

Mammaspezifische Expression von *p53* Hot-Spot-Mutationen des Menschen im transgenen Mausmodell

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat. (*doctor rerum naturalium*)

an der Fakultät für Biologie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Diplom Biologin Frauke Krepulat

aus Bielefeld

Hamburg, Mai 2003

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Prof. Dr. W. DEPPERT
Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. H. LÖRZ

Tag der Disputation: 24. Oktober 2003

Hamburg, den 14. Juni 2003



A handwritten signature in black ink, appearing to read "Andreas Frühwald".

Professor Dr. A. Frühwald
Dekan

ZUSAMMENFASSUNG	1
1. EINLEITUNG	2
1.1 P53 IN HUMANEN MALIGNEN TUMOREN	2
1.2 STRUKTUR DES TUMORSUPPRESSOR-PROTEINS P53	3
1.3 FUNKTION DES TUMORSUPPRESSOR-PROTEINS P53	6
1.4 STABILISIERUNG DES TUMORSUPPRESSOR-PROTEINS P53	8
1.5 MUTATIONEN IM TUMORSUPPRESSOR-PROTEIN P53	10
1.6 P53-MUTATIONEN IM HUMANEN MAMMAKARZINOM	13
1.7 MUTP53 IM TIERMODELL	16
1.8 AUFBAU UND ENTWICKLUNG VON MURINEM MAMMAGEWEBE	18
1.9 PROBLEMSTELLUNG	20
2. ERGEBNIS	22
2.1 KONSTRUKTION DER <i>WAP-MUTP53</i> -TRANSGEN-DNS	22
2.1.1 FUSION VON <i>WTP53</i> UND HA-TAG DURCH PCR-MUTAGENESE	24
2.1.2 GENERIERUNG VON <i>MUTP53</i> ^{R245W} UND <i>MUTP53</i> ^{R270H} MUTANTEN MITTELS <i>UNIQUE-SITE-ELIMINATION</i> - (U.S.E.) MUTAGENESE VON <i>WTP53</i>	25
2.1.3 EINSATZ DER <i>OVERLAP-EXTENSION</i> -PCR-MUTAGENESE ZUR HERSTELLUNG EINER <i>MUTP53</i> ^{R172H} MUTANTE	27
2.1.4 HERSTELLUNG DER <i>WAP-MUTP53</i> TRANSGEN-KONSTRUKTE	28
2.2 ERZEUGUNG <i>WAP-MUTP53</i> TRANSGENER MAUS-LINIEN	31
2.3 IDENTIFIZIERUNG <i>WAP-MUTP53</i> TRANSGENER MAUS-LINIEN	32
2.4 CHARAKTERISIERUNG <i>WAP-MUTP53</i> TRANSGENER MAUS-LINIEN	38
2.4.1 TRANSKRIPTIONS-ANALYSEN <i>WAP-MUTP53</i> TRANSGENER MAUS-LINIEN	38
2.4.2 HISTOLOGISCHE UND IMMUNHISTOLOGISCHE ANALYSEN <i>WAP-MUTP53</i> TRANSGENER MAUS-LINIEN	41
2.4.2.1 Vergleich einzelner <i>WAP-mutp53</i> transgener Maus-Linien	41
2.4.2.2 Detaillierte Phänotyp-Analyse der niedrig exprimierenden Maus-Linie CB6-4	51
2.4.2.3 Einfluss von <i>mutp53</i> Proteinen auf die Zell-Proliferation	56
2.5 BEDINGTE PERMISSIVITÄT DER <i>MUTP53</i> -EXPRESSION	57
2.5.1 EXPRESSIONSANALYSE <i>IN VIVO</i> UND <i>IN VITRO</i>	57
2.5.2 RE-EXPRESSION VON <i>WAP-MUTP53</i> ^{R270H} IN BI-TRANSGENEN TIEREN	62
3. DISKUSSION	68
3.1 <i>WAP-MUTP53</i> MAUS-MODELL	68
3.2 EINFLUSS EPIGENETISCHER FAKTOREN AUF DIE TRANSGEN-EXPRESSION	70
3.3 AUSWIRKUNGEN EINER <i>WAP</i> -PROMOTOR AKTIVITÄT WÄHREND DER EMBRYOGENESE	73

3.4 INDUKTIONS-UNABHÄNGIGE MUTP53-EXPRESSION	74
3.5 MORPHOLOGISCHE AUFFÄLLIGKEITEN EINER WAP-MUTP53^{R245W} LINIE	75
3.6 BI-TRANSGENE WAP-MUTP53 X WAP-T	76
3.7 FVB WAP-MUTP53^{R172H} TRANSGENE MAUS-LINIE	77
3.8 ELIMINIERUNG DER WTP53-FUNKTION DURCH SV40 T-ANTIGEN	78
3.9 ELIMINIERUNG DER WTP53-FUNKTION IN BALB/C P53+/- TIEREN	79
3.10 MODELLSYSTEM ZUR ANALYSE EINER MAMMAKARZINOGENESE	79
4. MATERIAL	81
<hr/>	
4.1 MAMMALIA	81
4.2 EUKARYOTISCHE ZELLEN	81
4.3 PROKARYOTISCHE ZELLEN	82
4.4 MOLEKULARBIOLOGISCHES MATERIAL	82
4.4.1 PLASMIDE	82
4.4.2 ENZYME	83
4.4.3 ANTIKÖRPER	83
4.4.4 PRIMER	84
4.4.5 MOLEKULARGEWICHT-STANDARDS	85
4.5 KITS	85
4.6 CHEMIKALIEN	86
4.7 MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN	87
5. METHODEN	91
<hr/>	
5.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	91
5.1.1 PROKARYOTISCHE ZELLEN	91
5.1.2 EUKARYOTISCHE ZELLEN	92
5.1.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zell-Linien	92
5.1.2.2 Etablierung und Kultivierung von Primär-Zellkulturen	93
5.1.2.3 Transiente und stabile Transfektion eukaryotischer Zellen	94
5.1.2.4 5'-Azacytidin-Behandlung eukaryotischer Zell-Linien	95
5.1.2.5 Indirekte Immunfluoreszenz eukaryotischer Zellen	95
5.1.3 PRÄPARATION, ANALYSE UND KLONIERUNG VON DNS	96
5.1.3.1 Präparation von Plasmid-DNS aus E.coli Bakterienzellen	96
5.1.3.2 Fotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	97
5.1.3.3 Restriktionsspaltung von Nukleinsäuren	97
5.1.3.4 Gelelektrophoretische Auftrennung und Extraktion von DNS-Fragmenten	98
5.1.3.5 Klenow Fragment der DNS Polymerase I	99
5.1.3.6 Shrimp alkalische Phosphatase	99
5.1.3.7 Ligation	99
5.1.4 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	100
5.1.4.1 PCR-Amplifizierung und Sub-Klonierung der Transgen-Konstrukte	101
5.1.4.2 Unique site elimination (U.S.E.) Mutagenese	102
5.1.4.3 Overlap extension PCR Mutagenese	104

5.1.5 NUKLEINSÄURE-SEQUENZIERUNG	106
5.1.6 <i>IN VITRO</i> TRANSKRIPTION	106
5.1.7 <i>IN VITRO</i> TRANSLATION	106
5.2 HERSTELLUNG TRANSGENER TIERE	107
5.2.1 VORBEREITUNG DER TRANSGEN-DNS	107
5.2.2 VORBEREITUNG DER TIERE	108
5.2.3 ZYGOTEN PRÄPARATION	109
5.3 IDENTIFIZIERUNG TRANSGENER <i>WAP-MUTP53</i> TIERE	111
5.3.1 AUFREINIGUNG MURINER GENOMISCHER DNS AUS SCHWANZBIOPSIEN	111
5.3.2 IDENTIFIZIERUNG TRANSGENER TIERE	112
5.3.3 NACHWEIS EINER KEIMBAHNINTEGRATION DES TRANSGENKONSTRUKTES	113
5.4 CHARAKTERISIERUNG TRANSGENER TIERE	114
5.4.1 TRANSGEN-TRANSKRIPTION	114
5.4.1.1 RNS-Präparation	114
5.4.1.2 Reverse Transkription	115
5.4.2 TRANSGEN-EXPRESSION	116
5.4.2.1 Proteinbiochemische Methoden	116
5.4.2.1.1 Gesamtzell-Extrakt	116
5.4.2.1.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	116
5.4.2.1.3 Herstellung von Antikörpersäulen	116
5.4.2.1.4 Immunpräzipitation von Proteinen aus Gesamtzell-Extrakten	117
5.4.2.1.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	117
5.4.2.1.6 Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran	118
5.4.2.1.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen	118
5.4.2.2 Immunhistologische Methoden	118
6. LITERATURVERZEICHNIS	120
<hr/>	
7. ANHANG	136
<hr/>	
7.1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	136
7.2 TABELLENVERZEICHNIS	137
7.3 ABKÜRZUNGEN	138
7.4 DANKSAGUNG	142

Zusammenfassung

Missense-Punktmutationen im Gen des Tumorsuppressors *p53* resultieren nicht nur in einem Verlust der Wildtyp-*p53*-(*wtp53*) Tumorsuppressor-Funktion (*loss of function*), sondern führen auch zu einem Zugewinn an dominant-onkogenen Eigenschaften (*gain of function*). Für das Mammakarzinom wurde gezeigt, dass die Expression bestimmter *mutp53*-Proteine mit einer schlechteren Prognose und in einer Resistenz gegenüber bestimmten Chemotherapeutika korreliert.

Das postulierte onkogene Potential von definierten *mutp53*-Proteinen soll im Rahmen der Progression von Mammakarzinomen in einem induzierbaren transgenen Mausmodell untersucht werden. Voraussetzung für diese Arbeit war die Herstellung von transgenen Mäusen mit Hilfe einer Pronukleus-Mikroinjektion, die *mutp53* unter der Kontrolle des *whey acidic protein (WAP)*-Promotors tragen. Dieser Promotor führt nach Induktion durch laktotrophe Hormone im letzten Drittel der Schwangerschaft und während der Laktation zu einer gewebespezifischen Transgen-Expression in Epithelzellen der Brustdrüse. Zur Herstellung der transgenen Tiere wurde ein murines *p53*-Minigen über PCR-Mutagenese an Positionen homolog zu bekannten Hot-Spot-Punktmutationen des Menschen mutiert (humanes *mutp53*^{R248W} ~ murinem *mutp53*^{R245W}, humanes *mutp53*^{R273H} ~ murinem *mutp53*^{R270H}). Das transgene *mutp53* kann über einen eingeführten HA-Tag des Hämagglutinins aus dem Influenzavirus von endogenem *wtp53* unterschieden werden.

Insgesamt wurden 23 (10x *WAP-mutp53*^{R245W}; 13x *WAP-mutp53*^{R270H}) *WAP-mutp53* Ursprungstiere transgener Linien generiert, von deren Nachkommen sechs *WAP-mutp53*^{R245W} und acht *WAP-mutp53*^{R270H} Linien *mutp53* spezifisch, z. T. in wenigen, z.T. in beinahe allen Mammaepithelzellen sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär exprimieren. RT-PCR-Analysen und Immunmarkierungen zeigen, dass die *mutp53*-Expression während unterschiedlicher Reproduktionsphasen der Kontrolle des induzierbaren *WAP*-Promotors unterliegt.

Eine *WAP-mutp53*^{R245W} Linie (CB6-W1) zeigt bereits nach einer Induktion morphologische Veränderungen, wie hyperplastisches Drüsenepithel, mehrschichtiges und mikropapilläres Wachstum, sowie hormon-unabhängige persistierende *mutp53*-Expression in Mammaepithelzellen. Erste Beobachtungen an bi-transgenen Mauslinien (*WAP-mutp53* x *WAP-T*) deuten daraufhin, dass Tumor-Differenzierung und -Progredienz von T-Antigen induzierter Mammatumorigenese durch die Expression von *mutp53* gesteigert wird.

Hiermit steht ein Modellsystem zur Verfügung, um die molekulare Analyse der Tumorprogression von Mammakarzinomen und die Testung therapeutischer Verfahren weiter voranzutreiben.

