 1979; Linzer and Levine 1979; Melero et al. 1979; Smith et al. 1979). Da die p53-Proteinlevel in SV40 transformierten Zellen und vielen weiteren Tumorzellen gegenüber normalem Gewebe stark erhöht sind und p53 in Abhängigkeit von viralen Onkoproteinen wie dem LT-Protein und dem adenoviralen Onkoprotein E1B akkumulieren kann (Linzer and Levine 1979; Sarnow et al. 1982; Rotter 1983), wurde gefolgert, dass *p53* ein zelluläres Onkogen ist. In den folgenden Jahren wurden die murine und humane p53-cDNA in verschiedenen Laboren kloniert, und die Überexpression von *p53* in verschiedenen Modellsystemen lieferte starke experimentelle Unterstützung für diese Theorie (Chumakov et al. 1982; Leppard et al. 1983; Oren and Levine 1983; Eliyahu et al. 1984; Jenkins et al. 1984; Matlashewski et al. 1984; Parada et al. 1984; Pennica et al. 1984; Wolf et al. 1984; Eliyahu et al. 1985; Harlow et al. 1985; Wolf et al. 1985; Zakut-Houri et al. 1985). Obwohl bereits einige Arbeiten darauf hindeuteten, dass *p53*

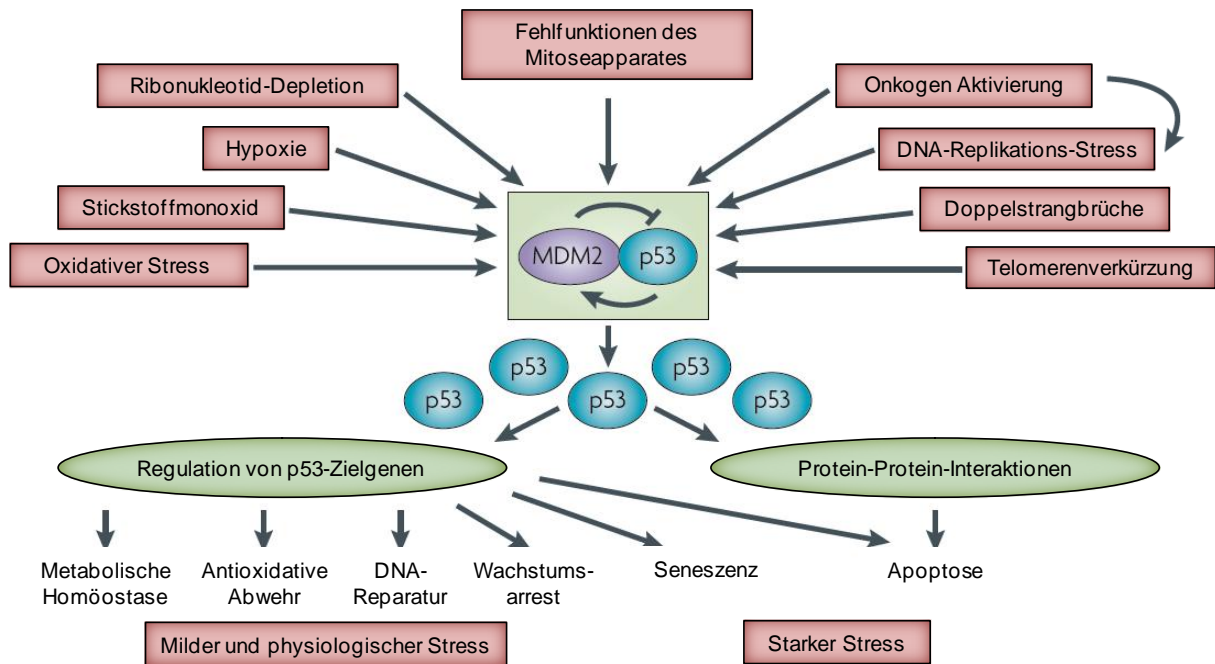
in verschiedenen Tumoren inaktiviert ist (Wolf and Rotter 1984; Mowat et al. 1985; Wolf and Rotter 1985; Ben David et al. 1988), wurde erst Ende der 1980er Jahre eindeutig nachgewiesen, dass es sich bei *p53* nicht um ein Onkogen sondern um ein Tumorsuppressorgen handelt. Alle Experimente, die *p53* als Onkoprotein auswiesen, waren mit *p53*-Mutanten durchgeführt worden, da die entsprechenden cDNAs aus transformierten Zellen isoliert worden waren. Die Sequenzierung der murinen Wildtyp cDNA, zeigte, dass *p53* in murinen Tumorzellen oftmals mutiert ist und nur die Mutanten transformierende Aktivitäten aufweisen (Eliyahu et al. 1988; Finlay et al. 1988; Halevy et al. 1991). Diese Ergebnisse wurden bald auf humane Tumore übertragen (Baker et al. 1989). Schließlich lieferten Überexpressionsexperimente, bei denen *p53* die Transformation durch Onkogene wie *RAS* und *MYC* verhindern konnte (Eliyahu et al. 1989; Finlay et al. 1989), sowie ein stark erhöhtes Tumoraufkommen in einem *p53-knockout* Mausmodell (Donehower et al. 1992) klare Hinweise, dass *p53* ein Tumorsuppressor ist. In den folgenden Jahren wurde die Wirkungsweise von *p53* eingehend untersucht.

## 1.2 Effektorfunktionen des Tumorsuppressors *p53*

Zu den Signalen, die eine Aktivierung von *p53* auslösen, gehören neben aktiven Onkogenen, DNA-Schäden, Fehlern bei der Zellteilung und Telomerenverkürzungen auch physiologische Signale wie Nukleotiddepletion, Hypoxie und oxidativer Stress (Levine and Oren 2009; Vousden and Ryan 2009).

Abhängig von der Art des Stresssignales und vom zellulären Kontext kann es zu unterschiedlichen *p53*-vermittelten biologischen Antworten kommen (Abb. 1). Milder Stress zieht einen transienten Zellzyklusarrest und die Aktivierung von Reparaturprozessen wie beispielsweise der DNA-Reparatur nach sich, während stärkere Schädigungen der Zelle Autophagie, Seneszenz oder Apoptose auslösen können (Yee and Vousden 2005; Riley et al. 2008; Green and Kroemer 2009). *P53* aktiviert dabei in erster Linie Zielgene als sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor, kann aber auch über Protein-Protein-Interaktionen wirken.





**Abbildung 1: Vereinfachtes Schema der p53-Funktionen.**

Diverse Stresssignale führen zu einer Aktivierung von p53, das seine Effektorfunktionen über transkriptionelle Regulation von Zielgenen und Protein-Protein-Interaktionen entfaltet. Milder Stress mündet in reversiblen Wachstumsarrest und Reparatur von Schäden, während starke Schädigungen einen permanenten Arrest oder Apoptose nach sich ziehen (verändert nach Levine and Oren 2009).

### 1.2.1 Zellzykluskontrolle durch p53

Nach dem Eintritt in den Zellzyklus durchläuft eine Zelle die DNA-Synthesephase (S-Phase) und die Mitose (M-Phase), die durch zwei Pausen (*Gaps*,  $G_1$ - und  $G_2$ -Phase) getrennt werden. Die Übergänge zwischen den Phasen werden durch Komplexe aus Cyclinen (Cycls) und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) gesteuert. Zellzyklus-Kontrollpunkte vor dem Eintritt in die S-Phase und in die Mitose stellen ein wichtiges Mittel dar, den korrekten Ablauf der Zellteilung zu gewährleisten. P53 ist in der Lage, den Zellzyklus sowohl am Übergang von der  $G_1$ - in die S-Phase ( $G_1/S$  Kontrollpunkt) als auch den Eintritt in die Mitose ( $G_2/M$  Kontrollpunkt) zu stoppen (Baker et al. 1990; Mercer et al. 1990; Michalovitz et al. 1990). Der  $G_1$ -Arrest wird dabei in erster Linie über die transkriptionelle Aktivierung von *p21* vermittelt, das für einen Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen kodiert (Brugarolas et al. 1995; Deng et al. 1995). Der Arrest am  $G_2/M$  Kontrollpunkt durch p53 wird hingegen über transkriptionelle Repression von *Cdc25c* ausgelöst, einer Phosphatase, die den Eintritt in die Mitose durch Dephosphorylierung des CyclinB/Cdc2-Komplexes auslöst (St Clair and Manfredi 2006). Mit *14-3-3 $\sigma$*  und *GADD45* konnten außerdem zwei weitere durch p53 transkriptionell regulierte Gene identifiziert werden, die zu einem Zellzyklusarrest beitragen.

14-3-3 $\sigma$  verhindert die nukleäre Lokalisation des CyclinB1/Cdc2-Komplexes und GADD45 verhindert direkt die Ausbildung dieses Komplexes (Chan et al. 1999; Zhan et al. 1999).

### 1.2.2 Einleitung der zellulären Seneszenz durch p53

Tritt eine Zelle in die zelluläre Seneszenz ein, so verändern sich Morphologie und Stoffwechsel, und die Zelle ist nicht mehr in der Lage, die DNA-Replikation einzuleiten. Die Folge ist ein irreversibler Zellzyklusarrest, dem eine wichtige Rolle in der Tumorsuppression zugesprochen wird, da er die weitere Proliferation von geschädigten Zellen unterbindet (Zilfou and Lowe 2009). P53 spielt eine entscheidende Rolle bei der Induktion von Seneszenz, was darin zum Ausdruck kommt, dass eine Reaktivierung von p53 in Tumoren zu Seneszenz führen kann (Vousden and Prives 2009), während eine Störung des p53-Signalweges eine medikamentöse Induktion von Seneszenz verhindert (Schmitt et al. 2002; Roninson 2003). Ausgelöst wird Seneszenz über die transkriptionelle Regulation verschiedener Zielgene durch p53, darunter als Schlüsselfaktor wiederum p21 (Brown et al. 1997). Einleitung und Aufrechterhaltung von Seneszenz sind Gegenstand der aktuellen Forschung als Ansatzpunkte für die Tumorthherapie. Bei der Aufrechterhaltung der Seneszenz spielen zahlreiche transkriptionelle Veränderungen eine Rolle, die eine veränderte Sekretion von Komponenten der extrazellulären Matrix, Matrix-degradierenden Enzymen und immunmodulatorischen Cytokinen nach sich ziehen. Einige dieser Faktoren sind wiederum transkriptionell durch p53 reguliert (Gorgoulis et al. 2003; Xue et al. 2007).

### 1.2.3 Induktion von Apoptose

Einer der bekanntesten Mechanismen, über den p53 seine Tumor-supprimierenden Eigenschaften entfaltet, ist der programmierte Zelltod, die Apoptose. Die Einleitung von Apoptose kann über externe und interne Stimuli erfolgen und hat die proteolytische Spaltung zellulärer Proteine, die Auflösung der Kernmembran und eine Fragmentierung der DNA zur Folge. Vermittelt werden diese Effekte durch Effektor-Proteasen, die am Ende einer Kaskade von Proteasen (Caspase-Kaskade) stehen. Ein klassischer Weg der Aktivierung der Caspase-Kaskade erfolgt über den *apoptosis activating factor 1* (APAF-1), der mit Cytochrom C interagiert, das aus den Mitochondrien freigesetzt wird. P53 ist an der Induktion von Apoptose durch die transkriptionelle Regulation von Faktoren des extrinsischen und intrinsischen Weges beteiligt und wirkt zusätzlich über Protein-Protein-Interaktionen. Zu den

p53-Zielgenen zählen *CD95/Fas* und *Killer/DR5*. Sie kodieren für sog. Todesrezeptoren, die über externe Stimuli die Apoptose auslösen. Zu den durch p53 regulierten intrinsischen Effektoren gehören die pro-apoptotischen Proteine BAX, BAD, BAK, PUMA und NOXA und die anti-apoptotische Faktoren wie BCL2 und BCL-X<sub>L</sub> (Riley et al. 2008). Eine Verschiebung im Verhältnis von pro- und anti-apoptotischen Proteinen führt zu einer Porenbildung in der Mitochondrienmembran durch pro-apoptotische Proteine der BCL-Familie, gefolgt von einer Cytochrom C-Freisetzung. Neben der transkriptionellen Regulation dieser Effektoren kann p53 an die Mitochondrien translozieren und direkt mit Proteinen der BCL-Familie interagieren und pro-apoptotische Vertreter aktivieren (Green and Kroemer 2009).

Welche Mechanismen im Detail bestimmen, ob es nach p53-Aktivierung zu einem transienten Zellzyklusarrest, Seneszenz oder Apoptose kommt, ist Gegenstand aktueller Forschung. Hierbei scheinen jedoch das auslösende Signal, der zelluläre Kontext sowie posttranslationale Modifikationen von p53 eine wichtige Rolle zu spielen (Vousden and Prives 2009).

### **1.3 Proteinstruktur von p53**

P53 gliedert sich in drei funktionelle Domänen (Abb. 2A), eine N-terminale Transaktivierungsdomäne (TAD), die zentrale DNA-Bindedomäne (DBD) und eine C-terminale Tetramerisierungsdomäne (TET), die über eine flexible Linker-Sequenz mit der DBD verbunden ist. Die TAD setzt sich aus zwei Untereinheiten (TAD1 AS1-40; TAD2 AS40-61) und einer Prolin-reichen Region (AS64-92) zusammen (Chang et al. 1995; Walker and Levine 1996). Diese Domäne ist im nativen Zustand des Proteins ungefalteter (Bell et al. 2002; Dawson et al. 2003) und bildet eine Plattform für die Bindung zahlreicher Interaktionspartner, darunter Komponenten der Transkriptionsmaschinerie (Lu and Levine 1995; Thut et al. 1995; Di Lello et al. 2006), transkriptionelle Ko-Aktivatoren (Gu et al. 1997; Teufel et al. 2007) und negative Regulatoren wie MDM2/MDMX (Kussie et al. 1996; Schon et al. 2002; Marine and Jochemsen 2005). Die unstrukturierte Form der Transaktivierungsdomäne ermöglicht eine Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen, da kurze Abschnitte dieser Domäne  $\alpha$ -helikale Strukturen annehmen können, die eine Bindung an den jeweiligen Partner festigen (Joerger and Fersht 2008). Innerhalb der unstrukturierten TAD sind die Aminosäuren Leucin an Position 22 und Tryptophan an Position 23 essentiell für die Transaktivierung durch p53 (Zhu et al. 1998; Teufel et al. 2007). Die Funktion der

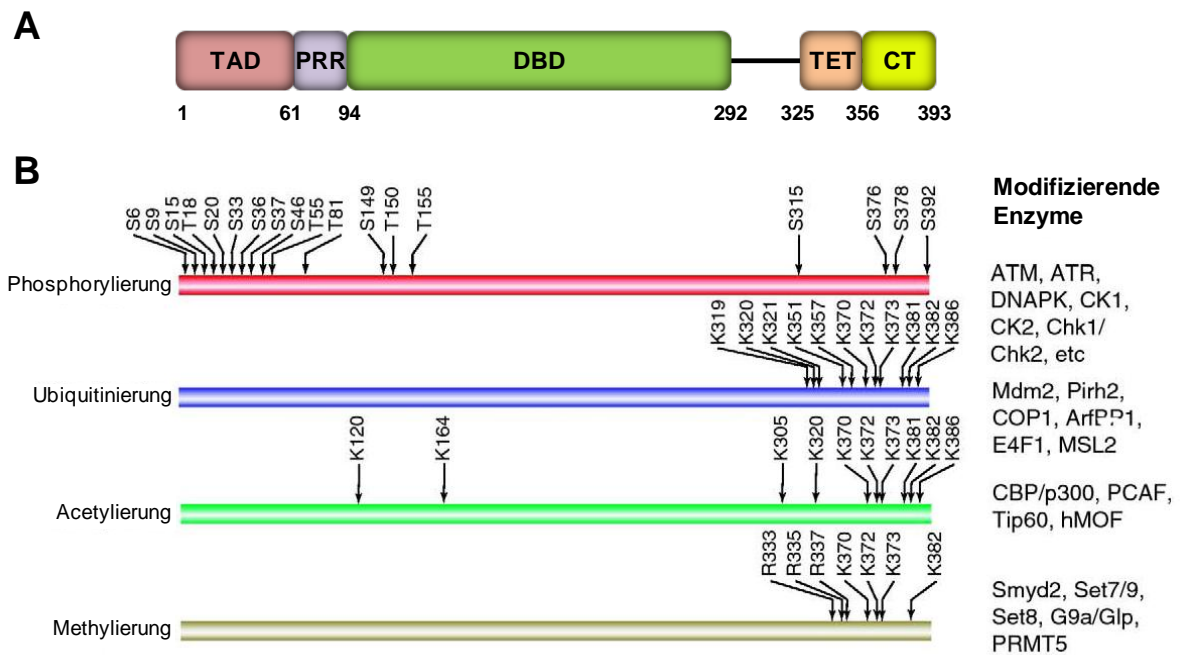
Prolin-reichen Region, die die TAD mit der DBD verbindet, ist nicht vollständig geklärt. Die Region besteht aus fünf Wiederholungen des Motivs PXXP (P: Prolin, X: beliebige AS, (Walker and Levine 1996)). Dieses Motiv ist in der Signaltransduktion als Protein-Protein-Interaktionsmotiv bekannt (Kay et al. 2000). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Aminosäuresequenz dieses Motivs im Fall von p53 scheinbar keine Rolle spielt, während dessen Länge wichtig für die Tumorsuppressorfunktion von p53 ist (Toledo et al. 2007).

Die zentrale DNA-Bindedomäne umfasst die Aminosäuren 94 bis 292 und vermittelt die sequenzspezifische Bindung von p53 an DNA (Bargonetti et al. 1993). Eine immunglobulinartige  $\beta$ -Sandwich-Struktur bildet das Gerüst für ein *loop-sheet-helix*-Motiv und ein Motiv aus zwei großen *loops*, die die große bzw. kleine Furche der DNA binden (Joerger and Fersht 2008). Spezifisch gebunden wird eine doppelsträngige p53-Erkennungssequenz (*p53 response element*, p53-RE), die sich aus zwei Halbseiten der palindromischen Dekamer-Sequenz 5'-RRRCWWGYYY-3' (R =A,G; W = A,T; Y = C,T) zusammensetzt (el-Deiry et al. 1992). Die Halbseiten können dabei durch 0-13 Basenpaare getrennt sein. Die DNA-Bindung erfolgt kooperativ durch vier DBDs eines p53-Tetramers, was zu einer Verbiegung und Verdrehung der Doppelstrang-DNA führt (Balagurumorthy et al. 1995). Innerhalb der DBD interagieren sog. „Schlüssel-Aminosäuren“ direkt mit DNA. Arg248 und Arg273 interagieren mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA, Arg280 interagiert mit dem konservierten Guanin des p53-RE und Lys120, Ala276 und Cys277 bilden sequenzspezifische Interaktionen aus, für die ein Beitrag zur Zielgenspezifität postuliert wurde (Cho et al. 1994; Kitayner et al. 2006).

Der DBD folgt, verbunden über eine flexible Linker-Region, die Tetramerisierungsdomäne (TET, AS325-356). Diese Domäne besteht aus einem kurzen  $\beta$ -Strang, der durch eine Biegung mit einer  $\alpha$ -Helix verbunden ist. Die antiparallele Ausbildung eines intermolekularen  $\beta$ -Faltblattes aus zwei  $\beta$ -Strängen und das Aneinanderlagern der  $\alpha$ -Helices führen zur Bildung eines p53-Dimers. Aus zwei Dimeren bildet sich in Lösung durch hydrophobe Wechselwirkungen ein Tetramer, in dem die Kerndomänen locker verbunden und zugänglich für regulatorische Proteine sind. Bei der Bindung an DNA wickelt sich das p53-Tetramer um die DNA-Helix und die Struktur des Komplexes wird verfestigt. (Joerger and Fersht 2008). Innerhalb der TET befinden sich außerdem drei nukleäre Lokalisationssignale, die die Translokation von p53 in den Nukleus vermitteln (Shaulsky et al. 1990).

Das C-terminale Ende von p53 ist wiederum ungefaltet, kann aber durch Interaktionen mit Bindungspartnern Strukturen annehmen. Es sind diverse Protein-Protein-Interaktionen und eine sequenzunabhängige Bindung an DNA für den C-Terminus beschrieben (Joerger and

Fersht 2008). Zunächst wurde postuliert, dass der C-Terminus eine inhibitorische Funktion bei der sequenzspezifischen Bindung an p53-REs hat, die erst nach einer Aktivierung durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen und Lysin-Acetylierungen aufgehoben wird. Bei *in vitro* Experimenten mit kurzen, linearen REs kam es nur zur Bindung, wenn der C-Terminus deletiert, C-Terminus-spezifische Antikörper zugegeben wurden oder der C-Terminus phosphoryliert oder acetyliert wurde (Hupp et al. 1992; Hupp and Lane 1994; Gu and Roeder 1997). Liegen die p53-REs allerdings zirkularisiert, superhelikal oder in *stem-loops* vor, bindet p53 und der C-Terminus ist essentiell für die sequenzspezifische Bindung (Gohler et al. 2002; McKinney et al. 2004; Palecek et al. 2004). Durch Deletion der letzten 30 AS wurde weiterhin gezeigt, dass die Bindung an REs und die Transaktivierungsaktivität von p53 im Kontext mit Chromatin abhängig vom C-Terminus sind. Es wurde postuliert, dass p53 über den C-Terminus mit DNA assoziiert und diese entlang gleiten kann (Espinosa and Emerson 2001; McKinney et al. 2004).



**Abbildung 2: Proteinstruktur und posttranslationale Modifikationen von p53**

**A.** Domänenstruktur von p53. Die Ziffern geben die Aminosäureposition an. TAD = Transaktivierungsdomäne, PRR = Prolin-reiche Region, DBD = DNA-Bindedomäne, TET = Tetramerisierungsdomäne, CT = C-Terminus  
**B.** Posttranslationale Modifikationen von p53. Es sind Aminosäuren dargestellt, die phosphoryliert, ubiquitinyliert, acetyliert und methyliert werden. Rechts sind einige der modifizierenden Enzyme aufgeführt (verändert nach (Dai and Gu 2010)).

## 1.4 Regulation der p53-Aktivität

### 1.4.1 Negative Regulation von p53 durch MDM2

Die Regulation der p53-Aktivität erfolgt über eine Regulation des Proteinlevels und über posttranslationale Modifikationen (Abb. 2B). In Abwesenheit von Stresssignalen wird p53 schnell der proteasomalen Degradation zugeführt und hat eine Halbwertszeit von 6 bis 20 Minuten (Kubbutat et al. 1997; Riley et al. 2008). Infolge von Stresssignalen durch DNA-Schäden, aktivierte Onkogene oder physiologischen Stress wird p53 stabilisiert, akkumuliert im Zellkern und kann über sequenzspezifische DNA-Bindung seine Zielgene regulieren (Yee and Vousden 2005).

Der wichtigste negative Regulator von p53 ist die E3-Ubiquitin-Ligase MDM2 (im humanen System als HDM2 bezeichnet), die p53 durch Ubiquitinierung der sechs C-terminalen Lysine Lys370, Lys 372, Lys 373, Lys 381, Lys 382 und Lys 386 (Abb. 2B) (Rodriguez et al. 2000) für die proteasomale Degradation markiert (Haupt et al. 1997; Honda et al. 1997; Kubbutat et al. 1997). Neben der Markierung von p53 für die Degradation wirken die Bindung von MDM2 an p53 und die Ubiquitinierung *per se* bereits einer Aktivierung von p53 entgegen. Die sechs Lysine, die Ziel der Ubiquitinierung sind, werden unter p53-aktivierenden Bedingungen acetyliert. Ubiquitinierung und Acetylierung schließen sich gegenseitig aus (Gu and Roeder 1997; Ito et al. 2001). Die Bindung von MDM2 erfolgt in der TAD von p53, wo sie mit den Bindestellen von Faktoren der Transkriptionsmaschinerie und von transkriptionellen Ko-Faktoren überlappt und damit kompetitiert (Joerger and Fersht 2008). Diese inhibitorische Funktion kann MDM2 auch auf DNA-gebundenes p53 ausüben. So wurde MDM2 beispielsweise am *p21* Promotor gefunden, wo es die Transaktivierung durch p53 inhibiert (Minsky and Oren 2004; Arva et al. 2005). Zusätzlich zu dieser engen regulatorischen Verflechtung wird das *MDM2*-Gen von p53 transaktiviert, so dass es über einen negativen *feedback-loop* zu einer fein abgestimmten Regulation beider Proteine kommt (Wu et al. 1993). Die wichtige Rolle, die MDM2 bei der Regulation von p53 spielt, wurde in *knockout*-Mausmodellen demonstriert. MDM2-Defizienz ist früh embryonal letal; dieser Phänotyp konnte aber durch gleichzeitige Deletion von *p53* gerettet werden (Jones et al. 1995; Montes de Oca Luna et al. 1995). Re-Expression von p53 in einem MDM2-defizienten Mausmodell mit konditionell inaktiviertem p53 führt außerdem in Abwesenheit jeglicher Stresssignale in allen Geweben zu spontaner p53-Aktivität mit letalen Folgen (Ringshausen et al. 2006). Die Degradation von p53 ist nach MDM2-Verlust jedoch nicht völlig unterbunden. So konnten beispielsweise COP1 (Dornan et al. 2004), PIRH2 (Leng et al. 2003), ARF-BP1

(Chen et al. 2005) und MDMX (Marine and Jochemsen 2005) als zusätzliche E3-Ubiquitin-Ligasen für p53 identifiziert werden, von denen zumindest MDMX eine wichtige Rolle bei der Regulation der p53-Aktivität zu spielen scheint.

#### **1.4.2 Stabilisierung, Aktivierung und Modulation der p53-Aktivität durch posttranslationale Modifikationen**

Entsprechend der großen Bedeutung von MDM2 bei der Regulation der p53-Aktivität muss für eine p53-Aktivierung die MDM2-vermittelte Ubiquitinierung mit der angeschlossenen proteasomalen Degradation unterbunden werden. Bei der Stabilisierung von p53 und der Modulation seiner Aktivität spielen Phosphorylierungen von p53 insbesondere im N-Terminus eine wichtige Rolle. Für p53 sind bisher 23 Serine und Threonine beschrieben, die phosphoryliert werden können (Abb. 2B). Insbesondere infolge genotoxischen Stresses werden verschiedene dieser Aminosäuren durch Kinasen der DNA-Schadenssignalwege (ATM, ATR, CHK1, CHK2) modifiziert (Toledo and Wahl 2006). Dabei können sowohl einzelne Kinasen mehrere Serine/Threonine phosphorylieren, als auch einzelne Serine/Threonine durch mehrere Kinasen phosphoryliert werden. Diese Redundanz und die Frage, welche Modifikationen infolge welcher Stresssignale auftreten, sind Gegenstand aktueller Forschung. Es wird angenommen, dass die Redundanz eine strikte Regulation von p53 gewährleistet und Kombinationen aus Modifikationen zu einer Feinabstimmung der p53-vermittelten Antwort beitragen (Bode and Dong 2004).

In Bezug auf die Regulation der p53-Stabilität durch MDM2 konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Threonin 18 zu einer Schwächung der Bindung von MDM2 an p53 und damit zur Stabilisierung von p53 führt (Lai et al. 2000; Sakaguchi et al. 2000; Schon et al. 2002). Gleiches wurde für die Serine 15 und 20 postuliert und konnte *in vitro* bestätigt werden (Shieh et al. 1997). Neuere *in vivo* Mutationsanalysen deuten allerdings darauf hin, dass die Regulation komplexer ist. Der Austausch eines der in der Maus äquivalenten Serine Ser18 oder Ser23 durch Alanin zeigt nur einen schwachen Phänotyp und auch der Austausch beider Serine durch Alanin löst keine vollständige Destabilisierung von p53 aus (Wu et al. 2002; Chao et al. 2003; MacPherson et al. 2004; Sluss et al. 2004; Chao et al. 2006). Allerdings sind p53-Funktionen wie die Einleitung der Apoptose gestört, was zeigt, dass die Phosphorylierung von Ser18 und Ser23 zumindest für diese Aktivität von p53 essentiell ist.

Ein weiterer Weg der p53-Aktivierung durch Aufhebung der MDM2-vermittelten Ubiquitinierung läuft über den Tumorsuppressor p14<sup>ARF</sup>. Dieser entsteht aus einem

alternativen Transkript aus dem *INK4A/ARF*-Tumorsuppressor-Lokus, der für den CDK-Inhibitor p16<sup>INK4A</sup> codiert (Sherr 2001). Eine Aktivierung von p14<sup>ARF</sup> kann durch aktive Onkogene wie *RAS* oder *MYC* erfolgen. p14<sup>ARF</sup> ist in der Lage, MDM2 durch Hemmung seiner Ubiquitin-Ligase-Aktivität und durch Sequestrierung in die Nukleoli direkt zu inaktivieren (Kamijo et al. 1998; Pomerantz et al. 1998; Zhang et al. 1998; Honda and Yasuda 1999; Weber et al. 2000). Somit wird p53 stabilisiert und kann akkumulieren.

Phosphorylierungen von p53 dienen neben einer Unterdrückung der MDM2-p53-Interaktion auch der Aktivierung weiterer p53-Funktionen. Für zahlreiche posttranslationale Modifikationen ist dies als Feinabstimmung des p53-Signals beschrieben (Toledo and Wahl 2006; Kruse and Gu 2009). Für die Phosphorylierungen an Ser15, Thr18 und Ser20 gibt es Hinweise, dass sie die Bindung an die transkriptionellen Koaktivatoren p300/CBP verstärken und somit die Transaktivierungskapazität von p53 erhöhen. Die Phosphorylierung von Ser46 scheint eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Apoptose zu spielen (D'Orazi et al. 2002; Taira et al. 2007), und für Phosphorylierungen C-terminaler Serine wurde eine Rolle bei der sequenzspezifischen DNA-Bindung und der Tetramerisierung postuliert (Takenaka et al. 1995; Wang and Prives 1995; Sakaguchi et al. 1997).

Außerdem scheinen auch Acetylierungen von Lysinen Einfluss auf die p53-Aktivität und Zielgenspezifität zu haben (Abb. 2B). So wurde ein Modell vorgeschlagen, wonach bestimmte Acetylungsmuster im p53-C-Terminus das Expressionsmuster von p53-Zielgenen und somit das Schicksal der Zelle bestimmen (Knights et al. 2006). Für die Acetylierung von Lys120 und Lys164 innerhalb der DBD wurde gezeigt, dass sie wichtig sind für die spezifische Aktivierung der Zielgene *PUMA* und *BAX* (Sykes et al. 2006; Tang et al. 2006; Tang et al. 2008). Insgesamt ist die Regulation der p53-Aktivität aufgrund der Vielzahl an Modifikationen und damit möglichen Kombinationen sehr komplex und bisher nur wenig verstanden. Mit Hilfe genauer Untersuchungen einzelner Modifikationen von p53 an einzelnen p53-Zielgenen wird aktuell versucht, die fein abgestimmte Regulation der p53-Aktivitäten aufzuklären (Kruse and Gu 2009; Beckerman and Prives 2010).

## 1.5 Transkriptionelle Regulation durch p53

### 1.5.1 Ebenen der transkriptionellen Regulation in Eukaryonten

Die Transkription eukaryontischer Gene ist ein komplexer Prozess, der auf mehreren Ebenen kontrolliert wird. Eine Aktivierung der Transkription infolge extra- oder intrazellulärer



Signale beinhaltet die sequenzspezifische Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA, die Rekrutierung von Ko-Aktivatoren, eine Restrukturierung der Chromatin-Umgebung (Chromatin-Remodeling) und die Rekrutierung der basalen Transkriptionsmaschinerie sowie der RNA-Polymerasen. Außerdem werden die Prozessivität der Polymerase und die Prozessierung der naszenten Transkripte nach Initiation der Transkription reguliert (Venters and Pugh 2009).

### **1.5.1.1 Chromatinstruktur und Chromatin-Remodeling**

Die DNA ist im Zellkern Bestandteil des Chromatins, das sich aus der DNA, Histon-Proteinen und einer Vielzahl chromatinassoziierter Proteine aufbaut. Die Grundeinheit des Chromatins bilden Nukleosomen, die sich aus jeweils zwei Untereinheiten der vier *core*-Histone (H2A, H2B, H3, H4) zusammensetzen, um die 147 bp DNA gewickelt sind (Luger et al. 1997). Dies ergibt eine „Perlenkettenstruktur“ (*beads-on-a-string*), in der etwa alle 160-200 bp ein Nukleosom sitzt. Durch dichte Packung können daraus hochgeordnete Strukturen entstehen (Hayes and Hansen 2001; Woodcock and Dimitrov 2001). Die Verpackung der DNA bildet die erste Hürde für ein Ablesen der DNA-Sequenz im Zuge der Transkription. So können beispielsweise transkriptionell inaktive Bereiche durch Packung der Nukleosomen eine sog. 30 nm Faser ausbilden. In den transkriptionell kompetenten Bereichen mit *beads-on-a-string* Struktur scheint eine Region um den Startpunkt der Transkription (TSS) zwar frei von Nukleosomen zu sein, bzw. eine definierte Anordnung von Nukleosomen aufzuweisen (Mavrich et al. 2008; Schones et al. 2008), die die DNA zugänglich für Transkriptionsfaktoren und Transkriptionsmaschinerie macht. Aber auch in dieser Form bilden die benachbarten Nukleosomen eine Hürde für die Transkription (Lorch et al. 1987; Han and Grunstein 1988). Bereits Ende der 1980er Jahre wurde gezeigt, dass transkriptionelle Aktivierung mit der Bewegung von Nukleosomen verknüpft ist (Almer et al. 1986; Perez-Ortin et al. 1987). Anfang der 1990er Jahre wurde mit SWI2/SNF2 die erste Familie der Chromatin-Remodeling Komplexe identifiziert (Hirschhorn et al. 1992); es folgten Ino80/SWR1, ISWI und CHD (Bao and Shen 2007). Chromatin-Remodeling Komplexe können ATP-abhängig Nukleosomen verschieben oder komplett von der DNA entfernen und machen so die DNA-Sequenz zugänglich für die Bindung weiterer Faktoren und passierbar für die Transkriptionsmaschinerie (Venters and Pugh 2009).

### 1.5.1.2 Histonmodifikationen

Eng verflochten mit dem Chromatin-Remodeling sind posttranslationale Modifikationen der Histone, die eine zentrale Rolle bei der Regulation der Transkription einnehmen. Die Struktur der Histone ist größtenteils globulär. Ausnahme ist ein flexibler N-terminaler „Arm“, der unstrukturiert ist und aus der Kern-Histondomäne herausragt (Fletcher and Hansen 1996). Bisher sind acht posttranslationale Modifikationen bekannt, die an mehr als 60 verschiedenen Aminosäuren von Histonen zu finden sind (Kouzarides 2007). Dabei wird insbesondere der flexible, N-terminale Arm modifiziert. Die am besten charakterisierten Modifikationen sind Acetylierungen, Methylierungen und Phosphorylierungen der Histone H3 und H4. Acetylierungen und Methylierungen wurden bereits 1964 mit Veränderungen in der Transkription in Verbindung gebracht (Allfrey et al. 1964).

Acetylierungen von Lysinen werden von Histon-Acetyltransferasen (HATs) katalysiert, unter denen sich zahlreiche transkriptionelle Aktivatoren und Ko-Aktivatoren befinden (Sternier and Berger 2000; Chen et al. 2001; Roth et al. 2001). Entsprechend wurden Acetylierungen insbesondere innerhalb von Genpromotoren gefunden und in zahlreichen Studien mit transkriptioneller Aktivierung in Verbindung gebracht (Liu et al. 2005; Pokholok et al. 2005; Clayton et al. 2006; Rosaleny et al. 2007; Wang et al. 2008). Die Acetylierung von Histon H3 Lysin 9 (H3K9Ac) befindet sich beispielsweise in Enhancern und Promotoren aktiver Gene (Agalioti et al. 2002). An der Repression von Transkription sind oftmals Histon-Deacetylasen (HDACs) beteiligt (Khochbin et al. 2001; Clayton et al. 2006).

Verschiedene Lysin-Methylierungen in Histonen sind sowohl mit transkriptioneller Aktivität als auch mit Repression verbunden. Für aktiv transkribierte Promotoren und die Region um den Transkriptionsstart transkribierter Gene ist insbesondere die Histon H3 Lysin 4 Trimethylierung (H3K4Me3) beschrieben (Fischle et al. 2003; Pray-Grant et al. 2005; Barski et al. 2007; Guenther et al. 2007), während nach dem Transkriptionsstart in aktiv transkribierten Bereichen Di- und Trimethylierungen von Histon H3 Lysin 36 (H3K36Me2/Me3) zu finden sind (Bannister et al. 2005; Barski et al. 2007). Trimethylierung von Histon H3 Lysin 27 (H3K27Me3) ist hingegen mit der Repression der Transkription verbunden (Boyer et al. 2006; Lee et al. 2006; Roh et al. 2006; Barski et al. 2007), und die Trimethylierung von Histon H3 Lysin 9 (H3K9Me3) ist ein Marker für transkriptionell inaktives Heterochromatin (Bannister et al. 2001; Barski et al. 2007). Diese und weitere Histonmodifikationen stehen im Mittelpunkt intensiver Forschung. Es wurden zahlreiche Enzyme identifiziert, die diese Modifikationen setzen oder entfernen. Infolge der Reversibilität der posttranslationalen Modifikationen von Histonen entsteht eine dynamische

Chromatin-„Landschaft“, die lokale Prozesse wie die Regulation von Transkription und DNA-Reparatur und die Ausbildung globaler Chromatinstrukturen wie Heterochromatin steuert (Kouzarides 2007; Kim et al. 2009).

Die posttranslationalen Modifikationen der Histone wirken auf zwei verschiedene Arten: Sie beeinflussen die Struktur des Chromatins direkt durch die veränderten biophysikalischen Eigenschaften der modifizierten Aminosäuren, und sie bilden Bindemotive für eine Vielzahl regulatorischer Proteine. Lysin-Acetylierungen der Histone H3 und H4 neutralisieren die positiven Ladungen der Lysine und schwächen die Interaktion mit DNA. So behindern sie die Faltung des Chromatins in kompakte hochgeordnete Strukturen *in vitro* (Garcia-Ramirez et al. 1995; Tse et al. 1998), und eine erhöhte DNase I-Sensitivität *in vivo* (Hebbes et al. 1994; Krajewski and Becker 1998) deutet auf bessere Zugänglichkeit der DNA hin. Allerdings weisen einige Forschungsarbeiten darauf hin, dass für eine Verstärkung der Transkription zusätzlich die Aktivität von Chromatin-Remodeling Komplexen nötig ist (Loyola et al. 2001; Carey et al. 2006). Weitaus besser charakterisiert ist die Rolle der Histonmodifikationen als Bindeplattform für Effektor-Proteine mit spezifischen Bindedomänen. Lysin-Acetylierungen werden durch Bromodomänen erkannt, Methylierungen über Chromo-ähnliche Domänen und Phosphorylierungen durch eine Domäne in 14-3-3-Proteinen (Kim et al. 2009). Bromo- und Chromo-ähnliche Domänen sind häufig in Chromatin-Remodeling Komplexen zu finden und sind nötig, um diese an Genpromotoren zu rekrutieren. Der SWI/SNF Chromatin-Remodeling Komplex bindet beispielsweise über eine Bromodomäne an acetylierte Histone und kann über Nukleosom-Remodeling die Transkription fördern (Chandy et al. 2006; Hassan et al. 2006; Ferreira et al. 2007). Eine ähnliche Rolle spielt der NURF Chromatin-Remodeling Komplex, der über die Chromo-ähnliche PHD-Domäne H3K4Me3 erkennt und den ATP-abhängigen SNF2L Nukleosom-Remodeler rekrutiert (Wysocka et al. 2006). Ein Beispiel für repressive Aktivitäten ist ING2, das ebenfalls über eine PHD-Domäne an H3K4Me3 in proliferativen Genen bindet und infolge von DNA-Schäden deren Transkription durch Rekrutierung eines HDAC-Komplexes unterdrückt (Pena et al. 2006; Shi et al. 2006). Auch vollständige Unterdrückung der Transkription durch Heterochromatin-Bildung ist mit der Bindung von Faktoren mit Chromodomäne verbunden. Das HP1 Protein bindet über eine Chromodomäne an H3K9Me3 und erhält die transkriptionelle Repression durch seine Deacetylase- und Methylase-Aktivitäten aufrecht (Fuks et al. 2003).

### 1.5.1.3 Regulation der Aktivität der RNA-Polymerase II

Alle Protein-kodierenden Gene und eine Vielzahl nicht-kodierender Transkripte werden durch die RNA-Polymerase II (Pol II) transkribiert. Rekrutierung der Pol II an Promotoren und die Initiation der Transkription wird durch basale Transkriptionfaktoren (*general transcription factors*, GTFs) vermittelt, die praktisch keine Genspezifität aufweisen und an den *core*-Promoter nahe des TSS binden (Thomas and Chiang 2006). Die GTFs TFIIA, -B, -D, -E, -F und -H binden sequentiell an den *core*-Promotor und bilden zusammen mit Pol II den Pre-Initiationskomplex (PIC). Nach Rekrutierung von Pol II wird ein Transkriptionszyklus durch Initiation, Elongation und Termination vollendet (Wade and Struhl 2008). Ursprünglich wurde angenommen, dass die Rekrutierung von Pol II der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Aktivierung der Genexpression ist (Ptashne and Gann 1997). Zahlreiche aktuelle Studien zeigen jedoch, dass es nach Aufbau des PIC und Initiation zu einem Pausieren von Pol II in der 5'-Region von Genen kommt und deuten darauf hin, dass erst das Entlassen der Pol II aus dieser Pause der limitierende Schritt ist (Struhl 2007; Core and Lis 2008; Margaritis and Holstege 2008; Price 2008; Wade and Struhl 2008). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass auch Promotoren inaktiver Gene mit Pol II besetzt sind (Guenther et al. 2007; Muse et al. 2007; Hargreaves et al. 2009). Das Entlassen von Pol II aus der Pause und damit ein Umschalten von Initiation zu Elongation, sowie bereits die Initiation selbst werden über Phosphorylierungen von Pol II gesteuert. Die Pol II der Säuger besitzt in der C-terminalen Domäne (CTD) eine Sequenz von 52 Wiederholungen des Heptapeptids N-Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser-C (Corden et al. 1985), die Ziel verschiedener posttranslationaler Modifikationen sein können. Darunter sind insbesondere die Phosphorylierungen der Serine 2 und 5 gut charakterisiert (Brookes and Pombo 2009). Die Modifikationen in der Pol II CTD dienen als Bindemotive für die RNA-Prozessierungsmaschinerie, histonmodifizierende Proteine, Elongationsfaktoren und Terminationsfaktoren (Egloff and Murphy 2008). Während des PIC-Aufbaus wird Pol II in hypo-phosphorylierter Form an den Promotor rekrutiert. Die Initiation der Transkription erfordert die Phosphorylierung von Ser5 in der CTD von Pol II durch KIN28, eine TFIIH-assoziierte Kinase (Komarnitsky et al. 2000). Nach Verlassen des Promotors kommt es unter Einfluss der negativen Elongationsfaktoren NELF und DSIF zum Pausieren von Pol II in der proximalen 5'-Region (Yamaguchi et al. 1999; Cheng and Price 2007). Die Kinase-Untereinheit CDK9 des *positive transcription elongation factor b* (P-TEF-b) phosphoryliert NELF und DSIF (Peterlin and Price 2006), sowie Ser2 in der Pol II CTD, wodurch die Pause aufgehoben wird und elongationskompetente Pol II entsteht (Marshall et al. 1996; Lee and Greenleaf 1997). Die Phosphorylierung von Ser2 in der CTD

von Pol II ermöglicht die Rekrutierung von HMTs, die H3K36 methylieren (Krogan et al. 2003; Li et al. 2005), wodurch transkriptionskompetentes Chromatin entsteht, das infolge von Chromatin-Remodeling von Pol II passiert werden kann.

### **1.5.2 P53 als Transkriptionsfaktor**

Zentrale Eigenschaft und Grundlage der meisten tumorsupprimierenden Effektorfunktionen von p53 ist die Fähigkeit als sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor zu wirken. P53 wird infolge unterschiedlichster Stresssignale wie DNA-Schäden, aktivierter Onkogene, Telomerenverkürzung, Defekte des Spindelapparates, Hypoxie, Hitze- und Kälteschock, fehlgefalteter Proteine, Nährstoffmangel oder Fehler in der Ribosomenfunktion aktiviert und bindet an p53-REs innerhalb seiner Zielgene (Vogelstein et al. 2000; Levine and Oren 2009; Vousden and Ryan 2009). Hier kann es als transkriptioneller Aktivator oder Repressor wirken (Riley et al. 2008; Menendez et al. 2009; Beckerman and Prives 2010). Im Zuge der transkriptionellen Aktivierung ist p53 in der Lage, die Struktur des umliegenden Chromatins zu verändern und damit die Voraussetzung für eine Aktivierung zu schaffen. P53 interagiert mit dem Chromatin-Remodeling Komplex SWI/SNF (Lee et al. 2002) und kann die Histon-Acetylasen p300/CBP (Avantaggiati et al. 1997; Gu et al. 1997; Lill et al. 1997; Scolnick et al. 1997), GCN5 (Candau et al. 1997), PCAF (Scolnick et al. 1997; Barlev et al. 2001) und TIP60 (Gevry et al. 2007) als transkriptionelle Ko-Aktivatoren rekrutieren. Außerdem kann p53 selbst durch p300/CBP acetyliert, und dadurch seine Transaktivierungskapazität gesteigert werden. Für die Histon-Arginin-Methyltransferasen PRMT1 und CARM1 wurde eine Rolle in der p53-vermittelten Transaktivierung des *GADD45* Genes beschrieben (An et al. 2004).

Auch an der Rekrutierung der basalen Transkriptionsfaktoren und dem Aufbau des PIC scheint p53 aktiv mitzuwirken. Es bindet an die TFIID Untereinheiten TBP, TAFII40 und TAFII60 (Chen et al. 1993; Liu et al. 1993; Thut et al. 1995; Farmer et al. 1996); auch TFIIA sowie TFIIH können p53-abhängig rekrutiert werden (Ko and Prives 1996; Xing et al. 2001). Nach erfolgter Initiation erfordert das Verlassen des Promotors durch Pol II positive Elongationsfaktoren (vgl. 1.5.1.3). p53 bindet direkt an CDK9, die Kinase-Untereinheit von P-TEF-b, die Pol II an Ser2 der CTD phosphoryliert. Auch hier ist p53 wiederum selbst Ziel der Modifikation in Form von Phosphorylierungen der Serine 33, 315 und 392 (Claudio et al. 2006; Radhakrishnan and Gartel 2006). Eine ähnliche Interaktion findet mit dem Komplex aus *casein kinase 2* (CK2) und dem Elongationsfaktor FACT (*facilitates chromatin*

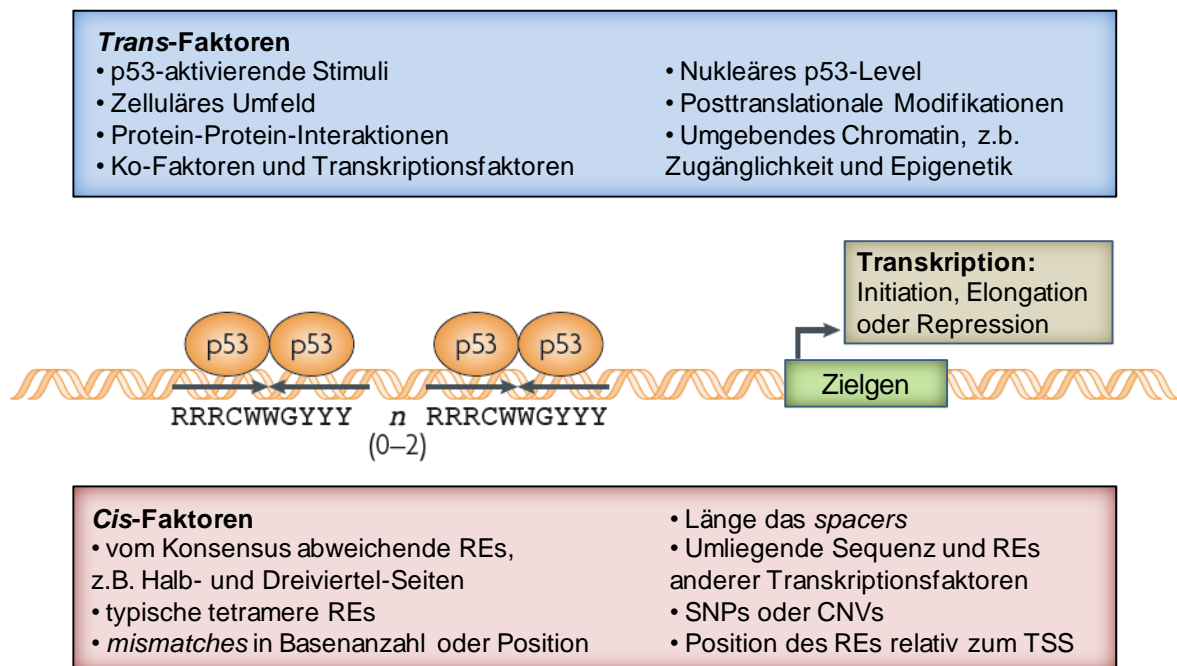
*transcription*) statt (Keller et al. 2001). Dies sind nur einige Beispiele der zahlreichen Interaktionen von p53 mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie und Elongationsfaktoren. Eine neuere Studie in Hefe deutet sogar darauf hin, dass p53 selbst wie ein Elongationsfaktor während der Transkription im gesamten Gen mit Pol II assoziiert bleiben kann (Balakrishnan and Gross 2008).

Neben einer transkriptionellen Aktivierung von Genen mit tumorsupprimierenden Eigenschaften kann p53 auch als Repressor von tumorfördernden Genen wie *survivin* (*BIRC5*), *MYC*, *stathmin* (*STMN1*) oder *vascular endothelial growth factor* (*VEGF*) wirken (Ahn et al. 1999; Zhang et al. 2000; Hoffman et al. 2002; Ho et al. 2005). Unter bestimmten Bedingungen kann es auch zur Repression von *p21* und anderen tumorsupprimierenden Genen kommen (Weber et al. 2008). Bei der p53-vermittelten Repression einiger Gene ist die Interaktion mit dem Ko-Repressor mSIN3A von Bedeutung, über den p53 HDACs an seine Zielgene rekrutieren kann (Murphy et al. 1999; Zhang et al. 2004; Ho et al. 2005; Lin et al. 2005; Weber et al. 2008). Ein anderer Mechanismus ist die indirekte Repression von Genen, die durch p53-Zielgene reguliert werden. Beispielsweise kommt es zu einer Unterdrückung von Zielgenen des Transkriptionsfaktors E2F, da dieser durch p21-vermittelte Inhibition von Cyc/CDK-Komplexen in einem inaktiven Komplex mit dem RB-Protein verbleibt (Lohr et al. 2003). Schließlich kann p53 die Transaktivierung durch andere Transkriptionsfaktoren unterdrücken, wenn das p53-RE nahe der Bindestelle eines anderen Transkriptionsfaktors liegt (Lee et al. 1999; St Clair and Manfredi 2006), oder es kann die Aktivität eines anderen Transkriptionsfaktors durch Bindung an diesen beeinflussen (Imbriano et al. 2005). Insgesamt sind die Mechanismen der transkriptionellen Repression durch p53 bisher nur unzureichend verstanden. Insbesondere die Frage, wie es bei einigen Genen zu einer Transaktivierung oder Repression kommen kann ist Gegenstand aktueller Forschung.

### **1.5.3 Genspezifität bei der transkriptionellen Regulation durch p53**

Die Liste der eindeutig belegten p53 Zielgene umfasst nach einer aktuellen Bestandsaufnahme mindestens 129 Gene (Riley et al. 2008). Darunter befinden sich Gene, die in erster Linie den klassischen p53-vermittelten biologischen Antworten wie Zellzyklusarrest (Kastan et al. 1992), Apoptose (Vousden 2006) und Seneszenz (Garbe et al. 2007) zuzuordnen sind. Aber auch Gene aus DNA- und Energie-Stoffwechsel (Green and Chipuk 2006; Matoba et al. 2006; Helton and Chen 2007), Motilität und Migration (Roger et al. 2006; Singh et al. 2007; Qin et al. 2009), Zell-Zell-Kommunikation (Yu et al. 2006), Angiogenese (Zhang et al. 2000; Pal et

al. 2001; Menendez et al. 2006; Teodoro et al. 2006), Immunantwort (Taura et al. 2008) und Differenzierung (Molchadsky et al. 2008; Tedeschi and Di Giovanni 2009) sind vertreten. Angesichts dieser Vielzahl biologischer Funktionen stellt sich die Frage, wie nach p53-Aktivierung eine spezifische Antwort durch transkriptionelle Regulation spezifischer Gene eingeleitet wird. Diese Frage war und ist Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten. Zwei alternative Modelle versuchen die Zielgenspezifität zu beschreiben (Espinosa 2008). Beim Modell der selektiven Bindung wird davon ausgegangen, dass Unterschiede in der Transaktivierung (oder Repression) auf Unterschiede in der Affinität der Bindung von p53 an die REs in den jeweiligen Genen zurückgehen (Abb. 3). Das Modell des selektiven Kontextes hingegen legt zugrunde, dass p53 mit ähnlicher Affinität an alle seine REs bindet und spätere Schritte wie Histonmodifikationen, Ko-Faktor-Rekrutierung und Pol II-Prozessivität die Transaktivierung (oder Repression) bestimmen (Abb. 3). In den letzten Jahren beschäftigten sich zahlreiche Studien mit der unterschiedlichen Qualität der p53-REs, posttranslationalen Modifikationen von p53 und Interaktionen mit Ko-Faktoren und deren Einfluss auf die Transaktivierung und Repression (Espinosa 2008; Riley et al. 2008; Menendez et al. 2009).



**Abbildung 3: Beeinflussung der transkriptionellen Aktivität von p53 durch verschiedene Faktoren**

Die transkriptionelle Aktivität von p53 wird durch Unterschiede in den p53-REs selbst (*Cis*-Faktoren) und durch DNA-bindungsunabhängige Ereignisse wie externe Stimuli, Protein-Protein-Interaktionen, Ko-Faktoren etc. (*Trans*-Faktoren) gesteuert (verändert nach Menendez et al. 2009). SNP = *single nucleotide polymorphism*; CNV = *copy number variant*; TSS = Transkriptionsstart.

#### 1.5.4 Sequenz- und strukturabhängige Bindung von p53 an *response elements* (REs)

Mit der Identifizierung von p53 als sequenzspezifischem Transkriptionsfaktor und der Beschreibung eines Konsensusbindemotivs (el-Deiry et al. 1992) wurde es möglich, die Bindeeigenschaften von p53 *in vitro* zu untersuchen, *in vivo* Bindestellen zu charakterisieren und p53-Zielgene bioinformatisch vorherzusagen. Die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP), insbesondere mit angeschlossener Microarray- oder Sequenzierungs-Technologie, lieferte schließlich ein Werkzeug, um im großen Maßstab die p53-Bindung an DNA zu untersuchen und vorhergesagte Bindestellen zu verifizieren (Cawley et al. 2004; Hearnest et al. 2005; Wei et al. 2006). Das p53-Konsensusbindemotiv setzt sich aus zwei Halbseiten der palindromischen Dekamer-Sequenz 5'-RRRCWWGYYY-3' (R = A, G; W = A, T; Y = C, T) zusammen, die durch 0-13 Basenpaare (*spacer*) getrennt sein können (vgl. 1.3). Unterschiede in der Funktionalität von p53-REs können verschiedene Ursachen haben (Abb. 3). Es können mehrere p53-REs innerhalb eines Genes auftreten und additiv zur p53-Antwort beitragen, wie beispielsweise bei *p21* (el-Deiry et al. 1995; Espinosa and Emerson 2001; Saramaki et al. 2006). Außerdem scheint die Affinität der p53-Bindung an einzelne REs zu variieren. Einige p53-REs bilden sog. *cluster*, in denen mehr als zwei Halbseiten der Konsensussequenz auftreten, oder zusätzlich Viertelseiten (RRRCW und WGYYY) zu finden sind. Die Affinität von p53 und die anschließende Transaktivierung steigen linear mit der Anzahl der Halbseiten im Bindemotiv (Bourdon et al. 1997). Die Anzahl der *spacer*-Nukleotide zwischen den Halbseiten beeinflusst die p53-Bindung stark. Bis auf wenige Ausnahmen haben die validierten p53-REs weniger als drei *spacer*-Nukleotide (Wei et al. 2006; Jordan et al. 2008). Das p53-RE ist stark degeneriert, da fast 95% der validierten REs Abweichungen von der Konsensussequenz zeigen, die die Funktionalität beeinflussen könnten (Menendez et al. 2009). Einige Positionen der Konsensussequenz haben großen Einfluss auf die Transaktivierungskapazität. Ein Austausch von C oder G in der CWWG-Kernsequenz verringert die p53-Bindung und damit die Transaktivierung stark. Die höchste Transaktivierungskapazität hat die Kernsequenz CATG. Diese Nukleotidfolge ermöglicht eine starke Krümmung der DNA (Olson et al. 1998; Balagurumorthy et al. 2002; Veprintsev and Fersht 2008), und es wird angenommen, dass eine größere Flexibilität der Bindesequenz die Bindeaffinität erhöht (Riley et al. 2008). Weitere Arbeiten unterstützen die Vorstellung, dass die Topologie der DNA die p53-Bindung beeinflusst. Viele von p53 gebundene Sequenzen mit vom Konsensus abweichender Basenfolge weisen eine interne Symmetrie auf, die eine Ausbildung von *stem-loop*-Strukturen erlaubt (Gohler et al. 2002). In linearer Konformation erfolgt nur eine schwache Bindung, aber die *stem-loop*-Struktur wird mit hoher Affinität



gebunden; diese Bindung benötigt neben der DBD den C-Terminus. Im Extremfall konnte so eine Bindung von p53 an Sequenzen gezeigt werden, die *stem-loop*-Strukturen einnehmen, aber stark bis vollständig von der Konsensussequenz abweichen (Jett et al. 2000; Contente et al. 2002). Ein weiteres Beispiel für diese strukturabhängige Bindung von p53 an DNA ist die hochaffine Bindung an CTG-CAG-Trinukleotid-Wiederholungen, die strukturell flexibel sind und ebenfalls *stem-loop*-Strukturen bilden können (Walter et al. 2005). Folglich spielt auch die Topologie der DNA eine Rolle bei der p53-Bindung, und Unterschiede in der Topologie könnten somit zu verschiedenen Bindungsaffinitäten von p53 an REs beitragen.

Für eine Vielzahl von Ko-Faktoren ist ein Einfluss auf die p53-vermittelte Antwort beschrieben (Menendez et al. 2009; Vousden and Prives 2009) (vgl. 1.4.2; 1.5.2). Neben den intrinsischen Faktoren der DNA-Sequenz könnten somit auch posttranslationale Modifikationen und die Bindung von Ko-Faktoren die Affinität für verschiedene REs beeinflussen.

Unterschiedliche Affinitäten von p53 würden eine verstärkte Bindung an hochaffine REs bedeuten und die Grundlage für eine Diskriminierung zwischen Zielgenen liefern. Außerdem könnten Unterschiede in der p53-Konzentration eine Feinabstimmung der Expression von Zielgenen über niederaffine REs steuern (Menendez et al. 2009). Entsprechend des Modells einer selektiven Bindung sollten p53-Zielgene mit verschiedenen biologischen Funktionen durch REs unterschiedlicher Sequenz und/oder Topologie, die verschiedene p53-Affinität bewirken, zu differenzieren sein. Aktuelle bioinformatische Studien konnten dies allerdings bisher nicht bestätigen (Horvath et al. 2007).

### **1.5.5 Kontextabhängige transkriptionelle Regulation durch p53**

Eine kontextabhängige Regulation der Transkription durch p53 erfährt durch Studien der p53-Bindung an REs *in vitro* und in neuerer Zeit *in vivo* Unterstützung. Erste Bindungsstudien, die eine verstärkte Bindung von p53 an REs nach posttranslationalen Modifikationen zeigen, wurden *in vitro* an linearer, „nackter“ DNA durchgeführt (Hupp et al. 1992; Gu and Roeder 1997). Liegen die REs allerdings in nicht-linearer Form wie beispielsweise *stem-loop*-Strukturen vor, bindet p53 strukturabhängig (vgl. 1.5.4). Statt eines Einflusses der Topologie auf die Bindungsaffinität könnte dies auch dahingehend interpretiert werden, dass die Topologie einen kompensatorischen Effekt hat, wenn Veränderungen in der Konsensussequenz vorliegen. Die Daten von Experimenten mit strukturierter DNA decken sich mit Daten aus einem *in vitro* Transkriptionssystem mit einem chromatinverpackten *p21*-Promotor.

Dort bindet p53 bereits unmodifiziert, und auch diese Bindung benötigt den C-Terminus (Espinosa and Emerson 2001). Folglich scheint eine Aktivierung von p53 durch Modifikationen für eine Bindung an REs nicht notwendig zu sein, wenn die REs Sekundärstrukturen einnehmen, die *in vivo* auftreten können bzw. im Chromatinkontext vorliegen.

Weiterhin zeigt ein Vergleich der p53-Bindung nach UV- und  $\gamma$ -Bestrahlung, die in Zellen unterschiedliche transkriptionelle Programme auslösen, keine Unterschiede in der Bindung an die Zielgene *p21*, *BAX*, *PUMA*, *p53AIP1* und *PIG3* (Kaeser and Iggo 2002). Auch einzelne posttranslationale Modifikationen, die mit einem bestimmten transkriptionellen Programm in Verbindung gebracht werden, scheinen als Determinanten der Zielgenspezifität von p53 nicht auszureichen. Die Phosphorylierung von Ser46, die mit einer präferentiellen Aktivierung von apoptotischen Genen in Verbindung gebracht wurde, korreliert in Studien mit mehreren Zelllinien nicht mit einer apoptotischen Antwort (Kurihara et al. 2007). Den stärksten Hinweis auf einen kontextabhängigen Mechanismus der Regulation der p53-Antwort nach dessen DNA-Bindung lieferten genomweite Analysen. Sie zeigen, dass p53 auch an Zielgene bindet, die auf einen bestimmten Stimulus hin nicht reguliert werden, und dass sich die Muster der p53-Bindung infolge unterschiedlicher Stimuli nicht ändern (Wei et al. 2006; Shaked et al. 2008). Auf dieser Grundlage wurde die Aktivierung einzelner Gene durch p53 im Detail untersucht. Dabei wurden insbesondere zellzyklusarretierende Gene mit apoptotischen Genen verglichen.

Die Transkription des *p21*-Genes wird infolge von ionisierender Strahlung, 5-Fluoro-Uracil- und Doxorubicin-Behandlung stark und dauerhaft aktiviert, die p21-Expression nimmt stark zu und es kommt zum Zellzyklusarrest (Donner et al. 2007). UV-Bestrahlung hingegen führt zu einer schwächeren, transienten Transkription, p21-Protein akkumuliert nur mäßig und es kommt zur Apoptose. Alle Bedingungen führen zu einer Stabilisierung und Akkumulation von p53 und die Bindung an den p21-Promotor verändert sich lediglich entsprechend der Konzentration von p53. Außerdem unterscheidet sich in beiden Fällen die Histon-Acetylierung zwischen den Stimuli nicht, und es liegt bereits initiierte Pol II vor (Espinosa et al. 2003; Gomes et al. 2006; Donner et al. 2007; Mattia et al. 2007). Ein ähnliches Bild zeigt sich bei pro-apoptotischen Genen, allerdings ist die Menge an bereits vorhandener Pol II deutlich geringer, was auf Unterschiede in der Regulation hindeutet (Espinosa et al. 2003; Gomes et al. 2006; Gomes and Espinosa 2010). Die Regulation der Transkription scheint folglich erst nach der Bindung von p53 durch Rekrutierung von Pol II, Elongationsfaktoren und beim Umschalten zur Elongation stattzufinden. In Übereinstimmung mit diesen

Ergebnissen wurde vor Kurzem gezeigt, dass p53 mit Untereinheiten des transkriptionellen Ko-Aktivator-Komplexes Mediator interagiert. Der Multiproteinkomplex Mediator ist ein zentraler Regulator der Elongation und beeinflusst die Prozessivität der Pol II. Infolge der Interaktion mit p53 kommt es zu strukturellen Veränderungen im Mediator-Komplex, die über ein Umschalten von pausierter zu elongationskompetenter Pol II die transkriptionelle Aktivierung von HDM2 einleiten. Der Aufbau des PIC läuft hingegen unabhängig von p53 ab (Meyer et al. 2010). Die Mechanismen, die einer stimuluspezifischen Rekrutierung/Interaktion von p53 mit Komponenten der Elongationsmaschinerie und Ko-Faktoren bestimmen, sind bisher nur unzureichend geklärt. Es wird vermutet, dass stimuluspezifische posttranslationale Modifikationen von p53 und eine stimulusabhängige Regulation von Ko-Faktoren diesen Prozess steuern (Abb. 3) (Gomes and Espinosa 2010).

Eine aktuelle Untersuchung der *core*-Promotoren der Gene *p21* (Zellzyklusarrest) und *FAS* (Apoptose) ohne die p53-REs und in Abwesenheit von p53 zeigt, dass auch p53-unabhängige Effekte einen starken Einfluss auf die Regulation der p53-Antwort zu haben scheinen. PIC-Aufbau und Initiation verlaufen an beiden Promotoren in Abwesenheit von p53. Am *p21*-Promotor finden sie sehr schnell statt, allerdings ist die Re-Initiation der Pol II gering. Am *FAS*-Promotor hingegen ist die Initiation langsam, wird aber durch erhöhte Re-Initiation länger aufrecht gehalten (Morachis et al. 2010). Entsprechend dieser Ergebnisse könnten die *core*-Promotoren verschiedener p53-Zielgene evolutionär so entstanden sein, dass sie einen schnellen, reversiblen Zellzyklusarrest erlauben, dem bei Bedarf eine irreversible Antwort wie Apoptose oder Seneszenz folgt.

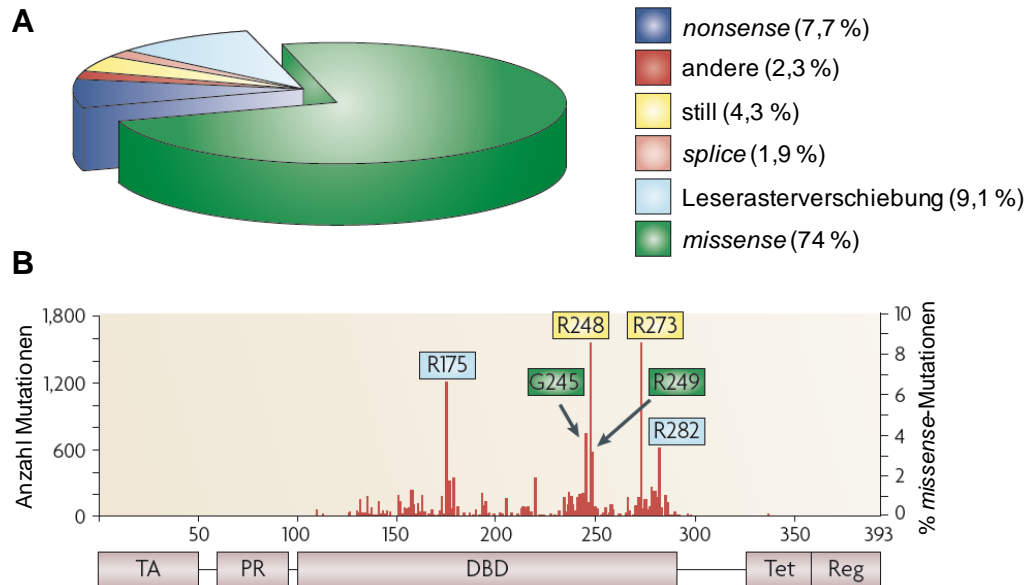
## 1.6 Mutationen im Tumorsuppressor p53

Der Tumorsuppressor p53 steht im Mittelpunkt eines Netzwerkes von Schadenssignalwegen. Seine zentrale Rolle spiegelt sich auch in der Mutationsrate von p53 in humanen Tumoren wider. Mit einer Mutationsfrequenz von 10-70% in verschiedenen Tumoren ist *p53* das am häufigsten mutierte krebsassoziierte Gen (Brosh and Rotter 2009). Mit einem Anteil von 74% sind der Großteil dieser Mutationen *missense*-Punktmutationen, von denen wiederum die Mehrzahl in der DBD liegt. Dabei entfallen allein 30 % auf die Mutanten R175, G245, R248, R249, R273 und R282, sechs sog. *hotspots* (Petitjean et al. 2007) (Abb. 4). Entsprechend der Bedeutung der Transaktivierungskapazität für die tumorsupprimierenden Funktionen hat die Mehrheit der p53-Mutanten die sequenzspezifische Bindung an das p53-RE verloren und

kann p53-Zielgene nicht mehr transaktivieren (Hollstein et al. 1991; Kato et al. 2003; Kim and Deppert 2006). Somit gehen wichtige Schutzmechanismen der Zelle verloren.

Anders als bei Mutationen anderer Tumorsuppressoren, die oftmals durch Verlust von Chromosomen, Deletionen, Rekombinationen oder *nonsense*-Mutationen eliminiert werden, kommt es durch *missense*-Mutationen zur Expression eines funktionellen Proteins mit einem Aminosäureaustausch. Die p53-Punktmutanten lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Bei Konformationsmutanten kommt es durch den Aminosäureaustausch zu lokalen oder globalen Veränderungen der Proteinstruktur. Bei Kontaktmutanten sind Aminosäuren betroffen, die direkt an der DNA-Bindung beteiligt sind (Bullock and Fersht 2001). Mutierte p53-Proteine (mutp53) zeichnen sich im Gegensatz zu Wildtyp-p53 (wtp53) durch eine erhöhte Stabilität aus und akkumulieren in Tumorzellen (Rotter 1983; Iggo et al. 1990; Bartek et al. 1991). Diese Stabilisierung scheint allerdings keine Folge der Mutationen in *p53* zu sein, sondern aus weiteren Veränderungen in den Tumorzellen zu resultieren (Lang et al. 2004; Terzian et al. 2008).

Konsequenz der *p53*-Mutation ist für die Zelle zunächst ein teilweiser Verlust der wtp53-Funktionen infolge der Mutation eines Allels. Hinzu kommt die Hemmung des verbleibenden wtp53 durch gemischte Tetramerisierung (dominant-negativer Effekt) (Milner and Medcalf 1991; Milner et al. 1991; Sigal and Rotter 2000), die abhängig von einem Überschuss der Mutante ist (Nicholls et al. 2002; Chan et al. 2004; Willis et al. 2004). Oftmals wird das verbleibende *p53*-Allel im Zuge der Tumorprogression auch mutiert oder geht verloren (*loss of heterozygosity*), so dass die Zelle jegliche Schutzfunktionen von wtp53 verliert. Zahlreiche Studien zeigen, dass mutp53 unter diesen Bedingungen zusätzlich zum dominant-negativen Effekt und nach Verlust des intakten *p53*-Allels tumorfördernde Wirkungen entfaltet (Weisz et al. 2007b; Brosh and Rotter 2009; Oren and Rotter 2010).



**Abbildung 4: Mutationen im Tumorsuppressor p53**

**A.** Prozentualer Anteil verschiedener *p53*-Mutationen in Tumoren. **B.** Verteilung der *missense*-Mutationen über die *p53*-Aminosäuresequenz. Die sechs *hotspot*-Mutationen sind hervorgehoben. DNA-Kontaktmutanten sind in Gelb dargestellt, Mutanten mit lokalen strukturellen Veränderungen in Grün und Konformationsmutanten in Blau (verändert nach Brosh and Rotter 2009). TA = Transaktivierungsdomäne; PR = Prolin-reiche Region; DBD = DNA-Bindedomäne; Tet = Tetramerisierungsdomäne; Reg = regulatorische, C-terminale Domäne

### 1.6.1 Tumorfördernde Eigenschaften von mutp53 (*gain of function*; GOF)

Erste Hinweise, dass mutp53 tumorfördernde Eigenschaften hat, lieferten bereits Experimente der 1980er Jahre nach der Entdeckung von p53. *P53* galt nach seiner Entdeckung zunächst als Onkogen und seine Expression in murinen *p53*-null Pre-B-Zellen führte zu Transformation und Bildung von Tumoren *in vivo* (Wolf et al. 1984). Später wurde nachgewiesen, dass bei diesen Experimenten mit *p53*-Mutanten gearbeitet worden war (vgl. 1.1). Das Konzept des GOF wurde 1993 offiziell eingeführt. In Experimenten mit *p53*-null Zellen wurde demonstriert, dass mutp53 diese Zellen transformieren kann und die Bildung von Kolonien *in vitro* sowie von Tumoren in der Maus erhöht (Dittmer et al. 1993). Seither haben zahlreiche Studien den mutp53-GOF untermauert und verschiedene Mechanismen aufgezeigt (Abb. 5).

Die wichtigsten Belege für den mutp53-GOF liefern *in vivo* Experimente mit Mäusen. In den ersten *in vivo* Experimenten wurden verschiedene *hotspot*-*p53*-Mutanten in *p53*-null Zellen überexprimiert. Nach Transplantation der Zellen in immundefiziente Nacktmäuse kam es zu verstärkter Tumorbildung (Oren and Rotter 2010). Diese Experimente werden durch aktuelle Studien erweitert, in denen endogenes mutp53 in Tumorzellen mittels shRNA stabil depletiert wurde (Bossi et al. 2006; Bossi et al. 2008). Werden diese Zellen in Nacktmäuse

transplantiert, ist das Tumoraufkommen verringert und die Tumore sind sensitiver gegenüber Chemotherapeutika. Außerdem ist die Vaskularisierung der Tumore verringert, was auf einen positiven Einfluss von *mutp53* auf die Angiogenese hindeutet (Bossi et al. 2008).

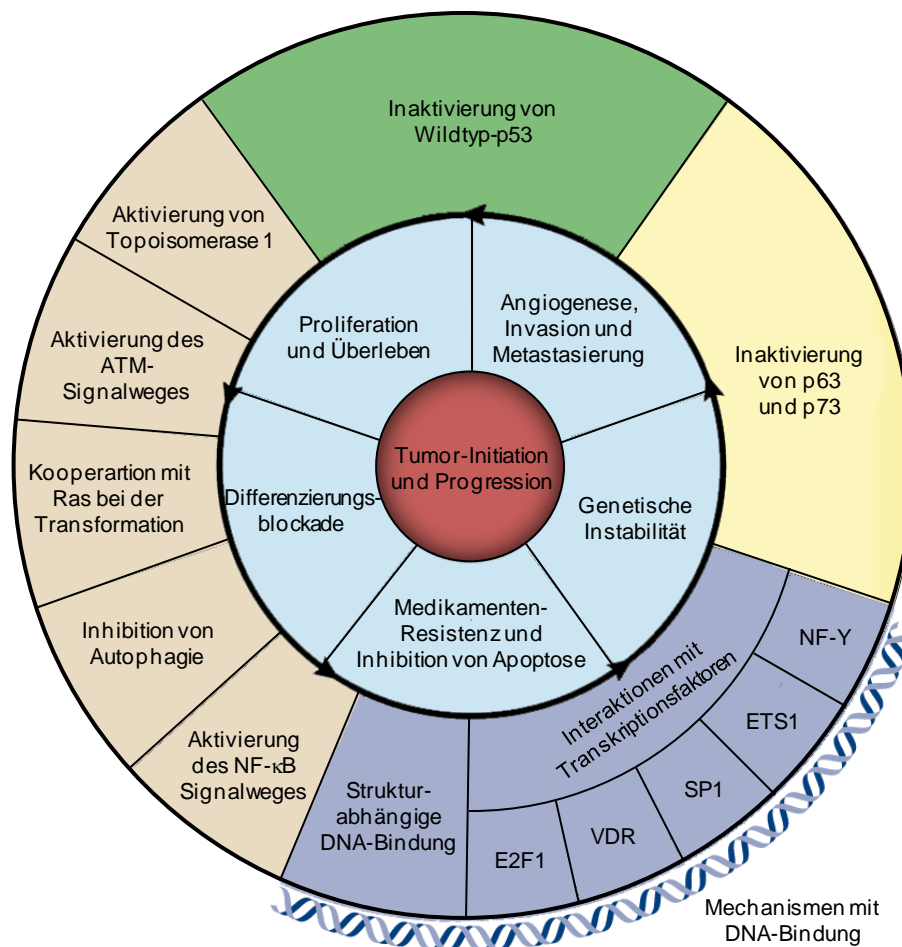
Neben Transplantationsexperimenten lieferten transgene Mausmodelle deutliche Belege für den *mutp53-GOF in vivo*. Gewebespezifische Expression von *mutp53* in der Lunge oder den Brustdrüsen zeigen eine Kooperation von *mutp53* mit onkogenvermittelter Tumorentstehung, sowie erhöhte Aggressivität, Invasivität und Metastasierung (Duan et al. 2002; Heinlein et al. 2008; Duan et al. 2009). Ähnliche Ergebnisse zeigen Mausmodelle für Hautkrebs und Pankreaskarzinome, in die mittels *knockin* ein *mutp53*-Allel eingefügt wurde (Caulin et al. 2007; Morton et al. 2010). Im Hautkrebs-Modell ist die Tumorentstehung und Progression erhöht und in beiden Systemen treten im Vergleich zum *p53-knockout* aggressivere Tumore und erhöhte Metastasierung auf.

Besonders starke Hinweise auf den *mutp53-GOF* liefern Mausmodelle für das Li-Fraumeni Syndrom in denen ein *mutp53*-Allel nach *knockin* unter physiologischer Kontrolle steht (Lang et al. 2004; Olive et al. 2004). Im Vergleich zu Mäusen mit nur einem *wtp53*-Allel ( $p53^{+/-}$ ) haben Mäuse mit einem *mutp53*- und einem *wtp53*-Allel ( $p53^{\text{mutant}/+}$ ) vergleichbare Überlebenskurven, allerdings zeigen sich ein aggressiveres Tumorspektrum und erhöhte Metastasierung. Mäuse ohne *wtp53*- mit einem *mutp53*-Allel ( $p53^{\text{mutant}/-}$ ) zeigen im Vergleich zu *p53*-null Mäusen ein erhöhtes Tumoraufkommen und aggressivere Tumore, wobei die Überlebenskurven wiederum vergleichbar sind.

Insgesamt fallen die in der Literatur beschriebenen *mutp53-GOF*-Effekte in die Kategorien genetische Instabilität, verstärkte Proliferation, unbegrenztes Replikationspotential, erhöhte Resistenz gegen Chemotherapeutika und Apoptose, Störung der Differenzierung, Förderung der Angiogenese, größere Motilität und Invasion sowie erhöhte Metastasierung in Mausmodellen (Weisz et al. 2007b; Brosh and Rotter 2009; Oren and Rotter 2010). Damit deckt der *GOF* durch *mutp53* das gesamte Spektrum der Veränderungen ab, die als grundlegend für die Tumorentstehung definiert sind (vgl. 1). Viele dieser Veränderungen beruhen auf einer veränderten Expression der an diesen Prozessen beteiligten Komponenten infolge direkter oder indirekter Effekte von *mutp53* auf deren Transkription (vgl. 1.6.2). Während *wtp53* die Ausbildung solcher Transkriptionsprogramme durch seine Tumorsuppressoreigenschaften unterbindet, fördert *mutp53* aberrante Transkription und steht damit funktionell in direktem Gegensatz zu *wtp53*.

### 1.6.2 Molekulare Grundlagen des mutp53-GOF

Aktuelle Forschungsarbeiten beschäftigen sich intensiv mit den molekularen Grundlagen des GOF. p53-GOF-Mutanten unterscheiden sich nur in einer Aminosäure von wtp53 und besitzen intakte N- und C-terminale Domänen, im Falle der Kontaktmutanten ist sogar die Gesamtstruktur des Proteins erhalten. Daher liegt es nahe, dass sich die Mechanismen des GOF von wtp53-Funktionen ableiten lassen, die nach Verlust der sequenzspezifischen DNA-Bindung und/oder durch die Akkumulation von mutp53 in der Zelle (verstärkt) zum Ausdruck kommen. Die zentrale Eigenschaft von wtp53 ist die eines Transkriptionsfaktors und tatsächlich resultieren viele GOF-Effekte aus transkriptioneller Regulation durch mutp53. Einige der betroffenen Gene sind sogar wtp53-Zielgene, werden aber durch mutp53 entgegengesetzt reguliert. Für einen Teil der GOF-Effekte von mutp53 sind indirekte Effekte auf die Transkription und Protein-Protein-Interaktionen als zugrunde liegender Mechanismus beschrieben (Abb. 5) (Brosh and Rotter 2009).



**Abbildung 5: Onkogene Funktionen von mutp53 und deren molekulare Grundlagen**

Im Inneren des Kreises sind die onkogenen Funktionen von mutp53 dargestellt. Der äußere Kreis zeigt zugrunde liegende molekulare Mechanismen der beobachteten Phänotypen (verändert nach Brosh and Rotter 2009).

Ein Beispiel für GOF durch Protein-Protein-Interaktionen ist die Interaktion von mutp53 mit den p53-Familienmitgliedern p63 und p73. Von diesen beiden Transkriptionsfaktoren werden verschiedene *splice*-Varianten exprimiert, die ebenfalls als Tumorsuppressoren wirken und einen Verlust von p53 teilweise kompensieren können (Flores et al. 2005; Deyoung and Ellisen 2007). Mutp53 kann direkt an einige p63- und p73-Isoformen binden und diese inaktivieren (Marin et al. 2000; Gaiddon et al. 2001; Strano et al. 2002). Außerdem können sich Komplexe über dritte Proteine bilden. Im Falle einer Interaktion von mutp53, SMAD-Proteinen und p63 kommt es zu einer Inaktivierung von p63, die eine erhöhte Invasion und Metastasierung nach sich zieht (Adorno et al. 2009). Dabei ist eine funktionelle TAD von p53 nicht wichtig.

Neben indirekten Effekten auf die Transkription von p63/p73-Zielgenen sind zahlreiche weitere Gene beschrieben, bei denen mutp53 einen direkteren Einfluss auf die Transkription nimmt (Weisz et al. 2007b; Brosh and Rotter 2009). Mutp53 reguliert beispielsweise Gene wie das *multi drug resistance gene 1* (*MDR1*, (Chin et al. 1992)) oder *early growth response 1* (*EGR1*, (Weisz et al. 2004)) hoch und kann damit Resistenz gegen Chemotherapeutika und Apoptose vermitteln, verstärkt die Expression proliferationsfördernder Gene wie *PCNA* (*proliferating cell nuclear antigen*, (Deb et al. 1992)), *MYC* (Frazier et al. 1998) und *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*, (Ludes-Meyers et al. 1996)) oder kann durch Aktivierung der *telomerase reverse transcriptase* (*TERT*, (Scian et al. 2004a)) zu einem uneingeschränkten Replikationspotential beitragen. Andererseits können auch anti-proliferative und pro-apoptotische Gene reprimiert werden. Beispiele hierfür sind der *inhibitor of DNA binding 2* (*ID2*, (Yan et al. 2008)), *macrophage stimulating 1* (*MST1*, (Zalcenstein et al. 2006)) und der apoptosefördernde Rezeptor *CD95/APO-1* (Zalcenstein et al. 2003). Am Beispiel von *MDR1* wurde das erste Mal demonstriert, dass für die Aktivierung eine intakte TAD vorhanden sein muss (Lin et al. 1995), und mit Hilfe von ChIP-Experimenten konnte gezeigt werden, dass mutp53 mit den Promotoren regulierter Gene (*CD95/APO-1*, *MST1*, *EGR1*, *ID2* u.a.) assoziiert ist (Zalcenstein et al. 2003; Weisz et al. 2004; Di Agostino et al. 2006; Zalcenstein et al. 2006; Yan et al. 2008; Stambolsky et al. 2010).

Trotz globaler Analysen der Expressionsänderungen infolge einer Überexpression von mutp53 in *p53*-null Zelllinien oder einer Depletion von endogenem mutp53 in etablierten Tumorzelllinien und einer systematischen Analyse von Tumorproben konnte bisher kein einheitlicher Mechanismus der Genregulation durch mutp53 identifiziert werden. Entsprechend dem Verlust der sequenzspezifischen DNA-Bindung ist bisher kein Konsensusbindemotiv für mutp53 beschrieben, und zwischen verschiedenen Zelllinien, Mausmodellen



und Tumoren besteht große Heterogenität bezüglich der regulierten Gene (Brosh and Rotter 2009). Dies kann zum Teil damit zusammenhängen, dass verschiedene Mutanten vorliegen, die sich in ihren Funktionen unterscheiden. Außerdem deuten neuere Studien darauf hin, dass mutp53-Effekte signalabhängig sind und somit der zelluläre Kontext starken Einfluss haben kann (Di Agostino et al. 2006; Weisz et al. 2007a; Adorno et al. 2009). Zurzeit herrschen zwei Modelle vor, die transkriptionelle Regulation durch mutp53 beschreiben.

Für einen Teil der mutp53-regulierten Gene konnten als Grundlage der mutp53-Effekte ebenfalls Protein-Protein-Interaktionen identifiziert werden. Mutp53 kann indirekt mit Promotorregionen assoziieren, indem es mit anderen Transkriptionsfaktoren interagiert und deren Funktion durch Rekrutierung von Ko-Aktivatoren oder Repressoren beeinflusst. Prominente Beispiele dafür sind der Vitamin D3 Rezeptor (VDR) (Stambolsky et al. 2010), NF- $\kappa$ B (Weisz et al. 2007a) und NF-Y (Di Agostino et al. 2006). Dabei resultiert aus der Modulation der Zielgenexpression durch mutp53 eine erhöhte Apoptoseresistenz gegenüber Vitamin D- (VDR) oder TNF- $\alpha$ -Behandlung (NF- $\kappa$ B), bzw. eine aberrante Zellzykluskontrolle (NF-Y).

Ein weiteres Modell für die transkriptionelle Regulation durch mutp53 stützt sich auf eine direkte Bindung an DNA. Analog zu wtp53, das an DNA binden kann, die nicht B-Konformation einnimmt - darunter auch Sequenzen, die vom Konsensus-RE abweichen (vgl. 1.5.4) - wurde für mutp53 ebenfalls eine strukturabhängige Bindung an DNA beschrieben. Mutp53 bindet mit hoher Affinität an S/MAR-Elemente (*nuclear scaffold/matrix attachment regions*), die sich durch A/T-reiche repetitive Sequenzen auszeichnen und nicht-B-Konformationen einnehmen können (Deppert 1996; Muller et al. 1996; Will et al. 1998a; Will et al. 1998b). Die S/MAR-Elemente verankern die DNA an der Kernmatrix und sind an der Organisation des Chromatins in funktionelle Bereiche beteiligt. Eine Bindung an diese Elemente könnte mutp53 die Eigenschaft verleihen, Gene durch Veränderungen auf der Ebene der Chromatinorganisation transkriptionell zu modulieren. Weitere *in vitro* Bindungsstudien zeigen, dass mutp53 mit hoher Affinität an Oligonukleotide bindet, die in nicht-B-Konformation vorliegen (Gohler et al. 2005). Diese strukturabhängige Bindung ist unabhängig von einer spezifischen Basensequenz. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen sind DNA-Fragmente in CHIP-Experimenten aus Tumorzelllinien mit endogenem mutp53 reich an repetitiven Elementen und anderen DNA-Sequenzen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht-B-DNA-Konformationen annehmen können (Koga and Deppert 2000; Brazdova et al. 2009).

Repetitive Elemente, die Sekundärstrukturen einnehmen können, sind in großer Anzahl im humanen Genom vorhanden. Über eine Bindung an diese Elemente hätte mutp53 das Potential, durch Veränderungen der Chromatinstruktur oder durch Bindung in der Nachbarschaft einer Vielzahl von Genen global in die Transkription einzugreifen. Die Effekte wären abhängig von der vorhandenen Chromatinstruktur und vorhandenen transkriptionellen Programmen. Damit bietet sich ein Modell an, das sowohl die große Anzahl mutp53-regulierter Gene als auch die Heterogenität zwischen verschiedenen Zellsystemen/Tumoren erklären kann.

In der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Grundlagen der transkriptionellen Regulation durch mutp53 näher charakterisiert. Das Modell von mutp53 als ein globaler, kontextabhängiger transkriptioneller Modulator wurde ausgehend von zwei Arbeitshypothesen untersucht: 1. Infolge der strukturabhängigen DNA-Bindung von mutp53 gibt es eine Vielzahl von Bindestellen. 2. Mutp53 hat eine intakte TAD und besitzt damit wie wtp53 transkriptionelles Potential.

In einem Tumorzellsystem mit endogener mutp53-Expression wurden zunächst die globalen Expressionsänderungen direkt nach mutp53-Depletion durch RNAi mittels Microarrays analysiert und mutp53-Zielgene identifiziert. An einem Set mutp53-regulierter Gene wurden anschließend in Chromatin-Immunopräzipitations-Experimenten Veränderungen im transkriptionellen Status in Form veränderter Histonmodifikationen und Pol II-Prozessivität untersucht. Parallel erfolgte eine Analyse der mutp53-Bindung über die gesamten genomischen Regionen von Genen, um eine Assoziation von mutp53 an regulierte Gene zu analysieren und Bindestellen zu charakterisieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

##### 2.1.1.1 Bakterienstämme

*E. coli* DH5 $\alpha$

Kompetenter Bakterienstamm, basierend auf dem DH5-Stamm, der 1986 in den Bethesda Research Laboratories entwickelt wurde (Bethesda Research Laboratories, 1986. BRL pUC host: *E. coli* DH5 $\alpha$  competent cells. Focus 8(2):9).

##### 2.1.1.2 Eukaryontische Zellen

U251

Aneuploide Glioblastom-Zelllinie mit der *hotspot-p53*-Mutation Arg273His. Isoliert aus einem primären Glioblastom (RCB 0461, Riken Gene Bank, Tsukuba, Japan).

MDA-MB-468

Aneuploide Mammakarzinom-Zelllinie mit der *hotspot-p53*-Mutation Arg273His. Isoliert aus einem Adenokarzinom (Cailleau et al. 1978).

HT29

Hypertriploide Kolonkarzinom-Zelllinie mit der *hotspot-p53*-Mutation Arg273His. Isoliert aus einem kolorektalen Adenokarzinom (Fogh et al. 1977).

##### 2.1.2 Plasmide

pSuper-p53

shRNA gegen p53 in pSuper (VEC-P53-0001; OligoEngine, Seattle, USA) (Brummelkamp et al. 2002).

pCI-neo

Expressionsvektor für Säugerzellen mit G418-Resistenz als Selektionsmarker (Promega, Mannheim).

pENTR/H1/TO-scr

scr-shRNA in pENTR/H1/TO-Plasmid (Invitrogen, Darmstadt), Klonierung durch Lars Tögel.

pENTR/H1/TO-shp53

p53-shRNA in pENTR/H1/TO-Plasmid (Invitrogen, Darmstadt), Klonierung durch Lars Tögel.

### 2.1.3 siRNA

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
p53 siRNA	GACTCCAGTGGTAATCTACTT ( <i>sense</i> ) GTAGATTACCACTGGAGTCTT ( <i>antisense</i> )
scr siRNA	CGAACTTTTGGACGCGCAC ( <i>sense</i> ) GTGCGCGTCCAAAAGTTCG ( <i>antisense</i> )

### 2.1.4 Oligonukleotide

#### 2.1.4.1 Sequenzierprimer

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
hp53-A1	AGCGTGCTTTCCACGACGGTGAC
hp53-A2	CGGTGACACGCTTCCCTGGATTG
hp53-B1	AACACCAGTGCAGGCCAACTTG TTC
hp53-B2	CAAATGGAAGTCCTGGGTGCTTCTG

#### 2.1.4.2 Primer für die Expressionsanalyse

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
hEGR1-Q1/2	GCACCTGACCGCAGAGTCTT ( <i>forward</i> ) AGTGGTTTGGCTGGGGTAACT ( <i>reverse</i> )
Hs-HPRT1-A/B	TGACACTGGCAAAACAATGCA ( <i>forward</i> ) GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT ( <i>reverse</i> )
qRT-BDKRB1-3/4	TGGGTTTCCTCCTACCACTG ( <i>forward</i> ) CTTGTCTGCTGACCTCCTC ( <i>reverse</i> )
qRT-CEBPA-1/2	ACCCTCAGCCTTGTTTGTACTGTAT ( <i>forward</i> ) GGACTGATCGTGCTTCGTGTT ( <i>reverse</i> )
qRT-CPA4-1/2	AGGTGGATACTGTTTCATTGGGG ( <i>forward</i> ) CTGATCTCGTCTCCATTTCTGAC ( <i>reverse</i> )
qRT-EBI3-3/4	TGGCCCTTCCCAGAGATCT ( <i>forward</i> ) CAGCTCCCTGACGCTTGTAAC ( <i>reverse</i> )
qRT-GAS1-1/2	CGCGCATGGATTTATGAAGA ( <i>forward</i> ) CGGAGCCGGTGGAAAAGT ( <i>reverse</i> )

qRT-GCNT3-1/2	CAGTTCCCACTGAGCAAAGAA ( <i>forward</i> ) GAGGGGCATACACAGCTCG ( <i>reverse</i> )
qRT-HAS2-1/2	ATGCACTGAACACACCCAAA ( <i>forward</i> ) AAGATCCCATGGTTGGAGGT ( <i>reverse</i> )
qRT-hGAPDH-1/2	ATGGGGAAGGTGAAGGTCG ( <i>forward</i> ) GGGGTCATTGATGGCAACAATA ( <i>reverse</i> )
qRT-HTR2A-1/2	TTGCCATAGCTGATATGCTGC ( <i>forward</i> ) CAGGTAAATCCAGACTGCACAAA ( <i>reverse</i> )
qRT-LZTS1-1/2	AAATGGGCAAGAGCGAAGACT ( <i>forward</i> ) GTGCCGTGTAATCTGGGTGA ( <i>reverse</i> )
qRT-MVD-1/2	CTCCTCCCTGAGCGTCACT ( <i>forward</i> ) CCGGCCATTCAGCCAAATC ( <i>reverse</i> )
qRT-PMEPA1-1/2	TAGCGGAGCTGGAGTTTGTT ( <i>forward</i> ) GACCGTGCAGACAGCTTGTA ( <i>reverse</i> )
qRT-RAB39B-1/2	GAGGCCATCTGGCTGTACC ( <i>forward</i> ) GGTGGGGTCAGAAACCTGG ( <i>reverse</i> )
TP53_Q1/2	CCGCAGTCAGATCCTAGCG ( <i>forward</i> ) AATCATCCATTGCTTGGGACG ( <i>reverse</i> )

### 2.1.4.3 ChIP-Primer

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz (5' - 3')</u>
ChIP-GAS1-7/8	CTCCGGGGAGCTCTTTCC ( <i>forward</i> ) AGCGCCGACTTTCTTGTCT ( <i>reverse</i> )
ChIP-GAS1-13/14	CATCTGTGCTTTCGACTGGA ( <i>forward</i> ) TGTGGTGATCAAGACCCAAA ( <i>reverse</i> )
ChIP-HTR2A-3/4	CTCCTGGCTGTTGCTACCTT ( <i>forward</i> ) TTCCACGGGAATGGAGTAG ( <i>reverse</i> )
ChIP-HTR2A-5/6	TACTCCATTCCCGTGGAAAC ( <i>forward</i> ) CCTCAGCAGGCACACATTA ( <i>reverse</i> )

## 2.1.5 Molekulargewichtstandards

DNA-Standards	Gene Ruler 100bp DNA Ladder, #SM0311; Gene Ruler 1kb DNA Ladder, #SM0241; MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Protein-Standards	SDS-7B Prestained SDS Molecular Weight Marker, #MWM-105A; Sigma-Aldrich, Steinheim Spectra Multicolour Broad Range Protein Ladder, #SM1849; MBI Fermentas, St. Leon-Rot

## 2.1.6 Enzyme

Benzonase	Merck, Darmstadt
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Proteinase K, PCR Grade	Roche, Mannheim
RNase A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin (1:250)	Biochrom, Berlin

## 2.1.7 Antikörper

### 2.1.7.1 Primärantikörper

GFAP	Ziege anti GFAP (C-19); polyklonal (sc-6170; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
H3K4Me3	Kaninchen anti Histone H3 trimethyl Lys4; polyklonal; ChIP Grade (#39159; Active Motif, Carlsbad, USA)
H3K9Ac	Kaninchen anti Acetyl-Histone H3; polyklonal; ChIP Grade (#07-352; Millipore, Billerica, USA)
HSC70	Ziege anti HSC 70 (K-19); polyklonal (sc-1059; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
IgG	Negativ Kontrolle; Kaninchen Immunglobulin Fraktion (#X0936; Dako; Glostrup, Dänemark)
Nestin	Maus anti Nestin (10c2); monoklonal (sc-23927; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
p300	Maus anti p300 CT (clone RW128); monoklonal (#05-257; Millipore, Billerica, USA)

p53	Kaninchen anti p53 (FL-393); polyklonal (sc-6243; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) Ziege anti p53 (FL-393-G); polyklonal (sc-6243; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
Pol II S2P	Kaninchen anti RNA polymerase II CTD repeat YSPTSPS (phospho S2); polyklonal; CHIP Grade (ab5095; Abcam, Cambridge, UK)
Pol II S5P	Kaninchen anti RNA polymerase II CTD repeat YSPTSPS (phospho S5); polyklonal; CHIP Grade (ab5131; Abcam, Cambridge, UK)
Pol II	Kaninchen anti RNA polymerase II (N-20); polyklonal; CHIP Grade (sc-899x; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
SP1	Kaninchen anti SP1; polyklonal (#07-645; Millipore, Billerica, USA)
Tubulin	Ratte anti Tubulin (YL1/2); monoklonal (sc-53029; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
Vimentin	Ziege anti Vimentin (C-20); polyklonal (sc-7557; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)

### 2.1.7.2 Sekundärantikörper, enzymgekoppelt

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

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

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

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

### 2.1.7.3 Sekundärantikörper, fluoreszenzmarkiert

Esel anti Maus IgG (H+L), konjugiert mit Alexa-568 (#A-21202; Invitrogen, Darmstadt)

Esel anti Ziege IgG (H+L), konjugiert mit Alexa-488 (#A-11057; Invitrogen, Darmstadt)

Esel anti Ziege IgG (H+L), konjugiert mit Alexa-568 (#A-11055; Invitrogen, Darmstadt)

### 2.1.8 Chemikalien und Reagenzien

Die handelsüblichen Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Steinheim), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Fluka (Neu-Ulm), Invitrogen (Darmstadt) und Roche (Mannheim) bezogen (Qualitätsstufe „p.a.“, „Für die Molekularbiologie“ oder „*cell culture grade*“). Darüber hinaus wurden folgende Chemikalien und Reagenzien eingesetzt:

30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid-Lösung	National Diagnostics, Atlanta, USA
Actinomycin D	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agar (A9915)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin	USB, Cleveland, USA
APS	Merck, Darmstadt
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA , Fraktion V	Roche, Mannheim
DAPI	Sigma-Aldrich, Steinheim
DEPC	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO	Merck, Darmstadt
dNTP-Mix (jeweils 100 mM)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DTT	Serva, Heidelberg
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
EGTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
FCS	PAA Laboratories, Pasching, A
Formaldehyd, mind. 37 %	Merck, Darmstadt
Geneticin-Sulphat (G418)	PAA Laboratories, Pasching, A
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin	Serva, Heidelberg
Glykogen	Roche, Mannheim
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Serva, Heidelberg
Leupeptin	Biomol, Hamburg
Magermilchpulver	Neuform, Lüneburg
MOPS 3-(N-morpholino)propansulfonsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mowiol 4-88	Calbiochem, Schwalbach
Natrium-Desoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim
N-Lauroylsarcosin	Sigma-Aldrich, Steinheim



Nonidet P40 (NP-40)	Fluka, Neu-Ulm
Oligofectamine	Invitrogen, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pefablock SC	Biomol, Hamburg
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Biomol, Hamburg
Power SYBR Green PCR Master Mix 2x	Applied Biosystems, Darmstadt
SDS	Serva, Heidelberg
SeaKem Agarose	Lonza, Basel, CH
Sucrose	Sigma-Aldrich, Steinheim
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trasyolol	Bayer HealthCare, Montville, USA
TriFast Reagenz	Peqlab, Erlangen
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trizma Base (Tris Base)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20	Fluka, Neu-Ulm
Zeocin	Invitrogen, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 2.1.9 Allgemeine Puffer und Lösungen

<b>1x SDS-Laufpuffer</b>	25 mM Tris Base; 200 mM Glycin pH 8,3; 0,1 % (w/v) SDS
<b>1x SDS-Probenpuffer</b>	10 % (v/v) Glycerol; 2 % (w/v) SDS; 50 mM Tris/HCl pH 6,8; 100 mM DTT; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
<b>2x SDS-Lysepuffer</b>	20 % Glycerol; 4 % SDS; 100 mM Tris/HCl pH 6,8
<b>4x Tris/SDS pH 6,8</b>	0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 0,4% (w/v) SDS
<b>4x Tris/SDS pH 8,8</b>	1,5 M Tris-HCl pH 8,8; 0,4% (w/v) SDS
<b>6x SDS-Probenpuffer</b>	60 % (v/v) Glycerol; 12 % (w/v) SDS; 300 mM Tris/HCl pH 6,8; 600 mM DTT; 0,6 % (w/v) Bromphenolblau
<b>Ampicillin Stammlösung</b>	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O

---

<b>ChIP CaCl<sub>2</sub>-Lösung</b>	300 mM CaCl <sub>2</sub> ; 10mM Tris pH 8.0
<b>ChIP Elutionspuffer</b>	50 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA; 1% (w/v) SDS
<b>ChIP Lysepuffer 1</b>	50 mM HEPES-KOH, pH 7,5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10 % (v/v) Glycerol; 0,5 % NP-40; 0,25 % Triton X-100; frisch versetzt mit 10 µg/ml Leupeptin; 0,1 mM Pefablock; 10 µg/ml Pepstatin A; 1% (v/v) Trasylol
<b>ChIP Lysepuffer 2</b>	10 mM Tris-HCl, pH 8; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; frisch versetzt mit 10 µg/ml Leupeptin; 0,1 mM Pefablock; 10 µg/ml Pepstatin A; 1% (v/v) Trasylol
<b>ChIP SDS-Lysepuffer</b>	50 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA; 1 % (w/v) SDS
<b>ChIP Verdünnungspuffer</b>	20 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1 % (v/v) Triton X-100
<b>ChIP Waschpuffer 1</b>	10 mM Tris-HCl, pH 8; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; 0,1 % (w/v) Natrium-Desoxycholat; 0,5 % (w/v) N-Lauroylsarcosin; 1% (v/v) Triton X-100
<b>ChIP Waschpuffer 2</b>	10 mM Tris-HCl, pH 8; 500 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,5 mM EGTA; 0,1 % (w/v) Natrium-Desoxycholat; 0,5 % (w/v) N-Lauroylsarcosin; 1% (v/v) Triton X-100
<b>DAPI Stammlösung</b>	1mg/ml in H <sub>2</sub> O
<b>DEPC-H<sub>2</sub>O</b>	0,1 % (v/v) DEPC in H <sub>2</sub> O über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, autoklaviert
<b>DNA-Extraktionspuffer</b>	10mM Tris-HCl pH8; 0,01mM EDTA; 0,5 % (w/v) SDS; 200 µg/ml Proteinase K
<b>Ethidiumbromid Stammlsg.</b>	10 mg/ml Ethidiumbromid in H <sub>2</sub> O
<b>G418 Stammlösung</b>	50mg/ml in PBS
<b>Kanamycin Stammlösung</b>	50mg/ml in H <sub>2</sub> O
<b>Ko-IP Elutionspuffer</b>	50 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA; 1% (w/v) SDS
<b>Ko-IP Lysepuffer</b>	50 mM HEPES-KOH pH 7,5; 300 mM NaCl; 0,5 % (v/v) NP-40; frisch versetzt mit 10 µg/ml Leupeptin; 0,1 mM Pefablock; 10 µg/ml Pepstatin A; 1% (v/v) Trasylol
<b>Ko-IP Nuklei-Puffer</b>	10 mM Tris-HCl pH 7,9; 10 mM KCl; 15 mM MgCl <sub>2</sub> ; frisch versetzt mit 10 µg/ml Leupeptin; 0,1 mM Pefablock; 10 µg/ml Pepstatin A; 1% (v/v) Trasylol

<b>Ko-IP Verdünnungspuffer</b>	50 mM HEPES-KOH pH 7,5; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5 % (v/v) NP-40; frisch versetzt mit 10 µg/ml Leupeptin; 0,1 mM Pefablock; 10 µg/ml Pepstatin A; 1% (v/v) Trasylol
<b>Leupeptin Stammlösung</b>	10 mg Leupeptin in 1 ml H <sub>2</sub> O; Lagerung bei -20°C
<b>Nuklei-Extraktionspuffer</b>	50 mM HEPES-KOH, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% (v/v) NP-40; frisch versetzt mit 10 µg/ml Leupeptin; 0,1 mM Pefablock; 10 µg/ml Pepstatin A; 1% (v/v) Trasylol
<b>Nuklei-Puffer 1</b>	0,3 M Sucrose in 60mM KCl; 15mM NaCl; 5mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,1mM EGTA; 15 mM Tris-HCl, pH 7,5; frisch versetzt mit 0,5 mM DTT; 10 µg/ml Leupeptin; 0,1 mM Pefablock; 10 µg/ml Pepstatin A; 1% (v/v) Trasylol
<b>Nuklei-Puffer 2</b>	0,3 M Sucrose in 60mM KCl; 15mM NaCl; 5mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,1mM EGTA; 0,4 % (v/v) NP-40; 15 mM Tris-HCl, pH 7,5; frisch versetzt mit 0,5 mM DTT; 10 µg/ml Leupeptin; 0,1 mM Pefablock; 10 µg/ml Pepstatin A; 1% (v/v) Trasylol
<b>Nuklei-Puffer 3</b>	1,2 M Sucrose in 60mM KCl; 15mM NaCl; 5mM MgCl <sub>2</sub> ; 0,1mM EGTA; 15 mM Tris-HCl, pH 7,5; frisch versetzt mit 0,5 mM DTT; 10 µg/ml Leupeptin; 0,1 mM Pefablock; 10 µg/ml Pepstatin A; 1% (v/v) Trasylol
<b>PBS</b>	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
<b>PBS 10x</b>	1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4
<b>Pefablock Stammlösung</b>	10 mM Pefablock in 50 % Glycerol; Lagerung bei -20°C
<b>Pepstatin A Stammlösung</b>	1 mg Pepstatin A in 1 ml Ethanol; Lagerung bei -20°C
<b>RIPA-Puffer</b>	50 mM HEPES-KOH, pH 7,5; 500 mM LiCl; 1 mM EDTA; 1 % (v/v) NP-40; 0,7 % Natrium-Desoxycholat
<b>TAE 50x</b>	2 M Tris-HCl pH 8,0; 1 M Eisessig; 50 mM EDTA
<b>TBS 10x</b>	1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl pH 7.4
<b>TBST</b>	1x TBS mit 0,1 (v/v)% Tween 20
<b>TE-Puffer</b>	10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA
<b>Transferpuffer 1</b>	192 mM Glycin; 50 mM Tris pH 8,3

<b>Transferpuffer 2</b>	20 mM Tris-Essigsäure pH 8,3; 0,1 % (w/v) SDS; 20 % (v/v) Isopropanol
<b>Transformationspuffer 1</b>	100 mM RbCl; 50 mM MnCl <sub>2</sub> ; 10 mM CaCl <sub>2</sub> ; 30 mM KAcetat; 15 % (w/v) Glycerol; pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure eingestellt
<b>Transformationspuffer 2</b>	10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl <sub>2</sub> ; 15 % (w/v) Glycerol; pH 7,0 mit 1 N NaOH eingestellt
<b>Trypsin/EDTA</b>	400 ml Trypsin 2,5 %; 10 ml EDTA 0,5 M; 1 l PBS 10x; auf 10 l aufgefüllt mit H <sub>2</sub> O steril filtriert, bei -20 °C gelagert
<b>Zeocin Stammlösung</b>	100mg/ml in PBS

### 2.1.10 Nährmedien

<b>DMEM, High Glucose</b>	PAA Laboratories, Pasching, A
<b>Einfrriermedium</b>	50% FCS; 40% DMEM; 10% DMSO; Lagerung bei -20°C
<b>LB-Agar</b>	1,5 % (w/v) Bacto-Agar in LB-Medium, autoklaviert
<b>LB-Medium</b>	10 g Bacto-Trypton; 5 g Bacto-Hefeextrakt; 10 g NaCl; in 1 l H <sub>2</sub> O; pH 7,5: autoklaviert
<b>Opti-MEM I</b>	ReducedSerumMedium; Invitrogen, Darmstadt

### 2.1.11 Kits

BCA Protein Assay Reagenzien	Thermo Scientific, Waltham, USA
Cell Line Nucleofector Kit V	Lonza, Basel, CH
GenomePlex Complete Whole Genome Amplification (WGA) Kit	Sigma-Aldrich, Steinheim
GFX Micro Plasmid Prep Kit	GE Healthcare Europe, Freiburg
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
NucleoBond Extract II Kit	Macherey&Nagel, Düren
NucleoBond PC500 Kit	Macherey&Nagel, Düren
RNase-Free DNase Set	QIAGEN, Hilden
RNeasy MiniElute	QIAGEN, Hilden

SuperSignal West Dura Extended Duration

Substrate Thermo Scientific, Waltham, USA

### 2.1.12 Verbrauchsmaterialien

44k Whole Human Genome Microarray	Source BioScience imaGenes, Berlin
Bakterienkulturschalen	Nunc, Wiesbaden
Deckgläschen Ø 12mm	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Dynabeads Protein A	Invitrogen, Darmstadt
Filterpapier Whatman 3 mm	Schleicher und Schüll, Dassel
Gradientengele 4-20 % Ready Gel Precast Gel	Biorad, München
Handschuhe Safeskin (Nitril und Latex)	Kimberly Clark, Zaventem, Belgien
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt
MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Darmstadt
NimbleGen 12 x 135k Custom Microarray	Source BioScience imaGenes, Berlin
Nitrozellulosemembran Hybond-C Super	GE Healthcare Europe, Freiburg
Objektträger 76 x 26 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm "M"	American National Can, Greenwich, USA
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biozym, Oldendorf
PVDF-Membran Immobilon-P	Millipore, Billerica, USA
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Röntgenfilme RP New, blau	CEA, Hamburg
Zellkulturschalen	Nunc, Wiesbaden

### 2.1.13 Geräte

Agarosegelapparaturen	Horizon 58; 11-14; 20-25; Gibco/BRL, Invitrogen, Darmstadt
Agarosegeldokumentation	BioDoc Analyze UV-Transilluminator; Biometra, Göttingen
Analysenwaagen	PM 460; PB 3001; XP 205DR; Mettler-Toledo, Gießen

Brutschrank, (Bakterien)	T5042 E; Heraeus, Hanau
Elektroporationsapparatur	Nucleofector I; Amaxa, Köln
Filmentwickler	Classic E.O.S.; AGFA, Köln
Filmkassette	X-OMAT; Kodak, USA
Fluoreszenzmikroskope	DMI 6000B mit DFC350 FX Kamera; Leica, Wetzlar  Axiovert 200 mit LSM 510 META Konfokal-scanner; Zeiss, Jena
Heizblock	Techne Dri-Block DB 2; Bibby Scientific, Burlington, USA
Horizontalschüttler	Polymax 2040; Heidolph, Schwabach
Inkubator (Zellen)	HeraCell 150; Heraeus, Hanau
Laborwasseranlage	Milli-Q Reagent Water System; Millipore, Billerica, USA
Magnetrührer	MR3001; Heidolph, Schwabach
PCR-Maschine	PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Massachussets, USA
Phasenkontrastmikroskope	IMT-2 (ULWCD 0,30); Olympus, Hamburg Axiovert 25; Zeiss, Jena
pH-Meter	SevenEasy; Mettler-Toledo, Gießen
Photometer	DU 800; Beckmann Coulter, Krefeld NanoDrop ND1000; Thermo Scientific, Wilmington, USA
Pipetten	20 µl, 200 µl, 1000 µl Gilson; Middleton, USA 2,5 µl Eppendorf Research; Eppendorf, Hamburg
Proteingel Elektrophoreseapparatur	Mighty Small II; Hoefer, San Francisco, USA
Proteingel Gießapparatur	Mighty Small Multiple Gel Caster SE 200 Series Hoefer, San Francisco, USA
Real-Time PCR Systeme	7500 Fast Real-Time PCR System; 7900HT Fast Real-Time PCR System; Applied Biosystems, Darmstadt

Rollenschüttler	RollerMixer SRT1; Stuart Scientific, Watford, UK
Schüttelheizblock	Thermomixer comfort; Eppendorf, Hamburg
Schüttelinkubator (Bakterien)	Multitron; Infors HAT, Basel, CH
Spannungsquellen	EPS 2A 200; Hoefer, San Francisco, USA PowerPAC 300; Biorad, München
Sterilwerkbank	Hera safe; Heraeus, Hanau
Tankblotapparatur	Mini Trans-Blot Cell; Biorad, München
Ultraschallgerät (Sonifikator)	Bioruptor UCD-200; Diagenode, Liège, B
Vortexmixer	Reax 2000; Heidolph, Schwabach
Wasserbad	GFL; Haake, Karlsruhe
Zentrifugen	Biofuge pico; Heraeus, Hanau Centrifuge 5415C; Eppendorf, Hamburg Centrifuge 5415D; Eppendorf, Hamburg Centrifuge 5810 R; Eppendorf, Hamburg GS-6R; Beckmann Coulter, Krefeld Rotana 96R; Hettich, Tuttlingen Sorvall RC 5C Plus; Thermo Scientific, Waltham, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Arbeiten mit prokaryontischen Zellen

Plasmide lassen sich in Bakterien vervielfältigen. Dazu wird das Plasmid durch Transformation in Bakterien eingebracht und Bakterien, die es tragen, werden durch eine Antibiotikaresistenz auf dem Plasmid selektioniert. So können Plasmide mit DNA-Sequenzen, die in eukaryontische Zellen eingebracht werden sollen, in großem Maßstab präpariert werden.

#### 2.2.1.1 Bakterienkulturen

Die Aufzucht von Bakterien erfolgte in Flüssigkulturen mit LB-Medium bei 37 °C und 200 rpm in einem Schüttelinkubator und auf LB-Agar Platten bei 37 °C im Brutschrank. Das LB-Medium bzw. der LB-Agar wurde frisch hergestellt und 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Vor der Verwendung wurden die entsprechenden Selektionsantibiotika zugegeben. Ampicillin wurde mit einer finalen Konzentration von 100 µg/ml und Kanamycin mit einer finalen Konzentration von 50 µg/ml verwendet.

Zur Herstellung von Agar-Platten wurde der LB-Agar nach dem Autoklavieren auf ca. 45 °C abgekühlt, die Selektionsantibiotika wurden zugegeben und es wurden ca. 12 ml des Ansatzes in eine Bakterienkulturschale mit 10 cm Durchmesser gegossen und bei Raumtemperatur zum Erstarren stehen gelassen. Die fertigen LB-Agarplatten wurden bei 4 °C kopfüber gelagert.

#### 2.2.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien

*E. Coli* Zellen eines Leerstammes wurden auf einer Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie gepickt und es wurde eine Flüssigkultur (5 ml LB-Medium) über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurde am nächsten Tag eine größere Flüssigkultur angesetzt (50-150 ml LB-Medium) und so lange inkubiert, bis eine optische Dichte (OD600) von 0,5 erreicht war. Die Bakterienzellen wurden dann sofort für 10 Minuten bei 3000 rpm abzentrifugiert (SS34-Rotor, Sorvall). Das Pellet wurde vorsichtig in 30 ml Transformationspuffer 1 resuspendiert und 30-60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen vorsichtig in 5 ml Transformationspuffer 2 resuspendiert und 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Von dieser Suspension wurden 200 µl Aliquots in



vorgekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aliquots der kompetenten Zellen wurden dann bei -80 °C gelagert.

### **2.2.1.3 Transformation von Bakterien**

Kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und 50 µl Bakterien wurden mit 100 ng Plasmid-DNA gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis, während der sich die DNA an die Bakterienmembran anlagert, wurden die Zellen für 45 s einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt und danach wieder für 2 min auf Eis inkubiert. Schließlich wurden 800 µl LB-Medium (ohne Antibiotika) zugefügt und diese Vorkultur für 1 h bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion von Einzelklonen auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Von den Agar-Platten wurden am folgenden Tag Klone gepickt und Flüssigkulturen für Plasmid-Präparationen angeimpft.

### **2.2.1.4 Dauerkulturen von Bakterien**

Die Langzeitaufbewahrung von Bakterienkulturen erfolgte bei -80°C als Glycerin-Dauerkultur. Dafür wurde von den Flüssigkulturen ein Aliquot abgenommen, mit 15 % Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

## **2.2.2 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen**

Alle Arbeiten, die eine weitere Kultivierung von Zellen erfordern, erfolgten in einer Sterilwerkbank mit sterilen Lösungen, Pipetten und steriler Plastikware.

### **2.2.2.1 Kultivierung und Passagieren von Zellen**

Die verwendeten Zellen wachsen adhärent und wurden in beschichteten Zellkulturschalen in DMEM mit 10 % (v/ v) FCS (*fetal calf serum*) im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Die Passage der Zellen erfolgte alle drei bis vier Tage, sobald die Zellen eine Konfluenz von 80-90 % erreichten. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit warmem PBS gewaschen und nach Zugabe von

1 ml warmem Trypsin/EDTA für 3 min bei 37 °C inkubiert. Trypsin löst die Zellen durch Spaltung der extrazellulären Matrix-Proteine von der Zellkulturschale ab. Die Trypsin-Aktivität wurde durch Zugabe von 9 ml warmem DMEM/10 % FCS gestoppt und die Zellen wurden in einer 1:8 bis 1:12 Verdünnung auf neue Zellkulturschalen ausgebracht.

#### **2.2.2.2 Zellzahlbestimmung und Vitalitätsbestimmung**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch in einer Neubauer Zählkammer, indem die Zellsuspension 1+1 mit Trypanblau (0,8 % (v/v) in PBS) versetzt wurde. Lebende Zellen sind in der Lage, Trypanblau aktiv auszuschleiden, während tote oder geschädigte Zellen dies nicht mehr vermögen und blau angefärbt werden. Um ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten, wurden vier Großquadrate ausgezählt. Für die Bestimmung der Zellzahl gilt die Formel:

$$N = (g/Q) \times 2 \times 10^4$$

N = Zellzahl/ml; g = gezählte Zellen; Q = ausgezählte Großquadrate

#### **2.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zum Einfrieren wurden die abgelösten Zellen bei 300 x g für 5 min bei 4 °C sedimentiert, in 1,5 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden anschließend in einer Styroporbox über Nacht in einen -80 °C Tiefkühlschrank eingefroren. Zur längeren Lagerung wurden die Kryoröhrchen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Kryoröhrchen erfolgte schnell in einem 37 °C warmen Wasserbad. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur bei 300 x g abzentrifugiert, in 10 ml DMEM/10 % FCS resuspendiert und ausplattiert.

#### **2.2.2.4 Transfektion von Zellen**

Unter Transfektion wird das Einbringen von Fremd-DNA/RNA in eine Eukaryontenzelle verstanden. Ziel ist eine Expression eingebrachter Gene oder eine Modulation vorhandener Gene durch RNA-Interferenz (RNAi, s.u.). Es gibt verschiedene Techniken, um die Zellmembran zu durchdringen und eukaryontische Zellen zu transfizieren. Gängige Methoden sind die Elektroporation oder die Verwendung kationischer Liposomen. Bei transienten

Transfektionen verlieren die Zellen die Fremd-DNA nach mehreren Tagen der Kultivierung wieder.