1. Einleitung

1.1 p53 in humanen malignen Tumoren

Tumorzellen zeigen eine autonome Zell-Proliferation. Sie teilen sich unkontrolliert und können umliegendes Gewebe infiltrieren. Der Grund hierfür sind Veränderungen in den Regulationsmechanismen, die in gesunden Zellen die Zellteilung kontrollieren. Der Prozess der Tumorentstehung basiert auf einem Komplex miteinander verknüpfter genetischer und epigenetischer Veränderungen. Dabei werden Proto-Onkogene aktiviert und Tumorsuppressor-Gene inaktiviert (Hernandez-Boussard *et al.*, 1999). Proto-Onkogene wurden im Laufe der Evolution hoch konserviert und erfüllen in der normalen Zelle wichtige Aufgaben bei der Wachstumsregulation, indem sie für Wachstumsfaktoren (z.B. sis-Proto-Onkogen), intrazelluläre Signalüberträger (z.B. ras-Proto-Onkogen) oder Transkriptionsfaktoren (z.B. c-myc) kodieren. Bestimmte Mutationen in diesen Proto-Onkogenen führen zu dominant wirkenden Onkoproteinen, die eine Zelle zur unkontrollierten Proliferation anregen und damit die Entstehung eines Tumors initiieren (Bishop, 1991).

Demgegenüber stehen die Tumorsuppressor-Gene, die eine inhibitorische Wirkung auf die Zell-Proliferation ausüben und im Gegensatz zu Proto-Onkogenen rezessiv wirken. Daher müssen beide Allele inaktiviert oder deletiert sein, damit es zu einer Tumorentstehung kommt (Levine 1993).

Mutationen im *p53*-Gen (*mutp53*) werden in 50-60% aller humanen Malignome gefunden. Im Gegensatz zu anderen Tumorsuppressorgenen, die meist durch Deletionen, Trunkierungen oder Promotor-*silencing* inaktiviert werden, handelt es sich beim *p53*-Gen in 90% aller Fälle um Missense-Punktmutationen (Levine *et al.*, 1991), (Hollstein *et al.*, 1991). Diese Punktmutationen liegen hauptsächlich in der zentralen Domäne des *p53*-Moleküls (Levine *et al.*, 1995) und führen zur Expression eines vollständigen *p53*-Proteins mit einem einzigen Aminosäure-Austausch (*mutp53*). Dieses sehr spezifische *p53*-Mutationsspektrum, das sich überproportional häufig in ganz bestimmten Hot-Spot-Punktmutationen äußert, impliziert, dass während der Tumorentstehung oder Tumorentstehung auf genau diese Mutationen selektioniert wird, und dass Tumore, die ein so mutiertes *p53* exprimieren, einen selektiven Wachstumsvorteil haben. Einerseits inaktivieren diese heterozygot mutierten *p53*-Proteine die Tumorsuppressor-Funktionen wie Wachstumsarrest und Einleitung der Apoptose des noch vorhandenen Wildtyp *p53*-Proteins (*wtp53*) (*loss of function*), andererseits können sie jedoch selbst neue biochemische Aktivitäten gewinnen (*gain of function*). Sowohl aufgrund von *in vitro* Daten als auch aufgrund statistischer Korrelationsanalysen von Tumor-Datenbanken (s. z.B. <http://www.iarc.fr/P53/index.html>)

konnten mutp53-Proteinen solche dominant-onkogenen Eigenschaften im Sinne eines *gain of function* zugeschrieben werden.

In humanen Tumoren, in denen der Tumorsuppressor p53 in seiner Wildtyp-Form (wtp53) weiterhin funktionsfähig ist, sind meist andere Gene, die zur Stabilisierung des wtp53 führen, verändert. So ist beispielsweise MDM2 (*murine double minute chromosome-2*) überexprimiert, während ARF (*alternative reading frame gene*) deletiert wird.

MDM2 ist eine E3-Ubiquitin-Ligase, die negativ auf die wtp53-Transkriptionsaktivität wirkt. MDM2 bindet an wtp53 und katalysiert dessen Ubiquitinierung, so dass wtp53 durch Proteasen degradiert wird (siehe auch 1.2). Eine MDM2-Überexprimierung in humanen Tumoren führt zu einer schnellen wtp53-Degradierung, die einem wtp53-Verlust gleichkommt (Deb 2002).

ARF hingegen wirkt durch seine Bindung an MDM2 positiv auf die wtp53-Transkriptionsaktivität. Wenn ARF in humanen Tumoren deletiert ist, kann die MDM2-Bindung an wtp53 nicht inhibiert werden (Lindstrom *et al.*, 2001).

Prinzipiell können entweder aktivierende Signale eliminiert werden (ARF), reprimierende Signale verstärkt werden (MDM2) oder Signale aktiviert werden, die der p53-Antwort auf einen onkogenen Stimulus entgegenwirken, wie z.B. die Aktivierung von anti-apoptotischen Faktoren wie Bcl-xL (Heinrichs and Deppert 2003). Es können aber auch Zellzyklus-Checkpunkte ausgeschaltet werden, über deren Aktivierung p53 einen Wachstumsarrest oder replikative Seneszenz einleiten könnte (z.B. durch Hochregulation von Zyklinen und/oder Cdks, Verlust oder Inaktivierung von pRb).

Darüber hinaus kann die wtp53-Funktion durch Kern-Ausschluss (z.B. in Neuroblastomen) (Moll *et al.*, 1995) oder durch Interaktion mit viralen Proteinen wie z.B. dem HPV16/18 E6 Protein in Zervix-Karzinomen unterdrückt sein (Crook *et al.*, 1992).

Die Vielzahl der in menschlichen Tumoren auftretenden *p53*-Mutationen und die Tatsache, dass diese Mutationen offensichtlich einem Selektionsvorteil unterliegen, deuten auf eine entscheidende Rolle von mutp53-Proteinen in der Tumorprogression hin.

1.2 Struktur des Tumorsuppressor-Proteins p53

Das Tumorsuppressor-Protein p53 wurde 1979 in SV40-transformierten Zellen als Komplex mit dem viralem T-Antigen entdeckt (Lane and Crawford 1979, Linzer *et al.*, 1979). Das humane wtp53-Protein besteht aus 393 Aminosäuren (murines p53 aus 390) und hat ein Molekulargewicht von 43,5 kDa. Durch eine Anhäufung von „helixbrechenden“ Prolin-Resten im N-Terminus wird in der SDS-PAGE ein aberrantes Laufverhalten bei 53 kDa beobachtet, welches dem Protein seinen Namen (Oren

1985) gab. Das humane 20 kb große *wtp53*-Gen, besteht aus 11 Exons und ist auf Chromosom 17p13 lokalisiert.

Wtp53 kann strukturell und aufgrund seiner verschiedenen biochemischen Funktionen in drei Bereiche unterteilt werden (Abb.1).

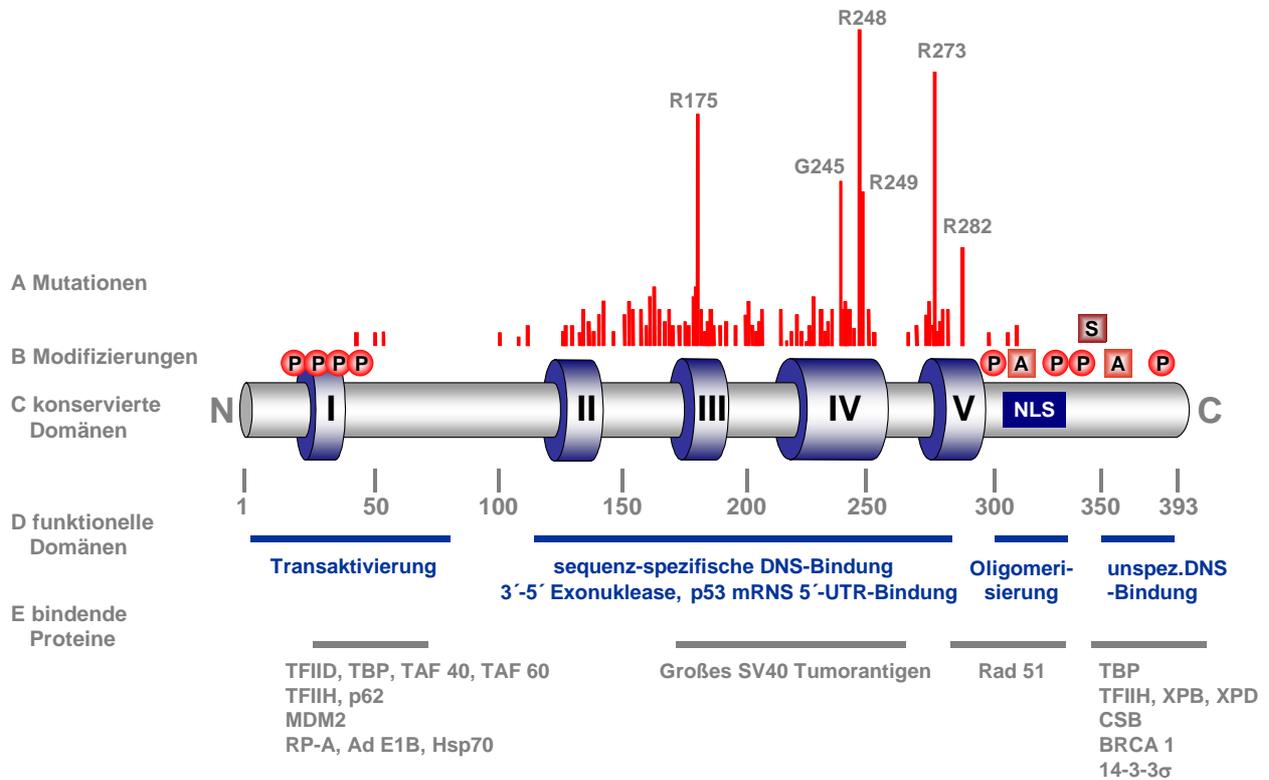


Abb. 1: Schematische Darstellung des Tumorsuppressors p53

(verändert nach: Albrechtsen, 1999)

A: Mutationen.

B: p53 wird am Amino- und am Carboxy-Terminus posttranslational modifiziert (P: Phosphorylierung, A: Acetylierung, S: Sumolylierung).

C: Vier der fünf konservierten Domänen befinden sich in der zentralen DNS-Bindungsdomäne.

D: p53 gliedert sich in drei Domänen, die verschiedene biochemische Eigenschaften aufweisen.

E: p53 interagiert mit einer Reihe von regulatorischen Proteinen.

In der aminoterminalen Region ist eine Transaktivierungs-Domäne (Aminosäuren 1-50) lokalisiert, die mit elementaren Transkriptionsfaktoren wie TFIID und TBP interagiert (Lu and Levine 1995) (Thut *et al.*, 1995). Bestimmte tumorigen wirkende p53-Proteine mit einer Mutation in der zentralen Domäne (wie z.B. an Aminosäure-Position 281) besitzen die Eigenschaft bestimmte Zielgene, wie z.B. MDR-1, über diese Domäne zu transaktivieren. Für die Transaktivierung sind zwei kritische Aminosäuren (Leucin 22 und Tryptophan 23) in p53 entscheidend (Lin *et al.*, 1994). *In vitro* erzeugte Tripel-Mutanten mit Mutationen innerhalb der Transaktivierungs-Domäne (Aminosäure-Positionen 22, 23) und der zentralen DNS-Bindungs-Domäne

(Aminosäure-Positionen 281) haben Transaktivierungs- und tumorigen wirkende Eigenschaften verloren (Lin *et al.*, 1995).

Die aminoterminal Domäne zeichnet sich weiterhin durch das gehäufte Vorkommen saurer Aminosäuren und durch verschiedene Phosphorylierungsstellen aus, die eine wichtige Rolle bei der p53-Stabilisierung spielen (Raycroft *et al.*, 1990) (Fields and Jang 1990).