#### 2.2.2.5 Transfektion von siRNAs

RNA Interferenz (RNAi) beschreibt einen sequenzspezifischen RNA-Degradationsprozess, der die Expression spezifischer Proteine verhindert (Agrawal et al. 2003). Die *short interfering* (si) RNAs mit einer Länge von 21-22 Nukleotiden vermitteln die RNAi. Die siRNAs werden auf den *RNA-induced silencing complex* (RISC) übertragen, der die Degradation von mRNAs mit komplementären Sequenzen bewirkt und somit die Expression des zugehörigen Proteins reduziert. Für die transiente Transfektion von siRNAs in U251 Zellen wurde das Oligofectamine-Reagenz verwendet.

Zellen wurden in 6-wells oder 10 cm Zellkulturschalen transfiziert. Die Zellen wurden am Vortag der Transfektion in einer Dichte von  $0,5 \times 10^5$  Zellen pro 6-wells bzw.  $2,95 \times 10^5$  pro 10 cm Schale ausgesät. Für ein 6-well wurden 10  $\mu$ l 20  $\mu$ M siRNA-Duplex mit 175  $\mu$ l OptiMEM mit einer Pipette gemischt, für eine 10 cm Schale wurden 60  $\mu$ l 20  $\mu$ M siRNA-Duplex mit 1050  $\mu$ l OptiMEM Medium gemischt. Als Kontrolle wurde eine Probe mit Wasser statt siRNA mitgeführt (mock). In einem anderen Reaktionsgefäß wurden 1  $\mu$ l bzw. 6  $\mu$ l OptiMEM mit 4  $\mu$ l bzw. 24  $\mu$ l Oligofectamine per Pipette gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Oligofectamine-Verdünnung mit einer Pipette mit der siRNA-Verdünnung gemischt und das Gemisch für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen einmal mit warmem PBS gewaschen und 1,3 ml bzw. 7,67ml DMEM/10 % FCS pro 6-well bzw. 10 cm Schale zugegeben. 200  $\mu$ l bzw. 1200  $\mu$ l des Transfektionsansatzes wurden mit einer Pipette zugetroffen, die Zellkulturschalen leicht geschwenkt und die Zellen für 48 h zurück in den Inkubator gestellt. Nach 48 h wurden entweder Ganzzelllysate hergestellt und RNA isoliert oder die Zellen wurden für spätere Zeitpunkte 1:2 oder 1:4 passagiert.

#### 2.2.2.6 Stabile Transfektion mit shRNA-Expressionsplasmiden

Um eine stabile Reduktion der p53-Expression in U251 Zellen zu erhalten, wurden die Zellen mit einem shRNA-Expressionsplasmid mit einer shRNA spezifisch für p53 transfiziert. Anschließend wurden Klone, die das Plasmid in ihr Genom integriert haben und die shRNA stabil exprimieren, mit Hilfe von Antibiotika selektioniert. Als Kontrolle für unspezifische

Effekte wurden U251 Zellen mit einem Expressionsplasmid für eine Kontroll-shRNA (*scrambled; scr*) transfiziert. Die Transfektion erfolgte mittels Elektroporation mit dem Cell Line Nucleofector Kit V der Firma Lonza.

U251 Zellen wurden von ~80 % konfluenten Zellkulturschalen mit Trypsin abgelöst. Pro Transfektion wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur und 300 x g für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand wurde möglichst vollständig abgesaugt. Das Zellpellet wurde bei Raumtemperatur in 100 µl mit Supplement 1 versetzter Nucleofektor-Lösung aus dem Nucleofector Kit resuspendiert. Die Zellsuspension wurde entweder mit den Plasmiden 1,8 µg pSuper-p53 (p53-shRNA) und 0,2 µg pCI-neo (Resistenz gegen das Antibiotikum G418) oder mit 2 µg pENTR/H1-p53 (p53-shRNA und Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin) bzw. pENTR/H1-scr (scr-shRNA und Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin) versetzt, durch Pipettieren gemischt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Zellen wurden dann mit dem Programm U20 elektroporiert und unmittelbar danach in 500 µl Kulturmedium aufgenommen und auf 10 cm Kulturschalen ausplattiert. 48 h nach Transfektion wurde das Medium gewechselt und mit 0,4 mg/ml G418 Sulfat oder 100 µg/ml Zeocin versetzt. G418- und Zeocin-resistente Klone wurden mit Klonierungsringen abgenommen und weiter kultiviert.

#### **2.2.2.7 Behandlung von Zellen mit Actinomycin D**

Actinomycin D (ActD) bindet stabil an doppelsträngige DNA und verhindert eine Trennung der DNA-Stränge und somit die Transkription. Durch Behandlung von Zellen mit ActD lässt sich die Stabilität von Transkripten in der Zelle untersuchen, da keine Transkripte mehr nachgeliefert werden. U251 Zellen wurden über einen Zeitraum von 6 h mit 1 µg/ml ActD inkubiert. Dazu wurde das Kulturmedium abgenommen, durch Medium mit ActD ersetzt und die Zellen weiter inkubiert.

#### **2.2.2.8 Immunfluoreszenzfärbung**

##### **2.2.2.8.1 Acetonfixierung**

Für Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Zellen auf Glasdeckgläschen bis zu einer Konfluenz von ~80 % kultiviert. Die Deckgläschen mit den Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und zur Fixierung für mind. 1 h in einem Bad mit Aceton bei -20 °C inkubiert. Vor der Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen für 15 min in PBS bei

Raumtemperatur rehydriert und zweimal für 5 min unter Schwenken mit PBS gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Bindestellen durch 30 min Inkubation in 0,5 % (w/v) BSA in PBS pH 7,4 bei Raumtemperatur abgesättigt. Dann wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach oben in eine mit angefeuchtetem Filterpapier ausgelegte Plastikkammer überführt. 100 µl Primärantikörper-Verdünnung (1:200) in 0,5 % BSA in PBS pH 7,4 wurden auf die Zellen pipettiert und die Zellen für 1 h bei Raumtemperatur in der verschlossenen, abgedunkelten Feuchtekammer inkubiert. Für Doppelfärbungen wurden beide Primärantikörper gemischt. Nach der Färbung mit dem Primärantikörper wurden die Zellen bei Raumtemperatur dreimal mit 0,5 % BSA in PBS pH 7,4 für 5 min unter Schwenken gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit 100µl einer 1:400 Verdünnung der fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper für mind. 30 min analog zur Inkubation mit dem Primärantikörper. Bei Doppelfärbungen wurden die entsprechenden Sekundärantikörper gemischt. Zur Färbung der Zellkerne wurde der Sekundärantikörperverdünnung der DNA-Farbstoff DAPI in einer Konzentration von 0,2 µg/ml zugesetzt. Anschließend wurde erneut gewaschen, die Deckgläschen wurden auf einem Objektträger mit Mowiol eingebettet und über Nacht bei 4 °C im Dunkeln getrocknet. Die Aufnahme von Immunfluoreszenzbildern erfolgte an einem Leica DMI 6000B Fluoreszenzmikroskop mit einer DFC350 FX Kamera.

#### **2.2.2.8.2 Fixierung mit Paraformaldehyd**

Für eine Fixierung mit Paraformaldehyd wurden Deckgläschen mit Zellen einmal mit PBS gewaschen und in einer 6-well Platte in 700 µl 4% PFA (w/v) in PBS pH 7,4 pro well für 10 min unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte eine Permeabilisierung mit 1% (v/v) Triton X-100 in PBS für 10 min bei Raumtemperatur. Sollte die lösliche Fraktion der Zellen extrahiert werden, erfolgte vor der Fixierung eine Inkubation in 1% Triton X-100 in PBS für 10 min. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden unspezifische Bindestellen durch Inkubation in 0,5 % (w/v) BSA in PBS pH 7,4 für 30 min bei Raumtemperatur abgesättigt. Die Färbung mit Primär- und Sekundärantikörpern erfolgte wie für die Acetonfixierung beschrieben.

Bilder wurden an einem Zeiss Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop mit einem LSM 510 META Konfokalscanner aufgenommen. Eine digitale Konvolution erfolgte mit der Huygens Essential Software (Version 2.7.2p0; Scientific Volume Imaging B.V., Hilversum, NL) und die weitere Bearbeitung und Messung von Ko-Lokalisation wurde mit der Imaris Software (Version 4.1.3, Bitplane AG, Zürich, CH) durchgeführt.

### **2.2.2.9 Präparation von Nuklei**

Für Untersuchungen von Vorgängen im Zellkern ist es möglich, die Bestandteile des Zytoplasmas abzutrennen und nur mit der nukleären Zellfraktion zu arbeiten. Dies erfolgt durch eine milde Lyse, bei der die Zellmembran aufgelöst wird, die Kernmembran hingegen intakt bleibt. In der vorliegenden Arbeit wurden Kerne für ChIP-Experimente präpariert.

Die Zellen von 3-5 15 cm Kulturschalen wurden bei einer Konfluenz von ~80 % mit Trypsin abgelöst, in DMEM mit 10 % FCS aufgenommen, in einem 50 ml Falcon-Röhrchen vereinigt und bei 300 x g und 4 °C für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit kaltem PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 2 ml kaltem Nuklei-Puffer 1 mit Proteaseinhibitoren aufgenommen. Dann wurden 2 ml kalter Nuklei-Puffer 2 mit Proteaseinhibitoren zugefügt und die Zellen wurden nach Mischen für 10 min auf Eis inkubiert. In der Zwischenzeit wurden zwei 15 ml Falcon-Röhrchen mit je 8 ml kaltem Nuklei-Puffer 3 mit Proteaseinhibitoren vorbereitet. Je 2 ml des Zelllysates wurden in die 15 ml Falcon-Röhrchen vorsichtig auf den Nuklei-Puffer 3 geschichtet und dann für 20 min mit 10000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde nach und nach vorsichtig und vollständig mit einer Pasteur-Pipette abgenommen und das Pellet wurde einmal in kaltem PBS gewaschen. Die so präparierten Nuklei können für nachfolgende Analysen eingesetzt werden.

#### **2.2.2.9.1 Extraktion von Nuklei**

Für ChIP-Experimente wurden präparierte Nuklei extrahiert, um lösliche Proteine zu entfernen und lediglich die Chromatin-gebundene Fraktion zu erhalten. Präparierte Zellkerne wurden in 1 ml kaltem Nuklei-Extraktionspuffer resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde mehrmals durch leichtes Schütteln gemischt. Anschließend wurde die unlösliche Fraktion durch Zentrifugation bei 20000 x g und 4 °C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Pellet wurde für ChIP-Experimente mit Formaldehyd vernetzt und anhand des ChIP-Protokolls weiter aufgearbeitet (vgl. 2.2.3.10).

## 2.2.3 Nukleinsäureanalytische Methoden

### 2.2.3.1 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

#### 2.2.3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA (Mini- und Maxipräparation)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden 4 ml (Mini-Präparation) bzw. 300 ml (Maxi-Präparation) LB-Flüssigkulturen mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und mit transformierten Bakterien angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bzw. für 6-8 h im Schüttelinkubator bei 37 °C.

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab wurde das GFX Micro Plasmid Prep Kit der Firma Amersham Biosciences verwendet, für die Gewinnung im großen Maßstab das NucleoBond PC500 Kit der Firma Macherey&Nagel. Die Aufarbeitung der Bakterienkulturen zur DNA-Isolation erfolgte nach Vorschrift der Hersteller. Bei der Mini-Präparation wurde die DNA in der Regel in 30-50 µl ddH<sub>2</sub>O und bei der Maxi-Präparation in 200-500 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

#### 2.2.3.1.2 Isolierung genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer DNA wurden  $1 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^6$  Zellen verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit warmem PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA von der Kulturschale abgelöst. Daraufhin wurden die Zellen bei Raumtemperatur bei 300 x g für 5 min pelletiert und in 5-10 ml PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 ml DNA-Extraktionspuffer resuspendiert und für 2 h bei 55 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung durch Phenol-Chloroform Extraktion (vgl. 2.2.3.3). Wenn eine große Interphase vorlag und die wässrige Phase nach der Phenol-Chloroform Extraktion noch weißlich-trübe war, wurde die Extraktion wiederholt. Die DNA wurde nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2 Volumen eiskaltem 100 % Ethanol für mind. 30 min bei -80 °C aus der wässrigen Phase gefällt und durch Zentrifugation bei 20000 x g für 10 min bei 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und luftgetrocknet und in 500 µl TE-Puffer gelöst. RNA-Kontaminationen des Pellets wurden durch Behandlung mit RNase A entfernt. Dazu wurde die DNA in 500 µl TE-Puffer mit 25 µg/ml RNase A versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte wiederum eine Aufreinigung durch Phenol-Chloroform Extraktion und Ethanol-Präzipitation. Das gewaschene Pellet wurde in 50-300 µl TE-Puffer aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt (vgl. 2.2.3.4). Die Lagerung der genomischen DNA erfolgte bei -20 °C.

### **2.2.3.2 Isolierung und Aufreinigung von RNA**

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte mit dem peqGOLD TriFast Reagenz der Firma Peqlab. Das Reagenz wurde direkt auf die Zellen in der Zellkulturschale gegeben. Auf ein 6-well mit Zellen wurde 1 ml TriFast pipettiert und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren lysiert. Nach Überführen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß erfolgte eine Inkubation von 3-10 min bei Raumtemperatur, dann wurden 200 µl Chloroform zugegeben und das Reaktionsgefäß für 15 s kräftig geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei Raumtemperatur für 5 min bei 12000 x g. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol für 15 min bei 4 °C ausgefällt. Durch Zentrifugation bei 4 °C mit 12000 x g für 10 min wurde die RNA pelletiert. Das Pellet wurde zweimal durch Resuspendieren in 75 % Ethanol in DEPC-H<sub>2</sub>O mit anschließender Zentrifugation gewaschen und dann 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die RNA wurde in 10-30 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen, für 5-10 min bei 55 °C gelöst und anschließend bei -80 °C gelagert.

### **2.2.3.3 Aufreinigung von DNA mittels Phenol/Chloroform Extraktion**

Für die Aufreinigung mittels Phenol-Chloroform Extraktion wurden DNA-Lösungen mit dem gleichen Volumen eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) versetzt und durch Vortexen gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 12000 x g für 5 min bei Raumtemperatur. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2 Volumen eiskaltem 100 % Ethanol für mind. 30 min bei -80 °C ausgefällt und für 10 min bei 4 °C und 20000 x g pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und in der gewünschten Menge TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **2.2.3.4 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren**

Die Konzentrationsbestimmung von DNA- und RNA-Lösungen erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm am NanoDrop Spektralphotometer. Um etwaige Verunreinigungen von Proteinen detektieren zu können, erfolgte die Aufnahme eines Spektrums im Bereich von 220-330 nm. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und



280 nm sollte für DNA zwischen 1,75 und 1,9 liegen. Bei Werten <1,75 ist die DNA zu stark mit Proteinen verunreinigt. Für RNA liegt die Grenze bei Werten >1,9, im Idealfall sollte die Ratio für RNA 2,0 betragen. Eine DNA-Konzentration von 50 ng/µl bzw. eine RNA-Konzentration von 40 ng/µl entspricht einer Absorption von eins.

### **2.2.3.5 Auftrennung von Nukleinsäuren mittels Agarosegelelektrophorese**

Zur Trennung von DNA-Fragmenten im Bereich zwischen 200-20000 bp mittels Elektrophorese werden Gele aus 1-2 %igen (w/v) Agaroselösungen verwendet, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit annähernd proportional dem Logarithmus des Molekulargewichts der DNA ist. Durch Zugabe von Ethidiumbromid zum Gel können Nukleinsäuren sichtbar gemacht werden. Der Farbstoff lagert sich zwischen benachbarte Basen (bevorzugt G/C-Paare) einer DNA-Helix, so dass einzelne Banden unter UV-Licht bei 312 nm durch die Fluoreszenz des interkalierten Ethidiumbromides sichtbar werden.

Zur Herstellung der Gele wurde die benötigte Agarosemenge in 1x TAE-Puffer unter Aufkochen gelöst und nach Abkühlen auf 50 °C in eine horizontale Elektrophoresekammer gegossen. Ethidiumbromid zur Detektion der DNA-Banden wurde dem Gel nach Lösen der Agarose in einer Konzentration von 0,1 µg/ml (final) direkt zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TAE-Puffer bei 40–100 V. Zur Größenbestimmung wurden auf jedem Gel 5-10 µl eines geeigneten DNA-Standards aufgetragen. Die Dokumentation erfolgte durch Aufnahme der Fluoreszenz an einem BioDoc Analyze UV-Transilluminator (Biometra).

### **2.2.3.6 Reverse Transkription von mRNA (RT)**

Für eine spätere Analyse der Genexpression mittels Real-Time PCR wurde isolierte mRNA zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die Reverse Transkription erfolgte mit dem High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit der Firma Applied Biosystems nach den Angaben des Herstellers. Pro Ansatz wurde jeweils 1 µg gesamt-RNA eingesetzt und Zufalls-Hexamer-Primer verwendet. Die erhaltene cDNA wurde bei -20°C gelagert oder direkt für eine Real-Time PCR eingesetzt.

RT-Ansatz

1 µg RNA in 10 µl H<sub>2</sub>O  
2 µl 10x RT Buffer  
0,8 µl 25x dNTP-Mix  
2 µl 10x RT Random Primer  
1 µl MultiScribe Reverse Transkriptase  
4,2 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O

RT-Zyklus

10 min	25 °C
120 min	37 °C
5 min	85 °C
<i>hold</i>	4 °C

**2.2.3.7 Expressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR)**

Die quantitative Real-Time PCR (qPCR) ermöglicht eine Messung der Zunahme des PCR-Produktes in Echtzeit und erlaubt daher eine quantitative Bestimmung von PCR-Produkten im Gegensatz zur semi-quantitativen Bestimmung von PCR-Produkten mittels Agarose-Gelelektrophorese am Ende einer konventionellen PCR. Während der qPCR-Reaktion entsteht ein Fluoreszenzsignal, das proportional zur Menge an PCR-Produkt ist und am Ende jedes PCR-Zyklus gemessen wird. Die Fluoreszenz ergibt sich entweder durch Fluoreszenzfarbstoffe, die an doppelsträngige DNA und damit an das entstandene PCR-Produkt binden und bei Anregung Fluoreszenzlicht einer bestimmten Wellenlänge abgeben, oder durch Sonden, die innerhalb der Amplikon-Sequenz binden und während der PCR-Reaktion durch die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der verwendeten Polymerase gespalten werden. Die Sonde trägt einen Fluoreszenzfarbstoff und einen Quencher, auf den der Farbstoff die Energie, die nach Anregung normalerweise als Fluoreszenzlicht abgegeben wird, in einem FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer)-Effekt überträgt. Bei der Spaltung der Sonde wird der Fluoreszenzfarbstoff vom Quencher freigesetzt und fluoresziert nach Anregung. Für jedes entstandene PCR-Produkt wird dabei eine Sonde gespalten und somit ein Molekül Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt. Die resultierende Fluoreszenz ist bei beiden Methoden proportional zur Menge an PCR-Produkt und steigt mit zunehmender Amplifikation der Zielsequenz an. Je häufiger die Zielsequenz in der Ausgangslösung

vorhanden ist, desto schneller nimmt die Fluoreszenz zu. Die Zahl der PCR-Zyklen bis die Fluoreszenz den Hintergrundwert übersteigt und detektiert werden kann (*threshold cycle*, Ct), dient folglich als Maß für die Häufigkeit der Zielsequenz in der Ausgangslösung.

In der vorliegenden Arbeit wurden das 7500 Fast Real-Time PCR System und das 7900HT Fast Real-Time PCR System der Firma Applied Biosystems verwendet. Als Fluoreszenzfarbstoff diente SYBR-Green, das an doppelsträngige DNA bindet.

Bei der Expressionsanalyse dient als Template cDNA, die durch Reverse Transkription von Gesamt-RNA gewonnen wird. Transkripte werden durch die Amplifikation eines PCR-Produktes mittels transkriptspezifischer Primer detektiert. Die Primer wurden mit Hilfe des WebTools Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/PCR>) erstellt. Die zu untersuchenden Proben wurden in 96-well-Platten als Triplikate pipettiert. Für mehrere Proben mit dem gleichen Primerpaar wurde jeweils ein Master-Mix hergestellt.

#### Real-Time PCR-Ansatz

2 µl cDNA-Verdünnung (aus RT-Reaktion)  
 10 µl Power SYBR Green PCR Master Mix (2x)  
 0,04 µl Primer 1 (100 µM; 200 nM final)  
 0,04 µl Primer 2 (100 µM; 200 nM final)  
 7,96 µl ddH<sub>2</sub>O (RNase-frei)

#### Real-Time PCR-Zyklus

10 min	95 °C	initiale Denaturierung
40 Zyklen à		
15 s	95 °C	Denaturierung
60 s	60 °C	Annealing, Elongation

Die Transkriptmengen wurden nicht absolut sondern relativ zu einer Referenzprobe (*calibrator*) bestimmt. Bei siRNA-Transfektionen wurden beispielsweise die Expressionsänderungen in der siRNA-Probe gegenüber der Probe mit Kontroll-siRNA dargestellt. Um Unterschiede in der eingesetzten cDNA-Menge und unterschiedliche RNA-Qualitäten auszugleichen, wurde auf das konstitutiv exprimierte *housekeeping*-Gen GAPDH normiert. Die relative Quantifizierung wurde mit der  $\Delta\Delta Ct$ -Methode durchgeführt. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens in allen Proben zunächst auf die

Expression des *housekeeping*-Gens normalisiert. Dabei wird für jede Probe der Ct-Wert des *housekeeping*-Gens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens abgezogen ( $\Delta Ct = Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ housekeeping-Gen}$ ). Dann wurde die Differenz der  $\Delta Ct$ -Werte der Proben und der Referenz-Probe gebildet ( $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct(\text{Probe}) - \Delta Ct(\text{Referenz})$ ). Der relative Expressionsunterschied zwischen den Proben und der Referenz ergibt sich aus der Formel  $R = 2^{-\Delta \Delta Ct}$ .

Diese Berechnung setzt voraus, dass die PCR-Effizienz 100 % ist, d.h. dass eine Verdoppelung der Produkt-Menge in jedem PCR-Zyklus stattfindet. In der Praxis liegen die PCR-Effizienzen im Idealfall nahe 100 %, bei zu hohen Abweichungen kommt es jedoch zu Verfälschungen des Ergebnisses der relativen Quantifizierung. Daher ist es wichtig, dass die PCR-Effizienzen aller Primer überprüft werden. Dies erfolgt in einer Verdünnungsreihe. Trägt man die Ct-Werte gegen den Logarithmus der eingesetzten DNA-Menge auf, ergibt sich eine Gerade, deren Steigung für alle verwendeten Primer im Bereich von -2,9 bis -3,5 liegen sollte.

### 2.2.3.8 Globale Expressionsanalyse mit Microarrays

Für eine globale Expressionsanalyse wurden Agilent 44k Whole Human Genome Microarrays verwendet. Gesamt-RNA wurde isoliert und an die Firma Source BioScience imaGenes (Berlin) verschickt. Dort wurden die Synthese von cRNA, Labelling, Hybridisierung und Auslesen der Daten durchgeführt. Auf den Microarrays befinden sich Oligonukleotid-Sonden, die jeweils ein Transkript detektieren. Dabei können mehrere Transkripte zum selben Gen gehören. In der Analyse wurde daher zwischen regulierten Transkripten und regulierten Genen differenziert. Die Microarrays zu den siRNA-Experimenten in U251 Zellen wurden als Teil eines größeren Sets von 28 Microarrays mit dem ComBat Script für die statistische Plattform *R* (Version 2.11.00) normalisiert. Für jedes Einzelexperiment wurden die Expressionsänderungen in den siRNA-behandelten Zellen relativ zur scr-Kontrolle berechnet. Außerdem wurden die Transkripte ermittelt, die in allen drei Experimenten mutp53-abhängig reguliert sind. Als Grenzwert für eine statistisch signifikante Regulation eines Transkripts in mutp53-depletierten Zellen gegenüber der Kontrolle wurde ein log<sub>2</sub>-Wert (*signal log ratio*, SLR) größer 0,8 (entspricht 1,74-facher Regulation) verwendet. Die statistische Auswertung der Microarrays wurde in Kooperation mit Dr. Benjamin Otto, Institut für Klinische Chemie Zentrallaboratorien, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, durchgeführt.

### 2.2.3.9 Sequenzierung

Die Arg273His-Mutation von *p53* in U251 Zellen wurde durch Sequenzierung des *p53*-Transkriptes verifiziert. Dazu wurde zunächst aus Gesamt-RNA wie beschrieben cDNA synthetisiert (vgl. 2.2.3.6). Aus der cDNA wurde die Sequenz von *p53* mit den Primern hp53-A1 und hp53-B1 amplifiziert. Für die PCR wurde *Pfu* DNA-Polymerase der Firma Ferments mit dem entsprechenden Puffer verwendet.

#### PCR-Ansatz

10 µl cDNA (aus RT-Reaktion)  
 50 µl 10x *Pfu* Puffer  
 10 µl 10 mM dNTPs  
 2 µl 100 µM Primer hp53-A1 (400 nM final)  
 2 µl 100 µM Primer hp53-B1 (400 nM final)  
 4 µl *Pfu* DNA-Polymerase 2,5 U/µl  
 422 µl ddH<sub>2</sub>O (RNase-frei)

Der PCR-Ansatz wurde in Aliquots à 100 µl auf fünf PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt und nach der PCR-Reaktion wieder vereint.

#### PCR-Zyklen

3 min	95 °C	initiale Denaturierung
32 Zyklen à		
30 s	95 °C	Denaturierung
30 s	64 °C	Annealing
2 min	72 °C	Elongation
abschließende Elongation		
30 s	95 °C	
30 s	64 °C	
8 min	72 °C	
<i>hold</i>	4 °C	

Das PCR-Produkt wurde auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen, nach Elektrophorese wurde die Bande des PCR-Produktes aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem Macherey&Nagel NucleoBond Extract II Kit nach den Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. Die

Sequenzierung des PCR-Produktes wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) mit den Primern hp53-A1, hp53-A2, hp53-B1 und hp53-B2 durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der Clone Manager Software aneinander gefügt und mit der Sequenz der *p53*-mRNA verglichen.

#### **2.2.3.10 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)**

Die Bindung von Proteinen (beispielsweise Transkriptionsfaktoren) an bestimmte DNA-Bereiche kann mit Hilfe von ChIP untersucht werden. Dabei werden DNA und Proteine durch Behandlung von Zellen mit Formaldehyd reversibel vernetzt. Anschließend werden die Zellen lysiert und die DNA durch Ultraschall-Behandlung (Sonifizierung) auf eine Länge von 200-1000 bp fragmentiert. Die DNA-Protein-Komplexe werden durch spezifische Antikörper gegen das zu untersuchende Protein präzipitiert. Die Antikörper sind dabei an eine Träger-Matrix gebunden. In der vorliegenden Arbeit wurden magnetische Protein A/G- *beads* verwendet. Nach Bindung der Protein-DNA-Komplexe an die Antikörper auf den *beads* werden diese mehrfach gewaschen, um das restliche Lysat und unspezifisch adherierte Protein-DNA-Komplexe zu entfernen. Nach dem Waschen können die Protein-DNA-Komplexe durch Inkubation in einen SDS-haltigen Puffer von den *beads* eluiert werden und die Vernetzung durch Formaldehyd wird durch Inkubation bei 65 °C rückgängig gemacht. Dann wird die in den Protein-DNA-Komplexen präzipitierte DNA durch Behandlung mit Proteinase K, RNase A und Phenol/Chloroform Extraktion aufgereinigt und kann bei -20 °C gelagert werden. Die Analyse der gebundenen DNA-Fragmente erfolgt mit spezifischen Primern in der qPCR.

#### **Vernetzung mit Formaldehyd**

Für die Vernetzung von Proteinen und DNA wurde das Medium von den Zellen abgegossen und auf eine 15 cm Kulturschale wurden 20 ml 1 % Formaldehyd in DMEM zugegeben und die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml 2,5 M Glycin, Schwenken und Inkubation für 3 min bei Raumtemperatur wurde die Vernetzung gestoppt. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Zellen in 10 ml PBS pro 15 cm Kulturschale abgeschabt, in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt.  $2 \times 10^7$  bis  $1 \times 10^8$  Zellen (ein bis fünf 15 cm Schalen) wurden vereinigt und die Zellen bei  $1350 \times g$  und 4°C für 5 min pelletiert.

### **Lyse der Zellen**

Die Lyse der Zellen erfolgte in drei Schritten. Zunächst wurde ein Pellet á  $2 \times 10^7$  bis  $1 \times 10^8$  Zellen in 5 ml ChIP Lysepuffer 1 mit Proteaseinhibitoren resuspendiert und für 10 min bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  unter Rotieren inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei  $1350 \times g$  und  $4\text{ }^\circ\text{C}$  wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml ChIP Lysepuffer 2 mit Proteaseinhibitoren resuspendiert. Nach Inkubation unter Rotieren bei Raumtemperatur für 10 min wurde wiederum für 5 min bei  $1350 \times g$  und  $4\text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 2-3 ml ChIP SDS-Lysepuffer resuspendiert und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt.

### **Sonifizierung**

Die Fragmentierung der DNA durch Ultraschall erfolgte mit einem Bioruptor UCD-200 mit Stabsonde in 15 ml Falcon-Röhrchen für 15 min bei der Einstellung „high“ mit 30 s an/aus Zyklen. Anschließend wurde das Lysat auf zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt für 10 min bei  $20000 \times g$  zentrifugiert, die Überstände in ein neues 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. 50  $\mu\text{l}$  des Lysats wurden als „Input“ abgenommen.

### **Aufarbeitung des Inputs und Analyse der DNA-Fragmentlängen**

Bevor das Lysat für eine Immunopräzipitation verwendet wurde, wurde anhand der Input-Probe die Länge der DNA-Fragmente nach der Sonifizierung überprüft. Die 50  $\mu\text{l}$  Input-Probe wurde mit 150  $\mu\text{l}$  ChIP Elutionspuffer gemischt und über Nacht bei  $65\text{ }^\circ\text{C}$  und 900 rpm in einem Schüttelheizblock inkubiert, um die Vernetzung rückgängig zu machen. Am nächsten Tag wurde das SDS im Elutionspuffer durch Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  TE-Puffer verdünnt und nach Zugabe von 8  $\mu\text{l}$  10 mg/ml RNase A erfolgte ein Verdau der RNA für 2 h bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$ . Für den Verdau der Proteine wurden 7  $\mu\text{l}$  ChIP  $\text{CaCl}_2$ -Lösung und 4  $\mu\text{l}$  20 mg/ml Proteinase K zugegeben und die Probe mind. 30 min bei  $50\text{ }^\circ\text{C}$  und Schütteln mit 900 rpm inkubiert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit einer Phenol/Chloroform Extraktion mit 400  $\mu\text{l}$  Phenol/Chloroform. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 16  $\mu\text{l}$  5 M NaCl (200 mM final), 1.5  $\mu\text{l}$  20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Glykogen (30  $\mu\text{g}$  total) und 880  $\mu\text{l}$  eiskaltem Ethanol versetzt. Die DNA wurde für mind. 30 min bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  präzipitiert und durch Zentrifugation für 10 Minuten bei  $20000 \times g$  und  $4\text{ }^\circ\text{C}$  pelletiert. Das Pellet wurde in 1 ml 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 70  $\mu\text{l}$  10 mM Tris-HCl, pH 8,0 aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde am NanoDrop bestimmt und 300-500 ng DNA wurden

auf einem 1,8 %igen Agarosegel analysiert. Wenn die Fragmentlängen eine Verteilung von 200-800 bp mit einem Maximum bei ~400 bp zeigten, wurden die Lysate für die Immunopräzipitation verwendet.

### **Bindung der Antikörper an die magnetischen *beads***

Vor der Immunopräzipitation der Protein-DNA-Komplexe wurden die Antikörper gegen die zu untersuchenden Proteine an die magnetischen *beads* gebunden. Für Antikörper aus Kaninchen wurden Protein A-*beads* verwendet. Pro Immunopräzipitation wurden 40 µl der Protein A-*beads* zweimal in 0,5 % (w/v) BSA in PBS gewaschen und in 250µl 0,5 % BSA in PBS aufgenommen. Dann wurden 4 µg Antikörper zugegeben und die *beads* mit den Antikörpern in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß über Nacht bei 4 °C unter Rotieren inkubiert. Wenn der gleiche Antikörper in mehreren ChIP-Proben verwendet werden sollte, wurden entsprechend mehr *beads* mit mehr Antikörper inkubiert. Dabei wurden in 250 µl 0,5 % BSA in PBS maximal 120 µl *beads* (Ausgangsmenge) mit maximal 12 µg Antikörper inkubiert. Bei einer größeren Menge an *beads* wurde die Menge an 0,5 % BSA in PBS entsprechend vergrößert. Als Negativkontrolle wurden *beads* ohne Antikörper während der gesamten Prozedur mitgeführt (noAb-Probe). Nach der Inkubation von *beads* und Antikörpern über Nacht wurden die *beads* am nächsten Tag dreimal mit 0,5 % BSA in PBS gewaschen und in 40µl 0,5 % BSA in PBS je 40µl eingesetzter *beads* aufgenommen.

### **Immunopräzipitation (IP)**

Aus den 2-3 ml sonifiziertem Lysat von  $2 \times 10^7$  bis  $1 \times 10^8$  Zellen können mehrere IPs angesetzt werden. Pro IP wurden 200 µl Lysat eingesetzt und in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 1,8 ml ChIP Verdünnungspuffer gemischt. Dieser Schritt ist essentiell, um das SDS im Lysat vor der IP zu verdünnen. Zu dem verdünnten Lysat wurden 40 µl der vorbereiteten *beads* mit dem gebundenen Antikörper zugeben und die Proben wurden über Nacht bei 4 °C rotiert.

### **Waschen der *beads* und Elution der Protein-DNA-Komplexe**

Die Waschschritte erfolgten mit vorgekühlten Waschpuffern bei 4 °C. Die magnetischen *beads* wurden in einem Reaktionsgefäßhalter mit Magnet an der Wand der Reaktionsgefäße gesammelt und das Lysat wurde vorsichtig mit einer Pipette entfernt. Dann wurden die *beads* mit der Pipette in 1 ml ChIP Waschpuffer 1 resuspendiert und in ein neues Reaktionsgefäß



überführt. Die *beads* wurden weitere drei Male mit ChIP Waschpuffer 1 gewaschen, dann einmal mit dem ChIP Waschpuffer 2, einmal mit RIPA-Puffer und abschließend einmal mit 50 mM NaCl in TE-Puffer. Die Elution der Protein-DNA-Komplexe erfolgte in 200 µl ChIP Elutionspuffer für 15 min bei 65 °C und 900 rpm im Schüttelheizblock. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Auflösung der Vernetzung, RNA- und Protein-Verdau erfolgten wie für die Input-Probe beschrieben.

Eine Analyse der durch das immunopräzipitierte Protein gebundenen DNA-Fragmente kann nach der Aufarbeitung direkt per PCR erfolgen, oder es wird eine Amplifikation der erhaltenen DNA angeschlossen und die in den Protein-DNA-Komplexen enthaltene DNA wird sequenziert oder auf einem Microarray analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Analyse direkt nach der Immunpräzipitation mittels qPCR durchgeführt und es wurden Proben auf Microarrays analysiert.

#### **2.2.3.11 Analyse von ChIP-DNA per qPCR**

Eine Analyse der in den Protein-DNA-Komplexen präzipitierten DNA erfolgt mit PCR-Primern in der genomischen Region, die auf Bindung des Proteins untersucht werden soll (beispielsweise die Promotorregion). Bindet das untersuchte Protein dort, wurde die entsprechende genomische Region in der IP der Protein-DNA-Komplexe angereichert und eine PCR mit den Primern sollte viel Produkt liefern. Bindet das untersuchte Protein dort nicht, sollte es gar kein oder nur sehr wenig PCR-Produkt geben. Der unspezifische Hintergrund ergibt sich aus der Analyse der Probe, in der das Lysat nur mit *beads* und ohne spezifischen Antikörper (noAb) inkubiert wurde, mit denselben Primern. Die PCR sollte für diese Probe gar kein, oder sehr wenig Produkt ergeben. Für eine spätere Normierung der ChIP-Proben wird eine Verdünnung der Input-Probe ebenfalls in eine PCR eingesetzt und die in der qPCR erhaltenen Werte der ChIP-Proben und der noAb-Probe werden als %-Input ausgedrückt. Dieser Wert gibt an, wie viel Prozent der im eingesetzten Lysat vorhandenen DNA-Sequenz in einer ChIP-Probe präzipitiert wurden.

Die PCR-basierte Auswertung erfolgte mittels qPCR. Die zu untersuchenden Proben wurden in 96-well-Platten als Duplikate pipettiert. Die Input-Probe wurde vor der PCR 1:10 verdünnt, die ChIP-Proben und die noAb-Probe 1:2. Für die spätere Quantifizierung der Ergebnisse wurde für jedes verwendete Primerpaar eine Verdünnungsreihe mit sonifizierter genomischer

DNA gleicher Fragmentlänge erstellt. Dabei wurden 20 ng, 4 ng, 0,8 ng und 0,04 ng eingesetzt.

#### Real-Time PCR-Ansatz

2 µl DNA (Input/noAb/ChIP-Probe)

10 µl Power SYBR Green PCR Master Mix

0,04 µl Primer 1 (100 µM; 200 nM final)

0,04 µl Primer 2 (100 µM; 200 nM final)

7,96 µl ddH<sub>2</sub>O (RNase-frei)

#### Real-Time PCR-Zyklus

10 min	95 °C	initiale Denaturierung
--------	-------	------------------------

40 Zyklen à

15 s	95 °C	Denaturierung
------	-------	---------------

60 s	60 °C	Annealing, Elongation
------	-------	-----------------------

Anhand der Standardkurven wurden für alle Proben (Input/noAb/ChIP-Probe) für das jeweilige Primerpaar Werte in „ng DNA“ errechnet. Die Werte für die noAb-Probe und die ChIP-Proben wurden unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren als Prozent des Wertes der Input-Probe ausgedrückt. Es wurden 50 µl Input vom Gesamt-Lysat abgenommen und pro IP wurden 200 µl Lysat eingesetzt. Außerdem wurden die IP-Proben vor der qPCR nur 1:2 verdünnt, während der Input 1:10 verdünnt wurde. Daraus ergibt sich für die Berechnung der %-Input-Werte ein Verdünnungsfaktor von 20.

#### **2.2.3.12 Analyse von ChIP-DNA auf einem Microarray (ChIP-chip)**

Die Verwendung eines Microarrays ermöglicht im Gegensatz zur qPCR die Analyse der Bindung von Proteinen über eine große genomische Region. Während bei der qPCR immer nur ein Amplikon gemessen wird, können auf dem Microarray mehrere tausend bp lange Regionen abgedeckt werden. Die zu untersuchende genomische Region wird durch 50 bp lange DNA-Sonden abgedeckt, die in definiertem Abstand (meist 100-200 bp) über die Region verteilt vorliegen. Die DNA-Fragmente aus dem ChIP-Experiment werden fluoreszenzmarkiert und auf den Microarray hybridisiert. Dann kann für jede Sondenposition die Fluoreszenz gemessen werden. Je stärker das Fluoreszenzsignal für eine Sonde, desto

häufiger war das DNA-Fragment in der ChIP-Probe vorhanden. Bei Bindung des präzipitierten Proteins an eine bestimmte DNA-Region liegen in der ChIP-Probe viele Fragmente aus der Region vor und dort entsteht ein starkes Fluoreszenzsignal.

Für Fluoreszenzmarkierung und Hybridisierung ist mehr Ausgangsmaterial nötig als ein ChIP-Experiment liefert. Daher wurde die ChIP-DNA mit Hilfe eines Kits zur ungerichteten Gesamt-Amplifikation von DNA amplifiziert. Es wurde das GenomePlex Complete Whole Genome Amplification (WGA) Kit der Firma Sigma verwendet. Für die Amplifikation werden an die DNA-Fragmente Bindesequenzen für universelle Amplifikationsprimer ligiert und anschließend werden die Fragmente mit den entsprechenden Primern in einer PCR amplifiziert. Für Die Amplifikation mit dem WGA Kit wurden 10 ng Input DNA in 10 µl und je 10 µl der ChIP-Proben eingesetzt.

#### WGA-Ansatz

10 µl DNA

+ 1 µl 10x Fragmentation Buffer

+ 2 µl 1x Library Preparation Buffer

+ 1 µl Library Stabilisation Solution

Die Proben wurden durch Vortexen gemischt, kurz abzentrifugiert und für 2 min bei 95 °C inkubiert. Dann wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und es wurde 1 µl Library Preparation Enzyme zugegeben, erneut durch Vortexen gemischt und abzentrifugiert. Es folgte eine Inkubation im PCR-Gerät.

#### Ligationszyklus:

20 min      16 °C

20 min      24 °C

20 min      37 °C

5 min        75 °C

*hold*        4 °C,

Die Proben wurden auf Eis überführt und für die Amplifikation vorbereitet. Bei mehreren Ansätzen wurde ein Master Mix vorbereitet.

Amplifikationsansatz

+ 7,5 µl 10 x Amplification Mix

+ 47,5 µl H<sub>2</sub>O

+ 5 µl WGA DNA-Polymerase

Amplifikationszyklus

3 min            95 °C

14 Zyklen á

15 s            94 °C

5 min           65 °C

*hold*            4 °C,

Nach der Amplifikation wurde die DNA mit dem NucleoBond Extract II Kit der Firma Machere&Nagel nach Protokoll des Herstellers für eine Aufreinigung von PCR-Fragmenten aufgearbeitet und am Ende in 50 µl Elutionspuffer eluiert. Die DNA wurde anschließend durch Zugabe von 2 µl 5 M NaCl (200 mM final), 1,5 µl 20 µg/µl Glykogen (30 µg total) und 125 µl eiskaltem 100 %igen Ethanol für mind. 30 min bei -80 °C gefällt. Nach Zentrifugation bei 20000 x g und 4 °C für 10 min wurde das Pellet einmal in 1 ml 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Konzentration wurde am NanoDrop bestimmt. Wenn nach der Amplifikation nicht genug Material für eine Analyse per Microarray vorhanden war, wurde eine zweite Amplifikation von 10 ng DNA mit anschließender Aufreinigung vorgenommen.

Für die Microarray-Analyse wurden die Proben an die Firma Source BioScience imaGenes (Berlin) verschickt. Dort erfolgte eine Qualitätskontrolle und die Proben wurden mit den Farbstoffen Cy3 (Input) und Cy5 (ChIP-Proben) fluoreszenzmarkiert. Jeweils eine ChIP-Probe wurde kompetitiv mit dem zugehörigen Input auf ein Feld eines NimbleGen 12 x 135k Custom Microarrays hybridisiert. Die Signale für Cy3 und Cy5 wurden für alle Sonden aufgenommen und daraus ein log<sub>2</sub>-Ratio aus dem Cy5-Signal der ChIP-Probe geteilt durch das Cy3-Signal des Inputs gebildet (log<sub>2</sub>(ChIP/Input)). Dieser Wert gibt die Anreicherung des entsprechenden DNA-Fragmentes in der ChIP-Probe gegenüber dem Input an und zeigt somit, ob das untersuchte Protein in der entsprechenden genomischen Region gebunden war.

#### **2.2.3.12.1 Design des NimbleGen 12 x 135k Custom Microarrays**

Für den Microarray wurden 779 Protein-kodierende Gene ausgewählt, die entweder in der Literatur beschriebene Zielgene von wtp53 oder mutp53 sind, oder in Experimenten während dieser Doktorarbeit und anderer Arbeiten in unserem Labor als potentielle mutp53-Zielgene identifiziert wurden. Außerdem wurde ein Set von 50 nicht durch mutp53 regulierten Kontrollgenen eingeschlossen. Die Chromosomenpositionen der Gene inklusive 1500 bp vor Transkriptionsstart und nach Transkriptionsstop wurden anhand der Genliste über die Biomart Homepage (<http://www.biomart.org>) herunter geladen. Das Design des Microarrays aus der Liste der Chromosomenpositionen und die Herstellung des Microarrays wurden von der Firma Source BioScience imaGenes (Berlin) durchgeführt. Die genomischen Regionen wurden dabei durch 50 bp lange Sonden in einem mittleren Abstand von 130 bp abgedeckt.

#### **2.2.3.12.2 Bioinformatische Analyse der NimbleGen 12 x 135k Custom Microarrays**

Die Messung der Cy3 und Cy5 Fluoreszenzwerte und die Berechnung eines  $\log_2$ -Ratios Cy5 zu Cy3 (entsprechend ChIP-Probe zu Input) für alle Sondenpositionen auf dem Microarray wurden durch die Firma Source BioScience imaGenes (Berlin) durchgeführt. Somit ergibt sich ein Verlauf des  $\log_2$ -Ratios über die genomischen Regionen, der der Anreicherung der jeweiligen genomischen Region in der mit spezifischem Antikörper präzipitierten Probe gegenüber dem Durchschnitt im Gesamtlisat entspricht. Dieser Signalverlauf wurde für ausgewählte Regionen graphisch dargestellt als  $\log_2$ -Signal auf der Y-Achse gegen die Chromosomenposition auf der X-Achse. Bei einigen Darstellungen wurden mehrere biologische Replikate zusammengefasst. Die Einzelheiten sind im Ergebnisteil an entsprechender Stelle beschrieben.

Für eine globale Auswertung der Microarrays wurden aus den Signalverläufen der Anreicherung in den ChIP-Proben Regionen identifiziert, die über mehrere Sonden eine signifikante Anreicherung aufweisen (*peaks*) und folglich einer Bindestelle des untersuchten Proteins entsprechen. Diese bioinformatische Auswertung erfolgte mit zwei unterschiedlichen statistischen Methoden mit der NimbleScan Software und der Carpet Software (Cesaroni et al. 2008) auf der Galaxy/IFOM IEO Webseite (<http://host13.bioinfo3.ifom-ieo-campus.it:8080>). Die Auswahl der Methoden und der genaue Ablauf der Auswertung sind im Ergebnisteil anhand der entsprechenden Microarrays im Detail beschrieben.

### Einstellungen der *peak*-Suche in der NimbleScan Software

P start: 90.0

P step: 1.0

# steps: 76

Width of sliding window (bp): 500

Min probes > cutoff peak: 3

When all probes in peak > cutoff: 2

Permute data within: Each track

Calculate FDR within: Each chip

FDR estimator: Optimize for strong peaks of varied width

### Einstellungen der *peak*-Suche in der Carpet Software

# percentile value: 0.90=0.93

# fold change:

# type of analysis: s

# log(pval analysis): 7

# num (probe defining a peak): 3

# dist: 130

# window length: 1000

## **2.2.4 Proteinanalytische Methoden**

### **2.2.4.1 Herstellung von Gesamtzelllysaten**

Die Herstellung von Gesamtzelllysaten zur Immuno-Detektion von Proteinen im Western Blot (vgl. 2.2.4.4) erfolgte durch direkte Zugabe des Lysepuffers in die Zellkulturschale. Wenn keine Proteinbestimmung nötig war, wurde 1x SDS-Probenpuffer verwendet, der bereits Bromphenolblau enthält. Sollte eine Proteinbestimmung stattfinden, wurde der 2x SDS-Lysepuffer ohne Bromphenolblau verwendet und eine Proteinbestimmung mit dem BCA-Assay angeschlossen.

Die Zellen wurden bei Raumtemperatur einmal mit PBS gewaschen, dann wurden für ein 6-well 50-200 µl Lysepuffer zugegeben. Wenn wenige Zellen vorhanden waren, oder die zu detektierenden Proteine schwach exprimiert waren, wurden kleine Volumina Lysepuffer verwendet. Nach Zugabe des Lysepuffers wurden die Zellen von der Zellkulturschale abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Um die Viskosität der Lysate zu

verringern, wurden die Proben für 8 min mit einem Bioruptor UCD-200 bei der Einstellung „high“ mit 30 s an/aus Zyklen sonifiziert. Dabei wird die hochmolekulare DNA fragmentiert. Die Lysate in 1x SDS-Probenpuffer wurden mit 5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt und nach 5 min Inkubation bei 95 °C direkt für die SDS-PAGE (vgl. 2.2.4.3) verwendet. Die Lysate in 2x SDS-Lysepuffer können für eine Proteinbestimmung eingesetzt werden. Vor der Verwendung für die SDS-PAGE wurde die gewünschte Menge an Lysat mit 6x SDS-Probenpuffer und 5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt und für 5 min bei 95 °C inkubiert.

#### **2.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay)**

Der BCA-Assay basiert auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen und einer Detektion der  $\text{Cu}^+$ -Ionen durch Bildung eines farbigen Komplexes mit Bicinchoninsäure in alkalischer Lösung.  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen werden in einen Chelat-Komplex durch Peptide mit drei oder mehr freien Aminosäureresten eingelagert und zu einem  $\text{Cu}^+$ -Ion reduziert. Die Anzahl der entstehenden  $\text{Cu}^+$ -Ionen ist somit proportional zur Proteinmenge in der Lösung. Die Reaktion ist insbesondere abhängig von den Aminosäuren Cystein, Tyrosin und Tryptophan. Bei höheren Temperaturen nehmen allerdings auch die Peptidbindungen an der Reaktion teil und die Reaktion wird weniger stark von der Aminosäure-Zusammensetzung beeinflusst. Zwei BCA-Moleküle formen mit dem  $\text{Cu}^+$ -Ion einen Chelat-Komplex, der dunkel lila erscheint und dessen Absorption bei 562 nm photometrisch bestimmt werden kann. Die Konzentration der Probe wurde anhand der Standardreihe bestimmt. Für den BCA-Assay wurde das BCA Protein Assay Reagenz der Firma Thermo Scientific verwendet. In einem Reaktionsgefäß wurden 1 ml BCA-Reagenz A mit 20  $\mu\text{l}$  BCA-Reagenz B gemischt, dann wurden 2,5  $\mu\text{l}$  der Proteinprobe zugegeben und die Lösung für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Aus BSA Lösungen mit 0, 250, 500, 1000, 1500 und 2000  $\mu\text{g/ml}$  BSA wurden jeweils 2,5  $\mu\text{l}$  für eine Standardkurve verwendet. Die Absorption wurde bei 565 nm am Photometer aufgenommen und die Konzentration der Proben wurde anhand der Standardkurve errechnet.

#### **2.2.4.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Beweglichkeit von Proteinen in einem Polyacrylamid-Gel im elektrischen Feld ist abhängig von ihrer Gesamtladung und ihrer Größe. Eine Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht wird durch den Einsatz anionischer Detergenzien wie

Natriumdodecylsulfat (SDS) möglich. SDS bindet an die hydrophoben Bereiche eines Proteins, wodurch die meisten Proteine in ihre Untereinheiten dissoziieren und führt eine starke negative Ladung in die denaturierten Polypeptidketten ein, so dass diese im elektrischen Feld zur Anode wandern. Je größer das denaturierte Protein ist, desto mehr SDS-Moleküle lagern sich an und alle Proteine besitzen im SDS-Gel annähernd das gleiche Masse-zu-Ladung-Verhältnis. In diesem Zustand erfolgt die Auftrennung der Proteine durch die Poren im Acrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht. Ihre Beweglichkeit stellt dabei eine Funktion des Logarithmus ihres Molekulargewichtes dar (dieses gilt streng genommen nur für die Beweglichkeit von Proteinen mit Molekulargewichten zwischen 12-70 kDa).

Acrylamidgele werden aus einer Lösung von Acrylamid und Bisacrylamid hergestellt. Durch Zugabe des Radikalbildners Ammoniumperoxidsulfat (APS) und des Radikalstabilisators N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin (TEMED) wird eine radikalische Polymerisation gestartet, in der Acrylamid und Bisacrylamid vernetzt werden. Die Porengröße des Gels richtet sich nach der Menge an Acrylamid. Es wurden Gele mit Acrylamidkonzentrationen von 10 % oder 12 % mit 4 %igem Sammelgel verwendet. Außerdem wurden 4-20 % Ready Gel Precast Gradienten-Gele der Firma BioRad verwendet.

Die 10 % und 12 % Gele wurden selbst hergestellt. Das folgende Schema gibt die Mengen für fünf Gele an.

		<b>10 %</b>	<b>12 %</b>
<b>Trenngel</b>	30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid	15 ml	18 ml
	H <sub>2</sub> O	18,75 ml	15,75 ml
	4x Tris/SDS pH 8,8	11,25 ml	
	APS	150 µl	
	TEMED	30 µl	
			<b>4 %</b>
<b>Sammelgel</b>	30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid	3,9 ml	
	H <sub>2</sub> O	18,3 ml	
	4x Tris/SDS pH 6,8	7,5 ml	
	APS	150 µl	
	TEMED	30 µl	



Zunächst wurden die Komponenten des Trenngels gemischt, wobei APS und TEMED zum Starten der Polymerisationsreaktion zum Schluss zugegeben wurden. Die Gellösung wurde zügig gemischt und in eine vorbereitete Apparatur für fünf Gele gegossen. Das Trenngel wurde bis etwa 4 cm unter den oberen Glasplattenrand gegossen und dann mit Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen, die Geloberfläche kurz mit Wasser gespült und getrocknet. Dann wurden die Komponenten des Sammelgels gemischt und die Polymerisation durch APS und TEMED gestartet. Nach Mischen wurde das Sammelgel bis zum Rand der Glasplatten über das Trenngel geschichtet und es wurde ein Kamm für die Geltaschen eingesetzt. Nachdem auch das Sammelgel auspolymerisiert war, wurden die Gele entweder direkt verwendet oder für bis zu einer Woche bei 4 °C (in feuchte Tücher gewickelt) gelagert.

Lysate in 1x SDS-Probenpuffer wurden mit 5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt, Lysate in 2x SDS-Lysepuffer wurden mit 6x SDS-Probenpuffer und 5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Ein Polyacrylamid wurde in eine Laufkammer eingesetzt und die Kammer mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt. Dann wurden für die Elektrophorese 5-35  $\mu$ l der Proben und 10  $\mu$ l eines Proteinmarkers in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte bei 12 mA pro Gel bis zum Durchlaufen des Sammelgels und dann bei 18 mA pro Gel, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

#### **2.2.4.4 Transfer von Proteinen auf eine Membran (Western Blot; WB) und Immunodetektion mittels ECL-Reaktion**

Beim Western Blot handelt es sich um eine analytische immunologische Methode, die dem spezifischen Nachweis geringer Proteinmengen aus einem komplexen Gemisch dient. Die Proteine werden nach Auftrennung in der SDS-PAGE auf eine Membran transferiert und dort mittels Antikörpern detektiert. Es wurde ein Nassblotverfahren auf PVDF-Membranen verwendet. Zunächst wurde die PVDF-Membran durch Inkubation für 5 min in Methanol aktiviert. Dann wurde die voraktivierte PVDF-Membran auf das Gel gelegt und von oben und unten in jeweils zwei Lagen Filterpapier (Dicke 1,2 mm) eingelegt, welches zuvor in 1x Transferpuffer 1 getränkt wurde. Das *Blotten* erfolgte für 1 h 10 min bei 100 V in einer mit Transferpuffer 1 gefüllten Nassblotapparatur.

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen, wurde diese nach dem Transfer der Proteine für 1 h bei Raumtemperatur in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST inkubiert. Anschließend wurde sie mit einer Verdünnung (1:500 bis 1:3000) des

Primärantikörpers in 5 % Magermilch in TBST über Nacht unter Schwenken bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Membran 30 min mit dreimaligem Wechsel des TBST gewaschen und anschließend mit einer Verdünnung des Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers in 5 % Magermilchpulver in TBST für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde wiederum für 30 min mit dreimaligem Wechsel des TBST gewaschen. Die Immunodetektion erfolgte anhand der Chemilumineszenz, die durch die Enzym-Substrat-Reaktion der Sekundärantikörper-gekoppelten Peroxidase mit dem ECL-Reagenz entsteht. Es wurde das SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate der Firma Thermo Scientific verwendet. Die Membran wurde auf eine Klarsichtfolie überführt. 200 µl einer 1:1 Mischung der ECL-Reagenzien 1 und 2 wurden auf die Membran pipettiert und dann wurde sofort eine zweite Klarsichthülle auf die Membran gelegt, so dass sich ein dünner Film des ECL-Reagenz auf der Membran befand. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 1 min wurde die Membran in den Klarsichthüllen in eine Filmkassette überführt und die Chemolumineszenz mit Röntgenfilmen detektiert. Um eine gleichmäßige Beladung des Gels mit Proteinen zu untersuchen, wurden zusätzlich zu den zu untersuchenden Proteinen die ubiquitär exprimierten Proteine HSC70 oder Tubulin detektiert.

#### **2.2.4.5 Ko-Immunopräzipitation (Ko-IP)**

Die Immunopräzipitation dient der Anreicherung von Proteinen aus Zelllysaten mittels Antikörper-Protein-Komplexen. Bei einer milden Aufarbeitung der Zellen können Proteine identifiziert werden, die mit dem präzipitierten Protein einen Komplex bilden und mit präzipitiert werden (Ko-IP). Der Antikörper gegen das zu untersuchende Protein wird zunächst an Protein A- oder Protein G-beschichtete magnetische *beads* gebunden. Dann werden die *beads* mit dem Zelllysat inkubiert, gewaschen und die gebundenen Proteine eluiert. Anschließend können eluierte Proteine im Western Blot nachgewiesen werden.

#### **Bindung der Antikörper an magnetische *beads***

Vor der Immunopräzipitation wurden die Antikörper gegen die zu untersuchenden Proteine an magnetische *beads* gebunden. Die magnetischen *beads* können zum Waschen mit Hilfe eines Magnetständers an der Wand von Reaktionsgefäßen gesammelt werden. Für die verwendeten Antikörper aus Kaninchen wurden Protein A-*beads* verwendet. Pro Immunopräzipitation wurden 40 µl der Protein A-*beads* zweimal in 0,5 % (w/v) BSA in PBS gewaschen und in

250 µl 0,5 % BSA in PBS aufgenommen. Dann wurden 4 µg Antikörper zugegeben und die *beads* mit den Antikörpern in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß über Nacht bei 4 °C unter Rotieren inkubiert. Als Negativkontrolle wurden *beads* mit Gesamt IgG aus nicht immunisierten Kaninchen inkubiert (IgG-Kontrolle). Nach der Inkubation von *beads* und Antikörpern über Nacht wurden die *beads* am nächsten Tag dreimal mit 0,5 % BSA in PBS gewaschen und in 40 µl 0,5 % BSA in PBS je 40µl eingesetzter *beads* aufgenommen.

### **Herstellung von Lysaten für die Ko-IP**

Für Ko-IP Experimente wurden U251 Zellen in 15 cm Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von ~80 % kultiviert. Dann wurde das Medium abgegossen, die Zellen wurden einmal in kaltem PBS gewaschen, in 10 ml kaltem PBS abgeschabt und in ein 50 ml Falcon überführt. Zellen von bis zu fünf 15 cm Kulturschalen wurden vereinigt und bei 300 x g und 4 °C für 5 min abzentrifugiert. Ein Pellet aus drei bis fünf 15 cm Kulturschalen wurde in 1 ml kaltem Ko-IP Nuclei-Puffer mit Proteaseinhibitoren aufgenommen und die Zellen wurden zur Präparation der Kerne für 10 min auf Eis inkubiert. Die Kerne wurden für 2 min 1000 x g bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 250-550 µl Ko-IP Lysepuffer aufgenommen und mit 3-5 µl Benzoyl-DL-argininyl-L-phenylalanine (25 U/µl, 1 µl pro 100 µl Lysepuffer) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert und mehrfach durch Schütteln gemischt. Die Menge an Lysepuffer richtet sich dabei nach der Menge geplanter IPs. Für eine IP sollten 100 µl Lysat eingesetzt werden und es wurden vor den IPs 50 µl Lysat als Input abgenommen. Nach der Inkubation wurden unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation für 5 min bei 10000 x g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Die Lysate wurden sofort für die Ko-IP eingesetzt.

### **Immunopräzipitation (IP)**

Für die IP wurden 100 µl Lysat mit 900 µl Ko-IP Verdünnungspuffer mit Proteaseinhibitoren verdünnt, pro IP wurden 40 µl der vorbereiteten *beads* mit Antikörpern zugegeben und die Proben wurden bei 4 °C für mind. 4 h oder über Nacht unter Rotieren inkubiert.

### **Waschen der *beads* und Elution der Proteine**

Nach der IP wurden die magnetischen *beads* fünfmal mit 1 ml Ko-IP Verdünnungspuffer gewaschen und dann in 50 µl Ko-IP Elutionspuffer aufgenommen und für 15 min bei 65 °C und 900 rpm im Schüttelheizblock inkubiert. Anschließend wurden die *beads* im

Magnetständer gesammelt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Eluate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt (vgl. 2.2.4.3) und zur Detektion präzipitierter Proteine für einen Western Blot eingesetzt.

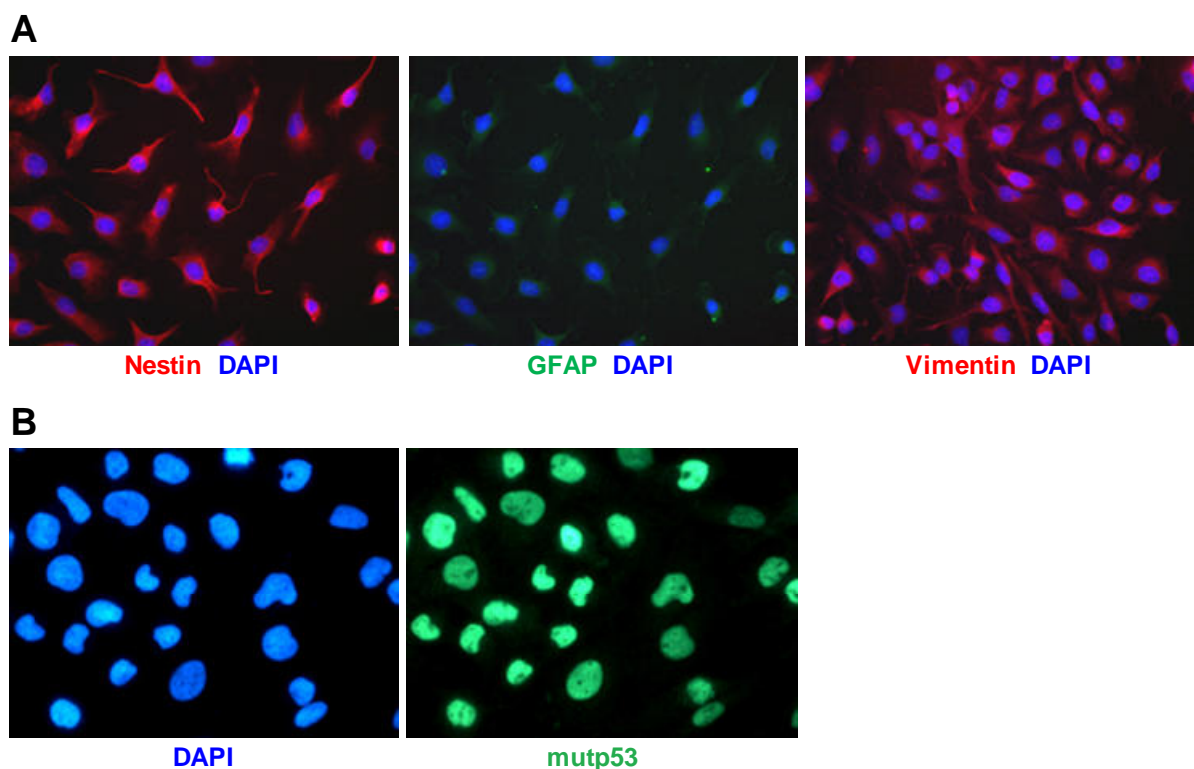
### **Detektion der präzipitierten Proteine im Western Blot**

Für die Detektion der präzipitierten Proteine im Western Blot wurden 15 µl der Eluate nach IP mit 3 µl 6x SDS-Probenpuffer und 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol versetzt. Von den Input-Proben wurden 3 µl mit 2 µl H<sub>2</sub>O, 1 µl 6x SDS-Probenpuffer und 5 % β-Mercaptoethanol versetzt. Die Proben wurden für 5 min bei 95 °C inkubiert und zusammen mit einem geeigneten Proteinmarker auf ein 4-20 % Ready Gel Precast Gradientengel (Biorad) aufgetragen. Anschließend folgten ein Western Blot und die immunologische Detektion der Proteine (vgl. 2.2.4.4). Die Ko-IP-Proben wurden unter Verwendung von Transferpuffer 2 auf Nitrocellulose-Membranen *geblottet*. Nitrocellulose-Membranen müssen nicht mit Methanol aktiviert werden. Es wurde für 1 h bei 60 V *geblottet*. Sollten große Proteine detektiert werden, wurde die Spannung auf 100V erhöht.

### 3 Ergebnisse

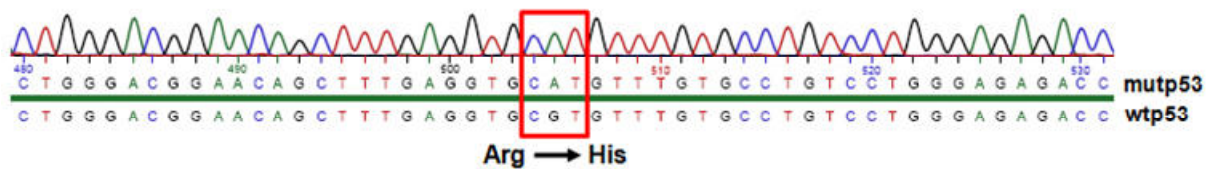
#### 3.1 U251 Glioblastom-Zelllinie

Die U251 Zelllinie wurde aus einem primären Glioblastom isoliert und zeichnet sich durch starke Expression der Intermediärfilamente Nestin und Vimentin aus, die charakteristisch für neuronale und Glia-Vorläuferzellen sind. Der für Gliazellen spezifische Marker GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) wird hingegen sehr schwach exprimiert. Abb. 6A zeigt die Immunfluoreszenzfärbung für die drei Intermediärfilamente. Außerdem zeichnen sich U251 Zellen durch eine starke endogene Expression der p53-*hotspot*-Mutante R273H (im Folgenden als mutp53 bezeichnet) aus. Die Mutation wurde durch Sequenzierung der p53-cDNA aus U251 Zellen verifiziert. Außerdem wurde nachgewiesen, dass kein wtp53-Allel mehr vorliegt (Abb. 7). Die Immunfluoreszenz-Analyse zeigt, dass mutp53 ausschließlich nukleär lokalisiert ist und die Proteinlevel innerhalb der Zellpopulation Unterschiede aufweisen (Abb. 6B).



**Abbildung 6: Expression von Intermediärfilamenten und mutp53 in U251 Zellen.**

U251 Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und mit Aceton fixiert. Die Intermediärfilamente Nestin, GFAP und Vimentin (A) sowie mutp53 (B) wurden mit entsprechenden Antikörpern in der Immunfluoreszenz detektiert. Für Nestin und Vimentin wurden Sekundärantikörper gekoppelt mit Alexa-568 verwendet, für GFAP und p53 Alexa-488-konjugierte Sekundärantikörper. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt.

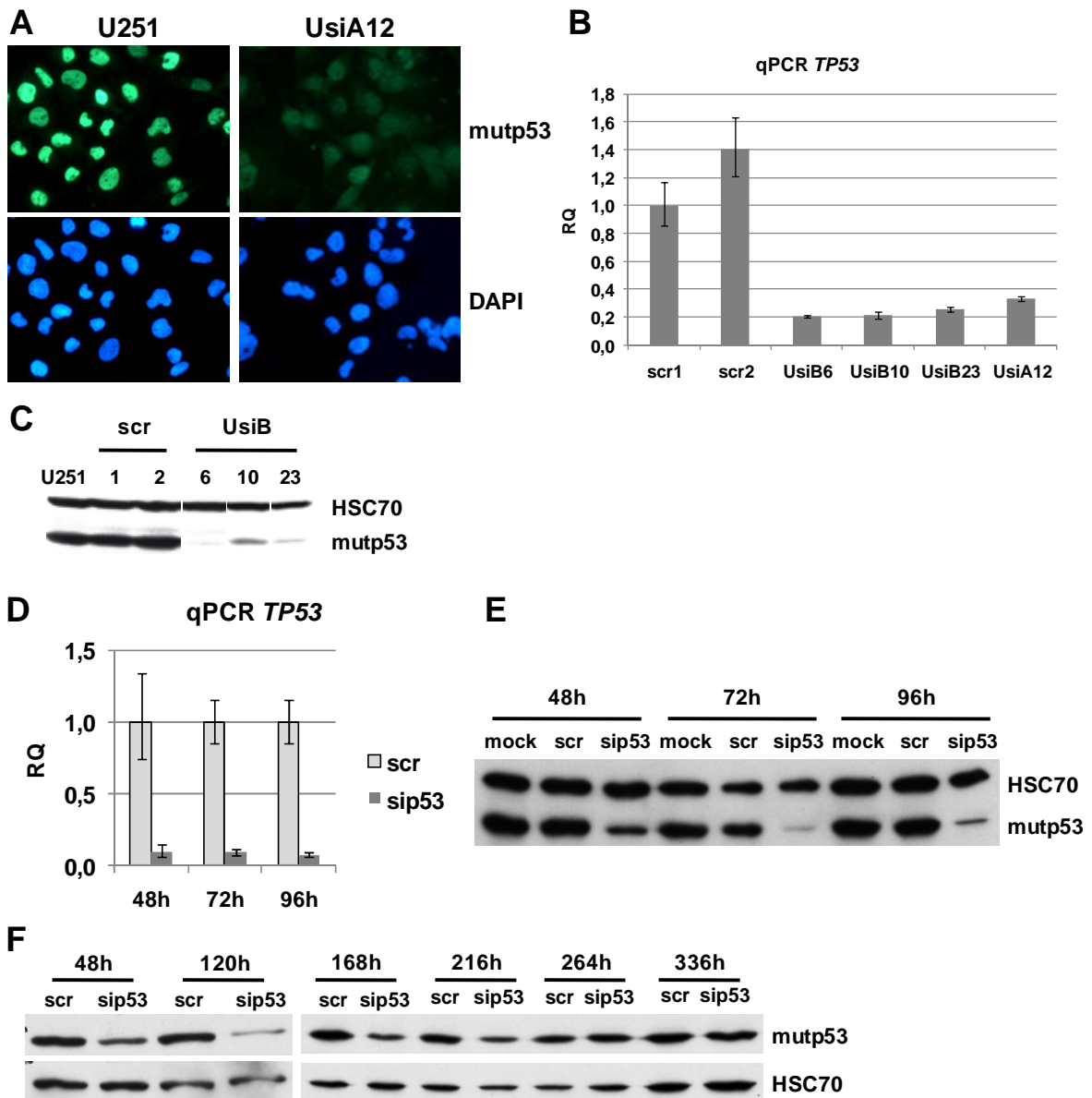


**Abbildung 7: U251 Zellen weisen die p53-hotspot-Mutation R273H auf.**

Gesamt RNA aus U251 Zellen wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Sequenz des *p53*-Transkriptes wurde per PCR amplifiziert und zur Sequenzierung an die Firma Eurofins MWG Operon verschickt. Es ist ein Ausschnitt der erhaltenen Sequenz aus U251 Zellen (*mutp53*) dargestellt, der das Kodon 273 enthält (markiert mit einem roten Kasten). Darunter ist zum Vergleich die Sequenz von *wtp53* dargestellt. In U251 Zellen hat das Kodon 273 durch einen Basenaustausch die Basenfolge CAT gegenüber CGT in der *wtp53*-Sequenz. Damit ergibt sich ein Aminosäureaustausch von Arginin zu Histidin.

### 3.2 Depletion von *mutp53* in U251 Zellen

Um den Einfluss von *mutp53* auf die Genexpression in U251 Zellen zu untersuchen, wurde die Depletion von *mutp53* mit Hilfe von RNA-Interferenz (RNAi) etabliert. Hierfür wurde eine publizierte siRNA-Sequenz gegen *p53*-mRNA verwendet (Brummelkamp et al. 2002). Die Zellen wurden einerseits transient mit siRNA-Duplexen transfiziert, um die Effekte direkt nach Depletion von *mutp53* zu untersuchen. Andererseits wurden Zellen mit einem Expressionplasmid für shRNAs mit der entsprechenden Sequenz transfiziert und anschließend mehrere Klone selektioniert, die eine stabile Depletion von *mutp53* aufwiesen. In beiden Ansätzen wurde jeweils eine unspezifische *scrambled*-siRNA bzw. shRNA (*scr*) als Kontrolle eingeschlossen. Für die siRNA-Experimente wurde eine Zeitreihe gewählt, um den Zeitpunkt maximaler *mutp53*-Depletion zu bestimmen. Die Effizienz der *mutp53*-Depletion wurde auf Transkript- und Protein-Ebene validiert. Änderungen in der *mutp53*-Transkriptmenge in den siRNA/shRNA-behandelten Zellen wurden relativ zu den jeweiligen *scr*-Kontrollen mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR) bestimmt. Als endogenes Kontrollgen dienten *GAPDH* oder *HPRT1*. Die *mutp53*-Depletion auf Protein-Ebene wurde per Western Blot (WB) aus Gesamtzelllysaten analysiert. Mit beiden Protokollen ist es möglich, die *mutp53*-Expression stark zu reduzieren (Abb. 8). Die Effizienz der *mutp53*-Depletion ist im Falle der transienten Transfektion von siRNAs mit einer Reduktion der *mutp53* Proteinmenge um >90% gegenüber den stabilen *knockdown*-Klonen deutlich erhöht, wobei die Effizienz der stabilen Depletion zwischen einzelnen Klonen stark variiert (Abb. 8C, E). Der Zeitverlauf der *mutp53*-Reduktion in der transienten Transfektion zeigt bereits 48 h nach Transfektion eine deutliche Reduktion der *mutp53*-Transkripte in den mit *mutp53*-siRNA(*sip53*)-transfizierten Zellen gegenüber der Kontrolle (*scr*), während die Proteinmenge 48 h nach Transfektion abzunehmen beginnt und zwischen 72 h und 120 h nach Transfektion ein Maximum aufweist (Abb. 8D, E).



**Abbildung 8: Mutp53-Depletion in U251 Zellen.**

U251 Zellen wurden mit shRNA gegen p53-mRNA (UsiB6, B10, B23, UsiA12) und mit einer scr-Kontrolle transfiziert (scr1, scr2). Zellklone, die das Expressionsplasmid ins Genom integriert hatten, wurden selektiert (A-C). Außerdem wurden U251 Zellen transient mit siRNA gegen p53-mRNA (sip53), der Kontrolle (scr) und nur dem Transfektionsreagenz (mock) transfiziert (D-F). **A.** Detektion von mutp53 in U251 Zellen und einem stabilen *knockdown*-Klon in der Immunfluoreszenz. Mutp53 wurde mit einem primären Ziege anti p53-Antikörper und dem entsprechenden Alexa-488-konjugierten Sekundärantikörper angefärbt. **B.** Detektion von p53-Transkripten in U251-Klonen mit stabiler mutp53-Reduktion und scr-Kontrollklonen. Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben und die p53-Transkripte wurden mit spezifischen Primern in der qPCR relativ zu einem Kontrollklon quantifiziert. **C.** Detektion von mutp53 in Gesamtzelllysaten von Zellklonen mit stabil reduzierter mutp53-Expression und scr-shRNA-exprimierenden Kontrollklonen im WB. **D.** Detektion von p53-Transkripten in U251 Zellen nach transienter Transfektion mit p53- und scr-siRNA. 48 h, 72 h und 96 h nach Transfektion wurden die p53-Transkripte in den sip53-transfizierten Zellen relativ zu den Kontroll-transfizierten Zellen in der qPCR bestimmt. **E.** Detektion von mutp53-Protein in Gesamtzelllysaten aus p53-siRNA-transfizierten Zellen und Kontroll-transfizierten Zellen 48 h, 72 h und 96 h nach Transfektion. **F.** Verlauf der mutp53-Depletion in der transienten Transfektion mit siRNAs. U251 Zellen wurden mit p53-siRNA und scr-siRNA transfiziert und 48 h, 120 h, 168 h, 216 h, 264 h und 336h nach Transfektion wurde mutp53 im WB detektiert. Als Ladungskontrolle in den WBs diente jeweils HSC70.

Die um ca. 48 h verzögerte Abnahme der Proteinmengen im Vergleich zur Transkriptmenge lässt auf eine hohe Stabilität von mutp53 in U251 Zellen schließen. Ab 120 h nach Transfektion steigen die Proteinlevel in den sip53-transfizierten Zellen wieder und entsprechen etwa 216 h nach Transfektion den Mengen in den Kontrollproben (Abb. 8F).

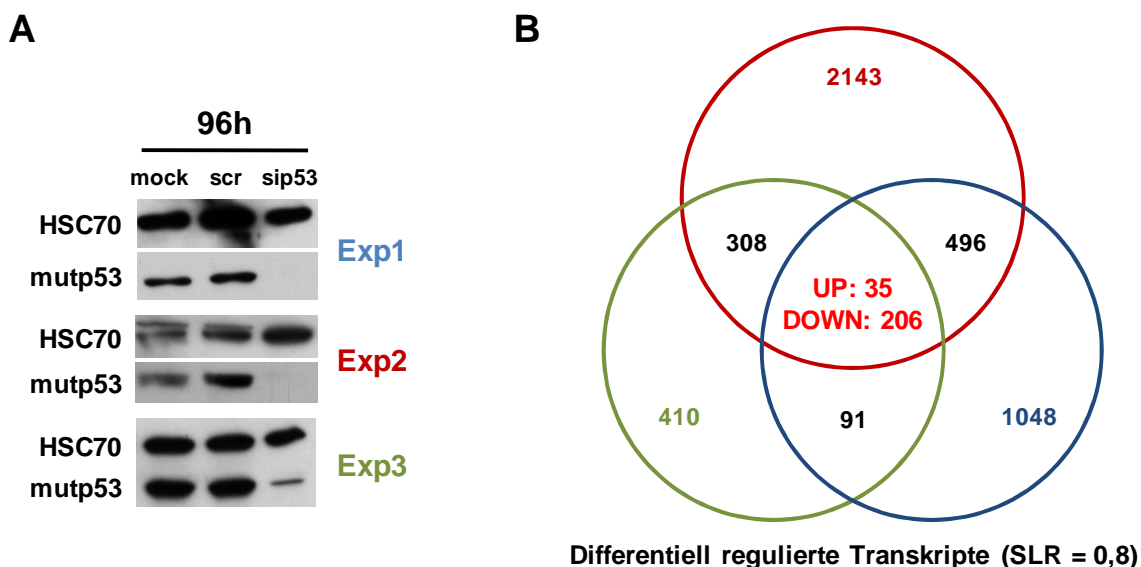
### 3.3 Globale Analyse der Genexpression in U251 Zellen nach mutp53-Depletion

Für die Analyse der Effekte einer mutp53-Depletion auf die Genexpression wurde die transiente siRNA Transfektion ausgewählt, da sie eine erhöhte Effizienz in der mutp53-Reduktion zeigt und außerdem die Möglichkeit bietet, die Effekte direkt nach mutp53-Depletion zu untersuchen. Die stabile Depletion von mutp53 erfordert hingegen eine Selektion über einen längeren Zeitraum und birgt damit die Gefahr von Sekundäreffekten.

Die Analyse der Genexpression erfolgte 96 h nach Transfektion der siRNA. Zu diesem Zeitpunkt ist die mutp53-Depletion im Bereich des Maximums und war bereits 24 h effektiv. U251 Zellen wurden mit mutp53-siRNA und scr-Kontrolle transfiziert. 96 h nach Transfektion wurde Gesamt-RNA isoliert. Zusätzlich wurden Gesamtzelllysate zur Kontrolle der mutp53-Depletion auf Proteinebene hergestellt. Drei biologische Replikate in Form von unabhängigen siRNA-Transfektionen wurden für die Genexpressionsanalyse auf Agilent 44k Whole Human Genome Microarrays verwendet (Abb. 9). Die Microarrays zu den siRNA-Experimenten wurden als Teil eines größeren Sets von 28 Microarrays mit dem ComBat Script für die statistische Plattform *R* (Version 2.11.00) normalisiert und die Expressionsänderungen in den siRNA-behandelten Zellen relativ zur scr-Kontrolle für jedes der drei biologischen Replikate berechnet. Alle Transkripte auf dem Microarray, die in den sip53-behandelten Zellen gegenüber der scr-Kontrolle eine Regulation mit einem  $\log_2$ -Wert (*signal log ratio*, SLR) größer 0,8 (entspricht 1,74-facher Regulation) aufwiesen, wurden in die statistische Auswertung der Ergebnisse eingeschlossen. Abb. 9B zeigt die Anzahlen der Transkripte, die in den einzelnen Experimenten eine Regulation anzeigten, sowie die Überlappung zwischen jeweils zwei bzw. allen drei Experimenten. Insgesamt waren in drei Experimenten nach mutp53-Depletion 4737 Transkripte reguliert, die 3679 Genen entsprechen. Die Anzahl der pro Experiment regulierten Transkripte korreliert dabei mit der Effizienz der mutp53-Reduktion auf Proteinebene (Abb. 9). Eine Gruppe von 241 Transkripten (entsprechend 209 Genen) ist in allen drei Experimenten reproduzierbar reguliert, darunter sind 35 Transkripte nach mutp53-Depletion hochreguliert, während die



Expression von 206 Transkripten reduziert ist. Die kleine Anzahl der in allen Experimenten regulierten Transkripte im Vergleich zu den insgesamt pro Experiment regulierten Transkripten deutet auf eine hohe Variabilität in der Regulation der Genexpression durch mutp53 hin.



**Abbildung 9: Globale Analyse der Veränderungen in der Genexpression in U251 Zellen nach mutp53-Depletion.**

U251 Zellen wurden mit siRNA gegen p53-mRNA (sip53), Kontroll-siRNA (scr) oder nur dem Transfektionsreagenz (mock) transfiziert und 96 h nach Transfektion wurden Gesamt-RNA und Proteine isoliert. **A.** Analyse der mutp53-Depletion im WB in drei biologischen Replikaten. Als Ladungskontrolle in den WBs diente jeweils HSC70. **B.** Venn-Diagramm der differentiell regulierten Transkripte nach mutp53-Depletion in sip53-transfizierten Zellen gegenüber scr-transfizierten Zellen in drei biologischen Replikaten. 96 h nach Transfektion wurde Gesamt-RNA isoliert und für die Expressionsanalyse auf Agilent 44k Whole Human Genome Microarrays eingesetzt. Alle Transkripte, die in sip53-transfizierten Zellen gegenüber scr-transfizierten Zellen eine Regulation mit einem SLR-Wert  $> 0,8$  (entspricht 1,74-facher Regulation) aufweisen wurden bei der Analyse berücksichtigt. Es sind die in den einzelnen Experimenten in sip53- gegenüber scr-transfizierten Zellen regulierten Gene sowie die Überlappung zwischen zwei und drei Experimenten dargestellt.

Durch zwei weitere statistische Analysen aller mutp53-abhängig regulierten Transkripte aus den drei Experimenten lassen sich allerdings trotz der Heterogenität zwischen den Experimenten statistisch signifikante Aussagen ableiten.

Neben der Anzahl an regulierten Transkripten nach mutp53-Depletion wurde zusätzlich untersucht, wie viele der mutp53-regulierten Gene vor mutp53-Depletion aktiv oder inaktiv waren. Ein Gen wurde als aktiv oder inaktiv definiert, wenn der Fluoreszenzwert des entsprechenden Transkriptes oberhalb oder unterhalb eines Grenzwertes von  $\log_2 = 6$  (entspricht 64 Fluoreszenzeinheiten) lag. Dieser Grenzwert entspricht einem Erfahrungswert für die Detektionsgrenze von Transkripten bei einer Validierung von Microarray Ergebnissen mittels qPCR. Alle mutp53-regulierten Transkripte aus den drei Experimenten wurden zusammengefasst und die Anzahl an aktiven bzw. inaktiven Genen vor mutp53-Depletion

berechnet. Von den insgesamt 3679 regulierten Genen sind 6 in allen drei Experimenten vor mutp53-Depletion inaktiv, 37 in zwei Experimenten und 150 in einem aus drei Experimenten. Dem gegenüber stehen 3486 Gene (94,8%), die in allen drei Experimenten vor mutp53-Depletion aktiv sind. Diese Zahlen deuten stark darauf hin, dass mut53 in die Regulation von aktiven Genen eingreift.

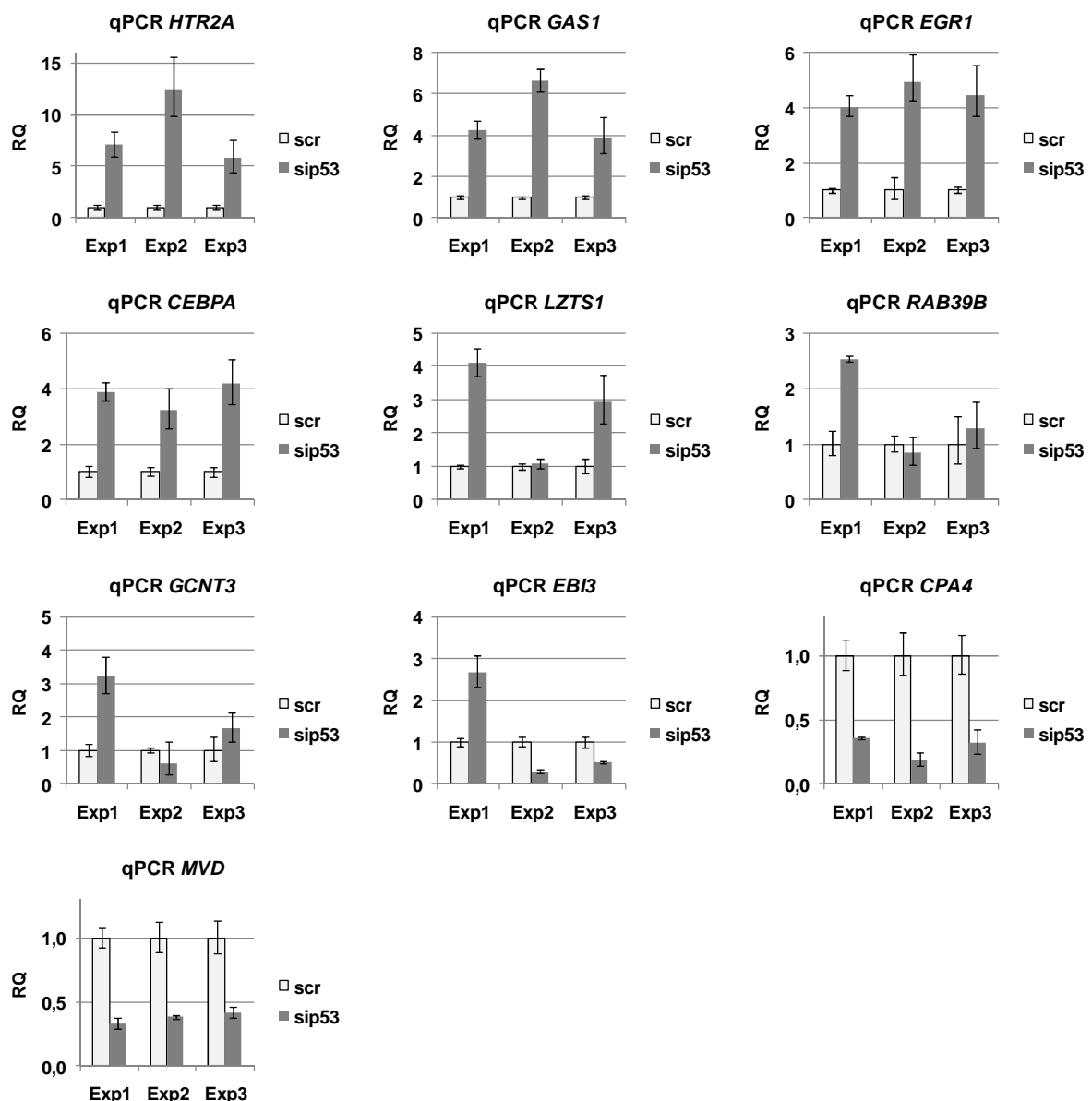
In einer weiteren statistischen Analyse wurden die 3679 regulierten Gene bezüglich der Anreicherung von bestimmten Signalwegen, Stoffwechselwegen, Zellzyklusgenen etc. untersucht (*gene set enrichment analysis*, GSEA). Hierfür wurde die GSEA Homepage genutzt (<http://www.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>). Unter den 3679 regulierten Genen befinden sich 13 von 17 Genen aus dem Steroidstoffwechsel (KEGG\_STEROID\_BIOSYNTHESIS; p-Wert =  $4,13 \times 10^{-3}$ ) und 15 von 21 Genen aus dem Cholesterinstoffwechsel (REACTOME\_CHOLESTEROL\_BIOSYNTHESIS; p-Wert =  $6,02 \times 10^{-3}$ ). Außerdem sind Gene, die im funktionellen Zusammenhang mit dem Zellzyklusregulator Cyclin A stehen, mit 34 Genen überrepräsentiert (p-Wert =  $4,96 \times 10^{-5}$ ).

### **3.4 Validierung von mutp53-regulierten Genen durch quantitative Real-Time PCR**

Anhand von in der Microarray-Studie identifizierten Genen sollten die mechanistischen Grundlagen der Genregulation durch mutp53 aufgeklärt werden. Aufgrund der beobachteten Heterogenität der transkriptionellen Regulation durch mutp53 zwischen den drei analysierten Einzelerperimenten erfolgte ein intensiver Validierungsprozess von mutp53-regulierten Genen. So sollten unspezifische Effekte infolge der Behandlung mit siRNAs ausgeschlossen und Gene identifiziert werden, die einer konstanten Regulation unterliegen. Nach der Microarray-Studie wurden für die erste Validierungsrunde exemplarisch zehn Gene ausgewählt. Darunter befinden sich sechs Gene, die in allen drei per Microarray analysierten biologischen Replikaten stark reguliert sind ( $> 3$ fach; *GAS1*, *HTR2A*, *CPA4*, *RAB39B*, *GCNT3*, *EBI3*). Außerdem wurden vier Gene verwendet, die schwächerer Regulation unterliegen ( $< 3$ fach; *EGR1*, *CEBPA*, *MVD*, *LZTS1*) und in einem Replikat der Microarrays knapp unterhalb des Grenzwertes für die Regulation liegen (1,74fach), allerdings in weiteren siRNA-Transfektionen als potentielle Zielgene von mutp53 identifiziert wurden.

Zunächst wurde die Expression der Gene in den gleichen Proben, die für die Microarrays verwendet worden waren, per qPCR analysiert. Dafür wurden, wenn möglich, Primer verwendet, die an einer anderen Stelle im Transkript liegen als die Sonden auf dem

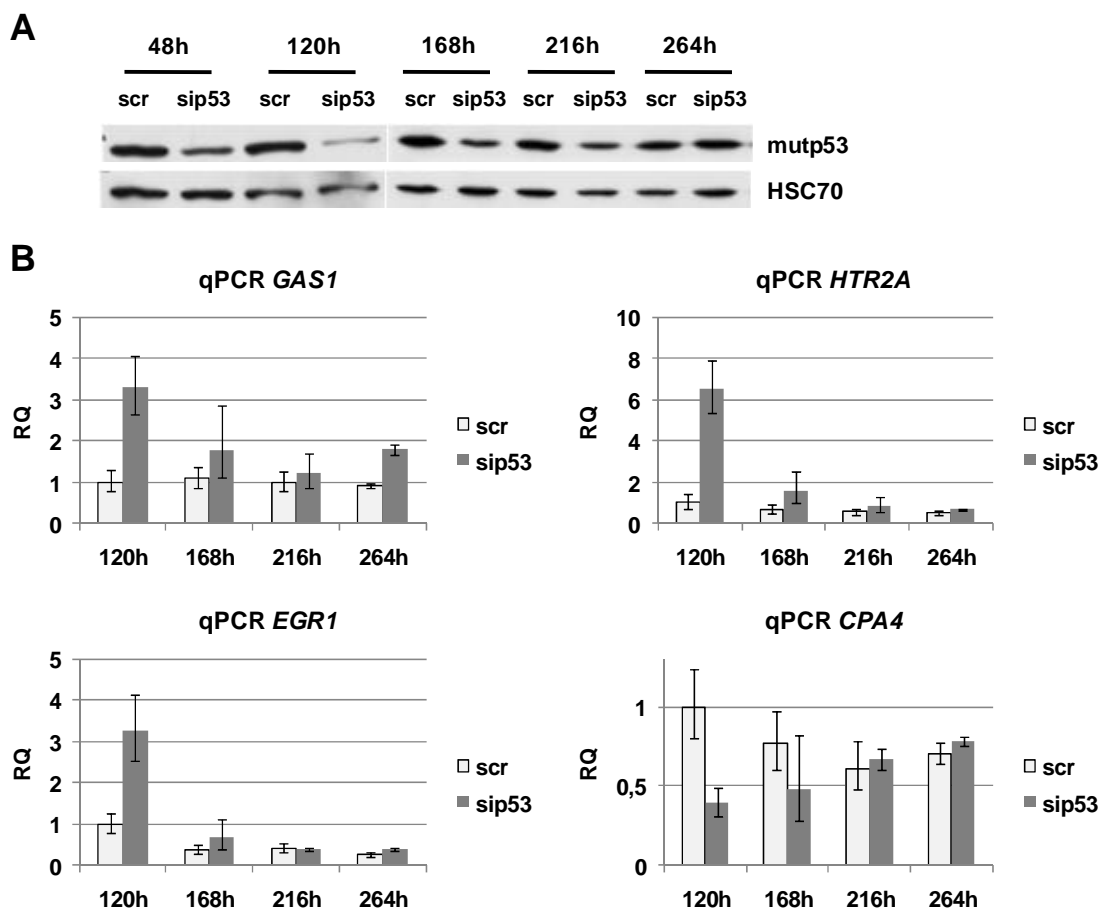
Microarray, die in der Regel in der 3'-UTR lokalisiert sind. Die Ergebnisse sind in Abb. 10 dargestellt. Für sechs der untersuchten Gene (*GAS1*, *HTR2A*, *EGR1*, *CEBPA*, *CPA4*, *MVD*) ergab die qPCR eine signifikante Regulation nach mutp53-Depletion. Vier weitere Gene (*LZTS1*, *RAB39B*, *GCNT3*, *EBI3*) wurden hingegen nur in einzelnen Experimenten signifikant reguliert, oder die Richtung der Regulation unterschied sich von den Ergebnissen der Microarrays.



**Abbildung 10: qPCR-Validierung von mutp53-regulierten Genen.**

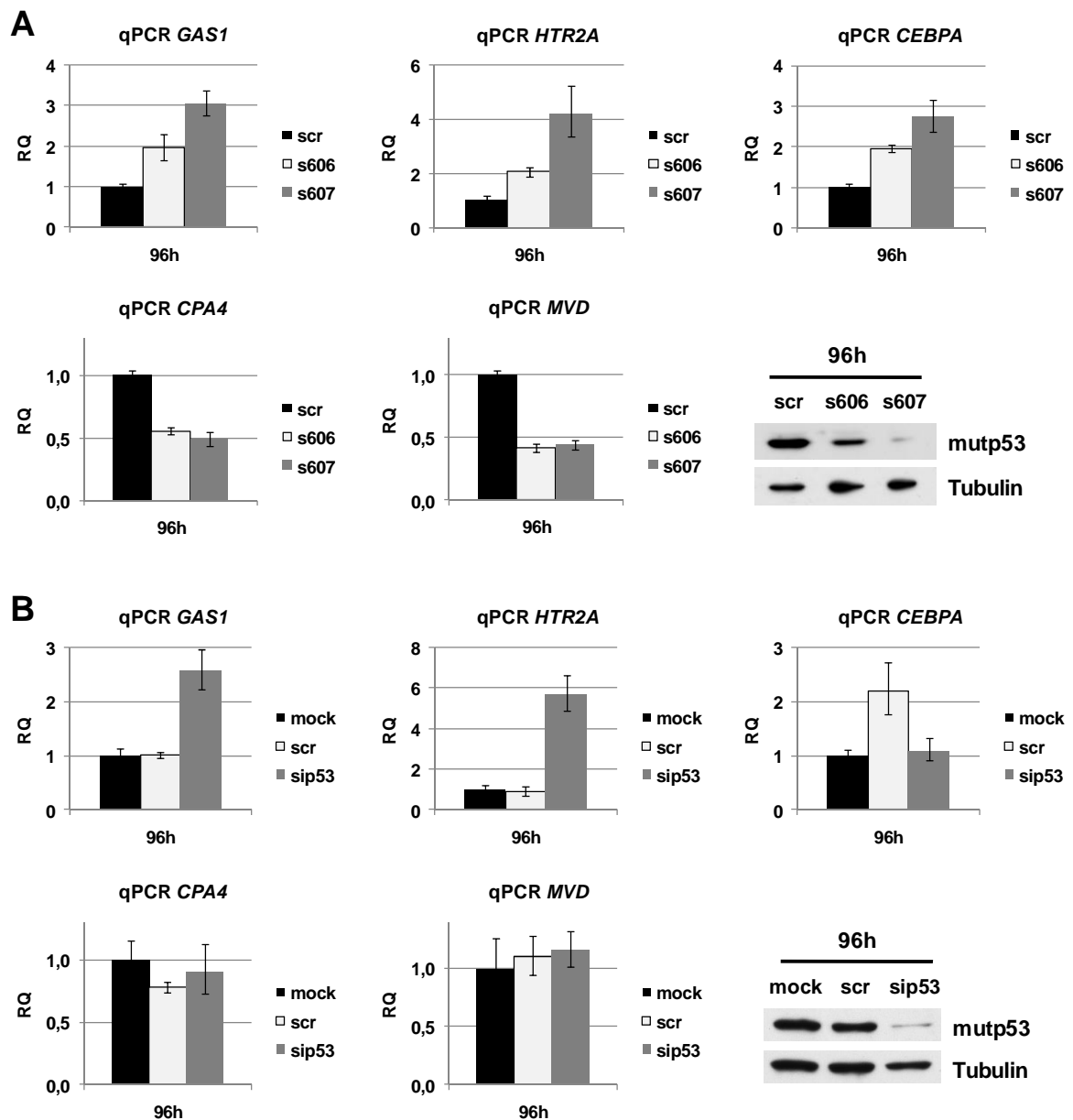
Aus den gleichen RNAs, die für die Microarray-Analyse eingesetzt wurden (vgl. Abb. 9), wurde cDNA hergestellt und die Expressionsänderungen ausgewählter Gene in sip53-transfizierten Zellen gegenüber scr-transfizierten Zellen wurden in der qPCR mit genspezifischen Primern bestimmt.

Für die sechs eindeutig regulierten Gene wurde ein Zeitreihen-Experiment angeschlossen, um die Regulation der Gene in Abhängigkeit der mutp53-Proteinmenge bis zur vollständigen Re-Expression von mutp53 zu verfolgen. Die Transkriptmengen in den siRNA-transfizierten Zellen relativ zur scr-Kontrolle wurden zu den Zeitpunkten 120 h, 168 h, 216 h und 264 h nach Transfektion mittels qPCR gemessen. Parallel wurde die mutp53-Menge per WB bestimmt. Abb. 11 zeigt die Ergebnisse exemplarisch anhand von vier mutp53-regulierten Genen (*GAS1*, *HTR2A*, *EGR1*, *CPA4*). Zum Zeitpunkt 120 h nach Transfektion ist mutp53 in den siRNA behandelten Zellen noch stark reduziert und die Zielgene sind im Vergleich zur scr-Kontrolle signifikant reguliert. Mit steigender mutp53-Re-Expression nähern sich die Transkriptmengen denen in der Kontrolle und erreichen deren Wert schließlich etwa 216 h nach Transfektion, wo auch die mutp53-Menge auf den Normalwert zurück gekehrt ist. Damit korreliert die Expression der mutp53-regulierten Gene eindeutig mit der mutp53-Proteinmenge.



**Abbildung 11: Zeitverlauf der Expression ausgewählter Gene in Abhängigkeit von der mutp53-Proteinmenge.**

U251 Zellen wurden mit p53-siRNA und scr-siRNA transfiziert und 48 h, 120 h, 168 h, 216 h und 264 h nach Transfektion wurden Proteine und Gesamt-RNA isoliert. **A.** Analyse der mutp53-Proteinlevel zu den Zeitpunkten im WB. Als Ladungskontrolle in den WBs diente HSC70. **B.** Detektion der Transkripte von vier Genen in sip53-transfizierten Zellen gegenüber scr-transfizierten Zellen.

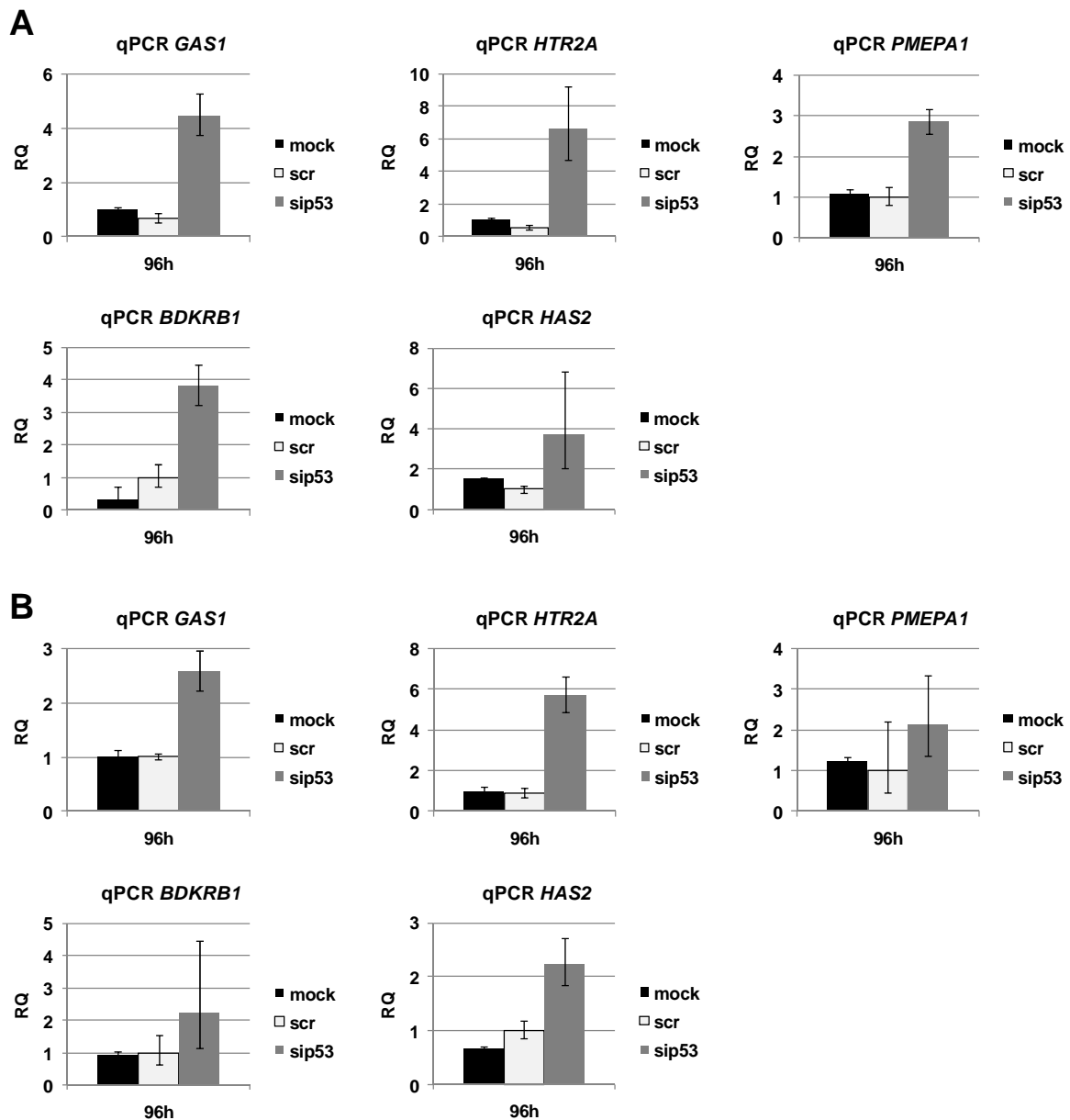


**Abbildung 12: Validierung ausgewählter mutp53-Zielgene mittels qPCR.**

**A.** U251 Zellen wurden mit zwei weiteren, validierten siRNAs und scr-Kontrolle transfiziert. 96 h nach Transfektion wurden Gesamtzelllysate hergestellt und Gesamt-RNA isoliert. Die mutp53-Proteinmenge wurde im WB detektiert und die Expression mutp53-regulierter Gene nach Umschreiben der RNA in cDNA in der qPCR gemessen. Die Expressionsänderungen sind in sip53-transfizierten Zellen relativ zur scr-Kontrolle dargestellt. **B.** U251 Zellen wurden mit p53-siRNA, einer anderen scr-Kontrolle und nur dem Transfektionsreagenz (mock) transfiziert. Es wurden Ganzzelllysate hergestellt und Gesamt-RNA isoliert, und die mutp53-Proteinlevel sowie die Expression von mutp53-regulierten Genen wurden 96 h nach Transfektion im WB bzw. in der qPCR gemessen. Als Ladungskontrolle in den WBs diente jeweils Tubulin.

In einem weiteren Validierungsexperiment wurden U251 Zellen mit zwei weiteren, validierten siRNA-Sequenzen transfiziert, die von Ambion erworben wurden (s606 und s607), um unspezifische Effekte der zuvor verwendeten siRNA auszuschließen. 96 h nach Transfektion wurden RNA und Proteine isoliert und die Transkriptmengen und die mutp53-Proteinlevel per qPCR bzw. Western-Blot analysiert. Mit beiden siRNAs lässt sich mutp53 gut depletieren (Abb. 12A). Allerdings ist die Effizienz etwas geringer als die der zuvor verwendeten siRNA. Die Expression der mutp53-Zielgene ist gegenüber der scr-Kontrolle wiederum signifikant reguliert und die Änderungen korrelieren mit der *knockdown*-Effizienz (Abb. 12A). Um auch unspezifische Effekte der scr-Kontroll-siRNA auszuschließen, wurde ein Experiment mit einer zusätzlichen scr-siRNA von Ambion angeschlossen. Außerdem wurden Proben, die nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt wurden (mock), mit in die Analyse einbezogen. Dieses Experiment zeigte, dass die beobachtete Regulation einiger Gene scheinbar auf unspezifische Effekte der verwendeten scr-siRNA zurück geht (Abb. 12B). Die beiden stark regulierten Gene *GAS1* und *HTR2A* hingegen waren in allen Validierungsrunden eindeutig mutp53-abhängig reguliert.

Im Zuge des strikten Validierungsprozesses erwies sich die Verwendung einer weiteren scr-siRNA als besonders effektiv bei der Identifikation von unspezifischen Effekten, während sich die Ergebnisse aus Versuchen mit unterschiedlichen p53-spezifischen siRNAs decken. Unter Verwendung der zusätzlichen scr-siRNA wurden neben *GAS1* und *HTR2A* mit *PMEPA1*, *BDKRB1* und *HAS2* noch drei weitere Gene identifiziert, die nach stringenten Kriterien in U251 Zellen mutp53-abhängig reguliert sind (Abb. 13).

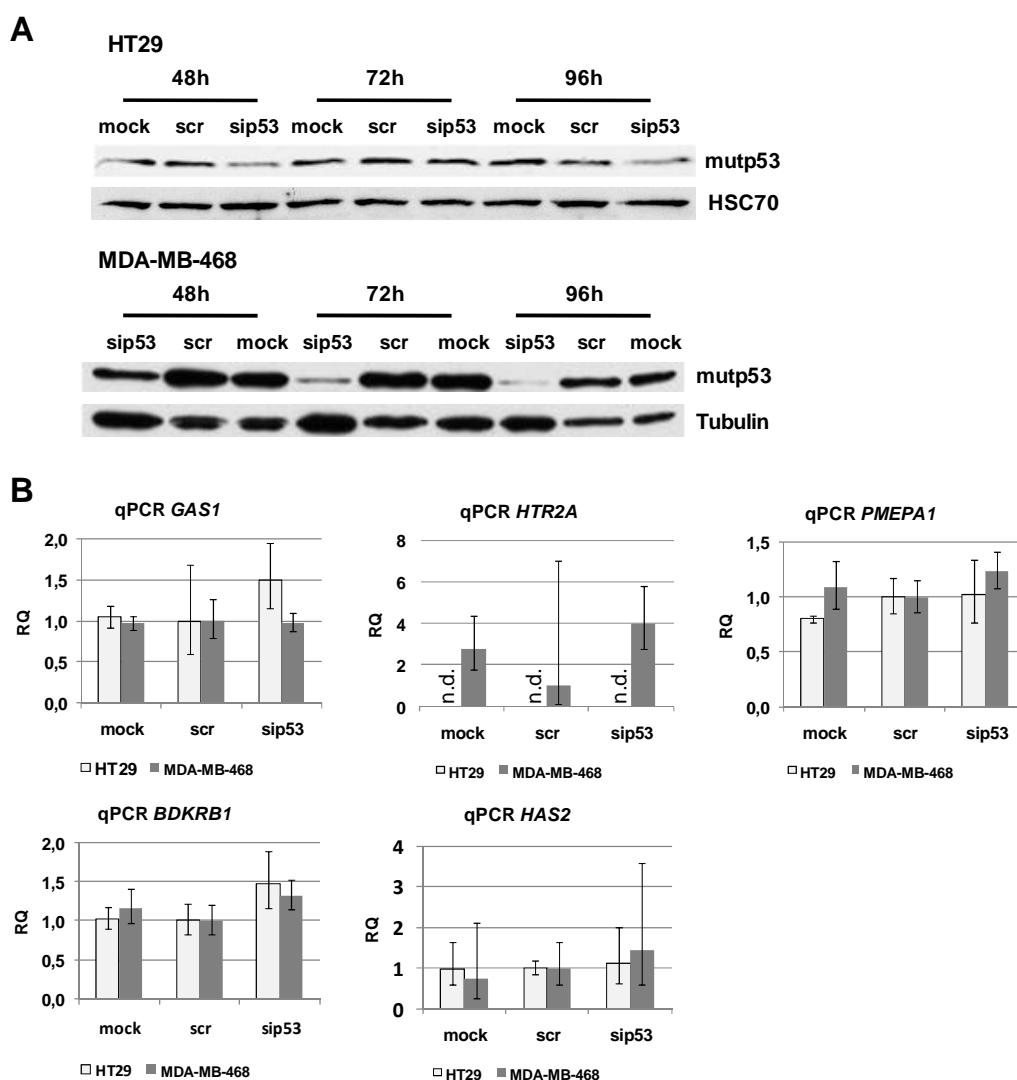


**Abbildung 13: Validierte mutp53-Zielgene in U251 Zellen.**

**A.** U251 Zellen wurden mit p53-siRNA, scr.Kontrolle und nur dem Transfektionsreagenz (mock) transfiziert, es wurde 96 h nach Transfektion Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Expressionsänderungen der Gene *GAS1*, *HTR2A*, *PMEPA1*, *BDKRB1* und *HAS2* gegenüber der scr-Probe wurde in der qPCR gemessen. **B.** Ein weiteres Experiment mit einer anderen scr-siRNA wurde analog durchgeführt.

Da die Genregulation durch mutp53 als stark kontext- und zelltypabhängig beschrieben ist (Brosh and Rotter 2009), wurde die Regulation dieser Gene in zwei weiteren humanen Tumorzelllinien getestet, die die gleiche endogene p53-Mutation (R273H) wie U251 Zellen tragen. Die Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-468 und die HT29 Kolon-Karzinom-Zelllinie wurden nach dem gleichen Protokoll wie U251 Zellen transient mit scr- und p53-siRNAs transfiziert. Zu den Zeitpunkten 48 h, 72 h und 96 h nach Transfektion wurden RNA

und Proteine isoliert. Nach reverser Transkription der RNA wurde die Regulation der Gene *GAS1*, *HTR2A*, *PMEPA1*, *BDKRB1* und *HAS2* mittels qPCR untersucht. Die mutp53-Depletion wurde im Western Blot analysiert. In HT29 Zellen war 48 h und 96 h nach Transfektion nur eine schwache mutp53-Depletion zu beobachten (Abb. 14A). In MDA-MB-468 Zellen entsprachen Effizienz und Zeitverlauf der mutp53-Depletion den Ergebnissen aus U251 Zellen (Abb. 14A, vgl. Abb. 8E). Für die qPCR-Analyse der aus U251 Zellen identifizierten mutp53-Zielgene wurden für die HT29 Zellen der Zeitpunkt 48 h nach Transfektion und für die MDA-MB-468 Zellen der Zeitpunkt 96 h nach Transfektion gewählt (Abb. 14B).



**Abbildung 14: Expressionsänderungen von in U251 Zellen validierten mutp53-Zielgenen in HT29 und MDA-MB-468 Zellen.**

HT29 und MDA-MB-468 Zellen wurden mit p53-siRNA, scr-Kontrolle und nur dem Transfektionsreagenz (mock) transfiziert. 48 h, 72 h und 96 h nach Transfektion wurden Gesamtzelllysate hergestellt und Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. **A.** Detektion der mutp53-Proteinmenge 48 h, 72 h und 96 h nach Transfektion im WB. Als Ladungskontrolle in den WBs dienten HSC70 und Tubulin **B.** Die Expressionsänderungen der Gene *GAS1*, *HTR2A*, *PMEPA1*, *BDKRB1* und *HAS2* gegenüber der scr-Probe wurden in der qPCR gemessen.



Für *GAS1*, *PMEPA1* und *BDKRB1* war keine signifikante Veränderung der Expression in sip53-transfizierten Zellen gegenüber der Kontrolle sichtbar. *HTR2A* ist in HT29 Zellen nicht detektierbar und in MDA-MB-468 Zellen so schwach exprimiert, dass die Messungen stark schwankten und somit keine Aussage über eine Expressionsänderung gemacht werden kann. Für *HAS2* war in HT29 und MDA-MB-468 Zellen wiederum keine signifikante Veränderung der Expression nach mutp53-Depletion festzustellen. In MDA-MB-468 Zellen lag auch *HAS2* an der Detektionsgrenze und es traten wiederum starke Schwankungen in der Messung auf. Die Tatsache, dass keines der mutp53-Zielgene aus U251 Zellen in HT29 oder MDA-MB-468 Zellen signifikant reguliert ist, ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Genregulation durch mutp53 vom untersuchten Zelltyp abhängig ist.

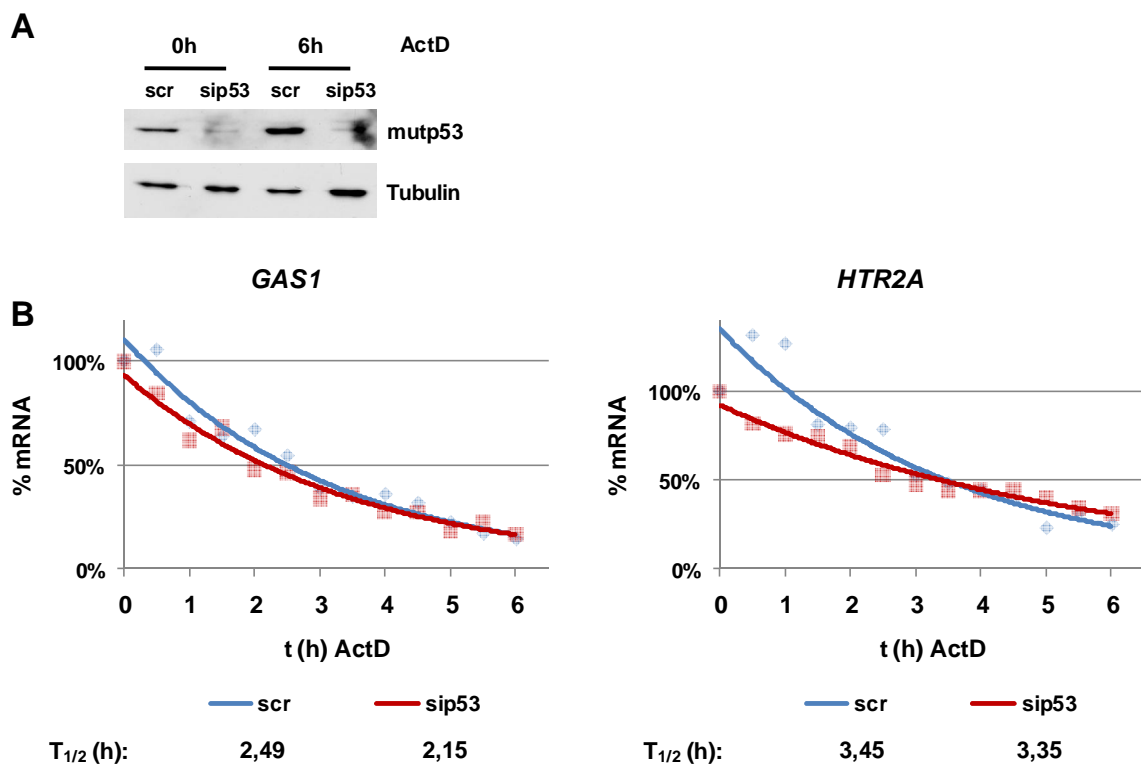
### **3.5 Molekulare Grundlagen der Genregulation durch mutp53 in U251 Zellen**

#### **3.5.1 Mutp53 reguliert Gene auf transkriptioneller Ebene**

Die Regulation der Transkriptmenge kann auf zwei übergeordneten Ebenen stattfinden. Entweder wird die Transkription selbst reguliert, oder es kommt zu einer posttranskriptionellen Regulation durch Änderung der RNA-Stabilität. Um die möglichen Ebenen der Regulation durch mutp53 einzuengen, wurde zunächst untersucht, ob eine posttranskriptionelle Regulation in Form von veränderter RNA-Stabilität vorliegt. Dafür wurden exemplarisch die Transkripte der beiden stark regulierten Gene *GAS1* und *HTR2A* getestet.

Für das *GAS1* Gen ist lediglich bekannt, dass es vornehmlich auf transkriptioneller Ebene kontrolliert wird (Ciccarelli et al. 1990). Für *HTR2A* gibt es in der Literatur keine Hinweise auf die Art der Regulation oder beteiligte Faktoren. U251 Zellen wurden mit siRNA und scr-Kontrolle transfiziert und 96 h nach Transfektion bei maximalem mutp53-*knockdown* wurde die Transkription durch Zugabe von Actinomycin D (ActD; 1 µg/ml Endkonzentration) gestoppt. Anschließend wurde in einer Zeitreihe alle 30 min RNA isoliert und die Transkriptmengen von *GAS1* und *HTR2A* mittels qPCR bestimmt. Die Transkriptmengen zu den einzelnen Zeitpunkten wurden jeweils in Prozent der bei Start der ActD-Behandlung (0 h) gemessenen Transkriptmengen dargestellt (Abb. 15). Die Abnahme der Transkriptmengen wurde näherungsweise über eine Exponentialfunktion beschrieben, aus der eine Halbwertszeit errechnet werden kann. Die berechnete Halbwertszeit von 2,49 h bzw. 2,15 h für *GAS1* in scr-

bzw. p53-siRNA-transfizierten Zellen entspricht der in der Literatur beschriebenen Halbwertszeit von  $\sim 2$  h (Ciccarelli et al. 1990). Für *HTR2A* ergeben sich Halbwertszeiten von 3,45 h bzw. 3,35 h für scr- bzw. siRNA-behandelte Zellen. In beiden Fällen sind die Halbwertszeiten von siRNA- und Kontrollprobe nahezu identisch. Die 4- bis 12-fachen Unterschiede in der Transkription zwischen mutp53-depletierten Zellen und Kontrollzellen lassen sich folglich nicht über Veränderungen in der mRNA-Stabilität erklären. Dieses Ergebnis deutet stark auf eine transkriptionelle Regulation durch mutp53 hin.