Das bereits erwähnte zelluläre Onkoprotein MDM2 (Chen *et al.*, 1993, Brown *et al.*, 1993, Picksley *et al.*, 1994) bindet den aminoterminalen Bereich von p53 und inhibiert so dessen Transaktivierungs-Funktion (Oliner *et al.*, 1993, Momand *et al.*, 1992). Zusätzlich leitet MDM2 die proteolytische Degradierung von p53 über den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg ein (Haupt *et al.*, 1997) (Kubbutat *et al.*, 1997). Da auch die *mdm2* Transkription durch wtp53 initiiert wird (Wu *et al.*, 1993) (Perry *et al.*, 1993), resultiert daraus ein negativer Rückkopplungsmechanismus, der einen übermäßigen Anstieg der p53-Konzentration verhindert. Bestimmte mutp53 entgehen allerdings diesem negativen *feedback loop*, da MDM2 mit diesen Proteinen nicht mehr interagieren kann. So akkumuliert mutp53 zu hohen Konzentrationen (Buschmann *et al.*, 2000), (Haupt *et al.*, 1997), (Midgley and Lane 1997).

In der zentralen hydrophoben Region (Aminosäuren 102-292) ist die sequenzspezifische DNS-Bindungsdomäne lokalisiert. Die DNS-Bindungsdomäne enthält innerhalb der Vertebraten hochkonserviert Bereiche (Abschnitte II bis V) (Friedman *et al.*, 1993, el-Deiry *et al.*, 1992) Strukturell besteht diese Domäne aus zwei antiparallelen β -Faltblättern, die als Gerüst für zwei große Schleifen und für ein *loop-sheet-helix* Motiv dienen. Diese beiden Strukturen bilden die DNS-Kontaktfläche von p53 (Cho *et al.*, 1994). Neben der sequenzspezifischen DNS-Bindung ist auch die 3'-5' Exonukleaseaktivität in der Kerndomäne lokalisiert (Mummenbrauer *et al.*, 1996).

Mutationsanalysen humaner Tumore zeigen, dass Missense-Punktmutationen gehäuft als sogenannte Hot-Spots in der DNS-Bindungsdomäne auftreten (siehe: 1.5 Mutationen im Tumorsuppressor-Protein p53).

Die vorwiegend basische carboxyterminale Region vereint mehrere Funktionen:

- die Oligomerisierungs-Domäne von p53-Monomeren (Sturzbecher *et al.*, 1992),
- die nicht-sequenzspezifische DNS-Bindungsdomäne (Jeffrey *et al.*, 1995),
- drei Kernlokalisierungssignale (Shaulsky *et al.*, 1990), (Shaulsky *et al.*, 1991),
- eine Domäne zur Bindung an einzelsträngige DNS-Enden (Bakalkin *et al.*, 1995),
- und eine „Bindungs-Plattform“ für Proteininteraktionen (Ahn and Prives 2001).

1.3 Funktion des Tumorsuppressor-Proteins p53

Das wtp53-Protein zeichnet sich durch eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen aus, die dazu dienen, die genomische Stabilität zu erhalten, die Etablierung von Mutationen zu verhindern und dadurch einer Tumorentstehung und Tumorprogression entgegen zu wirken.

Im Normalzustand, d.h. in ungestressten Zellen, sorgt wtp53 für eine Aufrechterhaltung der genomischen Integrität, indem wtp53 direkt an der Reparatur von endogenen DNS-Schäden beteiligt ist, wobei es fehlerhafte DNS-Reparatur und fehlerhafte Replikation verhindert (Janus *et al.*, 1999). Über Protein-Protein-Interaktionen und über die 3'-5' Exonukleaseaktivität kann wtp53 DNS-Reparatur, -Rekombination und -Replikation entscheidend beeinflussen (Albrechtsen *et al.*, 1999), (Susse *et al.*, 2000), (Akyuz *et al.*, 2002), (Janz and Wiesmuller 2002), (Zink *et al.*, 2002).

Unterschiedliche Stress-Faktoren stabilisieren wtp53. Je nach Stimulus, Zelltyp und zellulärem Kontext werden durch wtp53 bestimmte Zielgene transkriptionell aktiviert oder reprimiert. Die Expression der Zielgene bewirkt einen Wachstumsarrest, um damit Reparaturprozesse zu ermöglichen, oder sie leitet den programmierten Zelltod, die Apoptose, ein.

Ein Wachstumsarrest kann sowohl am G₁- als auch am G₂/M-Kontrollpunkt des Zellzyklus erfolgen. Beide Signalwege sind eng mit der Funktion von p53 als Transkriptionsfaktor verknüpft.

G1-Arrest

Der G1-Arrest wird durch die p53 abhängige Transaktivierung des p21waf1-Gens vermittelt (el-Deiry *et al.*, 1993), (Waldman *et al.*, 1995), (Deng *et al.*, 1995), (Brugarolas *et al.*, 1995).

P21waf1 ist ein Inhibitor von Zyklin-abhängigen Kinasen (CDKs) (Harper *et al.*, 1993), (Dulic *et al.*, 1994), (Xiong *et al.*, 1993). Die Aktivität von Zyklin D-CDK4/6 und Zyklin E-CDK2 führt in der G1-Phase des Zellzyklus zur sequentiellen Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (Rb). Dadurch werden die von hypophosphoryliertem Rb gebundenen und sequestrierten Proteine der E2F-Familie freigesetzt und können Gene transaktivieren, deren Produkte die S-Phase einleiten. Die Inhibierung von Zyklin D-CDK4/6 und Zyklin E-CDK2 durch p21waf1 hält die für die G1-Phase des Zellzyklus charakteristische Hypophosphorylierung des Retinoblastomproteins Rb aufrecht. Dadurch bleibt das hypophosphorylierte Rb an dem Transkriptionsfaktor E2F gebunden und reprimiert dessen Aktivität (Dowdy *et al.*, 1993), (Ewen *et al.*, 1993), (Hinds *et al.*, 1992). Ohne den Transkriptionsfaktor E2F kommt es nicht zur Transkription der für den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase benötigten Gene und somit zu einem G1-Arrest. Im Verlauf dieses Zellzyklus-Arrests bleibt der Zelle Zeit, DNS-Schäden zu reparieren.

S-Phase Arrest

Die p53 abhängige Transaktivierung des p21^{waf1}-Gens führt in der S-Phase dazu, dass die DNS-Replikation gestoppt wird, indem p21 an das Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) bindet und dessen Aktivität inhibiert (Waga *et al.*, 1994). Während der DNS-Synthese lokalisieren PCNA und der Replikationsfaktor C (RFC) die Primer-DNS-Verbindung und rekrutieren die Polymerase δ , um die DNS-Elongation der Polymerase δ zu unterstützen (Melendy and Stillman 1991). Durch p21 Bindung werden PCNA und die DNS-Synthese inhibiert, während die Reparatur-DNS-Synthese durch die Polymerasen δ oder ϵ auch in Anwesenheit von p21 erfolgen kann (Li *et al.*, 1994).

G2-Arrest

Für die Induktion eines G2-Arrests durch p53 scheinen mehrere Mechanismen verantwortlich zu sein. Im Vordergrund steht vermutlich die Transaktivierung von 14-3-3 σ (Hermeking *et al.*, 1997). 14-3-3 σ komplexiert Zyklin B-CDK1 und sequestriert diesen Komplex im Zytoplasma. Dadurch wird die Aktivierung von Zyklin B-CDK1 unterbunden und die Zelle geht nicht in die Mitose. Die Phosphatase Cdc25C, die den Zyklin B-CDK1-Komplex aktiviert, wird gleichzeitig über einen anderen Signalweg inaktiviert (Peng *et al.*, 1997), (Chan *et al.*, 1999).

Zusätzlich scheint auch eine Beteiligung von p21^{waf1} möglich, indem p21 transient im Nukleus in der späten G2-Phase mit Zyklin A und B Komplexen assoziiert ist (Bunz *et al.*, 1998), (Dulic *et al.*, 1998), (Medema *et al.*, 1998), (Niculescu *et al.*, 1998). p21 inhibiert direkt die aktive Kinase oder verhindert die Aktivierung durch CAK (Cdk activating kinase) (Poon *et al.*, 1996). Die beobachtete Repression der Transkription von Zyklin B durch p53 könnte ebenfalls zur Induktion eines G2-Arrests beitragen (Innocente *et al.*, 1999). Daneben wird auch die Transaktivierung von Gadd45, dessen Genprodukt Zyklin B-CDK1 hemmt, diskutiert (Zhan *et al.*, 1999).

Apoptose

Bei irreparablen Schäden steht der Zelle ein Eliminierungs-Mechanismus zur Verfügung: der programmierte Zelltod (Apoptose) (Clarke *et al.*, 1993), (Lowe *et al.*, 1993) (Ryan *et al.*, 1993), (Shaw *et al.*, 1992), (Yonish-Rouach *et al.*, 1991). Die Apoptose-relevanten Zielgene lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Zu der ersten Gruppe gehören Genprodukte, die als Oberflächenrezeptoren Apoptose induzieren können. Die zweite Gruppe kodiert für Proteine, die auf der Ebene der Mitochondrien in die Signaltransduktion eingreifen.

Wtp53 transaktiviert das *death*-Rezeptor Gen *CD95/apo/fas* (Owen-Schaub *et al.*, 1995), während dieser Rezeptor von mutp53 reprimiert wird, so dass eine Apoptose

nicht eingeleitet werden kann (Oren, in press, *Oncogene* 2003; Mutant p53 represses CD95(Fas/APO-1) expression).

Die Apoptose wird auch über das Verhältnis des Apoptose induzierenden Proteins Bax und des reprimierenden Proteins Bcl2 gesteuert. p53 ist in der Lage, dieses Verhältnis über transkriptionelle Transaktivierung zugunsten von Bax zu verschieben (Miyashita and Reed 1995). Als pro-apoptotisches Protein der Bcl-2 Familie ist Bax dann in der Lage, die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien zu induzieren, was dann die Apoptose auslöst (Jurgensmeier *et al.*, 1998).

Zusätzlich zu der Transaktivierung von pro-apoptotischen Genen der Bcl-2 Familie spielt die Transrepression von Genen mit anti-apoptotischer Wirkung wie z.B. *bcl-2* durch p53 eine Rolle (Miyashita *et al.*, 1994).

1.4 Stabilisierung des Tumorsuppressor-Proteins p53

Das *wtp53*-Gen wird konstitutiv in Zellen eines Organismus in sehr geringer Konzentration exprimiert. In normal proliferierenden Zellen liegen nur 1000 bis 10.000 *wtp53*-Moleküle pro Zelle vor, deren Halbwertszeit – mitbeeinflusst durch die zuvor erläuterte MDM2-Regulation - lediglich 5 bis 20 Minuten beträgt.

Zur Einleitung von Wachstumsarrest oder Apoptose sind jedoch erheblich höhere *wtp53*-Konzentrationen notwendig. Dazu müssen die Zahl der *wtp53*-Proteinmoleküle und ihre verhältnismäßig kurze Halbwertszeit erhöht werden (Patschinsky and Deppert 1990), (Oren *et al.*, 1981).

Die Stabilisierung des *wtp53*-Proteins wird unter anderem über aminoterminaler Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen beeinflusst.

Unterschiedliche Formen von Stress aktivieren Signaltransduktionswege, die zur post-translationellen Modifizierung (Phosphorylierung und Acetylierung) und damit zur Stabilisierung und Akkumulation von *wtp53* im Nukleus führen (Maltzman and Czyzyk 1984). Dabei spielen zwei voneinander unabhängige Signalwege eine entscheidende Rolle. DNS-Schäden werden durch die Proteinkinasen ATM und CHK2 signalisiert (Bell *et al.*, 1999), während onkogener Stress durch das p53 stabilisierende Protein ARF vermittelt wird (Sherr 1998), (Prives and Hall 1999), (Sharpless and DePinho 1999) (Abb. 2).