**Abbildung 15: Analyse der Stabilität der *GAS1*- und *HTR2A*-Transkripte nach mutp53-Depletion in U251 Zellen.**

U251 Zellen wurden mit scr- und p53-siRNA transfiziert und 96 h nach Transfektion wurde die Transkription durch Zugabe von ActD (1  $\mu$ g/ml Endkonzentration) gestoppt. Über einen Zeitraum von 6 h wurde alle 30 min Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. **A.** Detektion von mutp53 in scr- und sip53-transfizierten Zellen zu Beginn und am Ende der ActD-Behandlung. Als Ladungskontrolle im WB diente Tubulin. **B.** *GAS1*- und *HTR2A*-Transkripte wurden mittels qPCR gemessen und für die sip53- und scr-transfizierten Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten in Prozent der Transkriptmenge bei Beginn der ActD-Behandlung (0 h) dargestellt. Die Abnahme der Transkriptmengen wurde näherungsweise durch eine Exponentialfunktion beschrieben. Aus der entsprechenden Funktion wurden Halbwertszeiten für die Transkripte berechnet.

### 3.5.2 Ebenen der transkriptionellen Regulation durch mutp53 in U251 Zellen

Die Transkription eukaryontischer Gene wird auf mehreren Ebenen kontrolliert, die sich wiederum gegenseitig beeinflussen. Neben der Bindung sequenzspezifischer Transkriptionsfaktoren und der Rekrutierung von Ko-Faktoren und der basalen

Transkriptionsmaschinerie spielt die Zugänglichkeit der DNA eine Rolle, die durch Histonmodifikationen und Chromatin-Remodeling Komplexe gesteuert wird (vgl. 1.5.1.1 und 1.5.1.2). Sowohl die Bindung von Transkriptions- und Ko-Faktoren als auch die Anwesenheit von Histonmodifikationen und die Besetzung von Genpromotoren mit RNA-Polymerase II (Pol II) kann mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) untersucht werden. Eine Kopplung der ChIP-Methodik mit anschließender Analyse per Microarray (ChIP-chip) ermöglicht eine flächendeckende Analyse ganzer Genregionen auf Histonmodifikationen oder auf die Bindung bestimmter Faktoren. Um die Analyse der mutp53-Effekte auf transkriptioneller Ebene zu vertiefen und gleichzeitig auf weitere Gene auszuweiten, wurde ein Microarray konstruiert, der den Großteil der Gene umfasst, die in den Expressionsanalysen nach mutp53-Depletion in drei biologischen Replikaten reguliert waren. Zusätzlich befinden sich auf dem Array Gene, die in einem anderen Zellsystem als potentielle mutp53- sowie wtp53-Zielgene identifiziert wurden (vgl. 2.2.3.12.1). Der Microarray wurde so erstellt, dass die gesamten genomischen Regionen inklusive 1500 bp vor Transkriptionsstart (TSS) und 1500 bp nach Transkriptionsstopp abgedeckt sind. Mit Hilfe dieses Microarrays sollte die Besetzung der Promotoren von mutp53-regulierten Genen mit Histonmodifikationen und Pol II untersucht werden.

### 3.5.3 Mutp53 moduliert die Transkription von aktiven Genen

Die globale Expressionsanalyse nach mutp53-Depletion in U251 Zellen und die anschließende Validierung potentieller Zielgene zeigen, dass für einen Großteil der differentiell regulierten Gene sowohl in der Kontrolltransfektion als auch nach mutp53-Reduktion Transkripte detektierbar sind (vgl. 3.3 und 3.4). D.h., es findet offenbar keine *de novo* Aktivierung der Transkription oder ein Abschalten von Genen durch mutp53 statt. Aus diesem Grund wurde der Fokus auf Veränderungen der Histon H3 Lysin 4 Trimethylierung (H3K4Me3) und Histon H3 Lysin 9 Acetylierung gelegt, zwei charakteristische Marker für aktive Promotoren. Histonmodifikationen, die mit Heterochromatinbildung assoziiert sind und DNA-Methylierung wurden hingegen aus der Analyse ausgeschlossen. Zusätzlich wurde die Besetzung mit initiations- und elongationskompetenter Pol II untersucht, die sich durch Phosphorylierungen der Serine 5 (Pol II S5-P) bzw. 2 (Pol II S2-P) in der CTD auszeichnen (vgl. 1.5.1.3).

U251 Zellen wurden mit p53-siRNA und scr-siRNA transfiziert und 96 h nach Transfektion für die ChIP-chip-Analyse geerntet. Proteine und DNA wurden mittels Formaldehyd vernetzt

und mit spezifischen Antikörpern präzipitiert. Je zwei biologische ChIP-Replikate für H3K4Me3, H3K9Ac, Pol II S2-P und Pol II S5-P wurden auf dem erstellten Microarray analysiert. Die ChIP-Proben mit spezifischen Antikörpern wurden nach der ChIP-Prozedur mit einem Kit amplifiziert, fluoreszenzmarkiert und jeweils kompetitiv mit den Input-Proben hybridisiert. Aus beiden Signalen wurde für alle Sonden auf dem Microarray die Anreicherung in den Proben mit spezifischen Antikörpern gegenüber Input errechnet. So ergibt sich für jeweils zwei biologische Replikate von scr- und mutp53-siRNA-transfizierten Zellen ein Signalverlauf für die jeweiligen Modifikationen über die gesamten genomischen Regionen. Für eine globale Analyse der Besetzungen von H3K4Me3, H3K9Ac, Pol II S2-P und Pol II S5-P wurden die beiden biologischen Replikate gemittelt und die jeweiligen *peak*-Regionen in den gemittelten Anreicherungsprofilen mittels der Carpet Software (Cesaroni et al. 2008) auf der Galaxy/IFOM IEO Webseite (<http://host13.bioinfo3.ifom-ieo-campus.it:8080>) identifiziert.

Für eine graphische Darstellung der Ergebnisse anhand einiger ausgewählter Gene wurde jeweils die Anreicherung in Proben mit spezifischem Antikörper gegen die Sondenposition für ein repräsentatives Experiment aufgetragen. Die Werte für die Anreicherung der ChIP-Probe gegenüber Input sind als log<sub>2</sub> aufgetragen. Unter dem Diagramm befindet sich ein Schema der genomischen Region zur Orientierung. Exons sind als schwarze Balken dargestellt. Dünne schwarze Linien kennzeichnen Introns. Unterhalb des Gens sind, sofern vorhanden, CpG-Inseln als schwarze Balken dargestellt.

Die globale Analyse der H3K4Me3 Signale zeigt, dass etwa 80% der auf dem Microarray vertretenen Gene diese Modifikation in U251 Zellen tragen. Im Vergleich zur Kontrolltransfektion kommt es nach mutp53-Depletion bei der H3K4Me3-Besetzung zu keinen signifikanten Veränderungen. Diese Daten zeigen, dass sich die Promotoren unabhängig von der mutp53-Depletion in einem aktiven Grundzustand befinden und bestätigen somit das Ergebnis der globalen Expressionsanalyse in U251 Zellen nach mutp53-Depletion (vgl. 3.3).

Entsprechend zeigen die H3K4Me3-Profile für *GAS1* und *HTR2A* keine signifikanten Veränderungen zwischen scr- und sip53-transfizierten Zellen (Abb. 16A, B). Beide Promotorregionen zeigen ein starkes H3K4Me3-Signal mit einem Maximum um den TSS. Für *GAS1* ist auch in der 3'-UTR ein starkes Signal vorhanden, während die transkribierte Region nahezu frei von H3K4Me3 ist. Bei *HTR2A* ist die H3K4Me3 Modifikation auf einen Bereich vom Promotor bis zum Exon 3 beschränkt. In Exon 2 kommt es zu einem lokalen Abfall der Signalstärke. Für beide Gene decken sich die Profile der scr- und sip53-

transfizierten Zellen im Promotor praktisch vollständig. Für *GAS1* ist lediglich in der 3'-UTR eine leichte Verbreiterung und Erhöhung des Signals sichtbar, was auf eine erhöhte Transkription infolge der mutp53-Depletion hindeutet. Bei *HTR2A* ist die Tendenz zur Verbreiterung des Signals im Bereich nach Exon 3 leicht zu erkennen.

Die Profile von H3K9Ac über das *GAS1* Gen spiegeln die Verteilung von H3K4Me3 wider. Es ist ein Maximum um den TSS zu erkennen, die translatierte Region ist nahezu frei von H3K9Ac und in der 3'-UTR ist erneut ein Maximum. In der 3'-UTR sind wiederum eine Verbreiterung und eine Zunahme der Signalstärke in den sip53-transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu sehen. Für *HTR2A* zeigt die H3K9Ac-Besetzung etwas deutlichere Veränderungen in mutp53-depletierten Zellen. Zwar ist in scr- und sip53-transfizierten Zellen jeweils ein starkes H3K9Ac Signal in der Promotorregion vorhanden, allerdings ist dieses in den mutp53-depletierten Zellen leicht erhöht und verbreitert. Wiederum ist ein Signalabfall in Exon 2 zu sehen, der sich mit dem Abfall des H3K4Me3 Signals deckt.

Für *GAS1* und *HTR2A* zeigen die Profile für die aktiven Histonmodifikationen folglich aktive Promotoren und lediglich leichte Zunahmen nach mutp53-Depletion. Diese korrelieren allerdings mit der beobachteten Erhöhung der Transkription (vgl. 3.4).

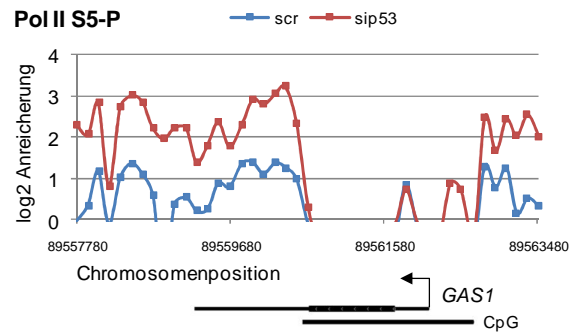
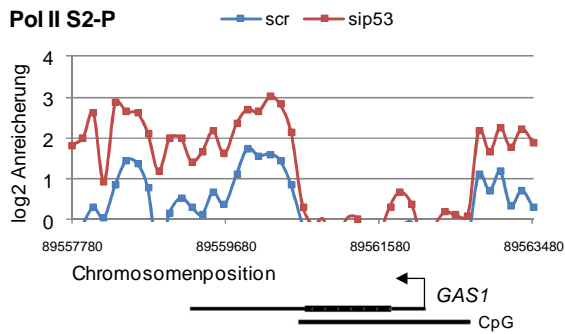
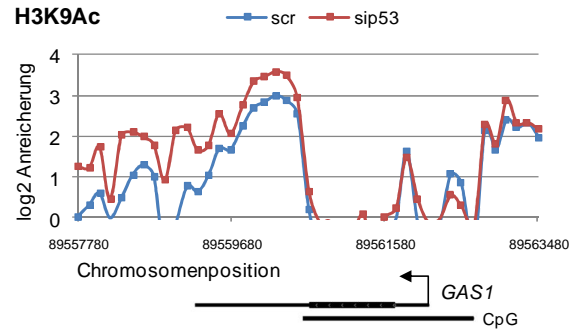
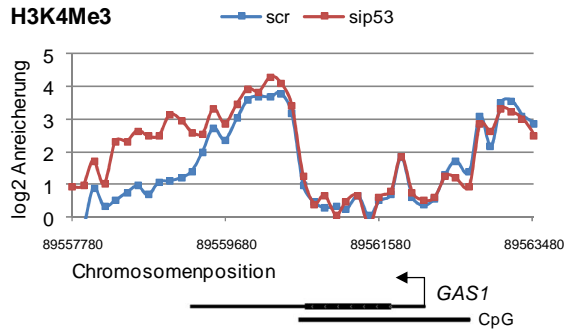
Bei der Verteilung initiations- (Pol II S5-P) und elongationskompetenter Pol II (Pol II S2-P) über die beiden Gene sind die Effekte nach mutp53-Depletion deutlich stärker (Abb. 16A, B). In der Promotorregion und der 3'-UTR von *GAS1* sind die Signale in den sip53-transfizierten Zellen gegenüber der scr-Kontrolle sowohl für Pol II S5-P als auch Pol II S2-P auf etwa das zweifache erhöht. Der Verlauf der Signale ist hingegen nahezu identisch und in der translatierten Region von *GAS1* ist keine Pol II-Besetzung messbar. Für den *HTR2A*-Promotor sind in den scr-transfizierten Zellen für Pol II S5-P und Pol II S2-P nur schwache Signale um den TSS und in Exon 2 sichtbar. Diese könnten pausierende Pol II darstellen. In den sip53-transfizierten Zellen ist hingegen ähnlich der Histonmodifikationen über den gesamten Promotorbereich bis zu Exon 3 eine starke Besetzung mit Pol II S5-P und Pol II S2-P messbar. Lediglich an der Stelle in Exon 2, an der die Signale für die Histonmodifikationen abfallen, gehen auch die Pol II Signale zurück. Somit korrelieren für beide Gene die Zunahme der Pol II-Besetzung und der -Prozessivität mit erhöhten Transkriptmengen in den sip53-transfizierten Zellen.

Die für *GAS1* und *HTR2A* beobachteten Veränderungen der Histonmodifikationen und der Pol II-Prozessivität nach mutp53-Depletion lassen sich auch für die anderen validierten Gene beobachten. Für *PMEPA1* (Abb. 16C) sind die H3K4Me3- und H3K9Ac-Signale um den TSS für sip53- und scr-behandelte Zellen sehr ähnlich. Sie zeigen jeweils *peaks* um das zweite

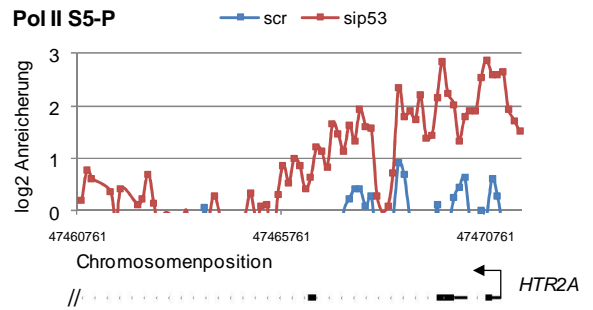
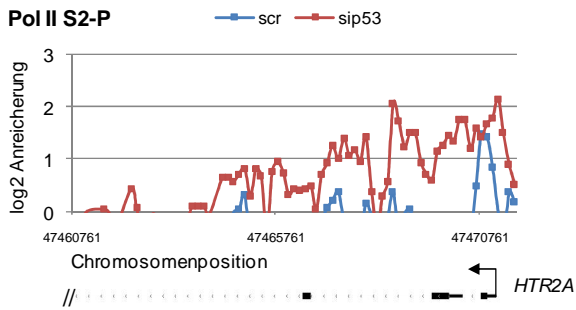
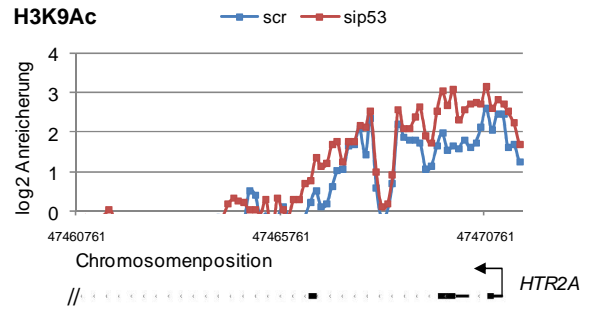
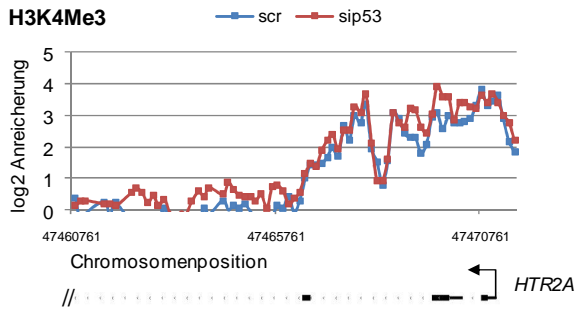
Exon und nach Exon 3, während das Exon 3 selbst frei von diesen Histonmodifikationen ist. Die Pol II S2-P-Besetzung ist an Exon 2 und nach Exon 3 in mutp53-depletierten Zellen leicht erhöht, während die scr-Kontrolle weiter innerhalb Intron 3 etwas mehr Pol II S2-P aufweist. Pol II S5-P ist in den sip53-transfizierten Zellen vor Exon 3 leicht und danach deutlich messbar, während die scr-behandelten Zellen nur ein sehr schwaches Signal zeigen. *BDKRB1* (Abb. 16D) weist über das gesamte Gen H3K4Me3-Signale auf. Ein *peak* befindet sich unmittelbar am TSS, dann nimmt das Signal im ersten Drittel von Intron 1 leicht ab und ist bis zum Transkriptionsstopp wieder verstärkt. In mutp53-depletierten Zellen ist das H3K4Me3-Signal vom TSS bis etwa zur Mitte von Intron 1 gegenüber der scr-Kontrolle leicht erhöht. Das H3K9Ac-Signal ist bei *BDKRB1* hingegen auf einen *peak* am TSS beschränkt. Das Signal für sip53-behandelte Zellen ist leicht erhöht. Die Pol II S2-P-Besetzung zeigt Signale vor, und für mutp53-depletierte Zellen zusätzlich direkt nach, dem TSS, während Pol II S5-P am TSS nur in den sip53-transfizierten Zellen messbar ist. Für *HAS2* sind die Unterschiede zwischen Kontrolle und mutp53-depletierten Zellen wiederum sehr deutlich (Abb. 16E). Die Signale für die H3K4Me3 und H3K9Ac sind für beide Proben sehr stark und nahezu identisch vom Promotor über den TSS bis in Exon 2. Zu Beginn von Exon 2 gibt es ein lokales Minimum für beide Histonmodifikationen. Nach Exon 2 fallen die Signale in den scr-Proben steil ab, während sie für die sip53-transfizierten Zellen langsam abflachen und auslaufen. Die Besetzung des *HAS2*-Promotors mit Pol II S2-P und Pol II S5-P zeigt für die Kontrollprobe jeweils drei schwache *peaks* am TSS sowie vor und nach Exon 2. In den mutp53-depletierten Zellen ist hingegen für beide Pol II-Formen ein starkes Signal über den gesamten Promotor bis in Intron 2 hinein vorhanden, das lediglich zu Beginn von Exon 2 jeweils kurz abfällt. Schwächere Pol II-Signale sind bis weit in das Gen hinein vorhanden.

Somit korrelieren auch für *PMEPA1*, *BDKRB1* und *HAS2* die Zunahme der Histonmodifikationen und die Besetzung mit initiations- bzw. elongationskompetener Pol II mit der beobachteten Zunahme der Transkription nach mutp53-Depletion (vgl. 3.4).

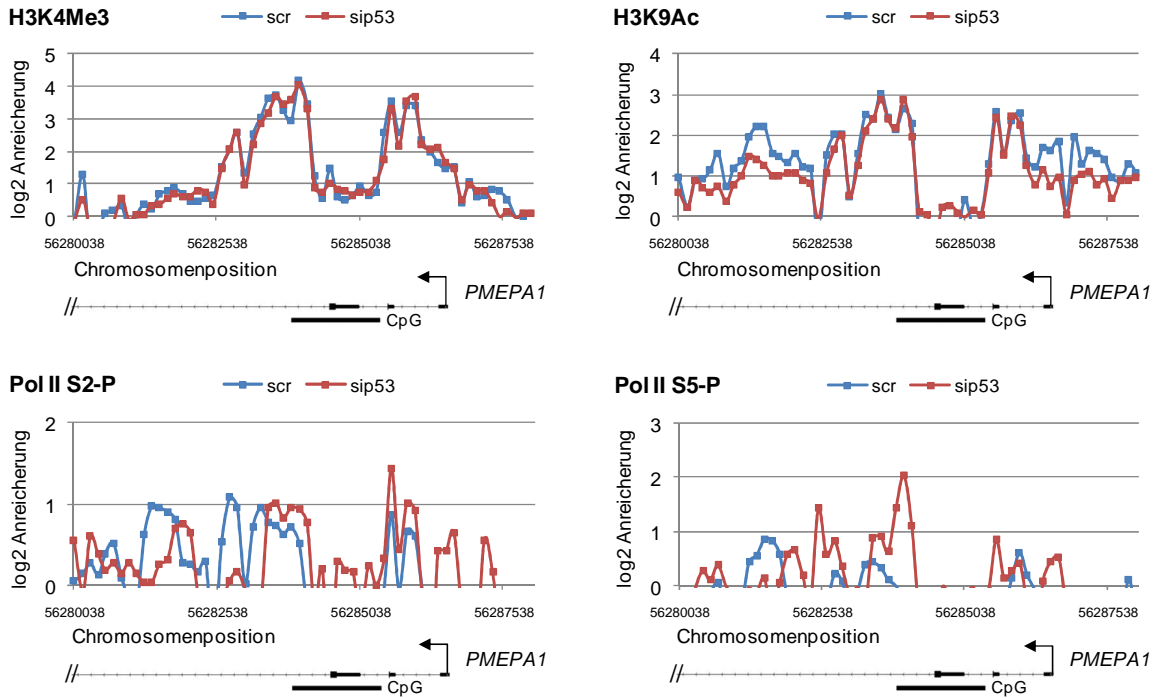
**A**



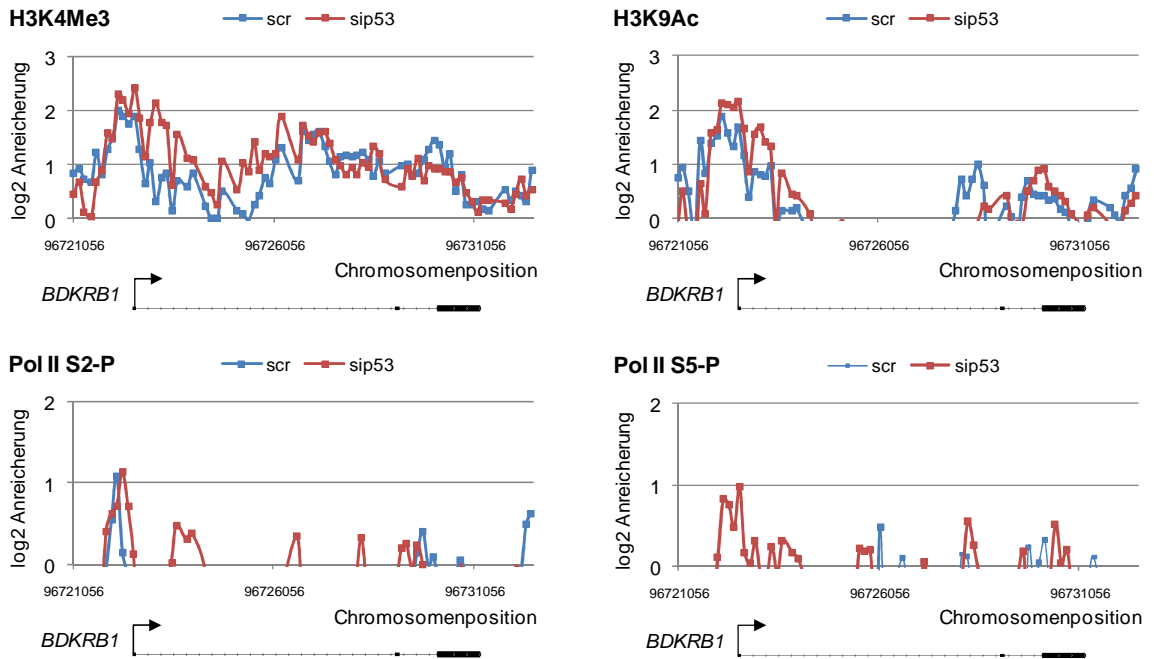
**B**



C

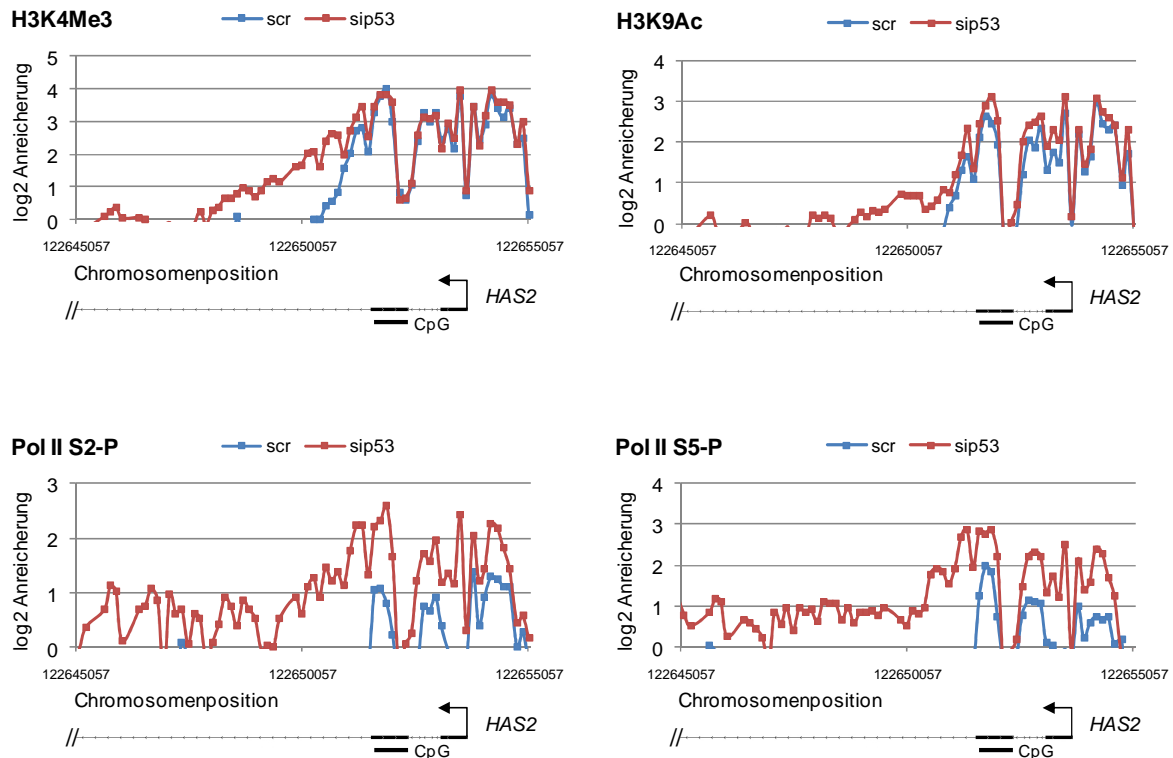


D





## E



**Abbildung 16: ChIP-chip-Profile für *GAS1* (A), *HTR2A* (B), *PMEPA1* (C), *BDKRB1* (D) und *HAS2* (E).**

U251 Zellen wurden mit p53- und Kontroll-siRNA transfiziert und 96 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Formaldehyd vernetzt, lysiert und für ChIP-Experimente mit Antikörpern gegen H3K4Me3, H3K9Ac, Pol II S2-P und Pol II S5-P eingesetzt. Die gewonnene ChIP-DNA wurde amplifiziert, fluoreszenzmarkiert und jeweils kompetitiv mit dem Input auf einen NimbleGen 12 x 135k Custom Microarray hybridisiert. Jede Sondenposition auf dem Microarray liefert ein Verhältnis der Signale in der Probe gegenüber dem Input, das als log<sub>2</sub>-Wert ausgedrückt wird. Der Signalverlauf in scr- und sip53-transfiziertem Zellen ist über die gesamte genomische Region oder die Promotorregion für die fünf mutp53-regulierten Gene dargestellt. Unter den Diagrammen sind die Gene dargestellt. Der Pfeil markiert den Transkriptionsstart, schwarze Balken entsprechen Exons, wobei die dickeren Balken für translatierte Bereiche stehen. Introns sind als dünne schwarze Linien dargestellt. Unter den Genen sind CpG-Inseln in schwarz dargestellt.

Die Ergebnisse der ChIP-chip-Experimente wurden am Beispiel von *GAS1* und *HTR2A* mittels qPCR validiert. Während die Microarray-Daten eine Analyse der Verteilung von Histonmodifikationen und Pol II über die gesamten Gene bzw. Promotorregionen erlauben, ist die Analyse von ChIP-Proben in der qPCR auf kleine Regionen entsprechend der PCR-Amplifikons beschränkt. Allerdings erlaubt die qPCR eine höhere Sensitivität in der Detektion von Unterschieden zwischen Proben; weiterhin ist keine Amplifikation der Proben wie für den Microarray nötig. Aus den ChIP-chip-Profilen lassen sich die Regionen mit den stärksten Signalen entnehmen (*peaks*). Für die qPCR-basierte ChIP-Auswertung wurden jeweils ein Amplikon in den *peak*-Regionen sowie ein benachbartes Amplikon gewählt. Neben H3K4Me3, H3K9Ac, Pol II S5-P und Pol II S2-P wurde ein zusätzlicher ChIP-Ansatz mit

einem Antikörper gegen Gesamt-Pol II mit in die qPCR-basierte ChIP-Analyse einbezogen. Anhand des Gesamt-Pol II-Ansatzes lässt sich beurteilen, ob die beobachteten Unterschiede in Pol II S5-P und Pol II S2-P sich lediglich aus unterschiedlichen Modifikationen der vorhandenen Pol II ergeben oder ob es auch Unterschiede in der Gesamtmenge an Pol II an den Promotoren gibt. Die Abbildungen 17 und 18 zeigen die Ergebnisse der qPCR-basierten Auswertung für *GAS1* und *HTR2A* für jeweils ein repräsentatives Experiment und die Zusammenfassung von drei biologischen Replikaten. Für das Einzelexperiment sind die Signale für scr- und sip53-transfizierte Zellen jeweils als Prozent der eingesetzten Probenmenge, die im jeweiligen Ansatz durch den Antikörper präzipitiert wurde, präsentiert (% Input). Außerdem ist ein Ansatz mit unspezifischem Antikörper als Kontrolle dargestellt. Für die Zusammenfassung der drei biologischen Replikate wurde pro Einzelexperiment jeweils die Änderung zwischen scr- und sip53-transfizierte Zellen bestimmt (*fold change*; FC) und daraus ein Mittelwert errechnet.

Für *GAS1* zeigt die H3K4Me3-Besetzung an beiden analysierten Loci in scr- und sip53-transfizierte Zellen keine signifikante Veränderung. Beim Amplikon nahe des TSS ist eine leichte Tendenz zu einer Abnahme des H3K4Me3-Signals in sip53-transfizierte Zellen gegenüber der scr-Kontrolle zu erkennen. Dies könnte auf eine Depletion von Histonen infolge verstärkter Transkription hindeuten. Das H3K9Ac-Signal ist in sip53-transfizierten Zellen 1,5-2-fach erhöht, und sowohl das Signal für Pol II als auch die Signale für beide Pol II-Phosphorylierungen sind in den sip53-transfizierten Zellen 2,5-4-fach stärker.

Für *HTR2A* ist das H3K4Me3-Signal in Kontrollprobe und sip53-Ansatz für beide untersuchten Loci nahezu unverändert. Die Besetzung mit H3K9Ac nimmt hingegen nach mutp53-Depletion um den Faktor drei zu. Auch die Mengen an Gesamt-Pol II, Pol II S5-P und Pol II S2-P sind nach sip53-Behandlung gegenüber der Kontrolle etwa 2-4-fach erhöht.

Für beide Gene wurden somit die Ergebnisse der ChIP-chip-Experimente insgesamt bestätigt und um zwei Aussagen erweitert. Die erhöhte Sensitivität der qPCR erlaubt den eindeutigen Nachweis, dass die H3K9Ac-Besetzung für beide Gene nach mutp53-Depletion ansteigt, und dass neben phosphorylierter initiations- (Pol II S5-P) und elongationskompetenter Pol II (Pol II S2-P) auch die Gesamtmenge an Pol II an beiden Promotoren zunimmt.

Die ChIP-chip-Profile und die qPCR-Daten zeigen, dass die Promotoren mutp53-regulierter Gene in einem aktiven Grundzustand vorliegen, bzw. die Bereitschaft für eine Aktivierung aufweisen. Dies wird charakterisiert durch die „aktiven“ Histonmodifikationen H3K4Me3 und H3K9Ac. In unterschiedlichem Maße ist auch bereits Pol II in initiations- (Pol II S5-P) und elongationskompetenter (Pol II S2-P) Form an den Promotoren vorhanden. Infolge der

Depletion von mutp53 kommt es zur Zunahme der Histonmodifikationen und einem starken Anstieg in der Besetzung mit den beiden aktiven Pol II-Formen, im Falle von *GAS1* und *HTR2A* auch von Gesamt-Pol II, was mit dem Anstieg der Transkription dieser Gene korreliert.

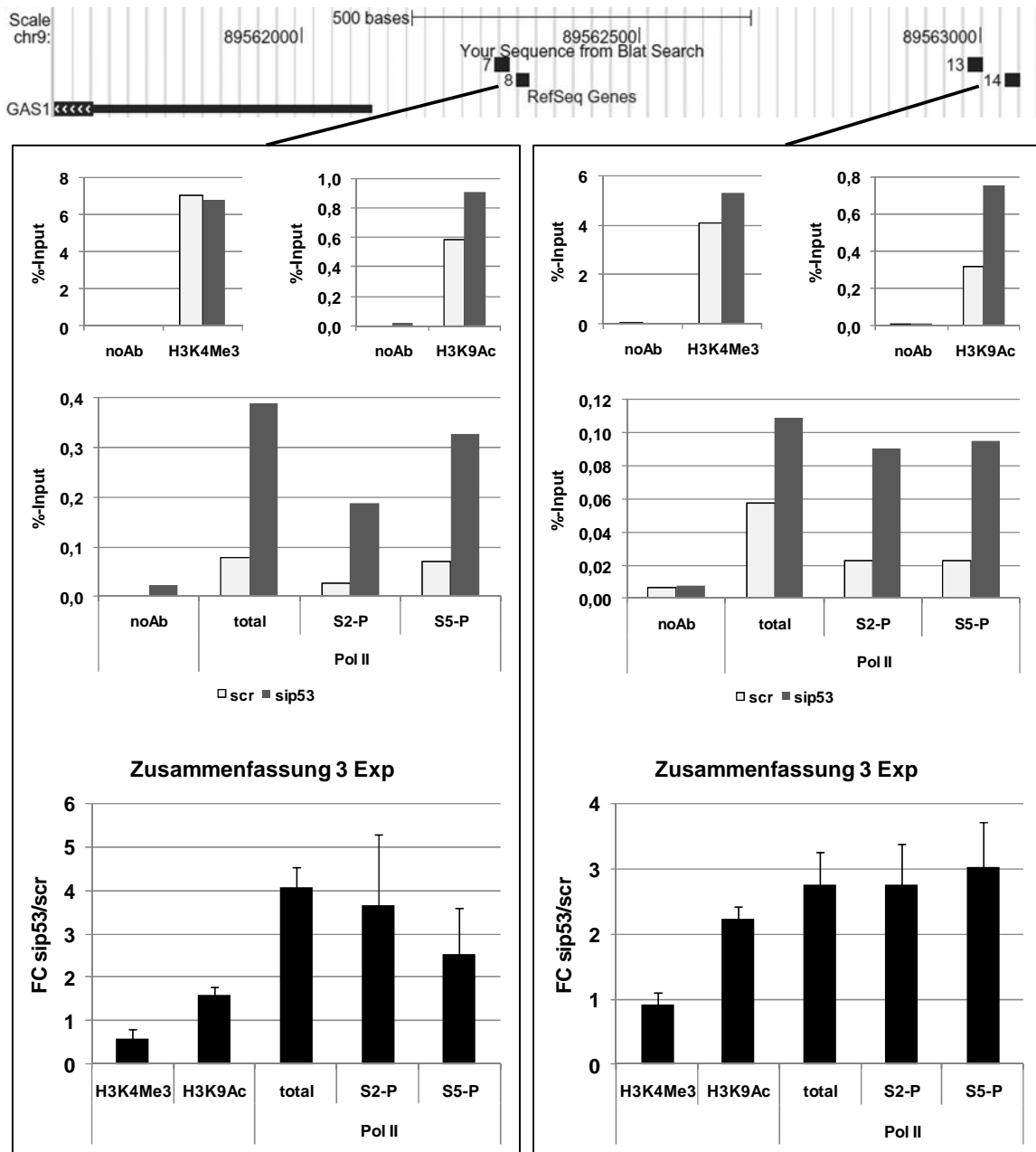
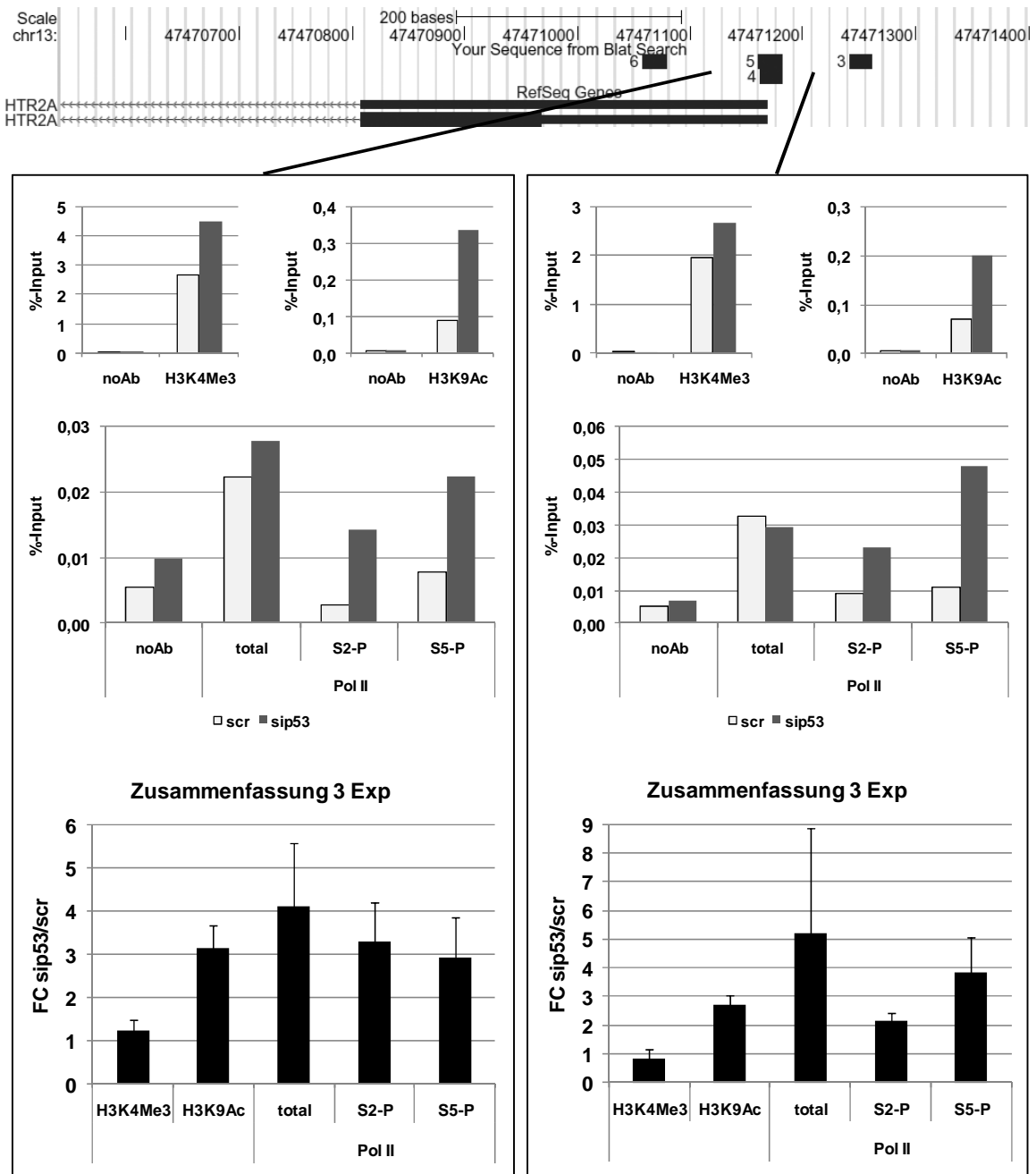


Abbildung 17: qPCR-basierte ChIP-Analyse für *GAS1*.

U251 Zellen wurden mit p53- und Kontroll-siRNA transfiziert und 96 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Formaldehyd vernetzt, lysiert und für ChIP-Experimente mit Antikörpern gegen H3K4Me3, H3K9Ac, Pol II S2-P und Pol II S5-P eingesetzt. Die gewonnene ChIP-DNA wurde in der qPCR mit zwei Primerpaaren in der *GAS1*-Promotorregion analysiert. Der Beginn des *GAS1*-Gens und die Primerpositionen sind oben im Ausschnitt zu sehen. Darunter sind für beide Primerpaare die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments dargestellt. Die Werte in den Proben aus scr- und sip53-transfizierten Zellen wurden als Prozent der eingesetzten DNA (Input) berechnet. Unten sind Ergebnisse aus drei biologischen Replikaten zusammen gefasst. Es wurde jeweils die Änderung des %-Input-Wertes in den sip53-transfizierten Zellen gegenüber der scr-Kontrolle (*fold change*; FC) berechnet und der Mittelwert mit Standardfehler dargestellt.



**Abbildung 18: qPCR-basierte ChIP-Analyse für *HTR2A*.**

U251 Zellen wurden mit *p53*- und Kontroll-siRNA transfiziert und 96 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Formaldehyd vernetzt, lysiert und für ChIP-Experimente mit Antikörpern gegen H3K4Me3, H3K9Ac, Pol II S2-P und Pol II S5-P eingesetzt. Die gewonnene ChIP-DNA wurde in der qPCR mit zwei Primerpaaren in der *HTR2A*-Promotorregion analysiert. Der Beginn des *HTR2A*-Gens und die Primerpositionen sind oben im Ausschnitt zu sehen. Darunter sind für beide Primerpaare die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments dargestellt. Die Werte in den Proben aus scr- und sip53-transfizierten Zellen wurden als Prozent der eingesetzten DNA (Input) berechnet. Unten sind Ergebnisse aus drei biologischen Replikaten zusammen gefasst. Es wurde jeweils die Änderung des %-Input-Wertes in den sip53-transfizierten Zellen gegenüber der scr-Kontrolle (*fold change*; FC) berechnet und der Mittelwert mit Standardfehler dargestellt.

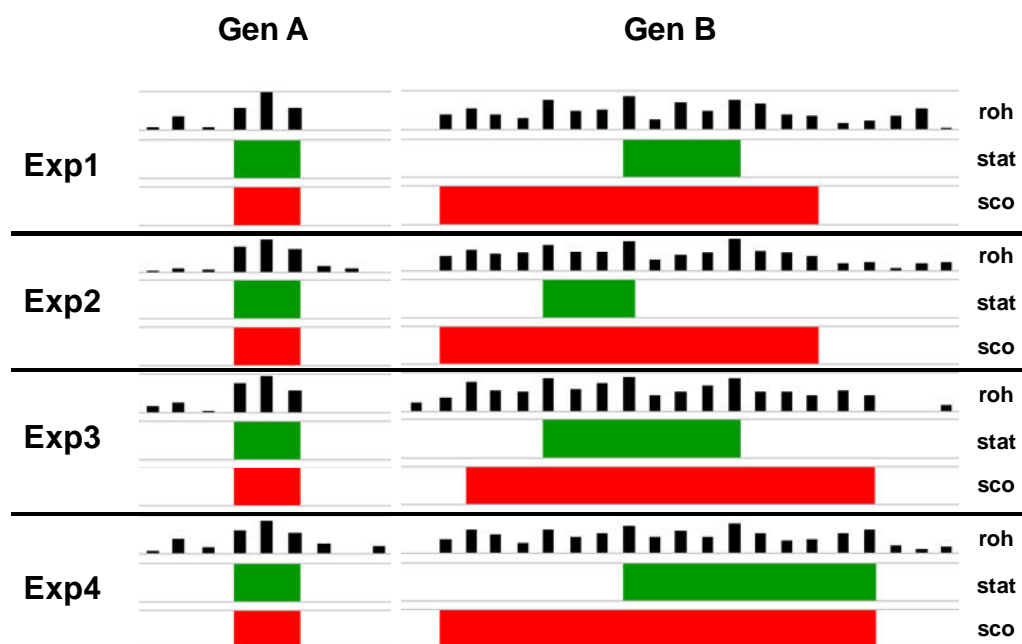
### 3.5.4 Verteilung von mutp53-Bindestellen in U251 Zellen

Mutp53 hat die sequenzspezifische Bindung an DNA verloren, die für wtp53 die Grundlage der transkriptionellen Regulation ist. Trotzdem konnte für diverse mutp53-regulierte Gene eine Assoziation von mutp53 mit deren Promotoren gezeigt werden. In einigen dieser Fälle konnte ein anderer Transkriptionsfaktor als Interaktionspartner von mutp53 identifiziert werden, der über Protein-Protein-Interaktionen eine mutp53-Rekrutierung an die Promotoren vermittelt (vgl. 1.6.2). Außerdem weisen einige Studien darauf hin, dass mutp53 in der Lage ist direkt an DNA zu binden, wenn diese Sekundärstrukturen annimmt, die von der B-Konformation abweichen. Diese Bindung scheint sequenzunspezifisch zu sein. Daher gibt es bisher keine genaue Definition dieser Strukturen, beispielsweise in Form bestimmter gebundener Sequenzmotive. Allerdings scheint die Bindung verstärkt in repetitiven DNA-Bereichen aufzutreten, für die eine strukturelle Flexibilität und nicht-B-Konformationen vorhergesagt werden. Um zu testen, ob mutp53 in U251 Zellen mit den von ihm regulierten Genen assoziiert ist, wurden ChIP-chip-Experimente mit einem Antikörper gegen p53 durchgeführt. Es wurde der gleiche Microarray wie für die Histonmodifikationen und die phosphorylierten Pol II-Formen verwendet. Somit waren wiederum die gesamten genomischen Regionen von Genen abgedeckt. Bei den mutp53-ChIP-Experimenten wurde mit vier biologischen Replikaten gearbeitet. Drei Proben davon wurden nach einem Standard-ChIP-Protokoll behandelt. Bei der vierten Probe wurden vor der Vernetzung von DNA und Proteinen zunächst die Kerne isoliert und dann unter milden Bedingungen extrahiert (vgl. 2.2.2.9). So sollte mutp53 in der löslichen Kernfraktion abgetrennt werden, um insbesondere das chromatinassoziierte mutp53 in der ChIP-Reaktion zu präzipitieren. Sowohl eine strukturabhängige, sequenzunspezifische Bindung von mutp53 mit einer erhöhten Tendenz zur Bindung an repetitive DNA-Bereiche (vgl. 1.6.2) als auch Interaktionen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren könnten eine hohe Variabilität in der mutp53-Bindung bedeuten, die die in den Genexpressionsanalysen beobachtete Heterogenität nach sich ziehen könnte. Die vier Replikate inklusive einer alternativen ChIP-Prozedur sollten die Möglichkeit bieten, starke (in allen Experimenten reproduzierbare) Assoziationen von mutp53 klar von schwachen Bindungen zu trennen. Aus den vier biologischen Replikaten wurden die ChIP-Proben wiederum amplifiziert, fluoreszenzmarkiert und kompetitiv mit dem Input hybridisiert. Daraus lieferte jede Sonde auf dem Array ein Signal für die Anreicherung der jeweiligen Bereiche in der Probe mit p53-Antikörper gegenüber dem Input. Daraus lassen sich wie für die Histonmodifikationen und Pol II Verläufe der mutp53-Bindung über die gesamten Genregionen darstellen.

Zunächst wurden die mutp53-Bindestellen aus den vier einzelnen Experimenten einer bioinformatischen Analyse unterzogen, um die mutp53-Binderegionen (*peaks*) zu identifizieren. Es wurden zunächst zwei Möglichkeiten der Analyse getestet und die Ergebnisse durch visuelle Inspektion der mutp53-Anreicherungsprofile verglichen. Die erste Analyse erfolgte mit einer Standard-Methode der *peak*-Identifikation mit der NimbleScan Software. Die Software verwendet eine statistische Analyse, bei der zunächst ein Grenzwert gesetzt wird, der überschritten werden muss, damit ein Signal als Anreicherung in der CHIP-Probe gegenüber Input gezählt wird. Dann fährt ein Fenster definierter Basenzahl die Anreicherungsprofile von Sonde für Sonde ab und errechnet einen p-Wert für jede Sondenposition. Je größer die Anzahl der im Fenster befindlicher Sonden mit positivem Signal ist, desto kleiner wird der p-Wert für die Sondenposition, d.h. umso wahrscheinlicher ist die Region im Fenster ein *peak*. Aus der p-Wert-Verteilung ergeben sich dann die *peaks* mit dem Maximum bei der Sondenposition mit kleinstem p-Wert. Diese Analyse entspricht der klassischen Annahme, dass ein Transkriptionsfaktor an eine genau definierte Sequenz bindet und dementsprechend das Signal genau an der Bindestelle ein Maximum hat und nach links und rechts langsam abfällt. Da für mutp53 keine sequenzspezifische Bindung erwartet wurde, wurde zusätzlich eine weitere Methode der *peak*-Identifikation verwendet. Mit der Carpet Software lässt sich die *peak*-Identifikation mit einer sog. *scoring*-Methode durchführen. Diese Methode errechnet Binderegionen aus der Signalstärke und der Anzahl hintereinander liegender Sonden, die den Grenzwert für eine Anreicherung überschreiten. Es wird keine Sondenposition als *peak*-Mitte definiert, und die Software ist somit in der Lage, Binderegionen über längere Bereiche zu identifizieren. Als Ausschlusskriterium für einen *peak* wurden vier aufeinander folgende Sonden, die den Grenzwert für die Anreicherung überschreiten, gewählt.

Die mittels der beiden Methoden in den einzelnen Experimenten für mutp53 identifizierten Binderegionen wurden visuell mit dem Verlauf der Rohsignale abgeglichen. Dabei fiel auf, dass die Signale für die mutp53-Bindung oftmals über größere Bereiche auftreten und nicht klar definierte *peaks* in Form von Gauss-Kurven ergeben, sondern mehr an die Profile für Histonmodifikationen erinnern. Abb. 19 zeigt ein Beispiel der mutp53-Profile mit den durch beide Methoden der *peak*-Suche identifizierten Bindestellen für die vier biologischen Replikate. Sowohl die statistische als auch die *scoring*-Methode identifizieren im Bereich der größten mutp53-Anreicherung *peaks*. Sind die *peaks* entsprechend einer Gauss-Verteilung geformt, kommt es zu keinen Unterschieden in der *peak*-Erkennung. Sind die Signale für die Anreicherung über eine größere Region hoch, kann die statistische Methode der *peak*-

Identifikation allerdings nicht die gesamten Regionen als Bindestellen identifizieren. Es werden jeweils nur einzelne Bereiche innerhalb der größeren Region, die einer Gauss-Verteilung nahekommen, als *peaks* erkannt. Entsprechend sind die Positionen der *peaks* in den einzelnen Experimenten verschoben. Die *scoring*-Methode erkennt hingegen den gesamten Bereich, in dem eine Anreicherung in der mutp53-Probe auftritt, als Binderegion. Folglich hat die *scoring*-Methode Vorteile bei der Identifikation breiter Binderegionen und wurde für die bioinformatischen Analyse der mutp53-Bindestellen gewählt.



**Abbildung 19: ChIP-chip-Analyse von mutp53-Bindestellen mit Hilfe zweier verschiedener Methoden der peak-Identifikation.**

Die Identifikation von mutp53-Bindestellen mit der statistischen (*stat*) und der *scoring* (*sco*) Methode wurde anhand der Ergebnisse aus vier biologischen Replikaten verglichen. Für zwei Gene sind jeweils die log<sub>2</sub>-Rohwerte für die Sondenpositionen angegeben (*roh*). Darunter sind in Grün die in der statistischen Analyse identifizierten *peaks* und in Rot die *peaks* aus der *scoring*-Analyse dargestellt.

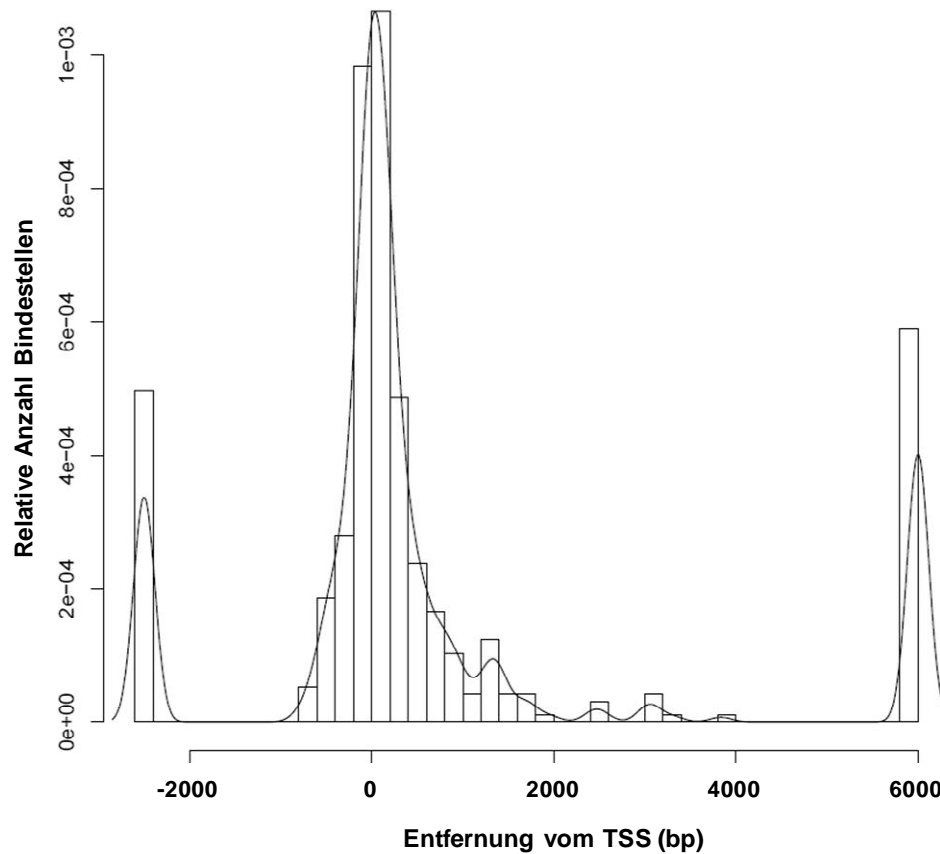
Bei Verwendung der Carpet Software ist es möglich, mehrere biologische Replikate zusammenzufassen und die Identifikation der Binderegionen nach Zusammenfassung der Proben vorzunehmen. Für die vier mutp53-ChIP-Experimente wurden die Werte für die Anreicherung mit der Funktion „Pre-Processing for Tiling“ (PPT) für jede Sonde als Median zusammengefasst. Der Median wurde anstelle eines einfachen Mittelwertes gewählt, da so die einzelnen Werte entsprechend ihres Auftretens in den vier Experimenten gewichtet werden. Somit fallen starke Abweichungen in einem einzelnen Experiment nicht so stark ins Gewicht. Für die Visualisierung der mutp53-Binderegionen an einzelnen Genen wurden die Werte für die Anreicherung von mutp53 aus den vier Experimenten für jede Sonde ebenfalls als Median

zusammengefasst. Der Median wurde dann wiederum als Signalverlauf über die Genregion graphisch dargestellt. So ist auch eine visuelle Analyse von Binderegionen möglich, allerdings müssen dabei stets das Ergebnis der bioinformatischen Analyse und die Varianz der Proben beachtet werden, um keine falsch positiven Binderegionen zu erhalten. Andererseits lassen sich durch die gezielte visuelle Analyse von bestimmten Genen schwächere Binderegionen identifizieren, die in der bioinformatischen Analyse nicht auftauchen, weil die Werte an der Grenze der Suchkriterien liegen. Mehrere Sonden hintereinander mit schwächeren Anreicherungswerten aber sehr kleiner Varianz könnten beispielsweise auf schwächere Binderegionen hindeuten.

Zunächst wurde die bioinformatische Analyse der vier mutp53-ChIP-Experimente nach deren Zusammenfassung wie beschrieben durchgeführt. Daraus ergeben sich 483 mutp53-Bindestellen. Verringert man die Stringenz der *peak*-Identifikation in der Carpet-Analyse leicht auf drei aufeinander folgende Sonden oberhalb des Grenzwertes, ergeben sich 842 mutp53-Bindestellen. Für weitere statistische Analysen wurden nur die 483 Binderegionen verwendet, die die stringenten Kriterien der *peak*-Suche erfüllen.

Mit Hilfe des Genomic Interval Notator (GIN) Tools in der Carpet Software lassen sich die Binderegionen genomischen Regionen zuordnen. Eine Analyse der mutp53-Binderegionen bezüglich ihrer Lage relativ zum TSS bekannter Gene zeigt, dass 59% der Binderegionen innerhalb einer Region von  $\pm 500$  bp um den TSS von 275 Genen liegen (Abb. 20). Insgesamt sind die identifizierten Bindestellen sowohl mit Genen assoziiert (d.h. sie liegen innerhalb oder in unmittelbarer Umgebung des Gens), die nach mutp53-Depletion in drei siRNA-Experimenten gegenüber der Kontrolle reguliert waren, als auch mit solchen, die nicht reguliert waren. Von den per *peak*-Suche in allen vier biologischen Replikaten identifizierten Bindestellen sind 97 mit Genen assoziiert, die in mind. einem siRNA-Experiment nach mutp53-Depletion reguliert sind. 25 dieser Bindestellen entfallen auf Gene, die in allen drei siRNA-Experimenten reguliert waren.

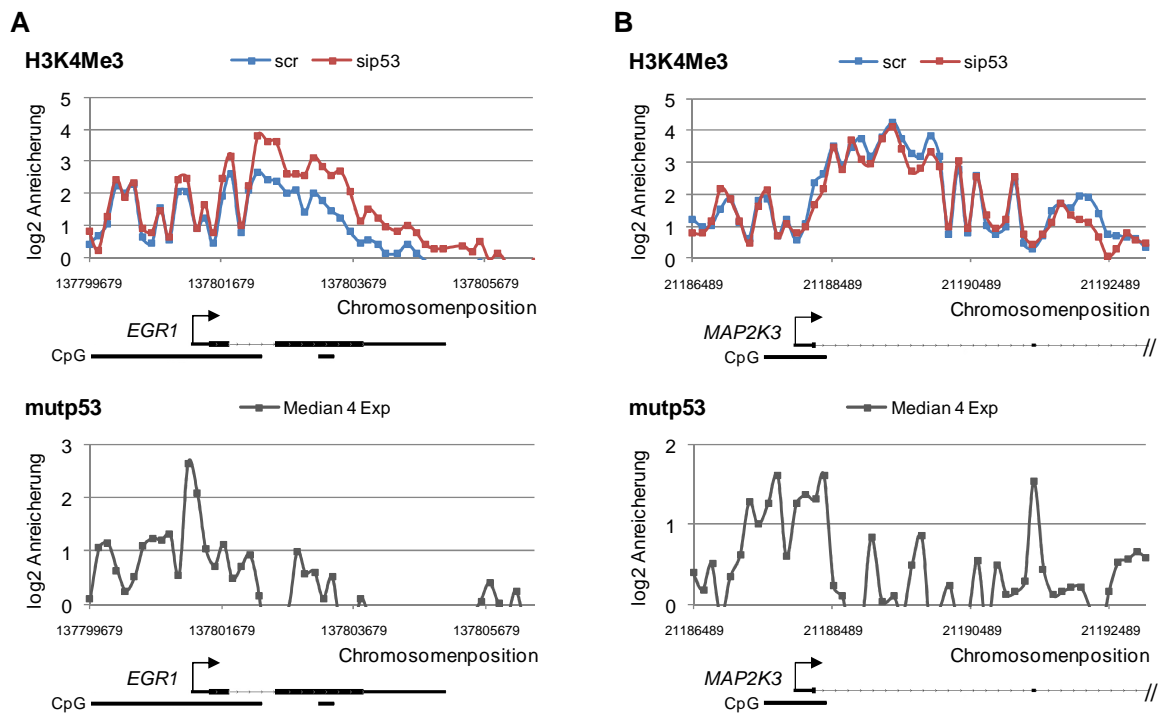




**Abbildung 20: Statistische Analyse der mutp53-Bindestellen mit der Carpet Software.**

Die Positionen der identifizierten mutp53-Bindestellen wurden mit Hilfe des Genomic Interval Notator (GIN) Tools in der Carpet Software bestimmt. Das Diagramm zeigt die Verteilung der Bindestellen relativ zum Transkriptionsstart von Genen.

Unter den Genen, die nach mutp53-Depletion in U251 Zellen nicht reguliert wurden, an denen aber eine mutp53-Bindung stattfindet, befinden sich *MAP2K3* und *EGR1*, die in der Literatur als mutp53-regulierte Gene beschrieben sind (Weisz et al. 2004; Gurtner et al. 2010). Abb. 21 zeigt die Verläufe der mutp53-Anreicherung nach Zusammenfassung der vier Experimente für diese beiden Gene. Außerdem sind die Profile für H3K4Me3 in einem siRNA-Experiment dargestellt. Bei beiden Genen ist H3K4Me3 nach dem TSS stark angereichert, während das Signal am TSS und unmittelbar davor schwächer ist. Bei *EGR1* erstreckt sich die mutp53-Bindung von vor dem TSS bis ans Ende von Exon 1 mit einem Maximum nahe am TSS. Die Binderegion liegt in einem Bereich, in dem die H3K4Me3-Besetzung schwächer ist. Bei *MAP2K3* befindet sich ebenfalls eine breite mutp53-Binderegion um den TSS im Bereich schwacher H3K4Me3-Signale. Die für beide Gene genannten Binderegionen von mutp53 werden auch durch die Carpet-Analyse eindeutig identifiziert, während die beiden schwachen *peaks* in Intron 1 und an Exon 2 in *MAP2K3* nicht als Binderegionen erkannt werden.

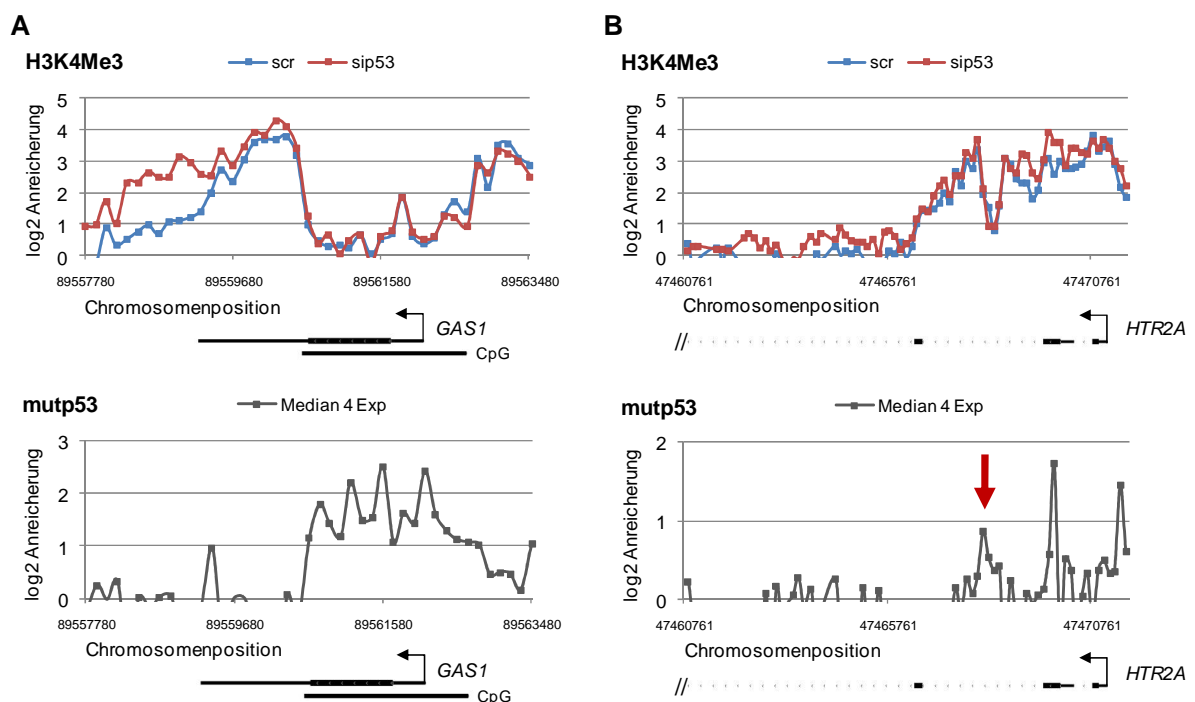


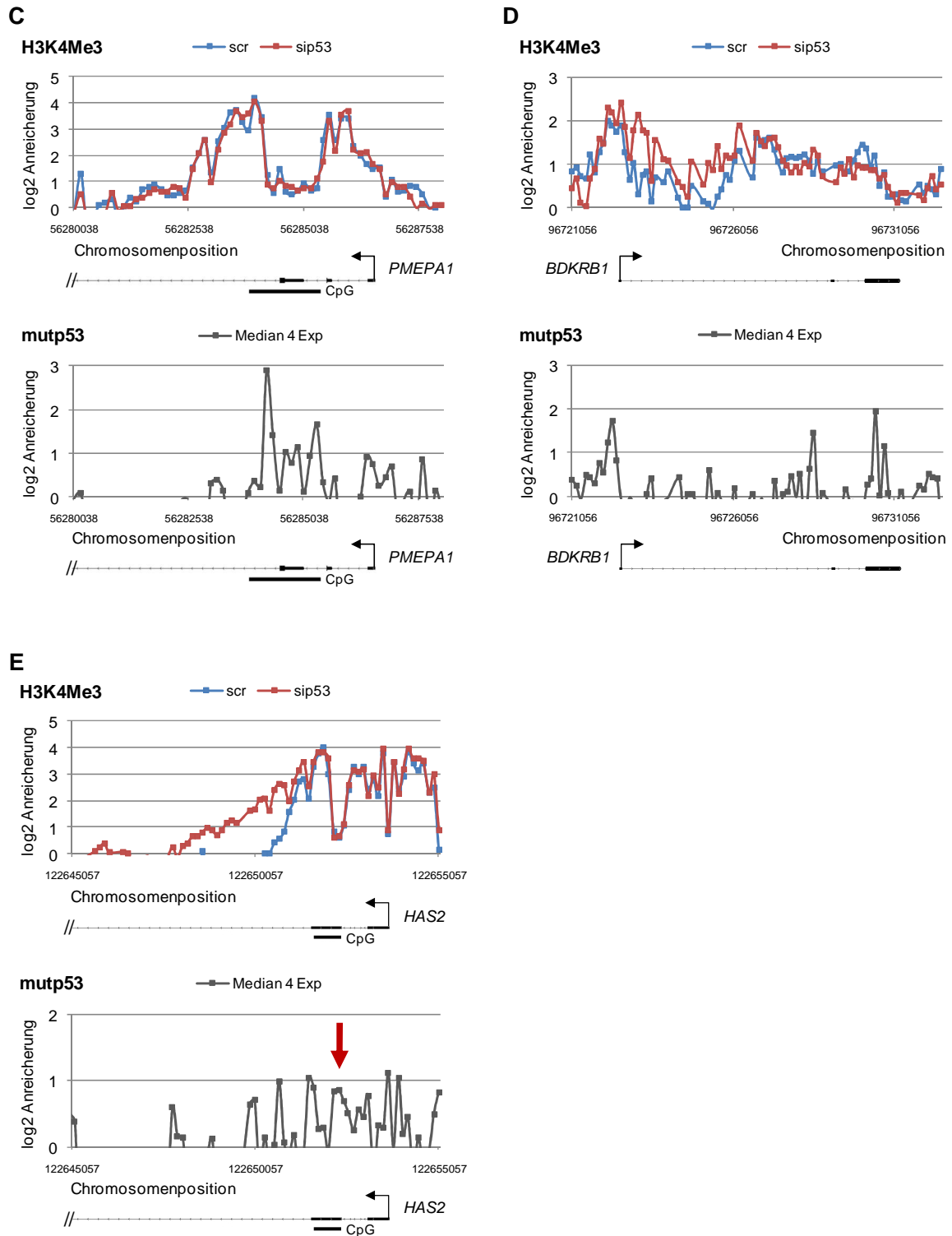
**Abbildung 21: Mutp53-Bindung an *EGR1* (A) und *MAP2K3* (B).**

U251 Zellen wurden mit p53- und Kontroll-siRNA transfiziert und 96 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Formaldehyd vernetzt, lysiert und für ChIP-Experimente mit einem Antikörper gegen p53 eingesetzt. Die gewonnene ChIP-DNA wurde amplifiziert, fluoreszenzmarkiert und jeweils kompetitiv mit dem Input auf einen NimbleGen 12 x 135k Custom Microarray hybridisiert. Die Diagramme zeigen den Verlauf des Signals für die mutp53-Bindung und zur Darstellung der Promotorregion den Verlauf des Signals aus dem H3K4Me3 ChIP-Experiment. Unter den Diagrammen sind die Gene dargestellt. Der Pfeil markiert den Transkriptionsstart, schwarze Balken entsprechen Exons, wobei die dickeren Balken für translatierte Bereiche stehen. Introns sind als dünne schwarze Linien dargestellt. Unter den Genen sind CpG-Inseln in schwarz dargestellt.

Im Folgenden werden die Profile der mutp53-Anreicherung für die validierten mutp53-regulierten Gene *GAS1*, *HTR2A*, *PMEPA1*, *BDKRB1* und *HAS2* beschrieben (Abb. 22). Zusätzlich sind jeweils die H3K4Me3-Profile eines siRNA-Experimentes dargestellt, die die Promotorregion charakterisieren. Das *GAS1* Gen hat eine breite mutp53-Binderegion, die in allen vier Experimenten reproduzierbar auftritt und folglich auch in der bioinformatischen Analyse identifiziert wurde (Abb. 22A). Die Binderegion erstreckt sich von vor dem TSS bis zum Ende der translatierten Region und fällt genau in den Bereich, der keine Anreicherung für H3K4Me3 zeigt. Für *HTR2A* ergibt die bioinformatische Analyse nach Zusammenfassung aller vier Experimente keine übereinstimmenden mutp53-Binderegionen. In allen Einzelerperimenten treten *peaks* im Bereich vom TSS und Exon 2 auf, allerdings variieren die Positionen der einzelnen *peaks*. Daher treten in der Zusammenfassung der vier Experimente einzelne Signale in diesen Regionen auf (Abb. 22B). Ein kleiner Bereich in der Mitte von Intron 2 zeigt hingegen schwächere Signale, diese treten aber reproduzierbar in

allen vier Experimenten mit geringer Varianz auf (Abb. 22B; markiert mit einem Pfeil). Hier könnte es sich um eine schwächere Bindestelle handeln, die wiederum in einem Bereich läge, in dem die H3K4Me3-Signale abfallen. Ein ähnliches Bild bietet der mutp53-Signalverlauf für *PMEPA1* (Abb. 22C). Es tritt eine Region um den Start der translatierten Region mit starken Signalen auf, die im Bereich des Minimums des H3K4Me3-Signals liegt. Allerdings wird die Region durch zwei Signalabfälle unterbrochen und somit durch die bioinformatische Carpet-Analyse nur erfasst, wenn die Stringenz auf drei aufeinander folgende Sonden als *peak* reduziert wird. Für *BDKRB1* tritt ein Binde-*peak* für mutp53 direkt am TSS auf. Hier ist kein Abfall in der H3K4Me3-Besetzung zu beobachten. *HAS2* zeigt schließlich wieder mutp53-Binderegionen um den TSS mit variablen Positionen in den einzelnen Experimenten. Dies führt zu einem breiteren Bereich mit schwächeren Signalen nach Zusammenfassung der Experimente (Abb. 22D). Allerdings tritt wiederum ein Bereich auf, der sich durch schwächere Signale mit geringer Varianz (d.h. hohe Reproduzierbarkeit in den vier Experimenten) auszeichnet (Abb. 22D; markiert mit einem Pfeil). Auch diese Region liegt in einem Bereich abfallenden H3K4Me3-Signals.

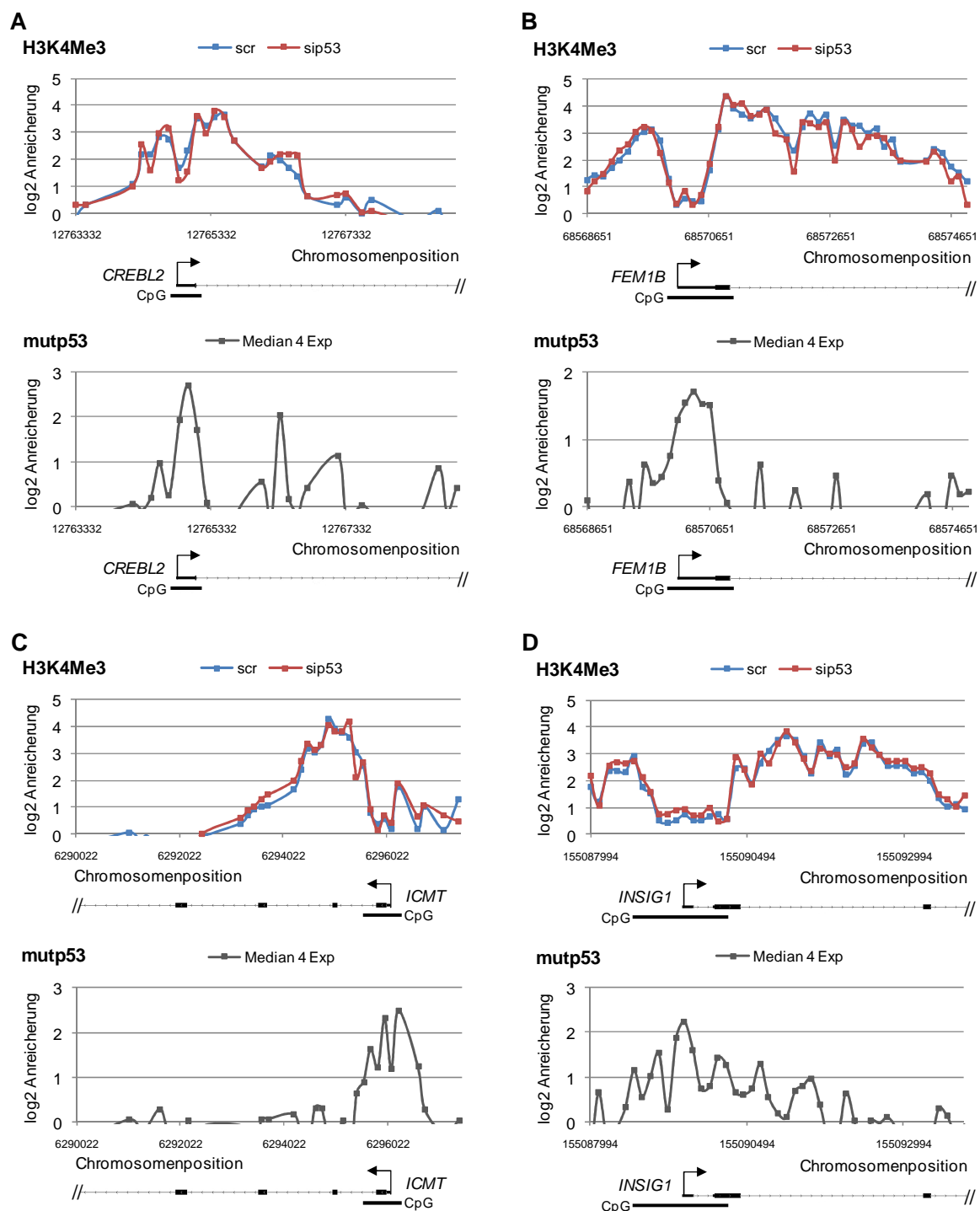


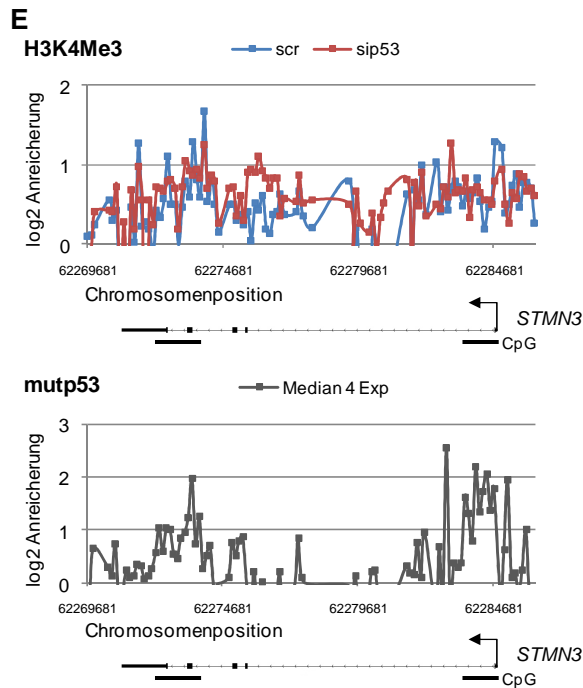


**Abbildung 22: Mutp53-Bindung an *GAS1* (A), *HTR2A* (B), *PMEPA1* (C), *BDKRB1* (D) und *HAS2* (E).**

U251 Zellen wurden mit p53- und Kontroll-siRNA transfiziert und 96 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Formaldehyd vernetzt. lysiert und für ChIP-Experimente mit einem Antikörper gegen p53 eingesetzt. Die gewonnene ChIP-DNA wurde amplifiziert, fluoreszenzmarkiert und jeweils kompetitiv mit dem Input auf einen NimbleGen 12 x 135k Custom Microarray hybridisiert. Die Diagramme zeigen den Verlauf des Signals für die mutp53-Bindung und zur Darstellung der Promotorregion den Verlauf des Signals aus dem H3K4Me3 ChIP-Experiment. Unter den Diagrammen sind die Gene dargestellt. Der Pfeil markiert den Transkriptionsstart, schwarze Balken entsprechen Exons, wobei die dickeren Balken für translatierte Bereiche stehen. Introns sind als dünne schwarze Linien dargestellt. Unter den Genen sind CpG-Inseln in schwarz dargestellt.

Für eine Reihe weiterer Gene, die in den Genexpressionsanalysen aus drei siRNA-Experimenten als *mutp53*-abhängig reguliert identifiziert worden sind, lassen sich ebenfalls *mutp53*-Bindeereignisse detektieren. Abb. 23 zeigt fünf weitere dieser Gene, die eindeutige *mutp53*-Binderegionen aufweisen, die in allen vier Experimenten an derselben Position liegen. Auch bei diesen Genen setzt sich der Trend fort, dass die *mutp53*-Binderegion mit Bereichen geringer H3K4Me3-Besetzung zusammenfällt. In diesen Bereichen liegen bei diesen fünf Genen und auch bei fünf der sieben zuvor beschriebenen Gene CpG-Inseln (vgl. Abb. 22 und 23).





**Abbildung 23: Mutp53-Bindung an *CREBL2* (A), *FEM1B* (B), *ICMT* (C), *INSIG1* (D) und *STMN3* (E).**

U251 Zellen wurden mit p53- und Kontroll-siRNA transfiziert und 96 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Formaldehyd vernetzt, lysiert und für ChIP-Experimente mit einem Antikörper gegen p53 eingesetzt. Die gewonnene ChIP-DNA wurde amplifiziert, fluoreszenzmarkiert und jeweils kompetitiv mit dem Input auf einen NimbleGen 12 x 135k Custom Microarray hybridisiert. Die Diagramme zeigen den Verlauf des Signals für die mutp53-Bindung und zur Darstellung der Promotorregion den Verlauf des Signals aus dem H3K4Me3 ChIP-Experiment. Unter den Diagrammen sind die Gene dargestellt. Der Pfeil markiert den Transkriptionsstart, schwarze Balken entsprechen Exons, wobei die dickeren Balken für translatierte Bereiche stehen. Introns sind als dünne schwarze Linien dargestellt. Unter den Genen sind CpG-Inseln in schwarz dargestellt.

### 3.5.5 Mutp53 bindet G/C-reiche Regionen mit strukturellen Besonderheiten

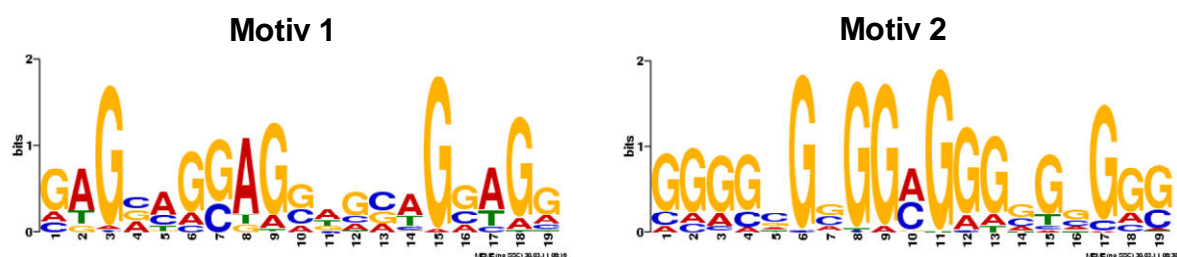
Die Korrelation der mutp53-Bindung mit Bereichen, in denen das H3K4Me3-Signal abfällt und gleichzeitig CpG-Inseln liegen, ist sehr auffällig und wurde weiter untersucht. Eine Analyse des Abfalls der H3K4Me3-Signale konnte nicht durchgeführt werden, da für diese Art der Auswertung keine bioinformatischen Werkzeuge zur Verfügung standen. Allerdings sind CpG-Inseln im Genom annotiert, sowie sog. DNase I hypersensitive (HS) Regionen. Diese Regionen sind im Chromatinkontext für den Verdau mit DNase I anfällig und entsprechen meist regulatorischen und/oder transkribierten Regionen, die in offener Chromatinstruktur vorliegen. Der beobachtete Abfall in den Profilen der Histonmodifikationen könnte auf eine Depletion von Histonen und eine offene Chromatinstruktur hindeuten. Deshalb sollte eine Korrelation mit DNase I HS Regionen getestet werden. Die Chromosomenpositionen der CpG-Inseln und der DNase I HS Regionen können von der Genome Browser Homepage (<http://genome.ucsc.edu/index.html>) herunter

geladen werden. Die DNase I HS Regionen werden für eine stetig wachsende Anzahl von humanen Zelllinien annotiert. Für den Vergleich mit den mutp53-Bindestellen wurden lediglich die oberen 20 % der im Humangenom (*assembly hg19*) annotierten DNase I HS Regionen verwendet. Dabei handelt es sich um die DNase I hypersensitiven Regionen, die am häufigsten auftreten und damit konserviert sind.

Die Chromosomenpositionen der mutp53-Bindestellen wurden mit Hilfe des Galaxy Web Browsers (<http://main.g2.bx.psu.edu/>) mit den Chromosomenpositionen der CpG-Inseln sowie der DNase I HS Regionen verglichen. Dabei wurden die Einstellungen so gewählt, dass mindestens 50 bp der mutp53-Bindestellen mit den CpG-Inseln bzw. den DNase I HS Regionen überlappen. Diese globale Analyse der mutp53-Binderegionen zeigt, dass 88 % der identifizierten mutp53-Bindestellen mit CpG-Inseln überlappen und 73,3 % mit DNase I HS Regionen zusammenfallen.

Die Analyse der mutp53-Bindestellen in einzelnen Genen zeigt weiterhin, dass Regionen schwächerer mutp53-Bindung, beispielsweise in *PMEPA1* und *HAS2* mit CpG-Inseln zusammenfallen (vgl. Abb. 22C, E) und auch die zuvor beschriebene Region schwacher mutp53 Bindung in *HTR2A* ist mit 65,5% äußerst G/C-reich (vgl. Abb. 22B).

Unterzieht man die 483 mutp53-Bindestellen aus allen vier Experimenten einer Motiv-Suche mit dem Web-Tool MEME-ChIP ([http://meme.sdsc.edu/meme4\\_6\\_0/meme-intro.html](http://meme.sdsc.edu/meme4_6_0/meme-intro.html)) (Bailey et al. 2010)), erhält man zwei 19 Nukleotide lange, G/C-reiche Konsensusmotive, die in 72 (Motiv 1, E-Wert =  $2,7 \times 10^{-29}$ ) bzw. 95 (Motiv 2, E-Wert =  $5,5 \times 10^{-24}$ ) der identifizierten mutp53-Bindestellen auftreten (Abb. 24).

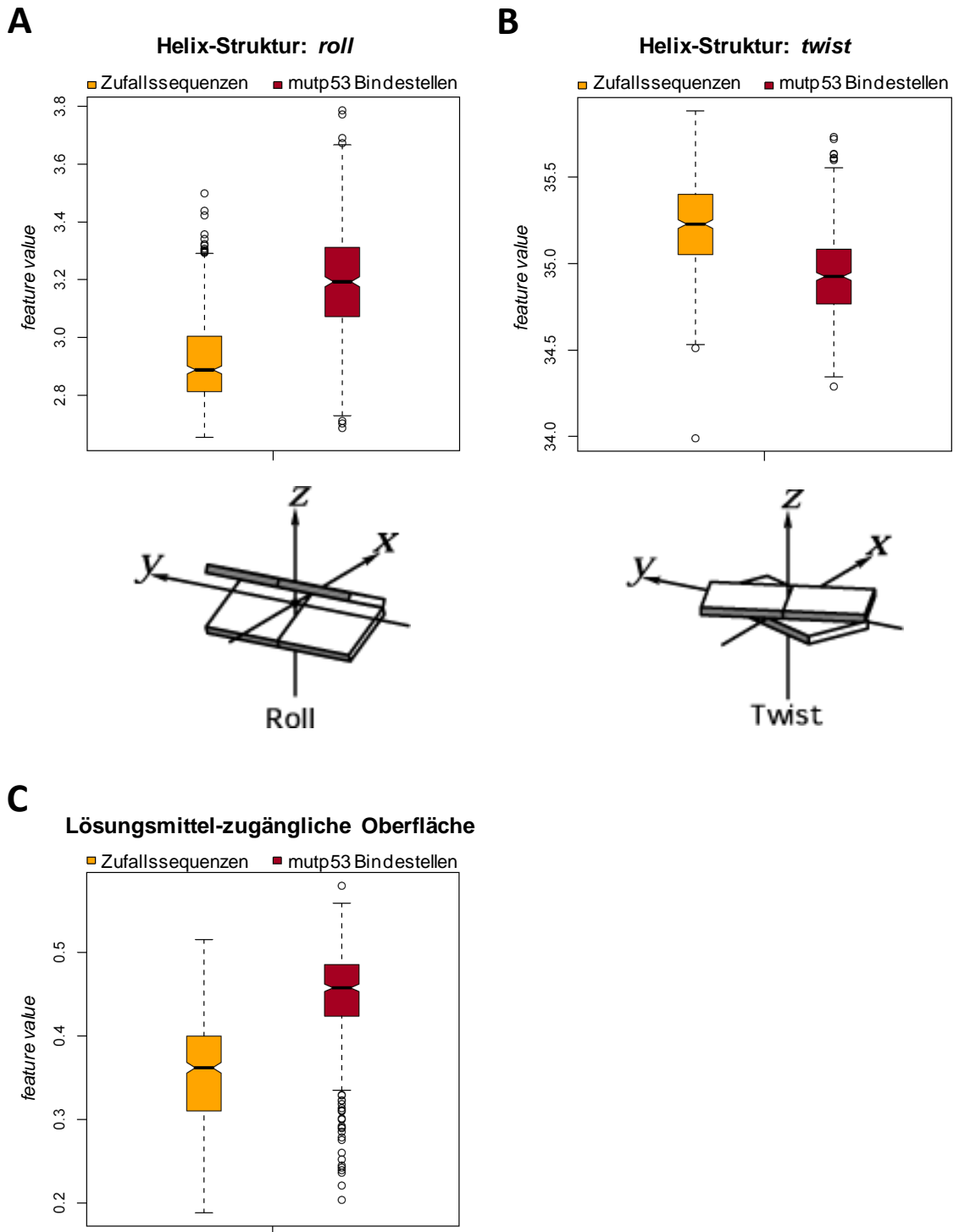


**Abbildung 24: Mutp53-Konsensusbindemotive in U251 Zellen.**

Die mutp53-Bindestellen aus den vier ChIP-chip-Experimenten wurden einer Motivsuche mit dem MEME-ChIP Web Tool unterzogen. Dabei ergeben sich die Motive 1 und 2 mit hoher statistischer Signifikanz.

Der hohe G/C-Gehalt der identifizierten mutp53-Bindestellen, deutet darauf hin, dass die gebundenen Sequenzen strukturelle Besonderheiten aufweisen könnten. Das EpiGRAPH Web Tool (<http://epigraph.mpi-inf.mpg.de/WebGRAPH/> (Bock et al. 2009)) macht Vorhersagen zu strukturellen Eigenschaften für DNA-Sequenzen. Beispielsweise werden die räumlichen Veränderungen in der Position aufeinander folgender Basenpaare (*base step parameters*) in der Helix oder die für Lösungsmittel zugängliche Fläche errechnet. Diese Parameter unterscheiden sich z.B. in verschiedenen DNA-Helices. Die 483 identifizierten mutp53-Binderegionen wurden mit EpiGRAPH bezüglich der Parameter *roll*, *twist* und *solvent accessible surface* (Rollen des nächsten Basenpaares um die Y-Achse, Drehung des nächsten Basenpaares um die Z-Achse und Lösungsmittel-zugängliche Oberfläche, (Abb. 25) untersucht. Als Vergleich wurde ein Set von 483 Sequenzen zufällig aus den auf dem Microarray vorhandenen Sequenzen erstellt und ebenfalls analysiert. Die mutp53-Bindestellen haben mit statistisch hoher Signifikanz (p-Werte = 0) höhere *roll*- und niedrigere *twist*-Werte als die Kontrollsequenzen. Die Werte entsprechen mehr einer A-DNA-Konformation als der B-DNA-Helix (El Hassan and Calladine 1997). Außerdem ist die *solvent accessible surface* in den mutp53-Binderegionen signifikant erhöht (p-Wert = 0), was auf deutliche strukturelle Unterschiede gegenüber den Zufallssequenzen hinweist.





**Abbildung 25: Strukturelle Charakteristika von mutp53-Bindestellen.**

Die mutp53-Bindestellen aus den vier ChIP-chip-Experimenten wurden mit dem EpiGRAPH Web Tool auf strukturelle Eigenschaften untersucht. Zum Vergleich wurde ebenfalls ein Set von Sequenzen analysiert, das zufällig aus den Sequenzen auf dem Microarray ausgewählt wurde. Es sind die *base step* Parameter *roll* (A) und *twist* (B) sowie die Analyse der Lösungsmittel-zugängliche Fläche dargestellt (C); (*roll* und *twist* Beispiele von <http://rutchem.rutgers.edu/~xiangjun/3DNA/examples.html>).

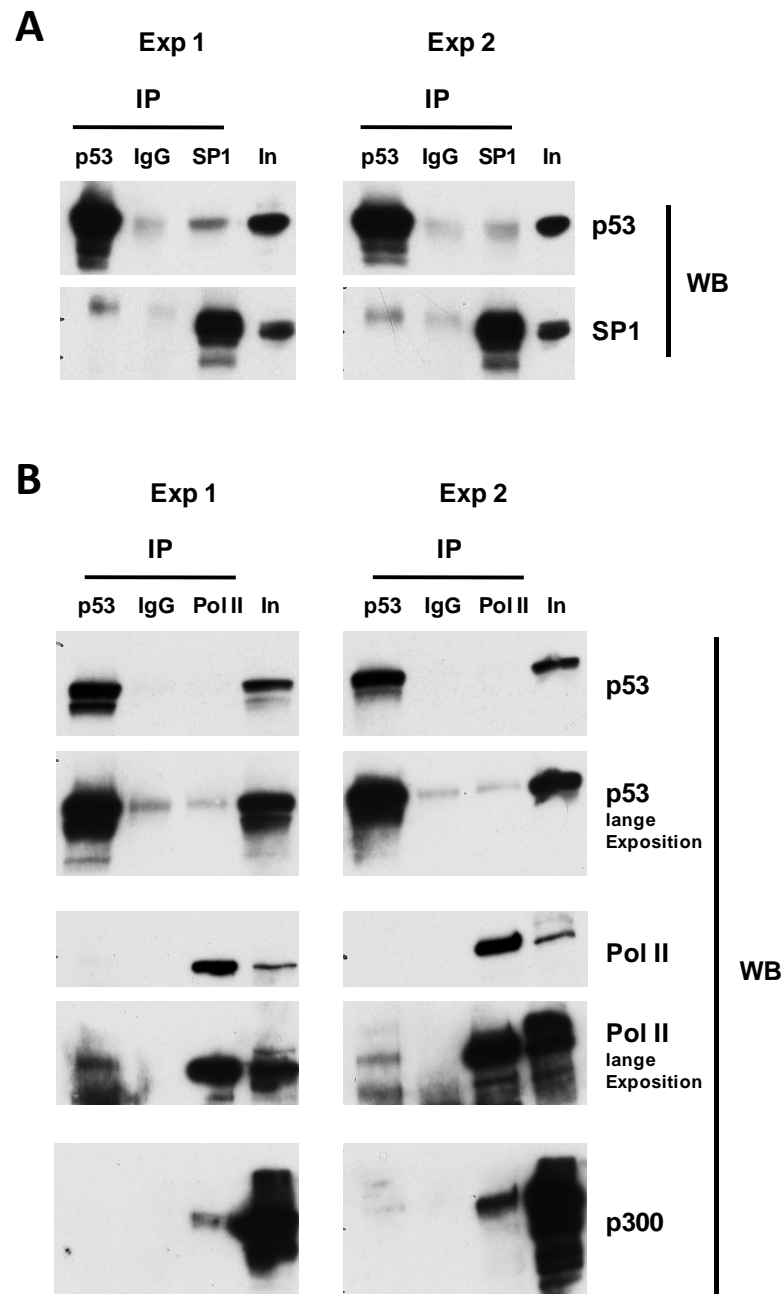
### 3.5.6 Protein-Protein-Interaktionen von mutp53

Das Konsensusmotiv, das aus den mutp53-Bindestellen abgeleitet wurde, weist große Ähnlichkeit mit der G/C-reichen Bindesequenz des Transkriptionsfaktors SP1 auf: 5'-(G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T)-3' (GC-Box Element). Neben anderen Transkriptionsfaktoren ist SP1 als Interaktionspartner von mutp53 beschrieben (Chicas et al. 2000) und SP1 ist in U251 Zellen stark exprimiert (s. Abb. 26A, 27A). Daher sollte in Ko-Immunopräzipitations(IP)-Experimenten getestet werden, ob mutp53 mit SP1 interagiert und dies die Grundlage für seine Assoziation mit GC-reichen Sequenzen ist. Außerdem wurden Interaktionen mit Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie, Pol II und dem Ko-Faktor p300 untersucht. Für einige Komponenten der Transkriptionsmaschinerie und Ko-Faktoren sind Interaktionen mit wtp53 beschrieben (vgl. 1.5.2). Die beobachteten Effekte von mutp53 auf die Transkription in U251 Zellen könnten auf die Fähigkeit von mutp53 zurückgehen, mit der Transkriptionsmaschinerie und Ko-Faktoren zu interagieren.

Für die Ko-IP-Experimente wurden aus U251 Zellen die Kerne präpariert und unter Zugabe von Benzon-Endonuklease lysiert. Durch Degradation der DNA werden so auch chromatin-gebundene Faktoren freigesetzt. Aus dem Lysat wurden mutp53, Pol II und SP1 mit entsprechenden Antikörpern präzipitiert und nach Aufreinigung eine Analyse ko-präzipitierter Proteine im Western Blot angeschlossen. Als Kontrolle dienten Proben mit unspezifischen Antikörpern gleichen Isotyps (IgG). Im Folgenden sind jeweils zwei biologische Replikate für die IPs mit den drei Antikörpern dargestellt.

Mutp53 ist in großer Menge in U251 Zellen vorhanden und lässt sich durch die IP in beiden Replikaten spezifisch anreichern (Abb. 26A; WB  $\alpha$ -p53, IP p53). Bei der Präzipitation mit der IgG-Kontrolle ist lediglich ein schwaches Hintergrundsignal für mutp53 vorhanden (WB  $\alpha$ -p53, IP IgG). Auch SP1 ist sehr stark exprimiert und lässt sich mit dem verwendeten Antikörper in beiden Experimenten in großer Menge spezifisch aus dem Lysat anreichern (Abb. 26A; WB  $\alpha$ -pSP1, IP SP1). Die IP mit IgG zeigt wiederum nur ein ganz schwaches unspezifisches Hintergrundsignal (WB  $\alpha$ -SP1, IP IgG). In der SP1-IP zeigt der Western Blot für beide Replikate eine Bande für mutp53 (WB  $\alpha$ -p53, IP SP1), die deutlich über dem unspezifischen Hintergrund (WB  $\alpha$ -p53, IP IgG) liegt. Im Vergleich zur Gesamtmenge an mutp53 im Lysat (WB  $\alpha$ -p53, Input) ist die mutp53-Menge, die in den SP1-IPs ko-präzipitiert wurde, trotz der großen Menge an präzipitiertem SP1 (WB  $\alpha$ -SP1, IP SP1) allerdings sehr gering. Das Ergebnis für die Ko-Präzipitation von SP1 in der mutp53-IP ist ähnlich. Der Western Blot für SP1 zeigt für beide Replikate der mutp53-IP eine schwache SP1-Bande (WB

$\alpha$ -SP1, IP p53), die über dem unspezifischen Hintergrund liegt (WB  $\alpha$ -SP1, IgG). Bezogen auf die Gesamtmenge an vorhandenem SP1 (WB  $\alpha$ -SP1, Input) und die große Menge an präzipitiertem mutp53 (WB  $\alpha$ -p53, IP p53) ist die durch mutp53 ko-präzipitierte SP1-Menge sehr gering.



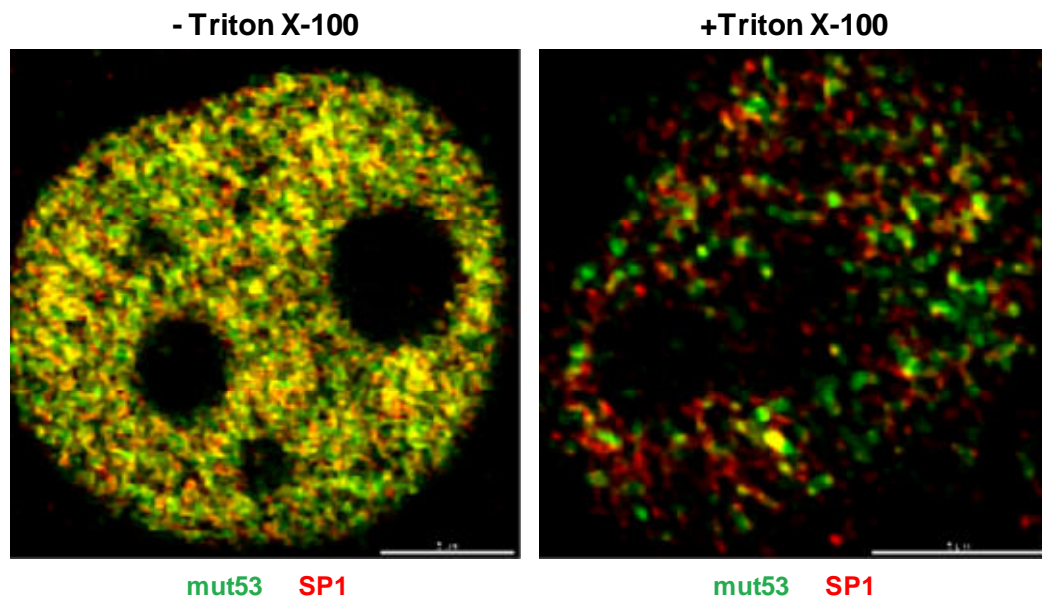
**Abbildung 26: Ko-Immunopräzipitationen von mutp53, SP1 und Pol II.**

Aus U251 Zellen wurden Kerne präpariert und einer milden Lyse mit NP-40 unterzogen. Mutp53, SP1 und Pol II wurden mit entsprechenden Antikörpern aus den Lysaten präzipitiert. Außerdem wurde in einem Kontrollansatz Lysat mit unspezifischem IgG inkubiert. Die präzipitierten Proteine und ko-präzipitierte Proteine wurden im WB detektiert. **A.** IP mit Antikörpern gegen p53, SP1 und IgG-Kontrolle mit anschließender Detektion von mutp53 und SP1 im WB. **B.** Mutp53 und Pol II wurden mit entsprechenden Antikörpern aus den Lysaten präzipitiert. Die präzipitierten Proteine und ko-präzipitierte Proteine wurden im WB detektiert.

Bei den Ko-IPs von mutp53 und Pol II zeigen die Western Blots für beide Replikate wiederum eine gute und spezifische Anreicherung von mutp53 (Abb. 26B; WB  $\alpha$ -p53, IP p53 im Vergleich zu IgG). Auch Pol II wird durch den verwendeten Antikörper spezifisch angereichert (Abb. 26B; WB  $\alpha$ -Pol II, IP Pol II im Vergleich zu IgG). Der Western Blot für mutp53 zeigt in den Pol II-IPs lediglich eine Bande (WB  $\alpha$ -p53, IP Pol II), die dem unspezifischen Hintergrund entspricht (WB  $\alpha$ -p53, IP IgG). Somit wird mutp53 nicht spezifisch mit Pol II ko-präzipitiert. Die mutp53-IPs zeigen hingegen eine leichte Ko-Präzipitation von Pol II, die deutlich über dem Hintergrund liegt (WB  $\alpha$ -Pol II lange Exposition, IP p53 gegenüber IgG). Es handelt sich allerdings nur um eine sehr kleine Menge der im Lysat vorhandenen Pol II (WB  $\alpha$ -Pol II, Input).

Der Ko-Faktor p300 wird in kleinen Mengen spezifisch mit Pol II ko-präzipitiert (Abb. 26B; WB  $\alpha$ -p300, IP Pol II im Vergleich zu IP IgG). Eine Ko-Präzipitation mit mutp53 ist dagegen nur ganz schwach in einem von zwei Experimenten zu erkennen (WB  $\alpha$ -p300, IP p53).

Insgesamt zeigen die Ko-IP-Experimente lediglich eine schwache Interaktion von mutp53 oder eine Interaktion von nur einem Teil des vorhandenen mutp53 mit SP1 und Pol II, während es mit p300 zu keiner Interaktion zu kommen scheint. Im Falle von SP1 zeigt die umgekehrte IP mit SP1-Antikörper ebenfalls eine schwache Interaktion. Für Pol II ist die Interaktion hingegen nur in der mutp53-IP messbar. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die per Ko-IP gemessenen Protein-Protein-Interaktionen von mutp53 mit SP1 und insbesondere Pol II lediglich schwacher und transienter Natur sind und es nicht zu einer Ausbildung stabiler Komplexe kommt. Diese Art der Analyse kann allerdings nicht ausschließen, dass eine stabile Interaktion im Kontext mit Chromatin stattfindet. Um diese Möglichkeit für mutp53 und SP1 zu prüfen, wurden U251 Zellen auf Deckgläschen kultiviert und entweder direkt mit Paraformaldehyd fixiert oder zuvor mit Triton X-100 extrahiert. Anschließend wurden mutp53 und SP1 in der Immunfluoreszenz detektiert (Abb. 27). Die Färbung zeigt eine starke nukleäre Expression beider Proteine, die allerdings nur teilweise koloalisieren (z.B. 19 % *region of interest* (ROI) in dem Beispiel in Abb. 27A). Die Extraktion mit Triton X-100 entfernt die lösliche Proteinfraction und es verbleiben lediglich fest mit der unlöslichen Chromatinfraction assoziierte Proteine. Jeweils ein Teil des in U251 Zellen vorhandenen mutp53 und SP1 ist mit Chromatin assoziiert, allerdings ist die Ko-Lokalisation noch geringer als in nicht extrahierten Zellen (6,5 % im Beispiel in Abb. 27B). Dieses Ergebnis deutet sehr stark darauf hin, dass eine starke kooperative Bindung von mutp53 und SP1 an DNA bzw. Chromatin nur in sehr begrenztem Umfang stattfindet.



**Abbildung 27: Ko-Lokalisation von mutp53 und SP1.**

U251 Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und entweder direkt mit Paraformaldehyd fixiert oder zuvor mit Triton X-100 extrahiert. Anschließend wurden mutp53 und SP1 in der Immunfluoreszenz mit den entsprechenden Primärantikörpern und Alexa-488- (mutp53) bzw. Alexa-568-konjugierten (SP1) Sekundärantikörpern angefärbt. Bilder wurden an einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop aufgenommen und die Ko-Lokalisation mit der Imaris Software bestimmt.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die humane U251 Glioblastom-Zelllinie mit endogener mutp53-Expression verwendet, um die molekularen Grundlagen der transkriptionellen Regulation durch mutp53 als einen wichtigen Mechanismus des onkogenen Funktionsgewinns (GOF) durch p53-Mutanten näher zu charakterisieren. Zahlreiche aktuelle Studien beschäftigen sich mit transkriptioneller Regulation durch mutp53 und es wurde eine große Zahl mutp53-regulierter Gene in verschiedenen Zellsystemen identifiziert (Brosh and Rotter 2009). Die Regulation der Gene im jeweiligen System stattet die Zellen mit Selektionsvorteilen wie verbessertem Wachstum von Einzelzellen, verstärkter Proliferation, erhöhter Resistenz gegen Apoptose und Chemotherapeutika oder stärkerer Invasivität und Metastasierung aus, Eigenschaften die insgesamt unter dem Begriff GOF zusammengefasst werden. Allerdings variieren die regulierten Gene, die diese Effekte vermitteln, zwischen Zellsystemen und Tumoren und genomweite Expressionsanalysen *in vitro* und *in vivo* zeigen keine einheitliche Gensignatur für mutp53. Die beobachtete Heterogenität könnte aus der gemeinsamen Analyse verschiedener p53-Mutanten mit verschiedenen Zielgenspezifitäten resultieren. Studien, die spezifische Gensignaturen für einzelne p53-Mutanten in verschiedenen Zellsystemen zeigen, fehlen allerdings bisher. Vielmehr zeichnet sich ab, dass mehrere *hotspot*-Mutanten im selben zellulären System spezifische Gensets regulieren. So wurde beispielsweise gezeigt, dass die Expression von vier *hotspot*-p53-Mutanten in Prostatakrebszellen zur einheitlichen Regulation von 95 Genen führt (Tepper et al. 2005) und eine Gensignatur mit mehr als 100 Genen wurde durch ektopische Expression von drei *hotspot*-Mutanten in p53-null H1299 Lungenkrebszellen identifiziert (Scian et al. 2004b; Scian et al. 2005). Auch *in vivo* Daten aus Mammakarzinomen zeigen eine Korrelation von Gensignaturen mit dem p53-Mutationsstatus in diesem Krebstyp (Miller et al. 2005; Troester et al. 2006; Langerod et al. 2007). Diese Daten verdeutlichen, dass die Effekte von mutp53 auf die Transkription in erster Linie zellkontextabhängig zu sein scheinen und es sich bei mutp53 nicht um einen klassischen Transkriptionsfaktor handelt. Diese Interpretation wird durch Studien zu den molekularen Grundlagen der transkriptionellen Regulation durch mutp53 unterstützt. Zwar konnte die Assoziation von mutp53 mit Promotoren zahlreicher regulierter Gene demonstriert werden (Brosh and Rotter 2009), aber eine Konsensusbindesequenz, die ein Set von Genen unabhängig vom zellulären Kontext definieren würde, konnte bisher nicht identifiziert werden. Die vorherrschende Vorgehensweise bei der Analyse der molekularen Grundlagen der transkriptionellen Regulation durch mutp53 stützt sich

dennoch in erster Linie auf die Annahme einer deterministischen Regulation von Zielgenen durch die Modulation der Aktivität anderer sequenzspezifischer Transkriptionsfaktoren. So konnte eine Interaktion von mutp53 mit diversen Transkriptionsfaktoren an den Promotoren von Zielgenen als Grundlage der transkriptionellen Regulation identifiziert werden. Dies ist allerdings kein allgemein gültiger Mechanismus für verschiedene zelluläre Systeme und Tumore. Bei den prominenten Beispielen, wie die mutp53-Interaktionen mit NF- $\kappa$ B, dem Vitamin D3 Rezeptor und NF- $\kappa$ B sind die Effekte auf die Transkription vielmehr unter spezifischen Stimuli wie DNA-Schädigungen, Vitamin D- oder TNF- $\alpha$ -Behandlung zu beobachten und somit klar zelltyp- und kontextabhängig (Di Agostino et al. 2006; Weisz et al. 2007a; Stambolsky et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein alternatives Modell untersucht, das die Kontextabhängigkeit der transkriptionellen Regulation durch mutp53 berücksichtigt, sich allerdings mit der Modulation der Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren nicht gegenseitig ausschließt, sondern vielmehr dieses Modell ergänzt. Dieses alternative Modell stützt sich auf eine direkte Bindung von mutp53 an DNA unabhängig von sequenzspezifischen Faktoren. Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe zeigen eine Bindung von mutp53 an DNA, die Sekundärstrukturen einnimmt. Diese strukturabhängige Bindung wurde in *in vitro* Studien gezeigt und erfährt Unterstützung durch *in vivo* CHIP-Analysen, bei denen repetitive DNA-Sequenzen, die mit großer Wahrscheinlichkeit nicht B-DNA Konformationen annehmen können, überrepräsentiert sind (vgl. 1.6.2). Die große Anzahl repetitiver DNA-Regionen in Kombination mit dem meist stark exprimierten mutp53 bietet somit eine Grundlage für eine transkriptionelle Regulation von mutp53 auf globaler Ebene, die aber jeweils innerhalb der durch den zellulären Kontext in Form vorhandener Transkriptionsmuster und (Ko-)Faktoren vorgegebenen Möglichkeiten stattfindet.

Es gibt bisher keine globalen Studien der DNA-Bindung durch mutp53, die eine Charakterisierung von Bindestellen in großem Maßstab ermöglichen, und bioinformatische Analysen scheiden aufgrund des Verlustes der sequenzspezifischen DNA-Bindung von mutp53 aus. Hinzu kommt, dass Microarrays für Bindeanalysen von klassischen Transkriptionsfaktoren durch CHIP-chip auf etwa 1500 bp in den Promotorregionen von Genen beschränkt sind. Zahlreiche Studien zeigen jedoch, dass weit vom Transkriptionsstart entfernte regulatorische Elemente und die Struktur des umliegenden Chromatins an der Regulation der Transkription beteiligt sind (Papantonis and Cook 2010; Zhou et al. 2011). Eine umfangreiche Charakterisierung von funktionellen mutp53-Bindestellen setzt folglich eine großflächige Analyse genomischer Regionen mutp53-regulierter Gene voraus. Als

Grundlage für eine solche Analyse diene ein Set von Genen, das im ersten Teil dieser Arbeit und in weiteren Studien aus der Arbeitsgruppe identifiziert wurde. Aufgrund der großen Heterogenität der transkriptionellen Regulation durch mutp53 wurde die Auswahl auf zwei zelluläre Systeme beschränkt. Eine Gruppe von Genen wurde in dieser Arbeit durch die transiente Depletion von endogenem mutp53 in U251 Zellen identifiziert (vgl. 3.3). Dieses Set wurde ergänzt durch mutp53- und auch wtp53-regulierte Gene aus *p53*-null H1299 *non small lung cell carcinoma* Zellen mit induzierbarer Expression von mutp53 (G245S und R273H) und wtp53 (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe).

#### 4.1 Identifikation mutp53-regulierter Gene in U251 Zellen

Endogen exprimiertes mutp53 lässt sich in U251 Zellen durch transiente Transfektion von siRNAs mit hoher Effizienz über einen Zeitraum von etwa 48 h depletieren (vgl. 3.2). Die transiente Depletion ist nicht nur deutlich effektiver als ein stabiler *knockdown*, sie erlaubt auch die Untersuchung der Effekte unmittelbar nach mutp53-Depletion. Die globale Analyse der Expressionsänderungen nach mutp53 zeigt in jedem Einzelexperiment eine Vielzahl regulierter Gene. Das Ergebnis, dass die Gesamtzahl regulierter Gene und auch die Stärke der Regulation einzelner Gene (vgl. 3.3 und 3.4) mit der Effizienz des mutp53-*knockdowns* korrelieren, spricht stark für einen funktionellen Zusammenhang dieser Regulation mit mutp53. Betrachtet man alle Gene, die in drei Experimenten nach mutp53-Depletion reguliert sind, so sind Gene aus dem Steroid- und Cholesterinstoffwechsel mit hoher Signifikanz überrepräsentiert (vgl. 3.3). Cholesterin und dessen Derivate sind ein wichtiger Bestandteil der Plasmamembran und beeinflussen deren Stabilität. Die Motilität der Zelle und damit deren invasive Eigenschaften sind stark abhängig von der Membranstruktur. Folglich deutet die Regulation von Genen aus Steroid- und Cholesterinstoffwechsel auf einen Einfluss von mutp53 auf die Invasion und Metastasierung von U251 Zellen hin, Eigenschaften, deren Erhöhung zu den mutp53-GOF-Effekten gezählt wird. Weiterhin sind funktionelle Verwandte von Cyclin A in den mutp53-regulierten Genen überrepräsentiert (vgl. 3.3). Cyclin A steuert den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus und ist damit ein wichtiger Regulator der Proliferation. Somit weist auch die Regulation dieser Gruppe von Genen in U251 auf mutp53-GOF-Effekte hin.

Im Gegensatz zur Analyse aller mutp53-regulierten Gene aus drei Experimenten liefert der Vergleich von drei biologischen Replikaten nur ein vergleichsweise kleines Set an einheitlich regulierten Genen (vgl. 3.3) und es ist keine klare funktionelle Gensignatur innerhalb dieses



Sets erkennbar. Mutp53 scheint in U251 Zellen bei einer großen Anzahl von Genen in die Transkription einzugreifen zu können, allerdings unterliegt die Regulation dieser Gene infolge einer transienten mutp53-Depletion einer gewissen Variabilität. Somit spiegelt sich die Heterogenität der transkriptionellen Regulation durch mutp53 bereits innerhalb dieses experimentellen Systems wider. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass mutp53 im Gegensatz zu klassischen Transkriptionsfaktoren kein klar definiertes Set von Zielgenen hat, sondern als Ko-Faktor die Transkription von Genen zu modulieren scheint, deren Regulation von weiteren Faktoren und Stimuli abhängig ist. Nach dem Modell der kontextabhängigen Regulation sorgt mutp53 somit durch leichte Veränderungen des vorliegenden Transkriptionsmusters für eine Plastizität des Transkriptoms. Anstelle der Förderung eines Transkriptionsmusters wird ein variables Transkriptionsmuster aufrecht erhalten, das sich zwischen einzelnen Zellen und Generationen von Zellen leicht unterscheiden kann. Unter optimalen Wachstumsbedingungen in der Zellkultur fehlt nach mutp53-Depletion der Selektionsdruck und somit ist das resultierende Transkriptionsmuster nicht klar festgelegt. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass der Großteil mutp53-regulierter Gene in U251 Zellen aktiv ist (94,8 %, vgl. 3.3) und es bei den per ChIP-chip untersuchten Genen zu keiner signifikanten Veränderung des aktiven Histonmarkers H3K4Me3 kommt (vgl. 3.5.3). Diese Ergebnisse zeigen, dass es nicht zur *de novo* Aktivierung oder Inaktivierung von Genen kommt, sondern Vielmehr eine Modulation der vorhandenen Transkription stattfindet.

Eine weitere Untersuchung der Hypothese von mutp53 als Modulator der aktiven Transkription, der transkriptionelle Plastizität schafft, ist durch zwei experimentelle Ansätze möglich. Einerseits ist eine Depletion von mutp53 über einen längeren Zeitraum, unter Umständen in Kombination mit veränderten Wachstumsbedingungen, abweichend von den optimalen Kulturbedingungen, notwendig. Andererseits müssen der transkriptionelle Status mutp53-regulierter Gene und eine Bindung von mutp53 in diesen Genen als molekulare Grundlage für die Modulation der Transkription untersucht werden. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag mit der Charakterisierung der molekularen Grundlagen der transkriptionellen Regulation auf dem zweiten Punkt. Parallel wurde daran gearbeitet, eine mutp53-Depletion über einen längeren Zeitraum zu erreichen. Dieser Ansatz ist jedoch technisch schwierig, da die beobachtete Heterogenität der transkriptionellen Regulation durch mutp53 nur ein experimentelles Modell mit einer induzierbaren mutp53-Depletion erlaubt, in dem die Effekte des mutp53-*knockdowns* ohne vorherige Selektion von mutp53-depletierten Klonen über einen längeren Zeitraum verfolgt werden können. Ein induzierbarer mutp53-*knockdown* ist in

der Literatur bisher nur einmal beschrieben (Bossi et al. 2006) und konnte in Kooperation mit Dr. Gianluca Bossi für U251 Zellen erst kürzlich in unserem Labor etabliert werden. Somit steht die Charakterisierung dieses Systems noch aus.

Um den transkriptionellen Status und eine mutp53-Bindung an regulierte Gene weiter zu untersuchen, wurden im Verlauf dieser Arbeit mutp53-regulierte Gene aus dem transienten *knockdown*-System verwendet. Trotz der beobachteten Heterogenität der transkriptionellen Regulation durch mutp53 ergibt die globale Expressionsanalyse ein Set von Genen, das reproduzierbar reguliert ist. Diese Gene scheinen im transkriptionellen Kontext von U251 Zellen besonders sensitiv gegenüber einer Modulation durch mutp53 zu sein und bieten somit ein gutes Modell für weitere Analysen. Aus dem Set von Genen aus der globalen Expressionsstudie wurden einige Kandidatengene exemplarisch einem rigorosen Validierungsprozess unterzogen, um eine unspezifische Regulation der Gene, sowie Artefakte aus dem Microarray vor weiteren mechanistischen Untersuchungen auszuschließen (vgl. 3.4). Im Laufe dieser Validierung ergaben sich für einige Gene unspezifische Effekte der verwendeten Kontroll-siRNA; eine andere Gruppe von Genen unterlag wiederum einer variablen Regulation zwischen den einzelnen Experimenten. Fünf Gene waren in allen Validierungsexperimenten eindeutig mutp53-abhängig reguliert. Die mutp53-abhängige Expressionsänderung dieser Gene wurde in zwei weiteren Zelllinien mit der gleichen p53-Mutation untersucht. Keines der fünf Gene ist in HT29 oder MDA-MB-468 Zellen nach mutp53-Depletion signifikant reguliert (vgl. 3.4). Diese Ergebnisse unterstützen wiederum das Modell der variablen und (zell-)kontextabhängigen Modulation der Transkription durch mutp53.