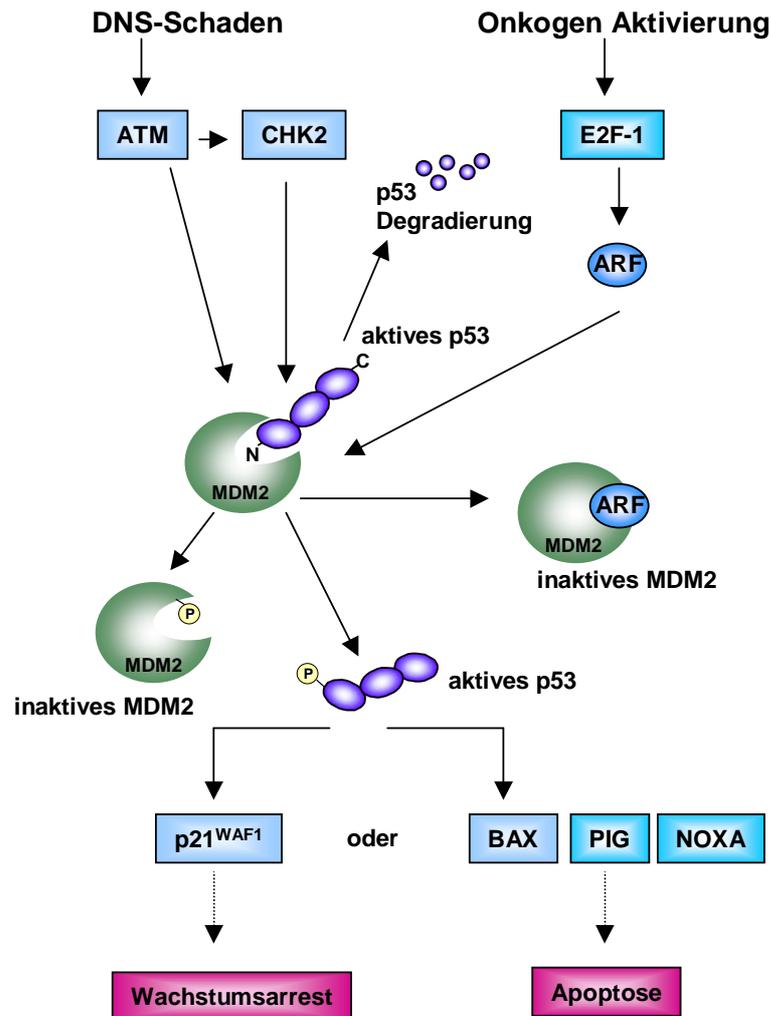


Abb.2: p53 Stabilisierung nach DNS-Schäden und Onkogenexpression

DNS-Schäden aktivieren die Proteinkinasen ATM und CHK2, die wiederum die Proteine MDM2 und p53 phosphorylieren. Die Phosphorylierung führt zur Auflösung des p53-MDM2-Komplexes, so dass p53 stabilisiert wird.

Oncogene aktivieren ARF, welches MDM2 durch Bindung funktionell inaktiviert.

Beide Signalwege führen zu einer p53-Stabilisierung, so dass p53 seine transkriptionelle Aktivität ausüben kann.

Eine Bindung von p53 durch MDM2 führt zur Ubiquitinierung von p53 und damit zur Degradierung des Proteins (nach Soussi 2001).

Ausgelöst durch DNS-Schäden, wie Doppelstrangbrüche, phosphorylieren ATM- (*a*taxia *t*elangiectasia *m*utated) und CHK2 (cell cycle *c*heckpoint *k*inase) Kinasen sowohl MDM2 als auch p53, so dass eine Interaktion der beiden Proteine verhindert wird. Dadurch wird die MDM2-vermittelte Degradierung und Transaktivierungshemmung von wtp53 unterbunden. p53 akkumuliert und ist verstärkt in der Lage, Zielgene zu transaktivieren.

Diese Phosphorylierung verstärkt zusätzlich eine Interaktion mit dem Transkriptions-Koaktivator p300. Man unterscheidet dabei drei verschiedene Stadien. Zuerst bindet p53 sequenzspezifisch an die DNS, was eine Konformationsänderungen hervorruft,

so dass p300 an die Aktivierungsdomäne von p53 bindet. Die DNS fungiert in diesem Fall als allosterischer Ligand für die p53 Acetylierung. Anschließend katalysiert p300 die DNS-Bindungs-abhängige Acetylierung von p53, welches im dritten Schritt den p300-p53 Komplex stabilisiert (Dornan *et al.*, 2003). Der Transkriptionsfaktor p53 rekrutiert p300 als Koaktivator mit einer Histon-Acetyl-Transferase (HAT) Aktivität, um die Histone H3 und H4 aminoterminal zu acetylieren. Diese Histon-Acetylierung schwächt die DNS-Histon-Bindung, so dass Promotorregionen für transkriptionsaktivierende Komplexe besser zugänglich werden (Liu *et al.*, in press 2003).

Onkogener Stress, d.h. die deregulierte Expression von Onkogenen wie *c-myc*, *ras*, *E1A* oder *β-catenin*, führt zu einer Induktion von ARF, welches an MDM2 bindet und dadurch die Ubiquitinierung sowie Degradierung von p53 verhindert. Gleichzeitig wird auf diese Weise p53 aktiviert (Bates *et al.*, 1998), (Stott *et al.*, 1998).

Neben der post-translationellen Stabilisierung nach Phosphorylierungen und Acetylierungen (Lutzker and Levine 1996), (Siegel *et al.*, 1995) kommt es nach DNS-Schädigung auch zum Ablösen des p53-Proteins von seiner autoregulatorisch-inhibierten mRNS. Dies führt zu einer vermehrten p53-Proteinbiosynthese (Mosner *et al.*, 1995).

Eine Stabilisierung von p53 kann darüber hinaus die Folge von Schäden am mitotischen Spindelapparat (Cross *et al.*, 1995), von Ribonukleotiddepletion (Linke *et al.*, 1996), Sauerstoffmangel (Graeber *et al.*, 1994), Hitzeschock (Ohnishi *et al.*, 1996), Stickoxidexposition (Forrester *et al.*, 1996), oder von Defekten in der DNS-Methylierung (Soussi and Beroud 2001) sein.

Die Differenzierung zwischen einzelnen Stress-Signalen ist bislang nicht geklärt. Je nach Zelltyp und Kontext der Stress-Induktion kommt es zu einem komplexen transkriptionellen Programm, welches zu einem p53-vermittelten Wachstumsarrest bzw. zur Apoptose führen kann.

Neben dem stress-induzierten Wachstumsarrest ist wtp53 auch in einem seneszenz-ähnlichen permanenten Wachstumsarrest, der durch verkürzte Telomere und damit ungeschützten Chromosomenenden entsteht, involviert (Serrano and Blasco 2001).

1.5 Mutationen im Tumorsuppressor-Protein p53

Datenbank-Analysen ergaben, dass mehr als 90% der Mutationen im *p53*-Genlokus Missense-Punktmutationen sind. Besonders auffällig ist das spezifische *p53*-Mutationsspektrum, das sich in einem gehäuften Vorkommen in ganz bestimmten Hot-Spot-Punktmutationen äußert. Sie liegen an Aminosäure-Positionen 175, 245, 248, 249, 273 und 282 (Abb. 1 und 3) (Hollstein *et al.*, 1991), (Levine *et al.*, 1991), (Hollstein *et al.*, 1994), (Cho *et al.*, 1994), (Deppert 1994), (Donehower and Bradley

1993). Diese Mutationen befinden sich hauptsächlich in der zentralen Domäne des *p53*-Moleküls und inaktivieren die *wtp53* sequenz-spezifische DNS-Bindungs- und Exonuklease-Aktivität.

Mutationen im *p53* führen nicht nur zu einer Inaktivierung der Tumor suppressierenden Eigenschaften von *wtp53*, sondern bestimmte Missense-Punktmutationen scheinen *mutp53* dominant-onkogene Eigenschaften mit einem Funktionszugewinn (*gain of function*) zu verleihen. Diese Missense-Punktmutationen führen zu einer Protein-Stabilisierung und zur intranuklearen *mutp53*-Akkumulation. Da diese Akkumulation von *mutp53* in Tumoren und häufig auch in Metastasen detektiert wird, geht man davon aus, dass die kontinuierliche Expression von *mutp53* entscheidend für die Tumorprogression ist.

Auf molekularer Basis sind die onkogenen Funktionen von *mutp53* noch wenig charakterisiert. Sie zeichnen sich phänotypisch durch eine erhöhte Tumorigenität und ein erhöhtes Metastasierungspotential der Tumore aus. Neben den transformierenden Eigenschaften von *mutp53* in Zellkultur-Experimenten gibt es eine Reihe weiterer Beobachtungen, die zeigen, dass zumindest bestimmte *mutp53*-Proteine eigenständige onkogene Eigenschaften haben. Diese lassen sich nicht durch einen dominant-negativen Effekt des überexprimierten *mutp53* gegenüber dem endogenen *wtp53* erklären (Kaczmarek *et al.*, 1986), (Eliyahu *et al.*, 1985), (Hinds *et al.*, 1989), (Milner and Medcalf 1991). Eine Überexpression von *mutp53* in *p53*-defizienten, schwach tumorigenen AMLV-transformierten murinen L12 Zellen führt zur Verstärkung der tumorigenen Eigenschaften (Shaulsky *et al.*, 1991). In *p53*-defizienten murinen Harnblasentumorzellen führt *mutp53* zu einem erhöhten metastatischen Potential (Pohl *et al.*, 1988). Verschiedene *mutp53*-Proteine erhöhen die Proliferationsrate und die Tumorigenität von *p53*-negativen humanen SAOS-2 Zellen (Dittmer *et al.*, 1993). Tumore mit *mutp53* zeigen häufig eine Resistenz gegen Strahlen- und Chemotherapie, was zum einen auf den Verlust der Fähigkeit von *wtp53* Apoptose nach massiver DNS-Schädigung einzuleiten zurückzuführen ist, zum anderen aber auch auf die von *mutp53* induzierte Resistenz dieser Tumorzellen gegen *p53*-unabhängige Apoptosewege (Matas *et al.*, 2001).

Durch Hetero-Oligomerisierung wirkt *mutp53* auf *wtp53* trans-dominant, bzw. dominant negativ, wodurch die tumorsupprimierende Funktion von *wtp53* ausgeschaltet wird. *Mutp53* interferiert so mit *p53*-abhängiger Apoptose, indem es durch Hetero-Oligomerisierung die *wtp53* spezifische Transaktivierung pro-apoptotischer Gene inhibiert (Milner and Medcalf 1991).

Andererseits kann *mutp53* auch durch Interaktion mit den *p53* homologen Proteinen *p63/p73* in die *p53*-unabhängige Apoptose und auch in zelluläre Differenzierungsprozesse eingreifen. Auch wenn noch kein direkter Beweis für die Interaktion existiert, zeigen Zellkultur-Daten, dass *mutp53* auf diesem Weg onkogene Funktionen

ausübt (Costanzo *et al.*, 2002), (Strano *et al.*, 2002). Während es erste Hinweise auf eine transkriptionelle Repression des Fas-Promotors durch mutp53 gibt, ist bereits gezeigt worden, dass Gene, die für Zell-Proliferation und die Tumorigenese von Bedeutung sind, spezifisch durch mutp53 transaktiviert werden (Matas *et al.*, 2001). Die Liste der durch mutp53 transaktivierten Gene wird ständig erweitert. Als Beispiele seien hier MDR1 (multi-drug resistance receptor 1), welches eine Resistenz gegen Chemotherapien mit Cisplatin, Etoposid, Doxorubizin hervorruft, c-myc, welches als aktiviertes Onkogen wirkt und PCNA, welches zur Zell-Proliferation führt, aufgeführt. Während für mutp53 bisher keine spezifische DNS-Erkennungssequenz identifiziert werden konnte, bleibt eine nicht-sequenz-spezifische DNS/RNS Bindung in mutp53-Proteinen ebenso erhalten (Steinmeyer and Deppert 1988), wie eine struktur-spezifische DNS-Bindung (Gohler *et al.*, 2002).

In Tumorzellen wurde eine Lokalisierung von mutp53 im Chromatin und an der Kernmatrix beobachtet (Zerrahn *et al.*, 1992). Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte mutp53-Proteine, im Gegensatz zu wtp53, mit MAR/SAR (S/MAR) DNS-Elementen interagieren (Deppert 1996), (Muller *et al.*, 1996), (Weissker *et al.*, 1992), (Will *et al.*, 1998), (Will *et al.*, 1998). S/MAR-Elemente sind mehrere hundert Basen bis mehrere Kilobasen lang und befinden sich in der Regel an den Grenzen von Transkriptionseinheiten und in der Nachbarschaft von Enhancer-ähnlichen regulatorischen Sequenzen (Boulikas 1995), (Bode *et al.*, 1995), (Bode *et al.* 1996). Ein wesentliches Sequenzmerkmal von S/MAR Elementen ist, dass sie repetitive DNS-Elemente enthalten, die in der Lage sind, non-B DNS-Strukturen auszubilden. *In vivo* Cross-linking und Chromatin- Immunpräzipitations- (ChIP) Experimente haben gezeigt, dass mutp53^{S245G} in Tumorzellen *in vivo* mit repetitiven DNS-Elementen, wie sie in S/MAR-Elementen enthalten sind, interagiert (Koga and Deppert 2000). S/MAR-Elementen wird eine regulatorische Rolle in der Transkription und der DNS-Replikation, insbesondere in der Kontrolle von Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen zugeschrieben (Berezney 1991), (Bode *et al.*, 1995), (Herbomel 1990), (Bode *et al.* 1996), (Boulikas *et al.*, 1995b), (Gasser *et al.*, 1987). Daher wird postuliert, dass aufgrund der hoch-affinen Interaktion von mutp53 mit S/MAR-Elementen eine Regulation der Expression von Genen, die für die Tumorprogression relevant sind, stattfindet (Deppert 1996). Dieser Mechanismus könnte die molekulare Basis des onkogenen Funktionsgewinns von mutp53 darstellen.

Abhängig vom experimentellen System (Ory *et al.*, 1994), (Deppert 1994), (Deppert 1996), (Muller *et al.*, 1996), und untersuchten Zelltyp (Forrester *et al.*, 1995) unterscheiden sich die mutp53-Proteine spezifisch in ihren biologischen Eigenschaften.

In humanen Tumoren zeichnet sich immer mehr eine Korrelation zwischen bestimmten mutp53-Proteinen und der Prognose für den Krankheitsverlauf ab. So scheinen Tumore mit bestimmten mutp53-Proteinen eine wesentlich höhere Tumorigenität und

damit eine deutlich schlechtere Prognose zu haben als andere (Goh *et al.*, 1995), (Aas *et al.*, 1996).

1.6 p53-Mutationen im humanen Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Tumorerkrankung bei Frauen in der westlichen Welt. In Deutschland erkranken jährlich 46000 Frauen am Mammakarzinom, 17000 sind unter 60 Jahre alt (Robert-Koch Institut, Deutsche Krebshilfe, 2003). In Europa und Nord-Amerika erkrankt jede vierte Frau an einem Mammakarzinom, während in China und Japan nur eine von 16 Frauen betroffen ist (Saitoh *et al.*, 1994), (Hartmann *et al.*, 1996). Die Ursachen für diesen Unterschied sind noch nicht bekannt. Trotz vermeintlich kurativer Resektion des Primärtumors kommt es bei vielen Krebspatientinnen im weiteren Verlauf zu einem metastatischen Tumorrezidiv in einem anderen Organ (z.B. Skelett 52%, Lunge 24%). Für eine erfolgreiche Bekämpfung des Mammakarzinoms wird deshalb neben der verbesserten Früherkennung, die Definition prognostischer Parameter auf molekularer Ebene von entscheidender Bedeutung sein, um eine dem Einzelfall besser angepasste Therapie anwenden zu können.

Zur Zeit werden zwei unterschiedliche Modelle zur Metastasierung von Mammakarzinomen diskutiert. Ausgehend von einer prä-neoplastischen Läsion im Mammarysenepithel entwickelt sich nach Ausschaltung von verschiedenen Regulationsmechanismen ein invasives Karzinom. In vielen Fällen entwickelt sich eine Hyperplasie oder ein sogenanntes *ductales Carcinoma in situ (DCIS)* zu einem invasiven, duktalem Karzinom mit metastatischen Absiedlungen. Die molekularen Grundlagen für dieses progressive Verhalten sind im Einzelnen noch nicht entschlüsselt.

Es wird angenommen, dass eine Reihe von zusätzlichen genetischen Veränderungen einigen Tumorzellen neue Eigenschaften verleihen, die es ihnen ermöglichen, sich vom Primärtumor abzulösen, in die Blutbahn einzudringen und in andere Organe zu metastasieren. Dabei scheinen auch Metastasierungs-Suppressorgene eine Rolle zu spielen, die erst nach ihrer Ausschaltung eine Metastasierung erlauben (Steeg *et al.*, 1988).

Eine andere Möglichkeit der Metastasierung wird durch neueste Genexpressionsanalysen aufgezeigt. Dieselben Gene (Onkogene), die zur Entwicklung eines Primärtumors führen, sind auch für die Metastasierung in andere Organe verantwortlich (Bernards and Weinberg 2002), (Golub 2003). Es handelt sich demnach nicht um eine Akkumulation genetischer Veränderungen, sondern um primäre genetische Veränderungen, die das Schicksal der Zelle von vornherein bestimmen. Auch Signale aus den späteren Metastasierungsorten beeinflussen die Ausbreitung der Tumor-

zellen (Ramaswamy *et al.*, 2003). So exprimieren beispielsweise Mammakarzinom-Zellen bestimmte Chemokin-Rezeptoren, deren Liganden in hoher Konzentration in der Lunge und den Lymphknoten vorhanden sind (Arenberg *et al.*, 2001).

Spontane humane Mammakarzinome zeigen in ca. 30% der Fälle Mutationen im Tumorsuppressor *p53* (Coles *et al.*, 1992). Auch beim Li-Fraumeni Syndrom, das sich durch Keimbahnmutationen von *p53* auszeichnet, treten Mammakarzinome gehäuft auf. *p53*-Mutationen scheinen ein unabhängiger prognostischer Marker für Mammakarzinom Patientinnen zu sein (Rahko *et al.*, 2003). Ebenso kann eine positive Korrelation zwischen *mutp53* und anderen prognostischen Faktoren wie hohes Grading, positiver Lymphknotenstatus und negativer Progesteron-Rezeptor-Status hergestellt werden (Overgaard *et al.*, 2000), (Ferrero *et al.*, 2000), (Turner *et al.*, 2000). Es wurde deutlich, dass *mutp53* mit einer schlechten Überlebensrate (Knoop *et al.*, 2001), (Turner *et al.*, 2000) und einer höheren Malignität korreliert (Overgaard *et al.*, 2000), (Berns *et al.*, 1996). Aufgrund statistischer Korrelationsanalysen scheinen bestimmte Mutationen im *p53*-Gen mit einer schlechteren Prognose des Mammakarzinoms zu korrelieren. Dabei gibt es Unterschiede zwischen einzelnen Punktmutationen (Hernandez-Boussard *et al.*, 1999). Mutations-Studien für das Mammakarzinom zeigen eine signifikante Abnahme der Überlebensrate in Abhängigkeit von bestimmten *p53*-Mutanten (Faille *et al.*, 1994), (Rosen *et al.*, 1995). Sie zeigen einen unterschiedlichen klinischen Verlauf (Overgaard *et al.*, 2000). Zusätzlich konnte für das Mammakarzinom gezeigt werden, dass die Expression bestimmter *mutp53*-Proteine (mutiert im Codon 248) mit einer Resistenz gegen Doxorubicin assoziiert ist (Aas *et al.*, 1996). Die Auswertung vergleichender Studien hat ergeben, dass *mutp53* mit einer geringen Überlebensrate einhergeht und als unabhängiger Risikofaktor gilt (Borresen-Dale 2003).

Das *p53*-Mutationsspektrum in Abb. 3 zeigt die Verteilung und die Häufigkeit der Mutationen im humanen *p53*-Protein für 10517 untersuchte, verschiedenartige Malignome und für 1157 analysierte Mammakarzinome. Auffällig sind dabei die drei Hot-Spot-Punktmutationen bei den Aminosäure-Positionen 248 (6,9%), 273 (6,1%) und 175 (4,9%) (Soussi, 1999). Die übrigen Mutationen sind zwar ebenfalls hauptsächlich in der DNS-Bindungsdomäne lokalisiert, kommen aber wesentlich seltener vor. Die Verteilung der Mutationen deutet auf einen Selektionsmechanismus mit Wachstumsvorteilen für bestimmte Mutationen hin.

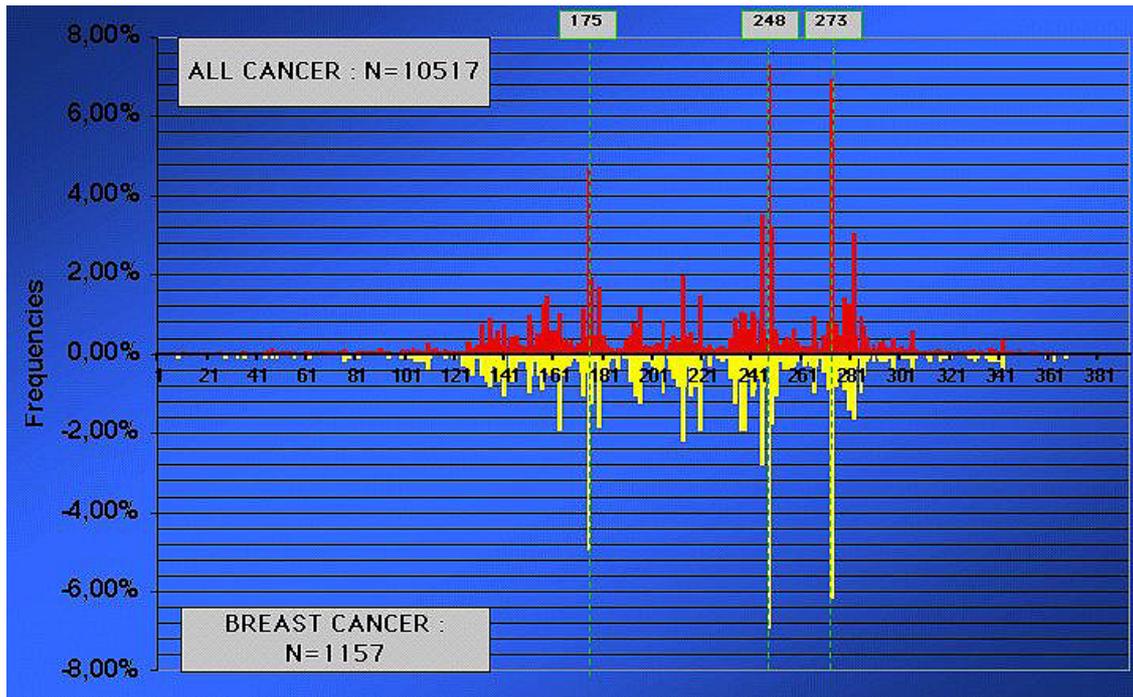


Abb. 3: *p53*-Mutationsspektrum in humanen Tumoren und im Mammakarzinom

Das *p53*-Mutationsspektrum im humanen Mammakarzinom (für 1157 Fälle) im Vergleich zu dem *p53*-Mutationsspektrum in allen Tumoren (für 10517 Fälle). Die Hot-Spot-Punktmutationen 248, 273, 175 sind in beiden Statistiken die häufigsten Mutationen (nach Soussi 2001).

Für das Mammakarzinom, wie aber auch für die meisten anderen Tumorarten, ist eine GC zu AT Transition im *p53* das mit über 90% vorherrschende Mutations-Ereignis. Diese Missense-Punktmutation führt für das Codon 175 zu einem Austausch der Aminosäure Arginin gegen Histidin (mutp53^{R175H}), für das Codon 248 zu einem Austausch der Aminosäure Arginin gegen Tryptophan (mutp53^{R248W}) und für das Codon 273 zu einem Austausch der Aminosäure Arginin gegen Histidin (mutp53^{R273H}).