## 4.2 Transkriptioneller Status mutp53-regulierter Gene

Die nähere Untersuchung mutp53-regulierter Gene erfolgte mit Hilfe von ChIP-chip-Experimenten. Dafür wurde ein *custom* Microarray entworfen, der die gesamten genomischen Regionen von Genen abdeckt (vgl. 2.2.3.12.1). Da Praktisch alle mutp53-regulierten Gene aus der globalen Expressionanalyse in U251 Zellen aktiv sind, wurde die Untersuchung des transkriptionellen Status der Gene auf Faktoren beschränkt, die an aktiven Promotoren zu finden sind. Die Auswahl orientiert sich außerdem an den transkriptionellen Eigenschaften von wtp53. Neben den für aktive Promotoren spezifischen Histonmodifikationen H3K4Me3 und H3K9Ac wurde die Prozessivität von Pol II untersucht, die durch Phosphorylierungen der Serine Ser2 und Ser5 in der CTD bestimmt wird. Dabei entsprechen Pol II S5-P initiiertes und

Pol II S2-P elongationskompetenter Pol II. Wtp53 interagiert mit mehreren Histon-Acetyltransferasen und wirkt laut neueren Studien beim Umschalten zur produktiven Elongation mit, die eine Phosphorylierung von Ser2 in der CTD erfordert. Daher liegt es nahe, dass p53-Punktmutanten mit intakter Transaktivierungsdomäne ebenfalls die Acetylierung von Histonen und die Prozessivität der Pol II an Zielgenen beeinflussen können. Wie bereits erwähnt zeigt eine globale Analyse der H3K4Me3-Besetzung der Gene auf dem Microarray, dass es infolge der mutp53-Depletion zu keiner signifikanten Veränderung dieser Modifikation kommt, d.h. mutp53 moduliert die Transkription von Genen, die sich in einem aktivierten Grundzustand befinden. Die Analyse der Besetzung mit H3K4Me3, H3K9Ac und den phosphorylierten Formen von Pol II wurde exemplarisch an den fünf eindeutig validierten mutp53-Zeilgenen aus U251 Zellen durchgeführt (vgl. 3.5.3). Entsprechend der globalen Analyse sind auch für diese fünf Gene nur leichte Veränderungen der H3K4Me3-Besetzung sichtbar, allerdings korreliert die beobachtete leichte Zunahme und/oder Verbreiterung der Profile nach mutp53-Depletion mit einer verstärkten Transkription. Klare Unterschiede zeigen sich bei der Besetzung mit H3K9Ac und dem Phosphorylierungsstatus von Pol II. Entsprechend der Zunahme der Transkription der fünf validierten Gene nehmen auch H3K9Ac, Pol II S2P und Pol II S5-P zu. Die PCR-basierte Analyse von ChIP-Experimenten für die beiden stark regulierten Gene *GAS1* und *HTR2A* bestätigt die Ergebnisse für H3K4Me3, H3K9Ac, Pol II S2-P und Pol II S5-P. Außerdem zeigt sie zusätzlich, dass mit verstärkter Transkription nach mutp53-Depletion auch die Gesamtmenge an Pol II an den Promotoren zunimmt. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass mutp53 in die Transkription der untersuchten Gene eingreift, verdeutlichen aber auch, dass nicht ein spezifischer Schritt, wie beispielsweise ein Umschalten zur Elongation betroffen ist. Stattdessen treten Veränderungen in der gesamten Sequenz aus Histonmodifikationen im Promotor, Initiation der Transkription und Umschalten zur Elongation auf. Daher deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass mutp53 einen frühen oder übergeordneten Prozess wie beispielsweise die Struktur des umliegenden Chromatins und damit die Zugänglichkeit des Promotors beeinflusst. Diese Art der Modulation der Transkription könnte entweder indirekt durch Sequestrierung von Ko-Faktoren, histonmodifizierenden Enzymen und Komponenten von Chromatin-Remodeling Komplexen über Protein-Protein-Interaktionen stattfinden, oder direkt am Promotor durch Beeinflussung von Aktivität und Bindung dieser Proteine erfolgen. Somit war die Analyse der mutp53-Bindung an regulierte Gene ein logischer nächster Schritt.

### 4.3 Identifikation von mutp53-Bindestellen in U251 Zellen

Um eine Assoziation von mutp53 an regulierte Gene zu untersuchen wurde der gleiche *custom* Microarray verwendet wie für die Untersuchung der Histonmodifikationen und Pol II-Phosphorylierungen. Trotz der erwarteten höheren Heterogenität der mutp53-Bindung an genomische DNA infolge der fehlenden Sequenzspezifität, ergab die Analyse von vier biologischen mutp53-ChIP-Replikaten eine beträchtliche Anzahl reproduzierbar auftretender mutp53-Bindestellen (483; vgl. 3.5.4). Eine weitere Analyse der mutp53-Bindung über die genomischen Regionen einzelner Gene zeigt zusätzliche putative Bindestellen, die in einzelnen Experimenten auftreten sowie Bindestellen, die mit hoher Reproduzierbarkeit in allen Experimenten auftreten, dabei allerdings an der Detektionsgrenze der in der globalen Analyse gesetzten Kriterien liegen. Darunter befinden sich mutp53-regulierte Gene wie *HTR2A* und *HAS2*, was darauf hindeutet, dass auch eine schwächere oder transiente Bindung von mutp53 funktionell ist.

Insgesamt befinden sich mutp53-Bindestellen sowohl an Genen, die in U251 Zellen nach mutp53-Depletion reguliert sind, als auch an nicht regulierten Genen. Die Tatsache, dass 88 % der Bindestellen mit CpG-Inseln und 76 % mit DNase I hypersensitiven Regionen zusammenfallen - Bereiche, die mit (aktiven) Promotoren und regulatorischen Regionen in Verbindung gebracht werden - und 59% innerhalb von Promotoren liegen (+/- 500 bp vom TSS), spricht stark für einen direkten Einfluss von mutp53 auf die Transkription. Trotz der großen Anzahl an mutp53-Bindestellen in U251 Zellen scheint die Depletion von mutp53 über einen kurzen Zeitraum (~ 48 h) allerdings nicht zwangsweise eine Regulation aller assoziierter Gene nach sich zu ziehen. Dieses Ergebnis deckt sich mit der beobachteten Heterogenität der transkriptionellen Veränderungen nach mutp53-Depletion und unterstreicht die Variabilität und/oder Kontextabhängigkeit der mutp53-vermittelten Effekte auf die Transkription. In Anbetracht der großen Anzahl von mutp53-Bindestellen, die mit funktionellen Regionen verbunden sind, wäre für die Zukunft eine Analyse einer mutp53-Depletion über einen längeren Zeitraum von großem Interesse, insbesondere in Kombination mit externen Stimuli und veränderten Wachstumsbedingungen. Diese Art der Analyse könnte klären, ob sich bei längerem mutp53-Verlust unter Selektionsdruck ein oder mehrere Transkriptionsmuster ausbilden, in denen Gene mit mutp53-Bindung stabil in eine Richtung reguliert werden und wie die molekularen Veränderungen in Form von Histonmodifikationen und vorhandenen Ko-Faktoren an den Promotoren dieser Gene aussehen.

#### 4.4 Charakterisierung der mutp53-Bindestellen und der Art der mutp53-Bindung

Die Analyse der 483 identifizierten mutp53-Bindestellen in U251 Zellen deutet darauf hin, dass ein hoher G/C-Gehalt eine Voraussetzung für eine mutp53-Bindung ist. 88 % der Bindestellen überlappen mit CpG-Inseln. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis besitzen viele der publizierten mutp53-regulierten Gene ebenfalls CpG-Inseln im Promotor, darunter *MYC* (Frazier et al. 1998), *ID2* (Yan et al. 2008), *ID4* (Fontemaggi et al. 2009), *TWIST1* (Kogan-Sakin et al. 2011), *EGR1* (Weisz et al. 2004), *MAP2K3* (Gurtner et al. 2010), sowie Zielgene des VDR (*CYP24A1*) (Stambolsky et al. 2010) und von NF-Y (*CCNA1*, *CCNB2*, *CDK1*, *CDC25C*) (Di Agostino et al. 2006).

Entsprechend des hohen Anteils an CpG-Inseln in den identifizierten mutp53-Bindestellen ergibt eine Motivsuche zwei G/C-reiche Konsensusbindemotive (vgl. 3.5.5). G/C-reiche DNA ist in der Lage nicht-B-DNA-Konformationen wie beispielsweise Z-DNA, Triplex(H)-DNA oder Quadruplex-Strukturen anzunehmen. Eine Analyse der mutp53-Bindesequenzen bezüglich struktureller Eigenschaften wie *base step parameter* (Basen-Achsen-Parameter) und lösungsmittelzugänglicher Oberfläche, zeigt folglich eindeutige Abweichungen der mutp53-gebundenen Sequenzen von der „normalen“ B-DNA-Konformation (vgl. 3.5.5). Außerdem deutet der Rückgang der Besetzung mit H3K4Me3, H3K9Ac und auch Pol II in genau diesen Regionen auf eine offene Chromatinstruktur hin. Somit hätte die DNA in diesen Regionen die Möglichkeit Sekundärstrukturen anzunehmen und wäre frei zugänglich.

Eines der beiden identifizierten mutp53-Bindemotive hat eine starke Ähnlichkeit mit dem GC-Box Bindemotiv des Transkriptionsfaktors SP1 (p-Wert =  $4,21923 \times 10^{-6}$ ; vgl. 3.5.6), der als Interaktionspartner von mutp53 beschrieben wurde (Chicas et al. 2000). Allerdings wurde diese Interaktion durch DNA-Affinitätschromatographie identifiziert. Dabei wurden mutp53 und SP1 unter denselben Bedingungen von DNA-Sequenzen mit SP1-Bindemotiv eluiert. Diese Methodik kann nicht auflösen, ob mutp53 durch Interaktion mit SP1 an die DNA rekrutiert wird, oder lediglich beide Proteine an die verwendete DNA-Sequenz binden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von mutp53 und SP1 mittels Ko-IP untersucht, und es konnte lediglich eine Interaktion einer kleinen Fraktion des gesamten mutp53 mit SP1 (und umgekehrt) gefunden werden (vgl. 3.5.6). Weiterhin zeigt die Immunfluoreszenzfärbung nach Extraktion der löslichen Kernfraktion in U251 Zellen nur eine sehr geringe Ko-Lokalisation von mutp53 und SP1 an Chromatin (vgl. 3.5.6). Wäre die Rekrutierung von mutp53 an DNA entscheidend abhängig von SP1, sollte in der bioinformatischen Analyse der

mutp53-Bindestellen aus U251 Zellen auch das SP1-Konsensusmotiv mit hoher statistischer Signifikanz vertreten sein. Diese Ergebnisse sprechen stark für eine unabhängige Bindung der beiden Faktoren an DNA.

In Anbetracht der beschriebenen strukturabhängigen DNA-Bindung von mutp53 (vgl. 1.6.2), deuten die vorliegenden Ergebnisse sehr stark auf eine direkte Assoziation von mutp53 mit DNA hin und stützen somit das Modell der transkriptionellen Regulation durch mutp53 über direkte DNA-Bindung. Diese Hypothese muss in Zukunft durch Bindungsstudien mit den identifizierten Konsensusmotiven und eine strukturelle Charakterisierung dieser DNA-Sequenzen weiter untersucht werden.

#### **4.5 Mechanistische Überlegungen zur transkriptionellen Regulation durch mutp53**

Die Analyse der mutp53-Bindestellen zeigt, dass mutp53 mit regulatorischen Regionen einer Vielzahl von Genen assoziieren kann und deutet stark auf eine direkte, strukturabhängige Bindung an DNA hin. Diese Bindung an G/C-reiche DNA-Sequenzen stattet mutp53 mit dem Potential aus, in die Transkription einer Vielzahl von Genen einzugreifen. Der Großteil der Gene mit mutp53-Bindung ist aktiv und die Untersuchung von Histonmodifikationen und der Pol II-Phosphorylierung in den Promotorregionen deutet darauf hin, dass ein früher Schritt der transkriptionellen Regulation und/oder die Zugänglichkeit des Promotors durch mutp53 beeinflusst werden (vgl. 4.2). Dies könnte durch Modulation der Aktivität und Bindung von histonmodifizierenden Enzymen und Chromatin-Remodeling Komplexen geschehen. Insofern könnte die beobachtete Veränderung der H3K9Ac-Besetzung einen entscheidenden Schritt darstellen. Die Acetylierung von Histonen ist mit der Aktivierung der Transkription verknüpft (Kouzarides 2007). Wtp53 kann sowohl die Acetyltransferasen p300/CBP, PCAF, GCN5 und TIP60 als auch die Deacetylase HDAC1 an Promotoren rekrutieren (vgl. 1.5.2). Außerdem konnte gezeigt werden, dass wtp53 im Zuge der DNA-Reparatur nach UV-Bestrahlung eine wichtige Rolle bei der globalen „Auflockerung“ der Chromatinstruktur spielt (Rubbi and Milner 2003). Dabei scheint eine p53-abhängige Histon-Acetylierung eine wichtige Rolle zu spielen. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind bisher ungeklärt, allerdings ist diese p53-Funktion höchstwahrscheinlich unabhängig von seinem Wirken als Transkriptionsfaktor. Die Acetylierung von Histonen bewirkt einerseits ein „Aufweichen“ der Chromatinstruktur infolge der Neutralisierung der positiven Ladung der acetylierten Lysine, andererseits bietet die Acetylierung eine Bindeplattform für Proteine mit Bromodomänen (Ruthenburg et al.

2007). Unter den Proteinen mit Bromodomänen befinden sich beispielsweise der Chromatin-Remodeling Komplex SWI/SNF (Ruthenburg et al. 2007) und GCN5 selbst (Dhalluin et al. 1999). Neben der Rekrutierung der Histon-Acetyltransferasen/Deacetylasen interagiert wtp53 auch mit Untereinheiten von SWI/SNF (Lee et al. 2002). Damit sind diese Komponenten mögliche Kandidaten, über deren Rekrutierung bzw. Modulation ihrer Aktivität mutp53 die Transkription beeinflusst. In Abhängigkeit von weiteren gebundenen Faktoren sowie der Chromatinlandschaft an den jeweiligen Promotoren können sowohl eine Verstärkung als auch eine Hemmung der Transkription das Resultat sein. Welche zusätzlichen Faktoren entscheiden, ob es zu einer Rekrutierung von Histon-Acetyltransferasen oder Deacetylasen kommt, ist auch für wtp53 bisher nur unzureichend verstanden und bedarf weiterer Studien der Histonmodifikationen und gebundener Faktoren an den jeweiligen Promotoren.

Die Modulation der Transkription durch mutp53 muss in diesem Szenario nicht ausschließlich von der Rekrutierung von Ko-Faktoren abhängig sein, sondern kann zusätzlich auf einer Konkurrenz um die promotornahen Bindungsstellen beruhen. Die meist hohe Konzentration von mutp53 im Zellkern kann die Grundlage für eine Bindung an zahlreiche G/C-reiche Regionen sein. Eine Besetzung dieser Regionen kann die Bindung von Transkriptionsfaktoren, Ko-Aktivatoren und -Repressoren, histonmodifizierenden Enzymen und Chromatin-Remodeling Komplexen erschweren und somit die Transkription deregulieren. Bei diesem Modell ist das Resultat der mutp53-Bindung komplett vom transkriptionellen Status der jeweiligen Promotoren abhängig. Stark aktive Gene wie beispielsweise *housekeeping*-Gene, deren Transkription ubiquitäre Faktoren erfordert, die in großer Menge vorliegen, wären nur schwach beeinflusst. Gene, deren Transkription hingegen entscheidend von einzelnen kontextabhängig regulierten Faktoren positiv oder negativ beeinflusst wird, würden durch deren Ausschluss vom Promotor stark moduliert. Insbesondere eine Inaktivierung von Genen durch Heterochromatin-Bildung, die eine koordinierte, schrittweise Rekrutierung von repressorischen Komponenten wie Histon-Deacetylasen, Chromatin-Remodeling Komplexen, DNA-Methylasen und Heterochromatin-Proteinen erfordert, wäre stark erschwert. Insofern könnte die beobachtete bevorzugte Assoziation von mutp53 mit aktiven Promotoren, statt einer Voraussetzung für die Bindung auch eine Folge der Bindung sein. In diesem Szenario moduliert mutp53 einerseits die vorhandene Transkription und kann zusätzlich die transkriptionelle Kompetenz einer Vielzahl von Genen mit G/C-reichen Promotoren aufrecht erhalten. Durch die resultierende transkriptionelle Plastizität entsteht eine Zelle mit einem fluktuierenden Transkriptionsmuster. Die in U251 Zellen beobachtete Heterogenität der nach transienter mutp53-Depletion

regulierten Gene ergibt sich aus dieser Plastizität. Ein Verlust von *mutp53* unterwirft die betroffenen Gene wieder der „normalen“ Regulation und fördert die Ausbildung definierter Transkriptionsmuster. Dieser Prozess wird, ähnlich einer Differenzierung, mehrere Zellgenerationen erfordern und kann verschiedene Endpunkte haben. Die vorübergehende *mutp53*-Depletion markiert lediglich den Startpunkt, hat aber keine stabile Änderung der Transkription zur Folge bevor *mutp53* re-exprimiert wird.

Diese Idee erfährt Unterstützung durch eine aktuelle Studie, die zeigt, dass die *mutp53*-abhängige Regulation von Genen, die mit Entwicklungsprozessen assoziiert sind, erst 15 Passagen nach Beginn der *mutp53*-Expression einsetzt (Kogan-Sakin et al. 2011). Dabei wird die epigenetische Repression von *TWIST1* aufgehoben, einem Faktor der eine Transition von einem epitheliale zu einem mesenchymalem Phänotyp fördert. Diese Daten deuten darauf hin, dass *mutp53* festgelegte entwicklungspezifische Transkriptionsmuster durch epigenetische Veränderungen über einen längeren Zeitraum aufheben kann. Eine weitere Studie aus derselben Arbeitsgruppe zeigt, dass *mutp53* eine Reprogrammierung von somatischen Zellen zu induzierten pluripotenten Stammzellen (*induced pluripotent stem cells*; iPSCs) fördert (Sarig et al. 2010). Bereits 2006 wurde gezeigt, dass die Expression eines Sets von Transkriptionsfaktoren, sog. Pluripotenzfaktoren, differenzierte Zellen in pluripotente Stammzellen reprogrammieren kann (Takahashi and Yamanaka 2006). Folgearbeiten zeigen, dass dieser Prozess mit massiven epigenetischen Veränderungen einhergeht (Maherali et al. 2007; Mikkelsen et al. 2008) und sich die Effizienz der Reprogrammierung durch den *knockdown* von *wtp53* deutlich steigern lässt (Zhao et al. 2008). Die aktuelle Studie aus dem Labor von Varda Rotter zeigt nun, dass die Expression von *mutp53* gegenüber dem Verlust von *wtp53* eine zusätzliche Steigerung der Effizienz bewirkt (Sarig et al. 2010). Außerdem kann *mutp53* einen der drei verwendeten „Reprogrammierungs-Faktoren“ ersetzen. Die entstehenden iPSCs weisen starkes tumorigenes Potential auf und haben die Fähigkeit zur Differenzierung verloren. Diese Daten deuten stark darauf hin, dass ein wichtiger *mutp53*-GOF-Effekt die Aufrechterhaltung eines undifferenzierten, „stammzellartigen“ Expressionsmusters ist. Grundlage dieser Fähigkeit könnte die in dieser Arbeit identifizierte Bindung von *mutp53* an G/C-reiche Regionen einer Vielzahl von Genen sein, die deren korrekte entwicklungsabhängige Regulation stört. Im Verlauf der Festlegung bestimmter Differenzierungslinien verlieren Gene anderer Differenzierungslinien den aktiven Status und pluripotenzassoziierte Faktoren werden herunterreguliert (Berdasco and Esteller 2010). Dieses epigenetische „Umschalten“ des Transkriptionsmusters ist ein entscheidender Schritt der Differenzierung und es gibt zahlreiche Studien, die Störungen in diesem Prozess mit

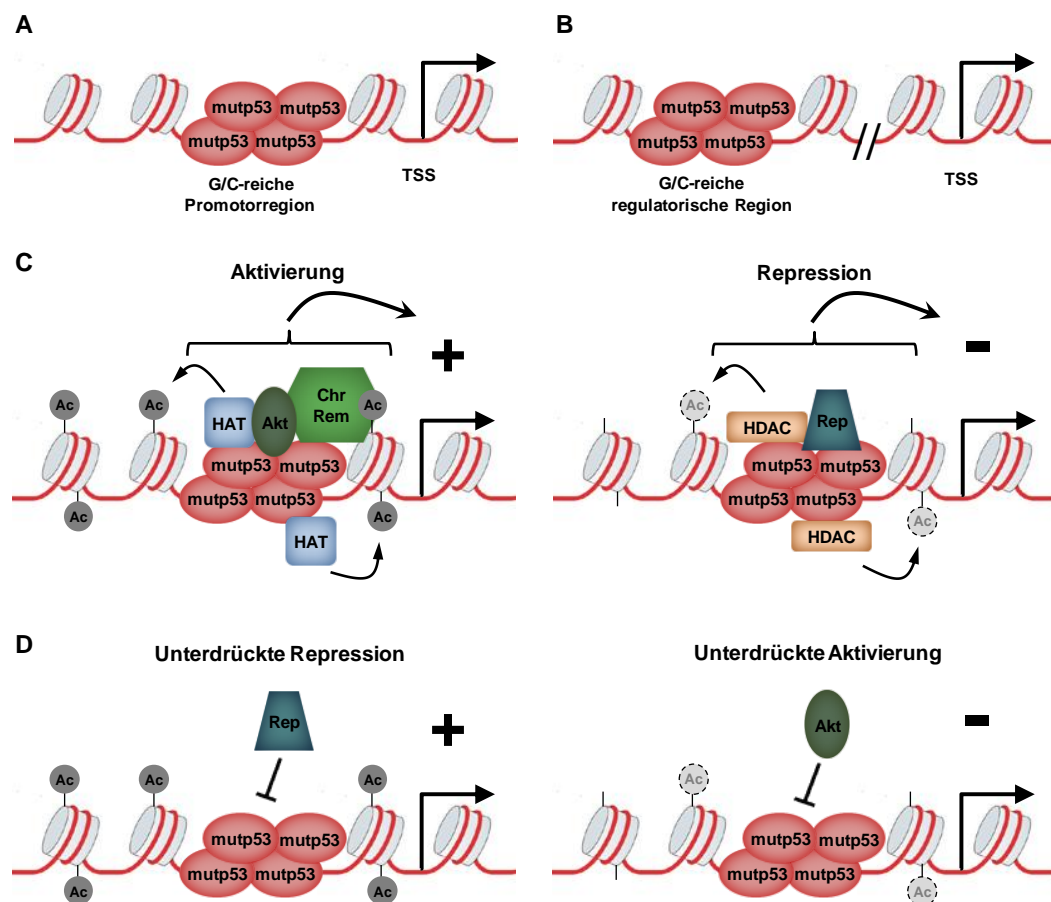


fehlerhafter Differenzierung und Tumorentstehung in Verbindung bringen (Berdasco and Esteller 2010; Portela and Esteller 2010). Eine Bindung von mutp53 an CpG-Inseln könnte genau diese Störung bewirken und Gene aktiv halten, die unter normalen Bedingungen abgeschaltet würden.

In dieser Hinsicht sind neuere Studien an embryonalen Stammzellen (ES Zellen) von großem Interesse. Artificielle CpG-Sequenzen, die in ES Zellen eingebracht werden, werden scheinbar spontan durch die Histon-Methyltransferase SET1 an H3K4 trimethyliert (Thomson et al. 2010). Während H3K4Me3-Besetzung im Allgemeinen mit aktiv transkribierten Genen korreliert (Bernstein et al. 2005; Kim et al. 2005), zeigen Studien in ES Zellen, dass dort praktisch alle CpG-reichen Promotoren H3K4Me3 tragen und dass diese Regionen mit H3K9Ac und einer offenen Chromatinstruktur einhergehen. Viele dieser Gene sind mit Pol II besetzt und es findet eine Initiation der Transkription statt; allerdings ist eine produktive Elongation blockiert. Eine weitere Gruppe CpG-reicher Promotoren wird als bivalent bezeichnet, da sie neben H3K4Me3 die inaktivierende Histonmodifikation H3K27Me3 trägt, die zur Repression der Transkription führt (Zhou et al. 2011). Diese Daten deuten an, dass CpG-reiche Sequenzen *per se* eine aktive Chromatinkonformation annehmen können und die Transkription an solchen Promotoren über zusätzliche Histonmodifikationen oder durch nachgeschaltete Kontrollpunkte wie die Pol II-Prozessivität gesteuert werden. So können im Verlauf der Differenzierung zelltypspezifische Gene in kurzer Zeit aktiviert werden. Gene anderer Differenzierungslinien und Pluripotenzgene hingegen können durch eine Rekrutierung repressorischer Komponenten schrittweise vollständig inaktiviert werden. Eine korrekte Differenzierung wäre somit stark abhängig von zusätzlich an die Promotoren rekrutierten Faktoren. Eine Deregulierung der Bindung oder Aktivität dieser Faktoren, beispielsweise durch mutp53-Bindung an die CpG-Inseln, würde zu einer gestörten Differenzierung und Zellen mit aberranten Transkriptionsmustern führen.

Insgesamt ergibt sich aus der Bindung von mutp53 an G/C-reiche, promotornahe Regionen somit ein Modell der transkriptionellen Regulation, das auf zwei sich ergänzenden Mechanismen aufbaut (Abb. 28). Einerseits kann mutp53 durch spezifische Interaktionen mit vorhandenen Faktoren deren Aktivität modulieren und zusätzliche Ko-Aktivatoren oder Repressoren rekrutieren, so dass die Transkription kontextabhängig beeinflusst wird. Andererseits kann die Assoziation von mutp53 mit promotornahen G/C-reichen Regionen zu einer Störung der Bindung von Faktoren führen, die an der korrekten kontextabhängigen Regulation der jeweiligen Gene beteiligt sind. Beide Effekte verhindern die Ausbildung eines definierten Transkriptionsmusters und erzeugen transkriptionelle Plastizität. Epigenetische

Mechanismen wie veränderte Histonmodifikationen, die zu einer aberranten Chromatinlandschaft führen, haben dabei wahrscheinlich einen entscheidenden Einfluss. In dieses Modell lässt sich auch die beschriebene Modulation der Transkription durch Interaktionen mit bestimmten Transkriptionsfaktoren integrieren. Die spezifischen Interaktionen von mutp53 tragen zur transkriptionellen Plastizität bei, indem sie die Transkription zelltyp- und stimulusabhängiger Gene modulieren. Zusammengefasst entsteht so ein globales Modell der transkriptionellen Regulation durch mutp53, dass die in der Literatur beschriebene augenscheinliche Heterogenität und Abhängigkeit der mutp53-Zielgene und Effekte vom Zellsystem nicht nur erklärt, sondern sogar fordert. Mutp53 nimmt dabei die Rolle eines globalen Ko-Faktors ein, der das Transkriptionsmuster zelltyp- und tumorspezifisch sowie in Abhängigkeit von externen Signalen beeinflusst.



**Abbildung 28: Modell der transkriptionellen Regulation durch mutp53.**

Mutp53 assoziiert mit G/C-reichen Promotoren (A) oder regulatorischen Regionen (B) und greift über spezifische (C) und unspezifische Effekte (D) in die Transkription benachbarter Gene ein. C. Mutp53 rekrutiert zusätzliche Ko-Faktoren, wie beispielsweise Histon-Acetylasen und Deacetylasen, die das umliegende Chromatin verändern und eine Repression oder Verstärkung der Transkription bewirken. D. Mutp53 besetzt Bindestellen wichtiger (Ko-)Faktoren und schwächt damit deren Einfluss auf die Transkription. HAT = Histon-Acetyltransferase, HDAC = Histon-Deacetylase, ChrRem = Chromatin-Remodeling Komplex, Akt = Aktivator, Rep = Repressor, Ac = acetylierter Lysinrest.

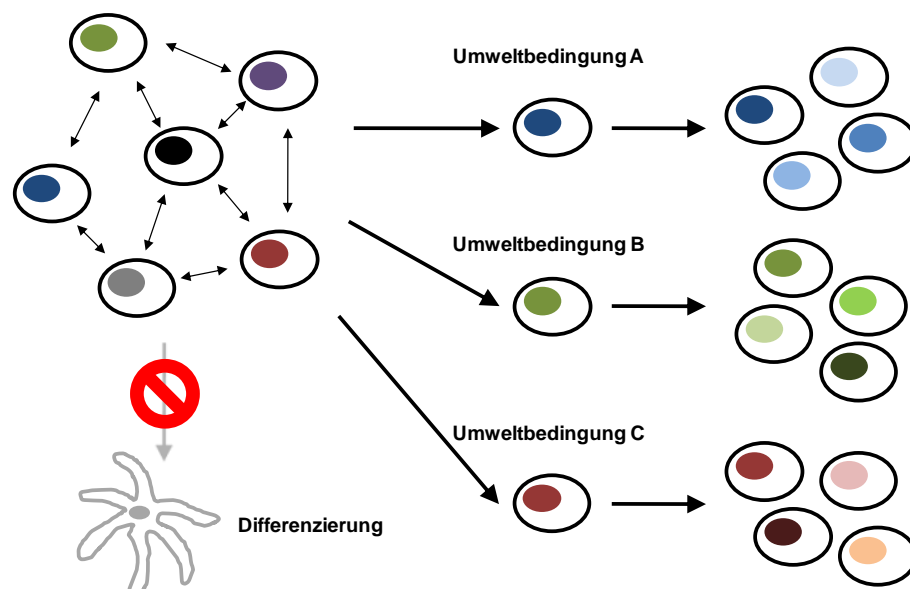
## 4.6 Biologische Konsequenzen der postulierten transkriptionellen Regulation durch mutp53

Die Aufrechterhaltung der transkriptionellen Kompetenz und die Förderung transkriptioneller Plastizität können eine Tumorentstehung und Progression stark begünstigen. Im Zuge einer Deregulierung der Differenzierung von Vorläuferzellen oder einer schrittweisen Reprogrammierung von differenzierten Zellen geht eine eindeutige zelluläre Identität verloren. Kommt es dabei durch epigenetische und/oder genetische Veränderungen zum Erhalt oder dem Erwerb eines unbegrenzten Replikationspotentials, entstehen Zellen, die ähnlich Stammzellen, das Potential besitzen Gene aller oder mehrerer Differenzierungslinien zu transkribieren, dabei jedoch nicht mehr der normalen Differenzierung und Regulationsprozessen unterworfen sind. Diese Zellen haben somit einen entscheidenden Wachstumsvorteil und können entsprechend des Modells der klonalen Evolution von Tumorzellen den Startpunkt der Tumorentstehung darstellen. Aber auch im Verlauf der Tumorprogression hat die durch mutp53 erzeugte transkriptionelle Plastizität einen großen Vorteil. Im Zellpool des Tumors befinden sich zu jeder Zeit Zellen mit leicht variierenden Transkriptionsmustern (Abb. 29). In der Folge erhöht sich das Potential der Anpassung an ein verändertes Mikroumfeld sehr stark. Vergleichbar der für Tumore beschriebenen genetischen Instabilität könnte diese transkriptionelle bzw. epigenetische Instabilität durch mutp53 die Evolution der Tumorzellen vorantreiben. Im Gegensatz zu genetischer Instabilität hat ein plastisches Transkriptionsmuster innerhalb der Tumorzellpopulation zwei entscheidende Vorteile. Erstens geht kein genetisches Material verloren und zweitens ist die Reaktionszeit auf veränderte Bedingungen stark verkürzt, da entweder schon Zellen mit einem vorteilhaften Transkriptionsmuster vorliegen oder Gene am Ende betroffener Signalwege direkt moduliert werden können. Resultat dieser Tatsache könnte die häufig beobachtete erhöhte Invasivität und Metastasierung mutp53 exprimierender Zellen sein. Diese Eigenschaften beruhen auf der Fähigkeit in ein fremdes biologisches Umfeld vordringen zu können.

Das Modell von mutp53 globaler Ko-Faktor, der innerhalb der durch den Zellkontext vorgegebenen Rahmenbedingungen transkriptionelle Plastizität erschafft, kann die Grundlage neuer Therapieansätze für mutp53-exprimierende Tumore sein. Die direkte Inaktivierung von mutp53 gelingt zwar in Zellsystemen, gestaltet sich aber in der Klinik schwierig und trotz intensiver Forschung sind bisher keine entsprechenden Medikamente auf dem Markt. Die weitere Aufklärung der molekularen Veränderungen an mutp53-regulierten Promotoren kann

dazu beitragen, generelle und zelltypspezifische Wirkungsmechanismen von mutp53 aufzuklären und die gezielte Entwicklung von Wirkstoffen gegen mutp53 voranzutreiben. Außerdem können tumorspezifische Schlüsselfaktoren als Therapieziele dienen. In erster Linie erscheinen Faktoren wie histonmodifizierende Enzyme und Chromatin-Remodeling Komplexe als vielversprechende Kandidaten. Ein Eingriff auf dieser Ebene könnte die transkriptionelle Plastizität erniedrigen und die Zellen empfindlicher für eine Therapie mit Strahlen, Chemotherapeutika, Hormonen, Cytokinen oder Proliferationshemmern machen. Außerdem könnte ein verringertes Metastasierungspotential die Chance bieten Tumore durch chirurgische Eingriffe vollständig zu entfernen.

Insgesamt wurde in der vorliegenden Arbeit ein Modell entwickelt, das eine umfassende Erklärung für die beobachtete Heterogenität der transkriptionellen Regulation durch mutp53 und die daraus resultierenden GOF-Effekte bietet. Die in dieser Arbeit identifizierte Bindung von mutp53 an CpG-Inseln als Grundlage der mutp53-spezifischen transkriptionellen Regulation stellt den Startpunkt für die detaillierte Charakterisierung allgemein gültiger und tumorspezifischer molekularer Grundlagen dar. Damit ergibt sich eine vielversprechende Perspektive für neue kombinatorische Therapieansätze für mutp53-positive Tumore. Beispielsweise wäre eine Ergänzung konventioneller Therapien durch Wirkstoffe, die die Bindung von mutp53 an G/C-reiche DNA unterbinden, denkbar.



**Abbildung 29: Biologische Konsequenzen transkriptioneller Plastizität.**

Transkriptionelle Plastizität führt dazu, dass die Einzelzellen innerhalb des Tumors eine Vielzahl unterschiedlicher, fluktuierender Transkriptionsmuster aufweisen (angedeutet durch die verschiedenen Farben der Zellkerne). Die normale Ausbildung eines definierten Transkriptionsmuster in Form einer Differenzierung ist blockiert. Infolge der transkriptionellen Plastizität können einzelne Zellen besser auf veränderte Umweltbedingungen reagieren, die sich aus einer medikamentösen Behandlung oder einem Vordringen in neue Nischen ergeben. Somit treibt die transkriptionelle Plastizität die klonale Evolution innerhalb des Tumors voran.

## 5 Literaturverzeichnis

- Adorno, M., Cordenonsi, M., Montagner, M., Dupont, S., Wong, C., Hann, B., Solari, A., Bobisse, S., Rondina, M.B., Guzzardo, V., Parenti, A.R., Rosato, A., Bicciato, S., Balmain, A., and Piccolo, S. 2009. A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis. *Cell* **137**(1): 87-98.
- Agalioti, T., Chen, G., and Thanos, D. 2002. Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* **111**(3): 381-392.
- Agrawal, N., Dasaradhi, P.V., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K., and Mukherjee, S.K. 2003. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**(4): 657-685.
- Ahn, J., Murphy, M., Kratowicz, S., Wang, A., Levine, A.J., and George, D.L. 1999. Down-regulation of the stathmin/Op18 and FKBP25 genes following p53 induction. *Oncogene* **18**(43): 5954-5958.
- Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. 1964. Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**: 786-794.
- Almer, A., Rudolph, H., Hinnen, A., and Horz, W. 1986. Removal of positioned nucleosomes from the yeast PHO5 promoter upon PHO5 induction releases additional upstream activating DNA elements. *EMBO J* **5**(10): 2689-2696.
- An, W., Kim, J., and Roeder, R.G. 2004. Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. *Cell* **117**(6): 735-748.
- Arva, N.C., Gopen, T.R., Talbott, K.E., Campbell, L.E., Chicas, A., White, D.E., Bond, G.L., Levine, A.J., and Bargonetti, J. 2005. A chromatin-associated and transcriptionally inactive p53-Mdm2 complex occurs in mdm2 SNP309 homozygous cells. *J Biol Chem* **280**(29): 26776-26787.
- Avantaggiati, M.L., Ogryzko, V., Gardner, K., Giordano, A., Levine, A.S., and Kelly, K. 1997. Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* **89**(7): 1175-1184.
- Bailey, T.L., Boden, M., Whittington, T., and Machanick, P. 2010. The value of position-specific priors in motif discovery using MEME. *BMC Bioinformatics* **11**: 179.
- Baker, S.J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., vanTuinen, P., Ledbetter, D.H., Barker, D.F., Nakamura, Y., White, R., and Vogelstein, B. 1989. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* **244**(4901): 217-221.
- Baker, S.J., Markowitz, S., Fearon, E.R., Willson, J.K., and Vogelstein, B. 1990. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* **249**(4971): 912-915.
- Balagurumorthy, P., Lindsay, S.M., and Harrington, R.E. 2002. Atomic force microscopy reveals kinks in the p53 response element DNA. *Biophys Chem* **101-102**: 611-623.
- Balagurumorthy, P., Sakamoto, H., Lewis, M.S., Zambrano, N., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Appella, E., and Harrington, R.E. 1995. Four p53 DNA-binding domain peptides bind natural p53-response elements and bend the DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(19): 8591-8595.
- Balakrishnan, S.K. and Gross, D.S. 2008. The tumor suppressor p53 associates with gene coding regions and co-traverses with elongating RNA polymerase II in an in vivo model. *Oncogene* **27**(19): 2661-2672.
- Bannister, A.J., Schneider, R., Myers, F.A., Thorne, A.W., Crane-Robinson, C., and Kouzarides, T. 2005. Spatial distribution of di- and tri-methyl lysine 36 of histone H3 at active genes. *J Biol Chem* **280**(18): 17732-17736.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., and Kouzarides, T. 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**(6824): 120-124.
- Bao, Y. and Shen, X. 2007. SnapShot: chromatin remodeling complexes. *Cell* **129**(3): 632.
- Bargonetti, J., Manfredi, J.J., Chen, X., Marshak, D.R., and Prives, C. 1993. A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein. *Genes Dev* **7**(12B): 2565-2574.

- Barlev, N.A., Liu, L., Chehab, N.H., Mansfield, K., Harris, K.G., Halazonetis, T.D., and Berger, S.L. 2001. Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell* **8**(6): 1243-1254.
- Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**(4): 823-837.
- Bartek, J., Bartkova, J., Vojtesek, B., Staskova, Z., Lukas, J., Rejthar, A., Kovarik, J., Midgley, C.A., Gannon, J.V., and Lane, D.P. 1991. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* **6**(9): 1699-1703.
- Beckerman, R. and Prives, C. 2010. Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(8): a000935.
- Bell, S., Klein, C., Muller, L., Hansen, S., and Buchner, J. 2002. p53 contains large unstructured regions in its native state. *J Mol Biol* **322**(5): 917-927.
- Ben David, Y., Prideaux, V.R., Chow, V., Benchimol, S., and Bernstein, A. 1988. Inactivation of the p53 oncogene by internal deletion or retroviral integration in erythroleukemic cell lines induced by Friend leukemia virus. *Oncogene* **3**(2): 179-185.
- Berdasco, M. and Esteller, M. 2010. Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell* **19**(5): 698-711.
- Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J., 3rd, Gingeras, T.R., Schreiber, S.L., and Lander, E.S. 2005. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* **120**(2): 169-181.
- Bock, C., Halachev, K., Buch, J., and Lengauer, T. 2009. EpiGRAPH: user-friendly software for statistical analysis and prediction of (epi)genomic data. *Genome Biol* **10**(2): R14.
- Bode, A.M. and Dong, Z. 2004. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **4**(10): 793-805.
- Bossi, G., Lapi, E., Strano, S., Rinaldo, C., Blandino, G., and Sacchi, A. 2006. Mutant p53 gain of function: reduction of tumor malignancy of human cancer cell lines through abrogation of mutant p53 expression. *Oncogene* **25**(2): 304-309.
- Bossi, G., Marampon, F., Maor-Aloni, R., Zani, B., Rotter, V., Oren, M., Strano, S., Blandino, G., and Sacchi, A. 2008. Conditional RNA interference in vivo to study mutant p53 oncogenic gain of function on tumor malignancy. *Cell Cycle* **7**(12): 1870-1879.
- Bourdon, J.C., Deguin-Chambon, V., Lelong, J.C., Dessen, P., May, P., Debuire, B., and May, E. 1997. Further characterisation of the p53 responsive element--identification of new candidate genes for trans-activation by p53. *Oncogene* **14**(1): 85-94.
- Boyer, L.A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L.A., Lee, T.I., Levine, S.S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M.K., Bell, G.W., Otte, A.P., Vidal, M., Gifford, D.K., Young, R.A., and Jaenisch, R. 2006. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* **441**(7091): 349-353.
- Brazdova, M., Quante, T., Togel, L., Walter, K., Loscher, C., Tichy, V., Cincarova, L., Deppert, W., and Tolstonog, G.V. 2009. Modulation of gene expression in U251 glioblastoma cells by binding of mutant p53 R273H to intronic and intergenic sequences. *Nucleic Acids Res* **37**(5): 1486-1500.
- Brookes, E. and Pombo, A. 2009. Modifications of RNA polymerase II are pivotal in regulating gene expression states. *EMBO Rep* **10**(11): 1213-1219.
- Brosh, R. and Rotter, V. 2009. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* **9**(10): 701-713.
- Brown, J.P., Wei, W., and Sedivy, J.M. 1997. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* **277**(5327): 831-834.
- Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J.I., Beach, D., Jacks, T., and Hannon, G.J. 1995. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* **377**(6549): 552-557.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R., and Agami, R. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**(5567): 550-553.
- Bullock, A.N. and Fersht, A.R. 2001. Rescuing the function of mutant p53. *Nat Rev Cancer* **1**(1): 68-76.

- Cailleau, R., Olive, M., and Cruciger, Q.V. 1978. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro* **14**(11): 911-915.
- Candau, R., Scolnick, D.M., Darpino, P., Ying, C.Y., Halazonetis, T.D., and Berger, S.L. 1997. Two tandem and independent sub-activation domains in the amino terminus of p53 require the adaptor complex for activity. *Oncogene* **15**(7): 807-816.
- Carey, M., Li, B., and Workman, J.L. 2006. RSC exploits histone acetylation to abrogate the nucleosomal block to RNA polymerase II elongation. *Mol Cell* **24**(3): 481-487.
- Caulin, C., Nguyen, T., Lang, G.A., Goepfert, T.M., Brinkley, B.R., Cai, W.W., Lozano, G., and Roop, D.R. 2007. An inducible mouse model for skin cancer reveals distinct roles for gain- and loss-of-function p53 mutations. *J Clin Invest* **117**(7): 1893-1901.
- Cawley, S., Bekiranov, S., Ng, H.H., Kapranov, P., Sekinger, E.A., Kampa, D., Piccolboni, A., Sementchenko, V., Cheng, J., Williams, A.J., Wheeler, R., Wong, B., Drenkow, J., Yamanaka, M., Patel, S., Brubaker, S., Tammana, H., Helt, G., Struhl, K., and Gingeras, T.R. 2004. Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell* **116**(4): 499-509.
- Cesaroni, M., Cittaro, D., Brozzi, A., Pelicci, P.G., and Luzi, L. 2008. CARPET: a web-based package for the analysis of ChIP-chip and expression tiling data. *Bioinformatics* **24**(24): 2918-2920.
- Chan, T.A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. 1999. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* **401**(6753): 616-620.
- Chan, W.M., Siu, W.Y., Lau, A., and Poon, R.Y. 2004. How many mutant p53 molecules are needed to inactivate a tetramer? *Mol Cell Biol* **24**(8): 3536-3551.
- Chandy, M., Gutierrez, J.L., Prochasson, P., and Workman, J.L. 2006. SWI/SNF displaces SAGA-acetylated nucleosomes. *Eukaryot Cell* **5**(10): 1738-1747.
- Chang, J., Kim, D.H., Lee, S.W., Choi, K.Y., and Sung, Y.C. 1995. Transactivation ability of p53 transcriptional activation domain is directly related to the binding affinity to TATA-binding protein. *J Biol Chem* **270**(42): 25014-25019.
- Chao, C., Hergenbahn, M., Kaeser, M.D., Wu, Z., Saito, S., Iggo, R., Hollstein, M., Appella, E., and Xu, Y. 2003. Cell type- and promoter-specific roles of Ser18 phosphorylation in regulating p53 responses. *J Biol Chem* **278**(42): 41028-41033.
- Chao, C., Herr, D., Chun, J., and Xu, Y. 2006. Ser18 and 23 phosphorylation is required for p53-dependent apoptosis and tumor suppression. *EMBO J* **25**(11): 2615-2622.
- Chen, D., Kon, N., Li, M., Zhang, W., Qin, J., and Gu, W. 2005. ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* **121**(7): 1071-1083.
- Chen, H., Tini, M., and Evans, R.M. 2001. HATs on and beyond chromatin. *Curr Opin Cell Biol* **13**(2): 218-224.
- Chen, X., Farmer, G., Zhu, H., Prywes, R., and Prives, C. 1993. Cooperative DNA binding of p53 with TFIID (TBP): a possible mechanism for transcriptional activation. *Genes Dev* **7**(10): 1837-1849.
- Cheng, B. and Price, D.H. 2007. Properties of RNA polymerase II elongation complexes before and after the P-TEFb-mediated transition into productive elongation. *J Biol Chem* **282**(30): 21901-21912.
- Chicas, A., Molina, P., and Bargonetti, J. 2000. Mutant p53 forms a complex with Sp1 on HIV-LTR DNA. *Biochem Biophys Res Commun* **279**(2): 383-390.
- Chin, K.V., Ueda, K., Pastan, I., and Gottesman, M.M. 1992. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science* **255**(5043): 459-462.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P. 1994. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* **265**(5170): 346-355.
- Chumakov, P.M., Iotsova, V.S., and Georgiev, G.P. 1982. [Isolation of a plasmid clone containing the mRNA sequence for mouse nonviral T-antigen]. *Dokl Akad Nauk SSSR* **267**(5): 1272-1275.
- Ciccharelli, C., Philipson, L., and Sorrentino, V. 1990. Regulation of expression of growth arrest-specific genes in mouse fibroblasts. *Mol Cell Biol* **10**(4): 1525-1529.
- Claudio, P.P., Cui, J., Ghafouri, M., Mariano, C., White, M.K., Safak, M., Sheffield, J.B., Giordano, A., Khalili, K., Amini, S., and Sawaya, B.E. 2006. Cdk9 phosphorylates p53 on serine 392 independently of CKII. *J Cell Physiol* **208**(3): 602-612.

- Clayton, A.L., Hazzalin, C.A., and Mahadevan, L.C. 2006. Enhanced histone acetylation and transcription: a dynamic perspective. *Mol Cell* **23**(3): 289-296.
- Contente, A., Dittmer, A., Koch, M.C., Roth, J., and Dobbelstein, M. 2002. A polymorphic microsatellite that mediates induction of PIG3 by p53. *Nat Genet* **30**(3): 315-320.
- Corden, J.L., Cadena, D.L., Ahearn, J.M., Jr., and Dahmus, M.E. 1985. A unique structure at the carboxyl terminus of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(23): 7934-7938.
- Core, L.J. and Lis, J.T. 2008. Transcription regulation through promoter-proximal pausing of RNA polymerase II. *Science* **319**(5871): 1791-1792.
- D'Orazi, G., Cecchinelli, B., Bruno, T., Manni, I., Higashimoto, Y., Saito, S., Gostissa, M., Coen, S., Marchetti, A., Del Sal, G., Piaggio, G., Fanciulli, M., Appella, E., and Soddu, S. 2002. Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* **4**(1): 11-19.
- Dai, C. and Gu, W. 2010. p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol Med* **16**(11): 528-536.
- Dawson, R., Muller, L., Dehner, A., Klein, C., Kessler, H., and Buchner, J. 2003. The N-terminal domain of p53 is natively unfolded. *J Mol Biol* **332**(5): 1131-1141.
- Deb, S., Jackson, C.T., Subler, M.A., and Martin, D.W. 1992. Modulation of cellular and viral promoters by mutant human p53 proteins found in tumor cells. *J Virol* **66**(10): 6164-6170.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J., and Leder, P. 1995. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* **82**(4): 675-684.
- Deppert, W. 1996. Binding of MAR-DNA elements by mutant p53: possible implications for its oncogenic functions. *J Cell Biochem* **62**(2): 172-180.
- Deyoung, M.P. and Ellisen, L.W. 2007. p63 and p73 in human cancer: defining the network. *Oncogene* **26**(36): 5169-5183.
- Dhalluin, C., Carlson, J.E., Zeng, L., He, C., Aggarwal, A.K., and Zhou, M.M. 1999. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature* **399**(6735): 491-496.
- Di Agostino, S., Strano, S., Emiliozzi, V., Zerbini, V., Mottolese, M., Sacchi, A., Blandino, G., and Piaggio, G. 2006. Gain of function of mutant p53: the mutant p53/NF-Y protein complex reveals an aberrant transcriptional mechanism of cell cycle regulation. *Cancer Cell* **10**(3): 191-202.
- Di Lello, P., Jenkins, L.M., Jones, T.N., Nguyen, B.D., Hara, T., Yamaguchi, H., Dikeakos, J.D., Appella, E., Legault, P., and Omichinski, J.G. 2006. Structure of the Tfb1/p53 complex: Insights into the interaction between the p62/Tfb1 subunit of TFIIH and the activation domain of p53. *Mol Cell* **22**(6): 731-740.
- Dittmer, D., Pati, S., Zambetti, G., Chu, S., Teresky, A.K., Moore, M., Finlay, C., and Levine, A.J. 1993. Gain of function mutations in p53. *Nat Genet* **4**(1): 42-46.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S., and Bradley, A. 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**(6366): 215-221.
- Donner, A.J., Szostek, S., Hoover, J.M., and Espinosa, J.M. 2007. CDK8 is a stimulus-specific positive coregulator of p53 target genes. *Mol Cell* **27**(1): 121-133.
- Dornan, D., Bheddah, S., Newton, K., Ince, W., Frantz, G.D., Dowd, P., Koeppen, H., Dixit, V.M., and French, D.M. 2004. COP1, the negative regulator of p53, is overexpressed in breast and ovarian adenocarcinomas. *Cancer Res* **64**(20): 7226-7230.
- Duan, W., Ding, H., Subler, M.A., Zhu, W.G., Zhang, H., Stoner, G.D., Windle, J.J., Otterson, G.A., and Villalona-Calero, M.A. 2002. Lung-specific expression of human mutant p53-273H is associated with a high frequency of lung adenocarcinoma in transgenic mice. *Oncogene* **21**(51): 7831-7838.
- Duan, W., Gao, L., Wu, X., Hade, E.M., Gao, J.X., Ding, H., Barsky, S.H., Otterson, G.A., and Villalona-Calero, M.A. 2009. Expression of a mutant p53 results in an age-related demographic shift in spontaneous lung tumor formation in transgenic mice. *PLoS One* **4**(5): e5563.
- Egloff, S. and Murphy, S. 2008. Cracking the RNA polymerase II CTD code. *Trends Genet* **24**(6): 280-288.



- el-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. 1992. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* **1**(1): 45-49.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Waldman, T., Oliner, J.D., Velculescu, V.E., Burrell, M., Hill, D.E., Healy, E., Rees, J.L., Hamilton, S.R., and et al. 1995. Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* **55**(13): 2910-2919.
- El Hassan, M.A. and Calladine, C.R. 1997. Conformational characteristics of DNA: empirical classifications and a hypothesis for the conformational behaviour of dinucleotide steps. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **355**(1722): 43-100.
- Eliyahu, D., Goldfinger, N., Pinhasi-Kimhi, O., Shaulsky, G., Skurnik, Y., Arai, N., Rotter, V., and Oren, M. 1988. Meth A fibrosarcoma cells express two transforming mutant p53 species. *Oncogene* **3**(3): 313-321.
- Eliyahu, D., Michalovitz, D., Eliyahu, S., Pinhasi-Kimhi, O., and Oren, M. 1989. Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(22): 8763-8767.
- Eliyahu, D., Michalovitz, D., and Oren, M. 1985. Overproduction of p53 antigen makes established cells highly tumorigenic. *Nature* **316**(6024): 158-160.
- Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D., and Oren, M. 1984. Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature* **312**(5995): 646-649.
- Espinosa, J.M. 2008. Mechanisms of regulatory diversity within the p53 transcriptional network. *Oncogene* **27**(29): 4013-4023.
- Espinosa, J.M. and Emerson, B.M. 2001. Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell* **8**(1): 57-69.
- Espinosa, J.M., Verdun, R.E., and Emerson, B.M. 2003. p53 functions through stress- and promoter-specific recruitment of transcription initiation components before and after DNA damage. *Mol Cell* **12**(4): 1015-1027.
- Esteller, M. 2008. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* **358**(11): 1148-1159.
- Farmer, G., Colgan, J., Nakatani, Y., Manley, J.L., and Prives, C. 1996. Functional interaction between p53, the TATA-binding protein (TBP), and TBP-associated factors in vivo. *Mol Cell Biol* **16**(8): 4295-4304.
- Ferreira, H., Flaus, A., and Owen-Hughes, T. 2007. Histone modifications influence the action of Snf2 family remodelling enzymes by different mechanisms. *J Mol Biol* **374**(3): 563-579.
- Finlay, C.A., Hinds, P.W., and Levine, A.J. 1989. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* **57**(7): 1083-1093.
- Finlay, C.A., Hinds, P.W., Tan, T.H., Eliyahu, D., Oren, M., and Levine, A.J. 1988. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* **8**(2): 531-539.
- Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S.A., Kim, Y., Allis, C.D., and Khorasanizadeh, S. 2003. Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev* **17**(15): 1870-1881.
- Fletcher, T.M. and Hansen, J.C. 1996. The nucleosomal array: structure/function relationships. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **6**(2-3): 149-188.
- Flores, E.R., Sengupta, S., Miller, J.B., Newman, J.J., Bronson, R., Crowley, D., Yang, A., McKeon, F., and Jacks, T. 2005. Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell* **7**(4): 363-373.
- Fogh, J., Fogh, J.M., and Orfeo, T. 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* **59**(1): 221-226.
- Fontemaggi, G., Dell'Orso, S., Triscioglio, D., Shay, T., Melucci, E., Fazi, F., Terrenato, I., Mottolese, M., Muti, P., Domany, E., Del Bufalo, D., Strano, S., and Blandino, G. 2009. The execution of the transcriptional axis mutant p53, E2F1 and ID4 promotes tumor neo-angiogenesis. *Nat Struct Mol Biol* **16**(10): 1086-1093.
- Frazier, M.W., He, X., Wang, J., Gu, Z., Cleveland, J.L., and Zambetti, G.P. 1998. Activation of c-myc gene expression by tumor-derived p53 mutants requires a discrete C-terminal domain. *Mol Cell Biol* **18**(7): 3735-3743.
- Fuks, F., Hurd, P.J., Deplus, R., and Kouzarides, T. 2003. The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res* **31**(9): 2305-2312.

- Gaiddon, C., Lokshin, M., Ahn, J., Zhang, T., and Prives, C. 2001. A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol Cell Biol* **21**(5): 1874-1887.
- Garbe, J.C., Holst, C.R., Bassett, E., Tlsty, T., and Stampfer, M.R. 2007. Inactivation of p53 function in cultured human mammary epithelial cells turns the telomere-length dependent senescence barrier from agonescence into crisis. *Cell Cycle* **6**(15): 1927-1936.
- Garcia-Ramirez, M., Rocchini, C., and Ausio, J. 1995. Modulation of chromatin folding by histone acetylation. *J Biol Chem* **270**(30): 17923-17928.
- Gevry, N., Chan, H.M., Laflamme, L., Livingston, D.M., and Gaudreau, L. 2007. p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes Dev* **21**(15): 1869-1881.
- Gohler, T., Jager, S., Warnecke, G., Yasuda, H., Kim, E., and Deppert, W. 2005. Mutant p53 proteins bind DNA in a DNA structure-selective mode. *Nucleic Acids Res* **33**(3): 1087-1100.
- Gohler, T., Reimann, M., Cherny, D., Walter, K., Warnecke, G., Kim, E., and Deppert, W. 2002. Specific interaction of p53 with target binding sites is determined by DNA conformation and is regulated by the C-terminal domain. *J Biol Chem* **277**(43): 41192-41203.
- Gomes, N.P., Bjerke, G., Llorente, B., Szostek, S.A., Emerson, B.M., and Espinosa, J.M. 2006. Gene-specific requirement for P-TEFb activity and RNA polymerase II phosphorylation within the p53 transcriptional program. *Genes Dev* **20**(5): 601-612.
- Gomes, N.P. and Espinosa, J.M. 2010. Gene-specific repression of the p53 target gene PUMA via intragenic CTCF-Cohesin binding. *Genes Dev* **24**(10): 1022-1034.
- Gorgoulis, V.G., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Kletsas, D., Mariatos, G., Zoumpourlis, V., Ryan, K.M., Kittas, C., and Papavassiliou, A.G. 2003. p53 activates ICAM-1 (CD54) expression in an NF-kappaB-independent manner. *EMBO J* **22**(7): 1567-1578.
- Green, D.R. and Chipuk, J.E. 2006. p53 and metabolism: Inside the TIGAR. *Cell* **126**(1): 30-32.
- Green, D.R. and Kroemer, G. 2009. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature* **458**(7242): 1127-1130.
- Gu, W. and Roeder, R.G. 1997. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**(4): 595-606.
- Gu, W., Shi, X.L., and Roeder, R.G. 1997. Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* **387**(6635): 819-823.
- Guenther, M.G., Levine, S.S., Boyer, L.A., Jaenisch, R., and Young, R.A. 2007. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* **130**(1): 77-88.
- Gurtner, A., Starace, G., Norelli, G., Piaggio, G., Sacchi, A., and Bossi, G. 2010. Mutant p53-induced up-regulation of mitogen-activated protein kinase kinase 3 contributes to gain of function. *J Biol Chem* **285**(19): 14160-14169.
- Halevy, O., Rodel, J., Peled, A., and Oren, M. 1991. Frequent p53 mutations in chemically induced murine fibrosarcoma. *Oncogene* **6**(9): 1593-1600.
- Han, M. and Grunstein, M. 1988. Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo. *Cell* **55**(6): 1137-1145.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**(5): 646-674.
- Hargreaves, D.C., Horng, T., and Medzhitov, R. 2009. Control of inducible gene expression by signal-dependent transcriptional elongation. *Cell* **138**(1): 129-145.
- Harlow, E., Williamson, N.M., Ralston, R., Helfman, D.M., and Adams, T.E. 1985. Molecular cloning and in vitro expression of a cDNA clone for human cellular tumor antigen p53. *Mol Cell Biol* **5**(7): 1601-1610.
- Hassan, A.H., Awad, S., and Prochasson, P. 2006. The Swi2/Snf2 bromodomain is required for the displacement of SAGA and the octamer transfer of SAGA-acetylated nucleosomes. *J Biol Chem* **281**(26): 18126-18134.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. 1997. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**(6630): 296-299.
- Hayes, J.J. and Hansen, J.C. 2001. Nucleosomes and the chromatin fiber. *Curr Opin Genet Dev* **11**(2): 124-129.
- Hearnese, J.M., Mays, D.J., Schavolt, K.L., Tang, L., Jiang, X., and Pietenpol, J.A. 2005. Chromatin immunoprecipitation-based screen to identify functional genomic binding sites for sequence-specific transactivators. *Mol Cell Biol* **25**(22): 10148-10158.