Ein prognostisch signifikanter Unterschied zwischen den *p53*-Mutationen wird noch diskutiert. Mutationen, die die Zink-Bindung der L2 und der L3 Schlaufe (Codon 163-195 und 236-251) verändern, haben für Patientinnen die schlechteste Prognose (Borresen *et al.*, 1995). Dabei sind besonders Aminosäuren, die direkt die DNS binden und in der Zink-Bindungsdomäne lokalisiert sind (Abb. 4), mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert (Berns *et al.*, 2000).

Solche Hot-Spot-Punktmutationen zeigen einen sehr aggressiven Phänotyp, der sich in einer kurzen Überlebensrate der betroffenen Patienten äußert (Alsner *et al.*, 2000). Andere Gruppen konnten diese Beobachtungen nicht bestätigen, sondern zeigten, dass Mutationen, die zu einer Denaturierung der *p53*-Protein-Struktur führen mit einer wesentlich schlechteren Prognose assoziiert waren (Powell *et al.*, 2000).

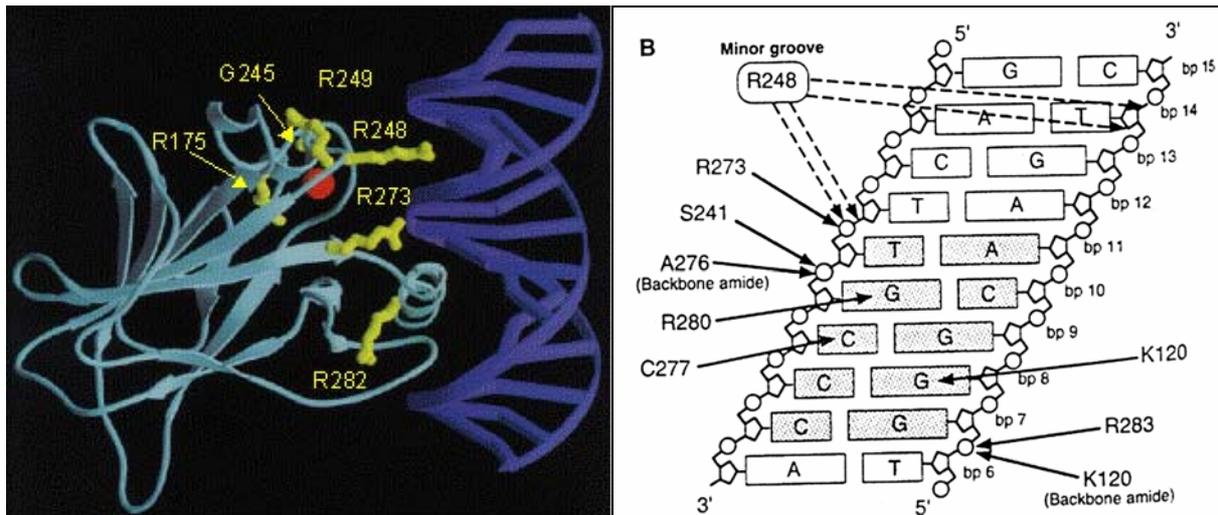


Abb. 4: p53-Kerndomäne im Komplex mit DNS-Doppelhelix

A: Die p53-Kerndomäne bindet an die DNS-Doppelhelix. Die Seitenketten von sechs Hot-Spot-Punktmutationen sind gelb, die Kerndomäne hellblau, das Zink-Atom rot und die DNS dunkelblau dargestellt.

B: Darstellung der an eine DNS-Konsensus-Sequenz bindenden p53-Aminosäuren. (Cho *et al.*, 1994)

1.7 mutp53 im Tiermodell

Die komplexen molekularen Ereignisse der Tumorprogression sind in Zellkulturmodellen schwer zu erfassen und entziehen sich deshalb bislang weitgehend einer kausalen Analyse. Untersuchungen an humanem Tumorgewebe können nur eine „Momentaufnahme“ darstellen und sind außerdem aufgrund der intrinsischen genetischen Heterogenität des Tumormaterials sowie aufgrund unterschiedlicher vorausgegangener Therapien, oftmals nur schwierig zu interpretieren. Ein zusätzliches Problem stellt häufig das nur begrenzt zur Verfügung stehende Gewebe-Material dar, was Limitierungen in Genom- und Proteomanalyse zur Folge hat.

Ein murines Modell bietet entscheidende Vorteile für die Analyse molekularer Prozesse der Tumorprogression. Im Gegensatz zu Zellkultur-Experimenten kann im Mausmodell der Prozess der Tumorprogression im Kontext des Gesamtorganismus sowie einzelne molekulare Ereignisse an jedem Punkt der Progression analysiert werden. Zudem können der komplexe Organ Aufbau und die Dynamik hormoneller und anderer physiologischer Funktionen nur in einem Tiermodell und nicht *in vitro* untersucht werden. Solche Modellsysteme basieren auf einem definierten genetischen Hintergrund der Tiere, so dass Proben und Daten zur Analyse der Tumorprogression homogen sind.

Voraussetzung für molekulare Analysen der kausalen Zusammenhänge humaner Erkrankungen im Mausmodell ist die Vergleichbarkeit beider Systeme. Eine solche

Vergleichbarkeit konnte vor kurzem in einem SV40 T-Antigen induzierbaren (*WAP-T*) transgenen, Mausmodell gezeigt werden (Schulze-Garg *et al.*, 2000). In diesem Modell tragen die Tiere als Transgen die frühe Genregion des SV40 Virus unter der Kontrolle des murinen *whey acidic protein (WAP)*-Promotors. Dieses 1600 Bp große, *Bgl*III – *Kpn*I Promotor-Fragment enthält die regulatorischen Elemente des murinen *whey acidic protein genes*. Dieser Promotor wird zum Ende der Schwangerschaft und während der Laktation in Mammaepithelzellen durch laktotrophe Hormone wie Prolaktin induziert und führt dadurch zur Expression des Transgens (Pittius *et al.*, 1988). Die frühe Region des SV40 Virus (2,7 Kb *Bgl*I-*Bam*HI DNS-Fragment) kodiert für zwei Proteine: das kleine t-Antigen und das große T-Antigen (Tooze, 1981). Durch die Expression von T-Antigen werden die Mammaepithelzellen transformiert, da T-Antigen sowohl wtp53 als auch pRb inaktiviert. Nach einer initialen Dysplasie entstehen im weiteren Verlauf der Tumorprogression Hyperplasien, *ductale Carcinoma in situ (DCIS)* und schließlich duktale Mammakarzinome. Histologische Untersuchungen zeigen, dass die Morphologie von humanen DCIS-Stadien denen muriner DCIS-Stadien gleicht, und beide Spezies die gleichen Wachstumsmuster zeigen. Diese Analogie in der Gewebsarchitektur könnte darauf hinweisen, dass sich molekulare Mechanismen für beide Konstellationen entsprechen.

Die dominant-onkogenen Eigenschaften von mutp53 wurden bislang hauptsächlich in Zellkultur-Experimenten analysiert, konnten aber auch in ersten *in vivo* Experimenten verifiziert werden. So besitzt eine „knock-in“ Mausmutante nach homologer Rekombination ein Allel, welches *mutp53^{R172H}* (die Mutation 172 Arginin zu Histidin, entsprechend der humanen Hot-Spot-Punktmutation 175 Arginin zu Histidin) trägt (Liu *et al.*, 2000). Untersuchungen zeigten, dass die Expression von *mutp53^{R172H}* in dieser Maus nicht äquivalent zur wtp53-Expression in einer heterozygoten p53 knockout Maus ist. Heterozygote transgene *mutp53^{R172H}* Mäuse unterschieden sich von heterozygoten p53+/- Mäusen sowohl im Tumorspektrum (mehr Karzinome, weniger Lymphome), vor allem aber auch darin, dass Osteosarkome und Karzinome mit hoher Frequenz metastasierten, während Metastasen aus Karzinomen von p53+/- Mäusen nur sehr selten hervorgehen.

Weiterhin wurde gezeigt, dass transgene *WAP-mutp53^{R172H}* (172 Arginin zu Histidin) Mäuse in einem p53+/+ FVB-Maushintergrund nach Induktion zwar spontan sehr selten Mammakarzinome entwickeln, aber nach chemisch Dimethylbenzanthrazen (DMBA) induzierter Kanzerogenese eine kürzere Latenzzeit für die Entstehung von Mammakarzinomen aufweisen als Wildtyp Mäuse (Li *et al.*, 1998). Diese Beobachtungen erlaubten allerdings keine Aussage darüber, ob die kürzere Latenzzeit auf ein onkogenes Potential von mutp53 zurückzuführen ist oder auf die dominant-negative Wirkung von mutp53 auf das in diesen Tumoren vorhandene Wildtyp p53.

1.8 Aufbau und Entwicklung von murinem Mammagewebe

Die Maus (*mus musculus*) besitzt 10 Brustdrüsen, wobei sich fünf auf jeder Seite befinden. Das erste zervikale Brustdrüsenpaar befindet sich in der Halsregion in der Nähe der *Parotis* (Ohrspeicheldrüse). Die beiden thorakalen Brustdrüsen überlappen auf der Höhe des Brustkorbs und werden durch den *M. pectoralis* getrennt. Das vierte und größte abdominale Brustdrüsenpaar liegt auf Höhe des Unterleibs und das fünfte inguinale Brustdrüsenpaar ist in der Leistenregion lokalisiert (Abb. 5).

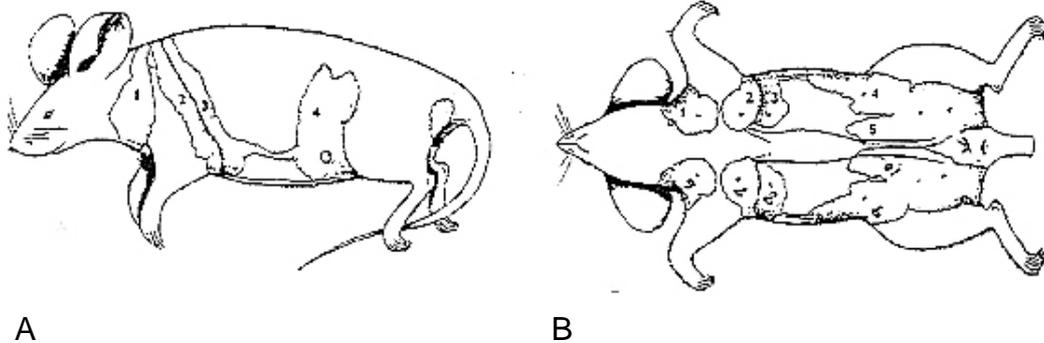


Abb. 5: Schematische Darstellung der Topographie muriner Mammae

<http://www.ncifcrf.gov/vetpath/lymph2.html>

Die weibliche Maus besitzt 10 Mammae, fünf auf jeder Seite.

Diagramm A: 1. linke zervikale Mamma, 2. linke thorakale Mamma, 3. rechte thorakale Mamma, 4. linke abdominale Mamma.

Diagramm B: 1. linke zervikale Mamma, 2. linke thorakale Mamma, 3. rechte thorakale Mamma, 4. linke abdominale Mamma, 5. linke inguinale Mamma, 6. rechte zervikale Mamma, 7. rechte thorakale Mamma, 8. rechte abdominale Mamma, 9. rechte inguinale Mamma, 10. linke inguinale Mamma.

Die Entwicklung des Mammagewebes und damit besonders des sekretorischen Drüsenepithels unterliegt während eines Lebens vielfältigen Umgestaltungen (Pupertät, ovarialer Zyklus, Parturition, Menopause).

Bei geschlechtsreifen Tieren bildet das glanduläre Mammagewebe in subkutanen Fettpolstern kollaterale und terminale Verzweigungen aus. Diese terminalen, duktulo-lobulären Einheiten (TDLU) sind von ringförmig angeordneter Basalmembran, Myoepithelzellen und Bindegewebsfasern umgeben und von einem einschichtigen Drüsenepithel ausgekleidet.

Während eines Östrus oder einer Schwangerschaft führen Hormone zur Proliferation der epithelialen Elemente. Prolaktin ist essentiell für das Wachstum und die funktionelle Differenzierung der Drüsen (Topper and Freeman 1980). Östrogen sowie Progesteron induzieren das Auswachsen der duktalem Gänge (Korach and McLachlan 1995) und die Bildung lobulärer, alveolärer Strukturen (Lydon *et al.*, 1995). Die Drüsenacini verdrängen die Fettzellen. Alveolares Wachstum findet ausschließlich an terminalen Endstücken (*end buds*) statt, die aus undifferenzierten Stammzellen bestehen.

Sofort nach Geburt folgt eine funktionelle Differenzierung des Drüsengewebes und eine zusätzliche alveolare Proliferation innerhalb der ersten Tage der Laktation. Dieser Prozess ist nach ca. drei bis vier Tagen abgeschlossen. Während der Laktation produzieren die sekretorischen Epithelzellen große Mengen an Milchtröpfchen, die ins Lumen abgegeben werden.

Nach dem Absetzen der Jungen und dem Ende des Säugens akkumuliert die Milch im alveolaren Lumen und der laktogene Hormonlevel sinkt. Eine gezielte Apoptose der Epithelzellen führt zur Involution des Drüsenparenchyms. Dieser Prozess läuft in zwei Phasen ab. Die erste akute und kurzfristige Phase ereignet sich innerhalb der ersten zwei bis drei Tage nach Absetzen der Jungtiere. Dabei wird die Hauptmasse des Drüsengewebes durch gezielte Apoptose abgebaut. Die vollständige Rückbildung des maternalen, sekretorischen Mammagewebes bis auf relativ wenige TDLU's zieht sich in der zweiten Phase über einen längeren Zeitraum von ca. zehn Tagen hin.

Die apoptotischen Zellen verlieren den Zell-Zell-Kontakt, das Chromatin kondensiert, der Nukleus wird fragmentiert und infiltrierende Makrophagen phagozytieren diese Zell-Fragmente. Dabei bleiben innerhalb des vorhandenen Drüsengewebes undifferenzierte, epitheliale Stammzellen zurück, um bei einer erneuten Schwangerschaft das Drüsengewebe wieder aufzubauen.

1.9 Problemstellung

Als längerfristiges Ziel dieses Projektes soll das postulierte onkogene Potential von spezifischen p53-Mutationen (*mutp53*) *in vivo* am Beispiel der Progression von Mammakarzinomen analysiert werden. Als eine Voraussetzung dafür sollten in dieser Arbeit induzierbare, transgene Mäuse generiert werden, die bestimmte humantypische Mutationen im p53-Gen spezifisch in Mammaepithelzellen exprimieren.

Für das Mammakarzinom wurde gezeigt, dass die Expression spezifischer *mutp53*-Proteine mit einer schlechteren Prognose und einer Resistenz gegenüber Chemotherapie korreliert (Hernandez-Boussard *et al.*, 1999), (Aas *et al.*, 1996), (Borresen-Dale 2003). Während korrelative Daten aus Tumordatenbanken (s. z.B. <http://www.iarc.fr/P53/index.html>), sowie Daten aus Zellkultur-Experimenten die These einer eigenständigen onkogenen Aktivität von *mutp53* stützen, steht ein experimenteller *in vivo* Beweis dafür noch aus. Um diese kausale Verknüpfung experimentell zu untermauern und um eine Basis für weitere Untersuchungen zu schaffen, sollten transgene Tiere hergestellt werden, die als Transgen ein mutiertes murines p53-Minigen mit den relevantesten humanen p53-Mutationen tragen. Außerdem sollte das Transgen gewebespezifisch und induzierbar in den Mammaepithelzellen exprimiert werden können.

Das Tiermodell sollte überdies die Tumorentstehung und -progression möglichst übereinstimmend mit der human pathologischen Situation reproduzieren. Aus diesem Grunde wurde eine Pronukleus-Injektion zur Transgen-Herstellung herangezogen, statt einer rekombinanten „knock in“-Methode, bei der ein endogenes *wtp53* durch ein *mutp53*-Allel ersetzt und dann konstitutiv exprimiert wird. Die Verwendung eines induzierbaren Promotors erlaubt es dem Organismus sich bis zur erstmaligen Induktion unbeeinflusst durch eine Transgen-Expression zu entwickeln. In etwa vergleichbar mit einer Spontanmutation beim Menschen, wird erst ab einem bestimmten Zeitpunkt (ab der Induktion) mutiertes p53 exprimiert.

Die auf diese Weise generierten transgenen Tiere sollten Missense-Punktmutationen innerhalb des murinen p53-Minigen enthalten, die äquivalent zu den bekannten Hot-Spot Missense-Punktmutationen beim Menschen sind. Diese Punktmutationen führen im humanen p53-Protein zu einem Aminosäure-Austausch von Arginin zu Histidin an Aminosäure-Position 175, von Arginin zu Tryptophan an Aminosäure-Position 248 und von Arginin zu Histidin an Aminosäure-Position 273. Die entsprechenden Aminosäure-Positionen befinden sich im murinen p53 aufgrund des aminoterminal um drei Aminosäuren verkürzten murinen p53-Proteins an den Positionen 172, 245 und 270 (humanes *mutp53*^{R175H} \triangleq murinem *mutp53*^{R172H}, humanes *mutp53*^{R248W} \triangleq murinem *mutp53*^{R245W}, humanes *mutp53*^{R273H} \triangleq murinem *mutp53*^{R270H}).

Anstelle des humanen p53-Gens wird, trotz großer Homologie beider Proteine, das murine p53-Gen verwendet, um nicht aufgrund einer artfremden Proteinspezies mög-

liche Interaktionspartner oder Wirkungsmechanismen in der Maus auszuschließen. Da auch Intronsequenzen die Expression regulieren können, hat in Tiermodellen die Verwendung eines *p53*-Minigens mit Exon-Intron-Struktur anstelle von *p53*-cDNS Konstrukten in einer effizienteren Transgen-Expression resultiert (Brinster *et al.*, 1988), (Lozano and Levine 1991).

Um die Tumorprogression organspezifisch in Mammakarzinomen analysieren zu können, sollte die Expression der transgenen *mutp53*-DNS durch den murinen *whey acidic protein* (*WAP*)-Promotor kontrolliert werden. Dieser Promotor führt nach Induktion durch laktotrophe Hormone im letzten Drittel der Schwangerschaft und während der Laktation zu einer gewebsspezifischen Transgen-Expression in sekretorischen Epithelzellen der Brustdrüse (Tzeng *et al.*, 1993).

Um bei der Phänotyp-Analyse das transgene *mutp53*-Protein von endogenem *wtp53* unterscheiden zu können, wurde ein Epitop des Hämagglutinin-Influenzavirus, ein neun Aminosäure langer HA-Tag, mit dem Carboxy-Terminus von *mutp53* fusioniert. Ziele dieser Arbeit waren die Herstellung der Transgen-Konstrukte, sowie der induzierbaren, transgenen Mausmutanten. In der anschließenden Charakterisierung der erhaltenen transgenen Linien mit den unterschiedlichen Mutationen im *p53* sollten die Transgen-Expression sowie mögliche morphologische Veränderungen untersucht werden.

Schließlich sollten geeignete *WAP-mutp53* Linien für weitere experimentelle Verwendungen zur Untersuchung des onkogenen Potentials von *mutp53* definiert werden.

2. Ergebnis

2.1 Konstruktion der *WAP-mutp53*-Transgen-DNS

Die potentiell onkogenen Eigenschaften von mutiertem p53 (*mutp53*) sollten in einem induzierbaren, transgenen Mausmodell untersucht werden. Hierfür wurden, wie im folgenden Abschnitt erläutert, entsprechende Transgen-Konstrukte hergestellt.

Zur Generierung der transgenen Tiere wurde ein murines *p53*-Minigen (4,03 Kb), das in den Vektor pLTRp53cGwt kloniert wurde (Eliyahu *et al.*, 1985), verwendet. Die Verwendung eines *p53*-Minigens mit Exon-Intron Struktur, anstelle von *p53*-cDNS Konstrukten, hat den Vorteil einer effizienteren p53-Transgen-Expression im Tier, da auch Intronsequenzen die Expression entscheidend beeinflussen können (Brinster *et al.*, 1988), (Lozano and Levine 1991). Daher wurde darauf verzichtet, ausschließlich cDNS für die Herstellung transgener Tiere zu verwenden. Das eingesetzte murine *p53*-Minigenkonstrukt enthielt DNS-Sequenzen aus muriner *p53*-cDNS ebenso wie aus muriner genomischer *p53*-DNS. Exon I, Intron 1 und Intron 10 waren nicht vorhanden (Abb. 6).

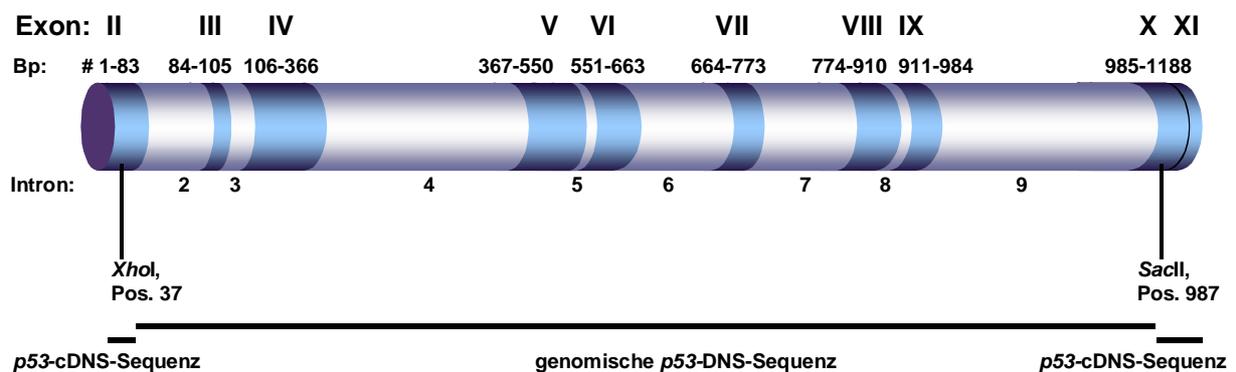


Abb. 6: Schematische Darstellung der verwendeten murinen *wtp53*-DNS

Die murine chimäre *p53*-DNS (4,026 Kb) ist aus cDNS und genomischer DNS zusammengesetzt.

p53-cDNS: *p53* Start A₁TG in Exon II bis zur *XhoI* Restriktionsschnittstelle an Nukleotidposition 37 in Exon II (37Bp).

p53-genomische DNS: von der *XhoI* (37) bis zur *SacII* Restriktionsschnittstelle an Nukleotidposition 897 in Exon X (3,788 Kb).

p53-cDNS: von der *SacII* (897) Restriktionsschnittstelle bis zur Nukleotidposition 1188 im 3'UTR (201 Bp); Stop-Codon befindet sich an Nukleotidpositionen 1171-1173 (TGA).

(*p53* Exon II – Exon XI, Intron 2 – Intron 9)

Die chimäre DNS begann mit einem murinen *p53*-cDNS-Abschnitt. Dieser erste cDNS-Abschnitt erstreckte sich von dem Start A₁TG an Nukleotidposition 1 in Exon II bis zur *XhoI* Restriktionsschnittstelle an Nukleotidposition 37. Die hier aufgeführten

Nukleotidpositionen beziehen sich auf die *p53*-cDNS bzw. die durchgängige Nummerierung der *p53*-Exons. Bei Position 37 folgte der cDNS genomische *p53*-DNS (3,7 Kb). Sie enthält die Exons II – X und Introns 2 – 9. Dieser genomische *p53*-Abschnitt endet an der *SacII* Restriktionsschnittstelle bei Nukleotidposition 987 in Exon X. Daran anschließend folgt wieder ein *p53*-cDNS Fragment, mit Exon X und Exon XI, bis zur Nukleotidposition 1188. Diese *wtp53*-DNS wurde über PCR-Mutagenese an bestimmten Positionen äquivalent zu humanen Hot-Spot-Punktmutationen mutiert. Die murinen Punktmutationen entsprechen humanen Hot-Spot-Punktmutationen wie folgt:

murines <i>mutp53</i> ^{R172H}	≙	humanes <i>p53</i> ^{R175H}	: Arginin gegen Histidin
murines <i>mutp53</i> ^{R245W}	≙	humanes <i>p53</i> ^{R248W}	: Arginin gegen Tryptophan
murines <i>mutp53</i> ^{R270H}	≙	humanes <i>p53</i> ^{R273H}	: Arginin gegen Histidin

Vor der Mutagenese wurde der HA-Tag carboxy-terminal eingefügt. Anschließend wurden die mutierten *p53*-Minigenkonstrukte unter die Kontrolle eines durch laktotrophe Hormone induzierbaren, murinen *whey acidic protein (WAP)*-Promotors kloniert.