- Hebbes, T.R., Clayton, A.L., Thorne, A.W., and Crane-Robinson, C. 1994. Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken beta-globin chromosomal domain. *EMBO J* **13**(8): 1823-1830.
- Heinlein, C., Krepulat, F., Lohler, J., Speidel, D., Deppert, W., and Tolstonog, G.V. 2008. Mutant p53(R270H) gain of function phenotype in a mouse model for oncogene-induced mammary carcinogenesis. *Int J Cancer* **122**(8): 1701-1709.
- Helton, E.S. and Chen, X. 2007. p53 modulation of the DNA damage response. *J Cell Biochem* **100**(4): 883-896.
- Hirschhorn, J.N., Brown, S.A., Clark, C.D., and Winston, F. 1992. Evidence that SNF2/SWI2 and SNF5 activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev* **6**(12A): 2288-2298.
- Ho, J.S., Ma, W., Mao, D.Y., and Benchimol, S. 2005. p53-Dependent transcriptional repression of c-myc is required for G1 cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* **25**(17): 7423-7431.
- Hoffman, W.H., Biade, S., Zilfou, J.T., Chen, J., and Murphy, M. 2002. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* **277**(5): 3247-3257.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C.C. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science* **253**(5015): 49-53.
- Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. 1997. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* **420**(1): 25-27.
- Honda, R. and Yasuda, H. 1999. Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J* **18**(1): 22-27.
- Horvath, M.M., Wang, X., Resnick, M.A., and Bell, D.A. 2007. Divergent evolution of human p53 binding sites: cell cycle versus apoptosis. *PLoS Genet* **3**(7): e127.
- Hupp, T.R. and Lane, D.P. 1994. Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Curr Biol* **4**(10): 865-875.
- Hupp, T.R., Meek, D.W., Midgley, C.A., and Lane, D.P. 1992. Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* **71**(5): 875-886.
- Iggo, R., Gatter, K., Bartek, J., Lane, D., and Harris, A.L. 1990. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* **335**(8691): 675-679.
- Imbriano, C., Gurtner, A., Cocchiarella, F., Di Agostino, S., Basile, V., Gostissa, M., Dobbelstein, M., Del Sal, G., Piaggio, G., and Mantovani, R. 2005. Direct p53 transcriptional repression: in vivo analysis of CCAAT-containing G2/M promoters. *Mol Cell Biol* **25**(9): 3737-3751.
- Ito, A., Lai, C.H., Zhao, X., Saito, S., Hamilton, M.H., Appella, E., and Yao, T.P. 2001. p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *EMBO J* **20**(6): 1331-1340.
- Jenkins, J.R., Rudge, K., and Currie, G.A. 1984. Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* **312**(5995): 651-654.
- Jett, S.D., Cherny, D.I., Subramaniam, V., and Jovin, T.M. 2000. Scanning force microscopy of the complexes of p53 core domain with supercoiled DNA. *J Mol Biol* **299**(3): 585-592.
- Joerger, A.C. and Fersht, A.R. 2008. Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annu Rev Biochem* **77**: 557-582.
- Jones, S.N., Roe, A.E., Donehower, L.A., and Bradley, A. 1995. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* **378**(6553): 206-208.
- Jordan, J.J., Menendez, D., Inga, A., Nouredine, M., Bell, D.A., and Resnick, M.A. 2008. Noncanonical DNA motifs as transactivation targets by wild type and mutant p53. *PLoS Genet* **4**(6): e1000104.
- Kaesler, M.D. and Iggo, R.D. 2002. Chromatin immunoprecipitation analysis fails to support the latency model for regulation of p53 DNA binding activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1): 95-100.
- Kamijo, T., Weber, J.D., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. 1998. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(14): 8292-8297.
- Kastan, M.B., Zhan, Q., el-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B., and Fornace, A.J., Jr. 1992. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* **71**(4): 587-597.

- Kato, S., Han, S.Y., Liu, W., Otsuka, K., Shibata, H., Kanamaru, R., and Ishioka, C. 2003. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8424-8429.
- Kay, B.K., Williamson, M.P., and Sudol, M. 2000. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J* **14**(2): 231-241.
- Keller, D.M., Zeng, X., Wang, Y., Zhang, Q.H., Kapoor, M., Shu, H., Goodman, R., Lozano, G., Zhao, Y., and Lu, H. 2001. A DNA damage-induced p53 serine 392 kinase complex contains CK2, hSpt16, and SSRP1. *Mol Cell* **7**(2): 283-292.
- Khochbin, S., Verdel, A., Lemercier, C., and Seigneurin-Berny, D. 2001. Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev* **11**(2): 162-166.
- Kim, E. and Deppert, W. 2006. The versatile interactions of p53 with DNA: when flexibility serves specificity. *Cell Death Differ* **13**(6): 885-889.
- Kim, J.K., Samaranyake, M., and Pradhan, S. 2009. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci* **66**(4): 596-612.
- Kim, T.H., Barrera, L.O., Zheng, M., Qu, C., Singer, M.A., Richmond, T.A., Wu, Y., Green, R.D., and Ren, B. 2005. A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* **436**(7052): 876-880.
- Kitayner, M., Rozenberg, H., Kessler, N., Rabinovich, D., Shaulov, L., Haran, T.E., and Shaked, Z. 2006. Structural basis of DNA recognition by p53 tetramers. *Mol Cell* **22**(6): 741-753.
- Knights, C.D., Catania, J., Di Giovanni, S., Muratoglu, S., Perez, R., Swartzbeck, A., Quong, A.A., Zhang, X., Beerman, T., Pestell, R.G., and Avantaggiati, M.L. 2006. Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate. *J Cell Biol* **173**(4): 533-544.
- Ko, L.J. and Prives, C. 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* **10**(9): 1054-1072.
- Koga, H. and Deppert, W. 2000. Identification of genomic DNA sequences bound by mutant p53 protein (Gly245-->Ser) in vivo. *Oncogene* **19**(36): 4178-4183.
- Kogan-Sakin, I., Tabach, Y., Buganim, Y., Molchadsky, A., Solomon, H., Madar, S., Kamer, I., Stambolsky, P., Shelly, A., Goldfinger, N., Valsesia-Wittmann, S., Puisieux, A., Zundelevich, A., Gal-Yam, E.N., Avivi, C., Barshack, I., Brait, M., Sidransky, D., Domany, E., and Rotter, V. 2011. Mutant p53(R175H) upregulates Twist1 expression and promotes epithelial-mesenchymal transition in immortalized prostate cells. *Cell Death Differ* **18**(2): 271-281.
- Komarnitsky, P., Cho, E.J., and Buratowski, S. 2000. Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* **14**(19): 2452-2460.
- Kouzarides, T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**(4): 693-705.
- Krajewski, W.A. and Becker, P.B. 1998. Reconstitution of hyperacetylated, DNase I-sensitive chromatin characterized by high conformational flexibility of nucleosomal DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(4): 1540-1545.
- Kress, M., May, E., Cassingena, R., and May, P. 1979. Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol* **31**(2): 472-483.
- Krogan, N.J., Kim, M., Tong, A., Golshani, A., Cagney, G., Canadien, V., Richards, D.P., Beattie, B.K., Emili, A., Boone, C., Shilatifard, A., Buratowski, S., and Greenblatt, J. 2003. Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol* **23**(12): 4207-4218.
- Kruse, J.P. and Gu, W. 2009. Modes of p53 regulation. *Cell* **137**(4): 609-622.
- Kubbutat, M.H., Jones, S.N., and Vousden, K.H. 1997. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**(6630): 299-303.
- Kurihara, A., Nagoshi, H., Yabuki, M., Okuyama, R., Obinata, M., and Ikawa, S. 2007. Ser46 phosphorylation of p53 is not always sufficient to induce apoptosis: multiple mechanisms of regulation of p53-dependent apoptosis. *Genes Cells* **12**(7): 853-861.
- Kussie, P.H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbaas, B., Moreau, J., Levine, A.J., and Pavletich, N.P. 1996. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* **274**(5289): 948-953.

- Lai, Z., Auger, K.R., Manubay, C.M., and Copeland, R.A. 2000. Thermodynamics of p53 binding to hdm2(1-126): effects of phosphorylation and p53 peptide length. *Arch Biochem Biophys* **381**(2): 278-284.
- Lane, D.P. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**(6381): 15-16.
- Lane, D.P. and Crawford, L.V. 1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**(5701): 261-263.
- Lang, G.A., Iwakuma, T., Suh, Y.A., Liu, G., Rao, V.A., Parant, J.M., Valentin-Vega, Y.A., Terzian, T., Caldwell, L.C., Strong, L.C., El-Naggar, A.K., and Lozano, G. 2004. Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* **119**(6): 861-872.
- Langerod, A., Zhao, H., Borgan, O., Nesland, J.M., Bukholm, I.R., Ikdahl, T., Karesen, R., Borresen-Dale, A.L., and Jeffrey, S.S. 2007. TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. *Breast Cancer Res* **9**(3): R30.
- Lee, D., Kim, J.W., Seo, T., Hwang, S.G., Choi, E.J., and Choe, J. 2002. SWI/SNF complex interacts with tumor suppressor p53 and is necessary for the activation of p53-mediated transcription. *J Biol Chem* **277**(25): 22330-22337.
- Lee, J.M. and Greenleaf, A.L. 1997. Modulation of RNA polymerase II elongation efficiency by C-terminal heptapeptide repeat domain kinase I. *J Biol Chem* **272**(17): 10990-10993.
- Lee, K.C., Crowe, A.J., and Barton, M.C. 1999. p53-mediated repression of alpha-fetoprotein gene expression by specific DNA binding. *Mol Cell Biol* **19**(2): 1279-1288.
- Lee, T.I., Jenner, R.G., Boyer, L.A., Guenther, M.G., Levine, S.S., Kumar, R.M., Chevalier, B., Johnstone, S.E., Cole, M.F., Isono, K., Koseki, H., Fuchikami, T., Abe, K., Murray, H.L., Zucker, J.P., Yuan, B., Bell, G.W., Herbolsheimer, E., Hannett, N.M., Sun, K., Odom, D.T., Otte, A.P., Volkert, T.L., Bartel, D.P., Melton, D.A., Gifford, D.K., Jaenisch, R., and Young, R.A. 2006. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* **125**(2): 301-313.
- Leng, R.P., Lin, Y., Ma, W., Wu, H., Lemmers, B., Chung, S., Parant, J.M., Lozano, G., Hakem, R., and Benchimol, S. 2003. Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell* **112**(6): 779-791.
- Leppard, K., Totty, N., Waterfield, M., Harlow, E., Jenkins, J., and Crawford, L. 1983. Purification and partial amino acid sequence analysis of the cellular tumour antigen, p53, from mouse SV40-transformed cells. *EMBO J* **2**(11): 1993-1999.
- Levine, A.J. and Oren, M. 2009. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer* **9**(10): 749-758.
- Li, M., Phatnani, H.P., Guan, Z., Sage, H., Greenleaf, A.L., and Zhou, P. 2005. Solution structure of the Set2-Rpb1 interacting domain of human Set2 and its interaction with the hyperphosphorylated C-terminal domain of Rpb1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(49): 17636-17641.
- Lill, N.L., Grossman, S.R., Ginsberg, D., DeCaprio, J., and Livingston, D.M. 1997. Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* **387**(6635): 823-827.
- Lin, J., Teresky, A.K., and Levine, A.J. 1995. Two critical hydrophobic amino acids in the N-terminal domain of the p53 protein are required for the gain of function phenotypes of human p53 mutants. *Oncogene* **10**(12): 2387-2390.
- Lin, T., Chao, C., Saito, S., Mazur, S.J., Murphy, M.E., Appella, E., and Xu, Y. 2005. p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol* **7**(2): 165-171.
- Linzer, D.I. and Levine, A.J. 1979. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17**(1): 43-52.
- Liu, C.L., Kaplan, T., Kim, M., Buratowski, S., Schreiber, S.L., Friedman, N., and Rando, O.J. 2005. Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS Biol* **3**(10): e328.
- Liu, X., Miller, C.W., Koefler, P.H., and Berk, A.J. 1993. The p53 activation domain binds the TATA box-binding polypeptide in Holo-TFIID, and a neighboring p53 domain inhibits transcription. *Mol Cell Biol* **13**(6): 3291-3300.
- Lohr, K., Moritz, C., Contente, A., and Dobbelstein, M. 2003. p21/CDKN1A mediates negative regulation of transcription by p53. *J Biol Chem* **278**(35): 32507-32516.

- Lorch, Y., LaPointe, J.W., and Kornberg, R.D. 1987. Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones. *Cell* **49**(2): 203-210.
- Loyola, A., LeRoy, G., Wang, Y.H., and Reinberg, D. 2001. Reconstitution of recombinant chromatin establishes a requirement for histone-tail modifications during chromatin assembly and transcription. *Genes Dev* **15**(21): 2837-2851.
- Lu, H. and Levine, A.J. 1995. Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(11): 5154-5158.
- Ludes-Meyers, J.H., Subler, M.A., Shivakumar, C.V., Munoz, R.M., Jiang, P., Bigger, J.E., Brown, D.R., Deb, S.P., and Deb, S. 1996. Transcriptional activation of the human epidermal growth factor receptor promoter by human p53. *Mol Cell Biol* **16**(11): 6009-6019.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**(6648): 251-260.
- MacPherson, D., Kim, J., Kim, T., Rhee, B.K., Van Oostrom, C.T., DiTullio, R.A., Venere, M., Halazonetis, T.D., Bronson, R., De Vries, A., Fleming, M., and Jacks, T. 2004. Defective apoptosis and B-cell lymphomas in mice with p53 point mutation at Ser 23. *EMBO J* **23**(18): 3689-3699.
- Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., Plath, K., and Hochedlinger, K. 2007. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* **1**(1): 55-70.
- Margaritis, T. and Holstege, F.C. 2008. Poised RNA polymerase II gives pause for thought. *Cell* **133**(4): 581-584.
- Marin, M.C., Jost, C.A., Brooks, L.A., Irwin, M.S., O'Nions, J., Tidy, J.A., James, N., McGregor, J.M., Harwood, C.A., Yulug, I.G., Vousden, K.H., Allday, M.J., Gusterson, B., Ikawa, S., Hinds, P.W., Crook, T., and Kaelin, W.G., Jr. 2000. A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat Genet* **25**(1): 47-54.
- Marine, J.C. and Jochemsen, A.G. 2005. Mdmx as an essential regulator of p53 activity. *Biochem Biophys Res Commun* **331**(3): 750-760.
- Marshall, N.F., Peng, J., Xie, Z., and Price, D.H. 1996. Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *J Biol Chem* **271**(43): 27176-27183.
- Matlashewski, G., Lamb, P., Pim, D., Peacock, J., Crawford, L., and Benchimol, S. 1984. Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J* **3**(13): 3257-3262.
- Matoba, S., Kang, J.G., Patino, W.D., Wragg, A., Boehm, M., Gavrilova, O., Hurley, P.J., Bunz, F., and Hwang, P.M. 2006. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* **312**(5780): 1650-1653.
- Mattia, M., Gottifredi, V., McKinney, K., and Prives, C. 2007. p53-Dependent p21 mRNA elongation is impaired when DNA replication is stalled. *Mol Cell Biol* **27**(4): 1309-1320.
- Mavrich, T.N., Jiang, C., Ioshikhes, I.P., Li, X., Venters, B.J., Zanton, S.J., Tomsho, L.P., Qi, J., Glaser, R.L., Schuster, S.C., Gilmour, D.S., Albert, I., and Pugh, B.F. 2008. Nucleosome organization in the Drosophila genome. *Nature* **453**(7193): 358-362.
- McKinney, K., Mattia, M., Gottifredi, V., and Prives, C. 2004. p53 linear diffusion along DNA requires its C terminus. *Mol Cell* **16**(3): 413-424.
- Melero, J.A., Stitt, D.T., Mangel, W.F., and Carroll, R.B. 1979. Identification of new polypeptide species (48-55K) immunoprecipitable by antiserum to purified large T antigen and present in SV40-infected and -transformed cells. *Virology* **93**(2): 466-480.
- Menendez, D., Inga, A., and Resnick, M.A. 2009. The expanding universe of p53 targets. *Nat Rev Cancer* **9**(10): 724-737.
- Menendez, D., Krysiak, O., Inga, A., Krysiak, B., Resnick, M.A., and Schonfelder, G. 2006. A SNP in the flt-1 promoter integrates the VEGF system into the p53 transcriptional network. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(5): 1406-1411.
- Mercer, W.E., Shields, M.T., Amin, M., Sauve, G.J., Appella, E., Romano, J.W., and Ullrich, S.J. 1990. Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(16): 6166-6170.

- Meyer, K.D., Lin, S.C., Bernecky, C., Gao, Y., and Taatjes, D.J. 2010. p53 activates transcription by directing structural shifts in Mediator. *Nat Struct Mol Biol* **17**(6): 753-760.
- Michalovitz, D., Halevy, O., and Oren, M. 1990. Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell* **62**(4): 671-680.
- Mikkelsen, T.S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B.E., Jaenisch, R., Lander, E.S., and Meissner, A. 2008. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* **454**(7200): 49-55.
- Miller, L.D., Smeds, J., George, J., Vega, V.B., Vergara, L., Ploner, A., Pawitan, Y., Hall, P., Klaar, S., Liu, E.T., and Bergh, J. 2005. An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(38): 13550-13555.
- Milner, J. and Medcalf, E.A. 1991. Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* **65**(5): 765-774.
- Milner, J., Medcalf, E.A., and Cook, A.C. 1991. Tumor suppressor p53: analysis of wild-type and mutant p53 complexes. *Mol Cell Biol* **11**(1): 12-19.
- Minsky, N. and Oren, M. 2004. The RING domain of Mdm2 mediates histone ubiquitylation and transcriptional repression. *Mol Cell* **16**(4): 631-639.
- Molchadsky, A., Shats, I., Goldfinger, N., Pevsner-Fischer, M., Olson, M., Rinon, A., Tzahor, E., Lozano, G., Zipori, D., Sarig, R., and Rotter, V. 2008. p53 plays a role in mesenchymal differentiation programs, in a cell fate dependent manner. *PLoS One* **3**(11): e3707.
- Montes de Oca Luna, R., Wagner, D.S., and Lozano, G. 1995. Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* **378**(6553): 203-206.
- Morachis, J.M., Murawsky, C.M., and Emerson, B.M. 2010. Regulation of the p53 transcriptional response by structurally diverse core promoters. *Genes Dev* **24**(2): 135-147.
- Morton, J.P., Timpson, P., Karim, S.A., Ridgway, R.A., Athineos, D., Doyle, B., Jamieson, N.B., Oien, K.A., Lowy, A.M., Brunton, V.G., Frame, M.C., Evans, T.R., and Sansom, O.J. 2010. Mutant p53 drives metastasis and overcomes growth arrest/senescence in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(1): 246-251.
- Mowat, M., Cheng, A., Kimura, N., Bernstein, A., and Benchimol, S. 1985. Rearrangements of the cellular p53 gene in erythroleukaemic cells transformed by Friend virus. *Nature* **314**(6012): 633-636.
- Muller, B.F., Paulsen, D., and Deppert, W. 1996. Specific binding of MAR/SAR DNA-elements by mutant p53. *Oncogene* **12**(9): 1941-1952.
- Murphy, M., Ahn, J., Walker, K.K., Hoffman, W.H., Evans, R.M., Levine, A.J., and George, D.L. 1999. Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev* **13**(19): 2490-2501.
- Muse, G.W., Gilchrist, D.A., Nechaev, S., Shah, R., Parker, J.S., Grissom, S.F., Zeitlinger, J., and Adelman, K. 2007. RNA polymerase is poised for activation across the genome. *Nat Genet* **39**(12): 1507-1511.
- Nicholls, C.D., McLure, K.G., Shields, M.A., and Lee, P.W. 2002. Biogenesis of p53 involves cotranslational dimerization of monomers and posttranslational dimerization of dimers. Implications on the dominant negative effect. *J Biol Chem* **277**(15): 12937-12945.
- Nowell, P.C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **194**(4260): 23-28.
- Olive, K.P., Tuveson, D.A., Ruhe, Z.C., Yin, B., Willis, N.A., Bronson, R.T., Crowley, D., and Jacks, T. 2004. Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* **119**(6): 847-860.
- Olson, W.K., Gorin, A.A., Lu, X.J., Hock, L.M., and Zhurkin, V.B. 1998. DNA sequence-dependent deformability deduced from protein-DNA crystal complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(19): 11163-11168.
- Oren, M. and Levine, A.J. 1983. Molecular cloning of a cDNA specific for the murine p53 cellular tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(1): 56-59.
- Oren, M. and Rotter, V. 2010. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(2): a001107.
- Pal, S., Datta, K., and Mukhopadhyay, D. 2001. Central role of p53 on regulation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in mammary carcinoma. *Cancer Res* **61**(18): 6952-6957.

- Palecek, E., Brazda, V., Jagelska, E., Pecinka, P., Karlovska, L., and Brazdova, M. 2004. Enhancement of p53 sequence-specific binding by DNA supercoiling. *Oncogene* **23**(12): 2119-2127.
- Papantonis, A. and Cook, P.R. 2010. Genome architecture and the role of transcription. *Curr Opin Cell Biol* **22**(3): 271-276.
- Parada, L.F., Land, H., Weinberg, R.A., Wolf, D., and Rotter, V. 1984. Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature* **312**(5995): 649-651.
- Pena, P.V., Davrazou, F., Shi, X., Walter, K.L., Verkhusha, V.V., Gozani, O., Zhao, R., and Kutateladze, T.G. 2006. Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature* **442**(7098): 100-103.
- Pennica, D., Goeddel, D.V., Hayflick, J.S., Reich, N.C., Anderson, C.W., and Levine, A.J. 1984. The amino acid sequence of murine p53 determined from a c-DNA clone. *Virology* **134**(2): 477-482.
- Perez-Ortin, J.E., Estruch, F., Matallana, E., and Franco, L. 1987. Fine analysis of the chromatin structure of the yeast SUC2 gene and of its changes upon derepression. Comparison between the chromosomal and plasmid-inserted genes. *Nucleic Acids Res* **15**(17): 6937-6956.
- Peterlin, B.M. and Price, D.H. 2006. Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell* **23**(3): 297-305.
- Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S.V., Hainaut, P., and Olivier, M. 2007. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* **28**(6): 622-629.
- Pokholok, D.K., Harbison, C.T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N.M., Lee, T.I., Bell, G.W., Walker, K., Rolfe, P.A., Herbolsheimer, E., Zeitlinger, J., Lewitter, F., Gifford, D.K., and Young, R.A. 2005. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* **122**(4): 517-527.
- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.W., Cordon-Cardo, C., and DePinho, R.A. 1998. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* **92**(6): 713-723.
- Portela, A. and Esteller, M. 2010. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* **28**(10): 1057-1068.
- Pray-Grant, M.G., Daniel, J.A., Schieltz, D., Yates, J.R., 3rd, and Grant, P.A. 2005. Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* **433**(7024): 434-438.
- Price, D.H. 2008. Poised polymerases: on your mark...get set...go! *Mol Cell* **30**(1): 7-10.
- Ptashne, M. and Gann, A. 1997. Transcriptional activation by recruitment. *Nature* **386**(6625): 569-577.
- Qin, Q., Baudry, M., Liao, G., Noniyev, A., Galeano, J., and Bi, X. 2009. A novel function for p53: regulation of growth cone motility through interaction with Rho kinase. *J Neurosci* **29**(16): 5183-5192.
- Radhakrishnan, S.K. and Gartel, A.L. 2006. CDK9 phosphorylates p53 on serine residues 33, 315 and 392. *Cell Cycle* **5**(5): 519-521.
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P., and Levine, A. 2008. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(5): 402-412.
- Ringshausen, I., O'Shea, C.C., Finch, A.J., Swigart, L.B., and Evan, G.I. 2006. Mdm2 is critically and continuously required to suppress lethal p53 activity in vivo. *Cancer Cell* **10**(6): 501-514.
- Rodriguez, M.S., Desterro, J.M., Lain, S., Lane, D.P., and Hay, R.T. 2000. Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* **20**(22): 8458-8467.
- Roger, L., Gadea, G., and Roux, P. 2006. Control of cell migration: a tumour suppressor function for p53? *Biol Cell* **98**(3): 141-152.
- Roh, T.Y., Cuddapah, S., Cui, K., and Zhao, K. 2006. The genomic landscape of histone modifications in human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(43): 15782-15787.
- Roninson, I.B. 2003. Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res* **63**(11): 2705-2715.



- Rosaleny, L.E., Ruiz-Garcia, A.B., Garcia-Martinez, J., Perez-Ortin, J.E., and Tordera, V. 2007. The Sas3p and Gcn5p histone acetyltransferases are recruited to similar genes. *Genome Biol* **8**(6): R119.
- Roth, S.Y., Denu, J.M., and Allis, C.D. 2001. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* **70**: 81-120.
- Rotter, V. 1983. p53, a transformation-related cellular-encoded protein, can be used as a biochemical marker for the detection of primary mouse tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(9): 2613-2617.
- Rubbi, C.P. and Milner, J. 2003. p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *EMBO J* **22**(4): 975-986.
- Ruthenburg, A.J., Li, H., Patel, D.J., and Allis, C.D. 2007. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(12): 983-994.
- Sakaguchi, K., Saito, S., Higashimoto, Y., Roy, S., Anderson, C.W., and Appella, E. 2000. Damage-mediated phosphorylation of human p53 threonine 18 through a cascade mediated by a casein 1-like kinase. Effect on Mdm2 binding. *J Biol Chem* **275**(13): 9278-9283.
- Sakaguchi, K., Sakamoto, H., Lewis, M.S., Anderson, C.W., Erickson, J.W., Appella, E., and Xie, D. 1997. Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry* **36**(33): 10117-10124.
- Saramaki, A., Banwell, C.M., Campbell, M.J., and Carlberg, C. 2006. Regulation of the human p21(waf1/cip1) gene promoter via multiple binding sites for p53 and the vitamin D3 receptor. *Nucleic Acids Res* **34**(2): 543-554.
- Sarig, R., Rivlin, N., Brosh, R., Bornstein, C., Kamer, I., Ezra, O., Molchadsky, A., Goldfinger, N., Brenner, O., and Rotter, V. 2010. Mutant p53 facilitates somatic cell reprogramming and augments the malignant potential of reprogrammed cells. *J Exp Med* **207**(10): 2127-2140.
- Sarnow, P., Ho, Y.S., Williams, J., and Levine, A.J. 1982. Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell* **28**(2): 387-394.
- Schmitt, C.A., Fridman, J.S., Yang, M., Lee, S., Baranov, E., Hoffman, R.M., and Lowe, S.W. 2002. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell* **109**(3): 335-346.
- Schon, O., Friedler, A., Bycroft, M., Freund, S.M., and Fersht, A.R. 2002. Molecular mechanism of the interaction between MDM2 and p53. *J Mol Biol* **323**(3): 491-501.
- Schones, D.E., Cui, K., Cuddapah, S., Roh, T.Y., Barski, A., Wang, Z., Wei, G., and Zhao, K. 2008. Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell* **132**(5): 887-898.
- Scian, M.J., Stagliano, K.E., Anderson, M.A., Hassan, S., Bowman, M., Miles, M.F., Deb, S.P., and Deb, S. 2005. Tumor-derived p53 mutants induce NF-kappaB2 gene expression. *Mol Cell Biol* **25**(22): 10097-10110.
- Scian, M.J., Stagliano, K.E., Deb, D., Ellis, M.A., Carchman, E.H., Das, A., Valerie, K., Deb, S.P., and Deb, S. 2004a. Tumor-derived p53 mutants induce oncogenesis by transactivating growth-promoting genes. *Oncogene* **23**(25): 4430-4443.
- Scian, M.J., Stagliano, K.E., Ellis, M.A., Hassan, S., Bowman, M., Miles, M.F., Deb, S.P., and Deb, S. 2004b. Modulation of gene expression by tumor-derived p53 mutants. *Cancer Res* **64**(20): 7447-7454.
- Scolnick, D.M., Chehab, N.H., Stavridi, E.S., Lien, M.C., Caruso, L., Moran, E., Berger, S.L., and Halazonetis, T.D. 1997. CREB-binding protein and p300/CBP-associated factor are transcriptional coactivators of the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res* **57**(17): 3693-3696.
- Shaked, H., Shiff, I., Kott-Gutkowski, M., Siegfried, Z., Haupt, Y., and Simon, I. 2008. Chromatin immunoprecipitation-on-chip reveals stress-dependent p53 occupancy in primary normal cells but not in established cell lines. *Cancer Res* **68**(23): 9671-9677.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben-Ze'ev, A., and Rotter, V. 1990. Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol Cell Biol* **10**(12): 6565-6577.
- Sherr, C.J. 2001. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(10): 731-737.

- Shi, X., Hong, T., Walter, K.L., Ewalt, M., Michishita, E., Hung, T., Carney, D., Pena, P., Lan, F., Kaadige, M.R., Lacoste, N., Cayrou, C., Davrazou, F., Saha, A., Cairns, B.R., Ayer, D.E., Kutateladze, T.G., Shi, Y., Cote, J., Chua, K.F., and Gozani, O. 2006. ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* **442**(7098): 96-99.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. 1997. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* **91**(3): 325-334.
- Sigal, A. and Rotter, V. 2000. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* **60**(24): 6788-6793.
- Singh, K., Mogare, D., Giridharagopalan, R.O., Gogiraju, R., Pande, G., and Chattopadhyay, S. 2007. p53 target gene SMAR1 is dysregulated in breast cancer: its role in cancer cell migration and invasion. *PLoS One* **2**(7): e660.
- Sluss, H.K., Armata, H., Gallant, J., and Jones, S.N. 2004. Phosphorylation of serine 18 regulates distinct p53 functions in mice. *Mol Cell Biol* **24**(3): 976-984.
- Smith, A.E., Smith, R., and Paucha, E. 1979. Characterization of different tumor antigens present in cells transformed by simian virus 40. *Cell* **18**(2): 335-346.
- St Clair, S. and Manfredi, J.J. 2006. The dual specificity phosphatase Cdc25C is a direct target for transcriptional repression by the tumor suppressor p53. *Cell Cycle* **5**(7): 709-713.
- Stambolsky, P., Tabach, Y., Fontemaggi, G., Weisz, L., Maor-Aloni, R., Siegfried, Z., Shiff, I., Kogan, I., Shay, M., Kalo, E., Blandino, G., Simon, I., Oren, M., and Rotter, V. 2010. Modulation of the vitamin D3 response by cancer-associated mutant p53. *Cancer Cell* **17**(3): 273-285.
- Sterner, D.E. and Berger, S.L. 2000. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**(2): 435-459.
- Strano, S., Fontemaggi, G., Costanzo, A., Rizzo, M.G., Monti, O., Baccarini, A., Del Sal, G., Levrero, M., Sacchi, A., Oren, M., and Blandino, G. 2002. Physical interaction with human tumor-derived p53 mutants inhibits p63 activities. *J Biol Chem* **277**(21): 18817-18826.
- Struhl, K. 2007. Transcriptional noise and the fidelity of initiation by RNA polymerase II. *Nat Struct Mol Biol* **14**(2): 103-105.
- Sykes, S.M., Mellert, H.S., Holbert, M.A., Li, K., Marmorstein, R., Lane, W.S., and McMahon, S.B. 2006. Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell* **24**(6): 841-851.
- Taira, N., Nihira, K., Yamaguchi, T., Miki, Y., and Yoshida, K. 2007. DYRK2 is targeted to the nucleus and controls p53 via Ser46 phosphorylation in the apoptotic response to DNA damage. *Mol Cell* **25**(5): 725-738.
- Takahashi, K. and Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**(4): 663-676.
- Takenaka, I., Morin, F., Seizinger, B.R., and Kley, N. 1995. Regulation of the sequence-specific DNA binding function of p53 by protein kinase C and protein phosphatases. *J Biol Chem* **270**(10): 5405-5411.
- Tang, Y., Luo, J., Zhang, W., and Gu, W. 2006. Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Mol Cell* **24**(6): 827-839.
- Tang, Y., Zhao, W., Chen, Y., Zhao, Y., and Gu, W. 2008. Acetylation is indispensable for p53 activation. *Cell* **133**(4): 612-626.
- Taura, M., Eguma, A., Suico, M.A., Shuto, T., Koga, T., Komatsu, K., Komune, T., Sato, T., Saya, H., Li, J.D., and Kai, H. 2008. p53 regulates Toll-like receptor 3 expression and function in human epithelial cell lines. *Mol Cell Biol* **28**(21): 6557-6567.
- Tedeschi, A. and Di Giovanni, S. 2009. The non-apoptotic role of p53 in neuronal biology: enlightening the dark side of the moon. *EMBO Rep* **10**(6): 576-583.
- Teodoro, J.G., Parker, A.E., Zhu, X., and Green, M.R. 2006. p53-mediated inhibition of angiogenesis through up-regulation of a collagen prolyl hydroxylase. *Science* **313**(5789): 968-971.
- Tepper, C.G., Gregg, J.P., Shi, X.B., Vinall, R.L., Baron, C.A., Ryan, P.E., Desprez, P.Y., Kung, H.J., and deVere White, R.W. 2005. Profiling of gene expression changes caused by p53 gain-of-function mutant alleles in prostate cancer cells. *Prostate* **65**(4): 375-389.
- Terzian, T., Suh, Y.A., Iwakuma, T., Post, S.M., Neumann, M., Lang, G.A., Van Pelt, C.S., and Lozano, G. 2008. The inherent instability of mutant p53 is alleviated by Mdm2 or p16INK4a loss. *Genes Dev* **22**(10): 1337-1344.

- Teufel, D.P., Freund, S.M., Bycroft, M., and Fersht, A.R. 2007. Four domains of p300 each bind tightly to a sequence spanning both transactivation subdomains of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(17): 7009-7014.
- Thomas, M.C. and Chiang, C.M. 2006. The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **41**(3): 105-178.
- Thomson, J.P., Skene, P.J., Selfridge, J., Clouaire, T., Guy, J., Webb, S., Kerr, A.R., Deaton, A., Andrews, R., James, K.D., Turner, D.J., Illingworth, R., and Bird, A. 2010. CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1. *Nature* **464**(7291): 1082-1086.
- Thut, C.J., Chen, J.L., Klemm, R., and Tjian, R. 1995. p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science* **267**(5194): 100-104.
- Toledo, F., Lee, C.J., Krummel, K.A., Rodewald, L.W., Liu, C.W., and Wahl, G.M. 2007. Mouse mutants reveal that putative protein interaction sites in the p53 proline-rich domain are dispensable for tumor suppression. *Mol Cell Biol* **27**(4): 1425-1432.
- Toledo, F. and Wahl, G.M. 2006. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer* **6**(12): 909-923.
- Troester, M.A., Herschkowitz, J.I., Oh, D.S., He, X., Hoadley, K.A., Barbier, C.S., and Perou, C.M. 2006. Gene expression patterns associated with p53 status in breast cancer. *BMC Cancer* **6**: 276.
- Tse, C., Sera, T., Wolffe, A.P., and Hansen, J.C. 1998. Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* **18**(8): 4629-4638.
- Venters, B.J. and Pugh, B.F. 2009. How eukaryotic genes are transcribed. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **44**(2-3): 117-141.
- Veprintsev, D.B. and Fersht, A.R. 2008. Algorithm for prediction of tumour suppressor p53 affinity for binding sites in DNA. *Nucleic Acids Res* **36**(5): 1589-1598.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. 2000. Surfing the p53 network. *Nature* **408**(6810): 307-310.
- Vousden, K.H. 2006. Outcomes of p53 activation--spoilt for choice. *J Cell Sci* **119**(Pt 24): 5015-5020.
- Vousden, K.H. and Prives, C. 2009. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* **137**(3): 413-431.
- Vousden, K.H. and Ryan, K.M. 2009. p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer* **9**(10): 691-700.
- Wade, J.T. and Struhl, K. 2008. The transition from transcriptional initiation to elongation. *Curr Opin Genet Dev* **18**(2): 130-136.
- Walker, K.K. and Levine, A.J. 1996. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(26): 15335-15340.
- Walter, K., Warnecke, G., Bowater, R., Deppert, W., and Kim, E. 2005. tumor suppressor p53 binds with high affinity to CTG.CAG trinucleotide repeats and induces topological alterations in mismatched duplexes. *J Biol Chem* **280**(52): 42497-42507.
- Wang, Y. and Prives, C. 1995. Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. *Nature* **376**(6535): 88-91.
- Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J.A., Schones, D.E., Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Peng, W., Zhang, M.Q., and Zhao, K. 2008. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet* **40**(7): 897-903.
- Weber, A., Marquardt, J., Elzi, D., Forster, N., Starke, S., Glaum, A., Yamada, D., Defosse, P.A., Delrow, J., Eisenman, R.N., Christiansen, H., and Eilers, M. 2008. Zbtb4 represses transcription of P21CIP1 and controls the cellular response to p53 activation. *EMBO J* **27**(11): 1563-1574.
- Weber, J.D., Kuo, M.L., Bothner, B., DiGiammarino, E.L., Kriwacki, R.W., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. 2000. Cooperative signals governing ARF-mdm2 interaction and nucleolar localization of the complex. *Mol Cell Biol* **20**(7): 2517-2528.
- Wei, C.L., Wu, Q., Vega, V.B., Chiu, K.P., Ng, P., Zhang, T., Shahab, A., Yong, H.C., Fu, Y., Weng, Z., Liu, J., Zhao, X.D., Chew, J.L., Lee, Y.L., Kuznetsov, V.A., Sung, W.K., Miller, L.D., Lim, B., Liu, E.T., Yu, Q., Ng, H.H., and Ruan, Y. 2006. A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell* **124**(1): 207-219.
- Weinberg, R.A. 1989. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* **49**(14): 3713-3721.

- Weisz, L., Damalas, A., Lontos, M., Karakaidos, P., Fontemaggi, G., Maor-Aloni, R., Kalis, M., Levrero, M., Strano, S., Gorgoulis, V.G., Rotter, V., Blandino, G., and Oren, M. 2007a. Mutant p53 enhances nuclear factor kappaB activation by tumor necrosis factor alpha in cancer cells. *Cancer Res* **67**(6): 2396-2401.
- Weisz, L., Oren, M., and Rotter, V. 2007b. Transcription regulation by mutant p53. *Oncogene* **26**(15): 2202-2211.
- Weisz, L., Zalcenstein, A., Stambolsky, P., Cohen, Y., Goldfinger, N., Oren, M., and Rotter, V. 2004. Transactivation of the EGR1 gene contributes to mutant p53 gain of function. *Cancer Res* **64**(22): 8318-8327.
- Will, K., Warnecke, G., Albrechtsen, N., Boulikas, T., and Deppert, W. 1998a. High affinity MAR-DNA binding is a common property of murine and human mutant p53. *J Cell Biochem* **69**(3): 260-270.
- Will, K., Warnecke, G., Wiesmuller, L., and Deppert, W. 1998b. Specific interaction of mutant p53 with regions of matrix attachment region DNA elements (MARs) with a high potential for base-unpairing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23): 13681-13686.
- Willis, A., Jung, E.J., Wakefield, T., and Chen, X. 2004. Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. *Oncogene* **23**(13): 2330-2338.
- Wolf, D., Harris, N., Goldfinger, N., and Rotter, V. 1985. Isolation of a full-length mouse cDNA clone coding for an immunologically distinct p53 molecule. *Mol Cell Biol* **5**(1): 127-132.
- Wolf, D., Harris, N., and Rotter, V. 1984. Reconstitution of p53 expression in a nonproducer Ab-MuLV-transformed cell line by transfection of a functional p53 gene. *Cell* **38**(1): 119-126.
- Wolf, D. and Rotter, V. 1984. Inactivation of p53 gene expression by an insertion of Moloney murine leukemia virus-like DNA sequences. *Mol Cell Biol* **4**(7): 1402-1410.
- . 1985. Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(3): 790-794.
- Woodcock, C.L. and Dimitrov, S. 2001. Higher-order structure of chromatin and chromosomes. *Curr Opin Genet Dev* **11**(2): 130-135.
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D., and Levine, A.J. 1993. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* **7**(7A): 1126-1132.
- Wu, Z., Earle, J., Saito, S., Anderson, C.W., Appella, E., and Xu, Y. 2002. Mutation of mouse p53 Ser23 and the response to DNA damage. *Mol Cell Biol* **22**(8): 2441-2449.
- Wysocka, J., Swigut, T., Xiao, H., Milne, T.A., Kwon, S.Y., Landry, J., Kauer, M., Tackett, A.J., Chait, B.T., Badenhorst, P., Wu, C., and Allis, C.D. 2006. A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature* **442**(7098): 86-90.
- Xing, J., Sheppard, H.M., Corneillie, S.I., and Liu, X. 2001. p53 Stimulates TFIIID-TFIIA-promoter complex assembly, and p53-T antigen complex inhibits TATA binding protein-TATA interaction. *Mol Cell Biol* **21**(11): 3652-3661.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V., Cordon-Cardo, C., and Lowe, S.W. 2007. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**(7128): 656-660.
- Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J., and Handa, H. 1999. NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell* **97**(1): 41-51.
- Yan, W., Liu, G., Scoumanne, A., and Chen, X. 2008. Suppression of inhibitor of differentiation 2, a target of mutant p53, is required for gain-of-function mutations. *Cancer Res* **68**(16): 6789-6796.
- Yee, K.S. and Vousden, K.H. 2005. Complicating the complexity of p53. *Carcinogenesis* **26**(8): 1317-1322.
- Yu, X., Harris, S.L., and Levine, A.J. 2006. The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res* **66**(9): 4795-4801.
- Zakut-Houri, R., Bienz-Tadmor, B., Givol, D., and Oren, M. 1985. Human p53 cellular tumor antigen: cDNA sequence and expression in COS cells. *EMBO J* **4**(5): 1251-1255.
- Zalcenstein, A., Stambolsky, P., Weisz, L., Muller, M., Wallach, D., Goncharov, T.M., Krammer, P.H., Rotter, V., and Oren, M. 2003. Mutant p53 gain of function: repression of

- CD95(Fas/APO-1) gene expression by tumor-associated p53 mutants. *Oncogene* **22**(36): 5667-5676.
- Zalcenstein, A., Weisz, L., Stambolsky, P., Bar, J., Rotter, V., and Oren, M. 2006. Repression of the MSP/MST-1 gene contributes to the antiapoptotic gain of function of mutant p53. *Oncogene* **25**(3): 359-369.
- Zhan, Q., Antinore, M.J., Wang, X.W., Carrier, F., Smith, M.L., Harris, C.C., and Fornace, A.J., Jr. 1999. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* **18**(18): 2892-2900.
- Zhang, L., Yu, D., Hu, M., Xiong, S., Lang, A., Ellis, L.M., and Pollock, R.E. 2000. Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res* **60**(13): 3655-3661.
- Zhang, Y., Wang, J.S., Chen, L.L., Cheng, X.K., Heng, F.Y., Wu, N.H., and Shen, Y.F. 2004. Repression of hsp90beta gene by p53 in UV irradiation-induced apoptosis of Jurkat cells. *J Biol Chem* **279**(41): 42545-42551.
- Zhang, Y., Xiong, Y., and Yarbrough, W.G. 1998. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* **92**(6): 725-734.
- Zhao, Y., Yin, X., Qin, H., Zhu, F., Liu, H., Yang, W., Zhang, Q., Xiang, C., Hou, P., Song, Z., Liu, Y., Yong, J., Zhang, P., Cai, J., Liu, M., Li, H., Li, Y., Qu, X., Cui, K., Zhang, W., Xiang, T., Wu, Y., Liu, C., Yu, C., Yuan, K., Lou, J., Ding, M., and Deng, H. 2008. Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell* **3**(5): 475-479.
- Zhou, V.W., Goren, A., and Bernstein, B.E. 2011. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat Rev Genet* **12**(1): 7-18.
- Zhu, J., Zhou, W., Jiang, J., and Chen, X. 1998. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for mediating apoptosis. *J Biol Chem* **273**(21): 13030-13036.
- Zilfou, J.T. and Lowe, S.W. 2009. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**(5): a001883.

## 6 Anhang

### 6.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
Ala	Alanin
APAF	<i>apoptosis activating factor</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	<i>alternative reading frame</i>
Arg/R	Arginin
AS	Aminosäure
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ATM-related</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BDKRB1	Bradykinin Rezeptor B1
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	CREB-Bindeprotein
Cdc	<i>cell division cycle</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i> ; Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	<i>copy DNA</i>
CEBPA	<i>CCAAT/enhancer-binding protein alpha</i>
CHD	<i>chromodomain helicase DNA-binding</i>
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
CK2	<i>casein kinase 2</i>
CNV	<i>copy number variant</i>
CPA4	Carboxypeptidase A4
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
Ct	<i>threshold cyclce</i>
CTD	C-terminale Domäne
C-Terminus	Carboxyl-terminus
Cyc	Cyclin
Cys	Cystein
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DBD	DNA-Bindedomäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DSIF	<i>5,6-dichloro-1-beta-d-ribofuranosylbenzimidazole sensitivity inducing factor</i>
DTT	Dithiothreitol
EBI3	<i>epstein-barr virus induced gene 3</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGR1	<i>early growth response 1</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis-( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FACT	<i>facilitates Chromatin Transcription</i>
FCS	fötales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
G	Guanosin
GADD45	<i>growht arrest and DNA damage 45</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GAS1	<i>growth arrest specific 1</i>
GCNT3	<i>glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3, mucin type</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
Gly/G	Glycin
GOF	<i>gain of function; Funktionsgewinn</i>
GTFs	<i>general transcription factors</i>
h	Stunde(n)
H3K27Me3	Histon H3 Lysin27 Trimethylierung
H3K36Me2/Me3	Histon H3 Lysin36 Di-/Trimethylierung
H3K4Me3	Histon H3 Lysin4 Trimethylierung
H3K9Ac	Histon H3 Lysin9 Acetylierung
H3K9Me3	Histon H3 Lysin9 Trimethylierung
HAS2	Hyaluronan Synthase
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
His	Histidin
HMT	Histon-Methyltransferase
HP1	Heterochromatin Protein 1
HPRT1	Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1
HS	hypersensitiv
HTR2A	<i>5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A</i>
ID2	<i>inhibitor of DNA binding 2</i>
IgG	Immunglobulin G
INK4	<i>inhibitors of cdk4</i>

Ino80	<i>inositol requiring 80</i>
IP	Immunopräzipitation
ISWI	<i>imitation switch</i>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LT	<i>large T-antigen</i>
Lys	Lysin
LZTS1	<i>leucine zipper putative tumor suppressor 1</i>
M	Molar
mA	Milliampere
MAP2K3	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 3</i>
MDM2	<i>murine double minute 2</i>
MDR1	<i>multi drug resistance gene 1</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-morpholino)Propansulfonyl Säure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MST1	<i>macrophage stimulating 1</i>
mutp53	mutiertes p53
MVD	<i>mevalonate (diphospho) decarboxylase</i>
NELF	<i>negative elongation factor</i>
NF-Y	<i>nuclear Factor-Y</i>
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-Terminus	Amino-Terminus
NURF	<i>nucleosome remodelling factor</i>
OD	Optische Dichte
p.a.	<i>pro analysis</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PHD	<i>plant homeodomain</i>
PIC	Pre-Initiationskomplex
PMEPA1	<i>prostate transmembrane protein, androgen induced 1</i>
Pol II	RNA-Polymerase II
Pro	Prolin
P-TEF-b	<i>positive Transcription Elongation Factor b</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
qPCR	quantitative Real-Time PCR
RB	Retinoblastom



RE	<i>response element</i> ; DNA-Konsensussequenz
Reg	Regulatorische Domäne
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde(n)
S/MAR	<i>scaffold/ matrix attachment region</i>
scr	<i>scrambled</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
shRNA	<i>short-hairpin</i> RNA
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
SLR	<i>signal log ratio</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
STMN1	Stathmin
SV40	Simian Virus 40
SWI/SNF	<i>switch/sucrose nonfermenting</i>
SWR1	<i>sick with rat8 ts 1</i>
T	Thymin
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
TD	Tetramerisierungsdomäne
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N' Tetramethyl-ethylendiamin
TERT	<i>telomerase reverse transcriptase</i>
TET	Tetramerisierungsdomäne
Thr	Threonin
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
TSS	<i>transcriptional start site</i> ; Transkriptionsstart
Tween	20 Polyoxeethylen-Sorbitan-Monolaurat
U	<i>Unit</i> ; Aktivitätseinheit
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolette Strahlung
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VDR	Vitamin D3 Rezeptor
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Vol	Volumen
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen

WB

Western Blot

WGA

*whole genome amplification*

wtp53

Wildtyp p53

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachtes Schema der p53-Funktionen. ....	4
Abbildung 2: Proteinstruktur und posttranslationale Modifikationen von p53.....	8
Abbildung 3: Beeinflussung der transkriptionellen Aktivität von p53 durch verschiedene Faktoren.....	18
Abbildung 4: Mutationen im Tumorsuppressor <i>p53</i> .....	24
Abbildung 5: Onkogene Funktionen von mutp53 und deren molekulare Grundlagen .....	26
Abbildung 6: Expression von Intermediärfilamenten und mutp53 in U251 Zellen.....	72
Abbildung 7: U251 Zellen weisen die p53-hotspot-Mutation R273H auf. ....	73
Abbildung 8: Mutp53-Depletion in U251 Zellen.....	74
Abbildung 9: Globale Analyse der Veränderungen in der Genexpression in U251 Zellen nach mutp53-Depletion.....	76
Abbildung 10: qPCR-Validierung von mutp53-regulierten Genen.....	78
Abbildung 11: Zeitverlauf der Expression ausgewählter Gene in Abhängigkeit von der mutp53-Proteinmenge. ....	79
Abbildung 12: Validierung ausgewählter mutp53-Zielgene mittels qPCR.....	80
Abbildung 13: Validierte mutp53-Zielgene in U251 Zellen. ....	82
Abbildung 14: Expressionsänderungen von in U251 Zellen validierten mutp53-Zielgenen in HT29 und MDA-MB-468 Zellen. ....	83
Abbildung 15: Analyse der Stabilität der <i>GAS1</i> - und <i>HTR2A</i> -Transkripte nach mutp53- Depletion in U251 Zellen. ....	85
Abbildung 16: ChIP-chip-Profile für <i>GAS1</i> (A), <i>HTR2A</i> (B), <i>PMEPA1</i> (C), <i>BDKRB1</i> (D) und <i>HAS2</i> (E).....	92
Abbildung 17: qPCR-basierte ChIP-Analyse für <i>GAS1</i> .....	94
Abbildung 18: qPCR-basierte ChIP-Analyse für <i>HTR2A</i> . ....	95
Abbildung 19: ChIP-chip-Analyse von mutp53-Bindestellen mit Hilfe zweier verschiedener Methoden der <i>peak</i> -Identifikation. ....	98
Abbildung 20: Statistische Analyse der mutp53-Bindestellen mit der Carpet Software. ....	100
Abbildung 21: Mutp53-Bindung an <i>EGR1</i> (A) und <i>MAP2K3</i> (B).....	101
Abbildung 22: Mutp53-Bindung an <i>GAS1</i> (A), <i>HTR2A</i> (B), <i>PMEPA1</i> (C), <i>BDKRB1</i> (D) und <i>HAS2</i> (E).....	103
Abbildung 23: Mutp53-Bindung an <i>CREBL2</i> (A), <i>FEM1B</i> (B), <i>ICMT</i> (C), <i>INSIG1</i> (D) und STMN3 (E).....	105
Abbildung 24: Mutp53-Konsensusbindemotive in U251 Zellen. ....	106
	150

Abbildung 25: Strukturelle Charakteristika von mutp53-Bindestellen. ....	108
Abbildung 26: Ko-Immunopräzipitationen von mutp53, SP1 und Pol II. ....	110
Abbildung 27: Ko-Lokalisation von mutp53 und SP1. ....	112
Abbildung 28: Modell der transkriptionellen Regulation durch mutp53. ....	125
Abbildung 29: Biologische Konsequenzen transkriptioneller Plastizität. ....	127

## 6.3 Sicherheitstechnische Daten










### 6.3.1 Gefahrstoffe

Im Folgenden sind die Gefahrstoffe aufgelistet, die im Verlauf dieser Arbeit verwendet wurden. Für jede Substanz sind die Sicherheitskodierung sowie die H-Sätze (*hazard statements*) und P-Sätze (*precautionary statements*) nach dem „Global harmonisierten System zur Einstufung und Kennzeichnung von Chemikalien“ (GHS, *Globally Harmonized System of Classification, Labelling and Packaging of Chemicals*) aufgeführt.

Substanz	GHS-Kodierung	H-Sätze	P-Sätze
Aceton	GHS02/07	H225, 319, 336	P210, 261, 305+351+338
Acrylamid	GHS06/08	H301, 312, 315, 317, 319, 332, 340, 350, 361f, 372	P201, 281, 301+310, 302+352, 304+340, 305+351+338
Actinomycin D	GHS06	H300	P264, 270, 301+310, 321, 330
APS	GHS03/07/08	H272, 302, 319, 335, 334, 317	P280, 305+351+338, 302+352, 304+341, 342+311
Bisacrylamid	GHS07	H302	P264, 270, 301+312, 330
Chloroform	GHS07/08	H351, 302, 373, 315	P302+352, 314
DEPC	GHS07	H302, 315, 319, 332, 335	P280, 301+312, 302+352, 304+340, 305+351+338
DTT	GHS07	H302, 315, 319, 332, 335	P280, 301+312, 302+352, 304+340, 305+351+338, 332+313
EDTA	GHS07	H319	P264, 280, 305+351+338, 337+313
Essigsäure	GHS02/05/07	H226, 332, 302, 314, 335	P280, 301+330+331, 305+351+338
Ethanol	GHS02	H225	P210, 240, 243, 280, 303+361+353
Ethidiumbromid	GHS06/08	H341, 330, 302	P281, 304+P340

Formaldehydlsg. 37%	GHS05/06/08	H301, 311, 314, 317, 331, 335, 351, 370	P280, 301+330+331, 302+352, 304+340, 305+351+338
Isoamylalkohol	GHS02/07	H226, 332, 335	P210, 304+340
Isopropanol	GHS02/07	H225, 319, 336	P210, 233, 305+351+338
Methanol	GHS02/06/08	H225, 301, 311, 331, 370	P243, 280, 301+310, 302+350, 304+340, 307+311
Natriumazid	GHS06/09	H300, 410	P273
Natrium- Desoxycholat	GHS07	H302	
Natrium- hydroxid	GHS05	H314, 290	P280, 301+330+331, 305+351+338
N-Lauroyl- sarcosin	GHS06/07	H330, 315, 319, 317	P280, 304+340, 302+350, 305+351+338
Paraform- aldehyd	GHS02/07/08	H228, 302, 315, 317, 319, 332, 335, 351	P202, 280, 302+352, 305+351+338, 308+313, 362
Phenol	GHS05/06/08	H301, 311, 314, 331, 341, 373	P261, 280, 301+310, 305+351+338, 310
Salzsäure 37 %	GHS05/07	H314, 335, 290	P280, 301+330+331, 305+351+338
SDS	GHS02/06	H228, 302, 311, 315, 319, 335	P210, 261, 280, 305+351+338
TEMED	GHS02/05/07	H225, 302, 314, 332	P243, 260, 280, 301+330+331, 303+361+353, 304+340
Triton X-100	GHS05/07	H302, 318	P280, 305+351+338
Trizma Base	GHS07	H315, 319, 335	P261, 305+351+338
Trypanblau	GHS08	H350	P201, 308+313
β-Mercapto- ethanol	GHS05/06/09	H301, 310, 315, 317, 318, 330, 400, 410	P262, 280, 301+310, 302+350, 305+351+338, 363

## 6.3.2 Liste der GHS-Kodierungen und der zugehörigen Piktogramme

Piktogramm	GHS-Kodierung	Signalwort	Gefahrstoffklasse
	GHS01	Gefahr	instabile explosive Stoffe, Gemische und Erzeugnisse mit Explosivstoff(en), selbstzersetzliche Stoffe und Gemische, Organische Peroxide
	GHS02	Gefahr	Entzündbar, selbsterhitzungsfähig, selbstzersetzlich, pyrophor, Organische Peroxide
	GHS03	Gefahr	Entzündend (oxidierend) wirkend
	GHS04	Achtung	Gase unter Druck, verdichtete, verflüssigte, tiefgekühlt verfl., gelöste Gase
	GHS05	Gefahr/ Achtung	Auf Metalle korrosiv wirkend, hautätzend, schwere Augenschädigung
	GHS06	Gefahr	Akute Toxizität
	GHS07		Zusätzliche Kennzeichnung div. Kategorien
	GHS08	Gefahr	div. Gesundheitsgefahren
	GHS09	Achtung/ Gefahr	Gewässergefährdend

### 6.3.3 Verzeichnis der H- und P-Sätze

#### 6.3.3.1 H-Sätze (*hazard statements*)

##### **H200-Reihe: Physikalische Gefahren**

H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar.
H228	Entzündbarer Feststoff.
H272	Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.
H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

##### **H300-Reihe: Gesundheitsgefahren**

H300	Lebensgefahr bei Verschlucken.
H301	Giftig bei Verschlucken.
H302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
H310	Lebensgefahr bei Hautkontakt.
H311	Giftig bei Hautkontakt.
H312	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.
H314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.
H315	Verursacht Hautreizungen.
H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
H318	Verursacht schwere Augenschäden.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
H330	Lebensgefahr bei Einatmen.
H331	Giftig bei Einatmen.
H332	Gesundheitsschädlich bei Einatmen.
H334	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.
H335	Kann die Atemwege reizen.
H336	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
H340	Kann genetische Defekte verursachen.
H341	Kann vermutlich genetische Defekte verursachen.
H350	Kann Krebs erzeugen.
H351	Kann vermutlich Krebs erzeugen.



---

H361f	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.
H370	Schädigt die Organe.
H371	Kann die Organe schädigen.
H372	Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition.
H373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition.

**H400-Reihe: Umweltgefahren**

H400	Sehr giftig für Wasserorganismen.
H410	Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung.

**6.3.3.2 P-Sätze (*precautionary statements*)****P200-Reihe: Prävention**

P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
P202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen.
P210	Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.
P233	Behälter dicht verschlossen halten.
P240	Behälter und zu befüllende Anlage erden.
P243	Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen.
P261	Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.
P264	Nach Gebrauch ... gründlich waschen.
P270	Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen.
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.
P281	Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.

**P300-Reihe: Reaktion**

P310	Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P314	Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P321	Besondere Behandlung.
P330	Mund ausspülen.
P362	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

P363 Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.

### **Kombinationen der P-Sätze**

P301+310	Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P301+312	Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P301+330+331	Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen.
P302+350	Bei Kontakt mit der Haut: Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.
P302+352	Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen.
P303+361+353	Bei Kontakt mit der Haut (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
P304+340	Bei Einatmen: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P304+341	Bei Einatmen: Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P305+351+338	Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P307+311	Bei Exposition: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
P308+313	Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat Einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P332+313	Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P342+311	Bei Symptomen der Atemwege: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, deren Unterstützung mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht hat.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert für die Möglichkeit in seiner Abteilung promovieren und dieses interessante Thema bearbeiten zu dürfen und für seine stetige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft im Verlauf der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Wolfram Brune danke ich herzlich für die Übernahme der Begutachtung meiner Dissertation am Fachbereich Chemie der Universität Hamburg.

Besonders danke ich Dr. Genrich Tolstonog für die kompetente Betreuung. Seine Tür stand mir stets offen und mit zahlreichen Ideen und Diskussionen hat er mich durch die Arbeit begleitet und bei Problemen unterstützt.

Dr. Benjamin Otto danke ich für die Hilfe bei den bioinformatischen Analysen.

Weiterhin gilt mein Dank allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern aus der Abteilung Tumorstudiologie, die für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und viel Spaß im Labor gesorgt haben. Insbesondere möchte ich mich bei Marion Kühl, Heike Helmbold und Florian Wegwitz für die nette gemeinsame Labor- und Pausenzeit bedanken, ihre immerwährende Hilfsbereitschaft und ihren fachlichen und menschlichen Beistand.

Ein großes Dankeschön geht an all die Freunde, die stets ein großer Rückhalt waren, ganz besonders Matthieu, Sarah, Daniel, Ingmar und Phillip, die mich seit meiner Schulzeit begleiten.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei Julia und meiner Familie, die immer an mich geglaubt haben und durch ihre Liebe und Anteilnahme maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.