2.1.1 Fusion von *wtp53* und HA-Tag durch PCR-Mutagenese

Zur Durchführung der Mutagenese wurde die chimäre *p53* DNS aufgrund ihrer Größe von 4,03 Kb in zwei Abschnitte (A: von Exon II bis Exon VI und B: von Exon VI bis Exon XI) über zwei PCR-Amplifizierungen unterteilt (Abb. 7).

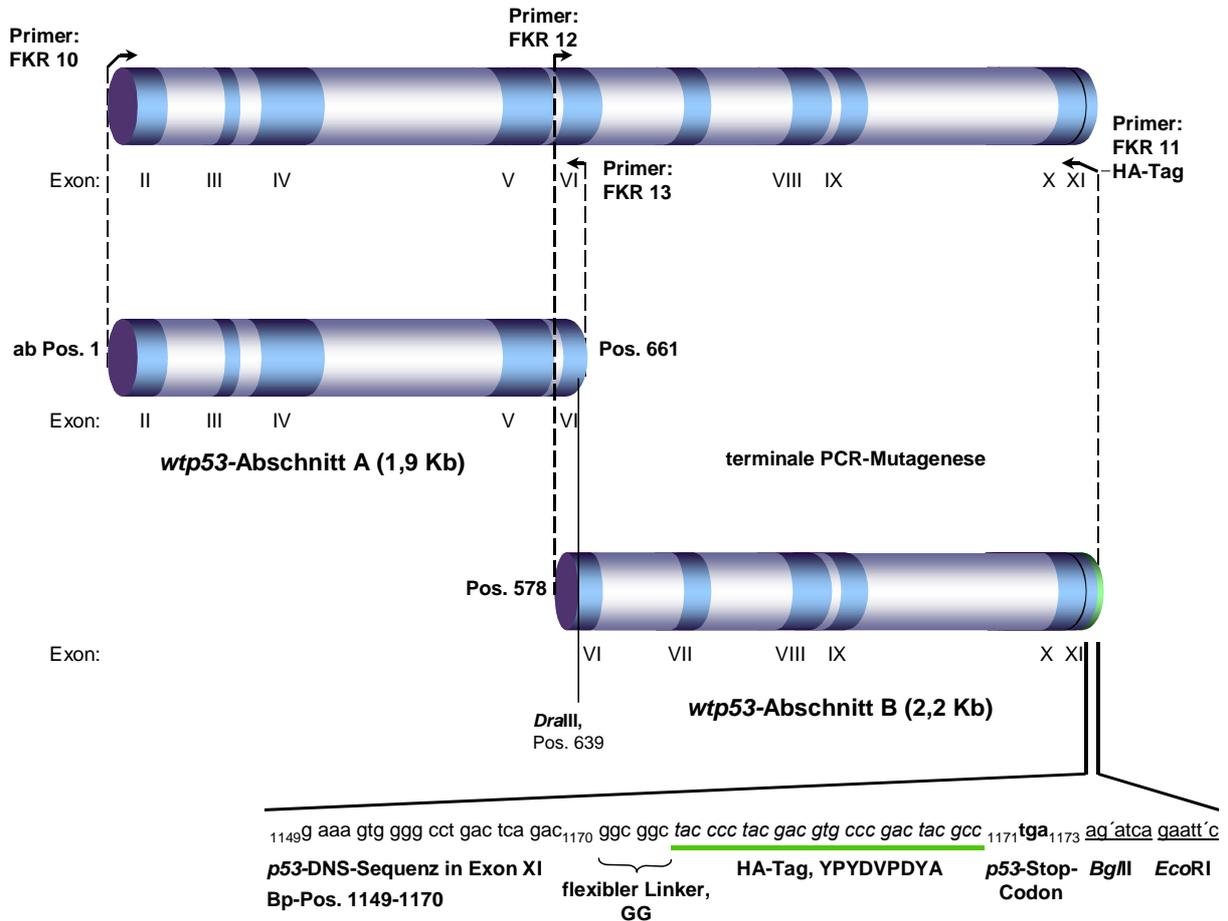


Abb. 7: Schematische Darstellung der *p53*-DNS-Teilkonstrukte

Abschnitt A: PCR-Produkt nach Amplifizierung der murinen *wtp53*-Sequenz aus pLTR*p53cGwt* mit den Primern FKR 10 (gct cag tag ccc ggg a, **tg** act gcc atg gag gag tca c₂₃) und FKR 13 (661c ggg tgg ctc ata agg tac cac c₆₃₉), die in *p53* Exon II und Exon VI binden.

Abschnitt B: PCR-Produkt nach Amplifizierung der murinen *wtp53*-Sequenz aus pLTR*p53cGwt* mit den Primern FKR 12 (578gg gtg gaa gga aat ttg tat ccc g₆₀₁) und FKR 11 (siehe Darstellung), die in *p53* Exon VI und Exon XI binden. Durch die terminale PCR-Mutagenese wird vor das *p53*-Stop-Codon (1171) ein flexibler Linker und der HA-Tag (siehe Darstellung) eingeführt.

Für beide Abschnitte wurde die murine, chimäre *p53*-DNS des Vektors pLTR*p53cGwt* als Matrize in einer PCR-Reaktion verwendet. In Abschnitt A war der vorwärtsgerichtete Primer (FKR10) komplementär zu dem 5' Terminus der *p53*-DNS

in Exon II mit einer vorausgehenden *Sma*I Restriktionsschnittstelle (gct cag tag ccc' ggg **a₁tg** act gcc atg gag gag tca c₂₃). Der rückwärtsgerichtete Primer (FKR13) war komplementär zu *p53*-Sequenzen in Exon VI (661c ggg tgg ctc ata agg tac cac c₆₃₉). Die Amplifizierung des Abschnittes B wurde mit einer terminalen PCR-Mutagenese zur Einführung eines *HA-Tags* kombiniert. Dieses neun Aminosäuren lange Epitop (YPYDVPDYA) eines Oberflächenproteins des Hämagglutinins des Influenza-Virus sollte zur Unterscheidung des mutierten *p53*-Transgens (*mutp53*) von endogenem Wildtyp *p53* (*wtp53*) dienen. Der HA-Tag wurde über einen 70 Bp langen rückwärtsgerichteten Primer (FKR11, Abb.5) eingeführt. Dieser Primer war komplementär zu *p53*-DNS-Sequenzen in Exon XI und darauffolgenden DNS-Sequenzen für zwei Glycine und dem HA-Tag. Die zwei Glycine zwischen *p53* und HA-Tag sollten die freie Beweglichkeit des C-Terminus erlauben. Für weitere Klonierungsschritte folgen auf das Stop-Codon eine *Bgl*II und eine *Eco*RI Restriktionsschnittstelle. Der vorwärtsgerichtete Primer (FKR12) zur Herstellung von Abschnitt B war komplementär zu *p53*-DNS Sequenzen in Exon VI (578gg gtg gaa gga aat ttg tat ccc g₆₀₁). Sowohl der amplifizierte Abschnitt A als auch der amplifizierte Abschnitt B wurden jeweils in die *Ava*I Restriktionsschnittstelle von pUC18 kloniert. Diese Plasmide wurden als pUC-*wtp53*-A und pUC-*wtp53*-B bezeichnet und enthielten die *wtp53*-DNS-Sequenzen mit der zusätzlichen DNS-Sequenz für einen HA-Tag am 3' Terminus von Abschnitt B.

2.1.2 Generierung von *mutp53*^{R245W} und *mutp53*^{R270H} Mutanten mittels *Unique-Site-Elimination*- (U.S.E.) Mutagenese von *wtp53*

Zwei der *p53*-Hot-Spot-Punktmutationen wurden mittels *unique-site-elimination*- (U.S.E.) Mutagenese (Deng and Nickoloff 1992) in pUC-*wtp53*-B (Exon VI-ExonXI, HA-Tag) eingeführt.

Die Mutagenese-Primer FKR17 (724ggc atg aac **TgG** cga cct atc c₇₄₅ im *p53* Exon VII) zur Herstellung von *mutp53*^{R245W} und FKR16 (797gc ttt gag gtt **cAt** gtt tgt gcc₈₁₉ im *p53* Exon VIII) zur Herstellung von *mutp53*^{R270H} wurden jeweils mit dem Selektionsprimer FKR18 (2192gac ttg gtt g a'cgcg ca cca gtc aca g₂₁₆₅ im pUC18) kombiniert. Der Selektionsprimer FKR18 eliminiert die *Scal* Restriktionsschnittstelle in pUC18 und ersetzt sie durch eine *Mlu*I Restriktionsschnittstelle, welche dann zur ersten Überprüfung einer erfolgreichen Mutation genutzt werden konnte.

Zur Erzeugung der Mutation an Aminosäure-Position 245 (Arginin zu Tryptophan) war der Austausch von zwei Nukleotiden nötig. Die Aminosäure Arginin 245 im murinen *p53*-Exon VII, welche durch das Codon CGC kodiert wird, kann aufgrund der „Degeneration“ des genetischen Codes durch insgesamt sechs unterschiedliche

Nukleotidtripletts repräsentiert werden (Khorana *et al.*, 1966). Dieses Codon ist äquivalent zu dem humanen *p53*-Codon CGG an der Aminosäure-Position 248, das ebenfalls für die Aminosäure Arginin kodiert. Die Hot-Spot-Punktmutation im humanen *p53* CGG → TGG resultiert in der Expression der Aminosäure Tryptophan. Tryptophan ist neben Methionin die einzige Aminosäure, die durch ein spezifisches Nukleotidtriplett repräsentiert wird. Um aus dem murinen Codon 245 CGC ein Codon zu generieren, das für die Aminosäure Tryptophan (*mutp53^{R245W}*) kodiert, sind zwei Punktmutationen an den Nukleotidpositionen 733 C → **T** und 735 C → **G** notwendig. Eine einzige Punktmutation an Nukleotidposition 733 von C → T würde in einen Austausch mit der Aminosäure Cystein resultieren (Abb. 8).

humanes <i>wtp53^{R248}</i>	→	humanes <i>mutp53^{R248W}</i>	murines <i>wtp53^{R245}</i>	→	murines <i>mutp53^{R245W}</i>
CGG		TGG	CGC		TGG
Arg		Trp	Arg		Trp
			CGC		TGC
			Arg		Cys

Abb. 8: Vergleich der humanen und murinen *p53*-DNS-Sequenz zur Einführung einer Hot-Spot-Punktmutation

Die Hot-Spot-Punktmutation CGG zu TGG im humanen *wtp53^{R248}* führt dazu, dass Arginin durch Tryptophan ersetzt wird. Im äquivalenten murinen *wtp53^{R245}* resultiert eine Punktmutation CGC zu TGC in der Aminosäure Cystein. Zwei Punktmutationen sind notwendig, um den äquivalenten Aminosäure-Austausch zu Tryptophan zu gewährleisten.

Die zweite U.S.E.-Mutagenese wurde durchgeführt, um an Nukleotidposition 809 in *p53*-Exon VIII über den Primer FKR16 die Punktmutation CGT → **CAT** einzufügen. Diese Transition führte zu einem Aminosäure-Austausch von Arginin zu Histidin an Aminosäure-Position 270 im murinen *p53* (*mutp53^{R270H}*). Dieser Austausch ist äquivalent zur humanen Hot-Spot-Punktmutation im *p53*-Codon 273, die ebenfalls zu einem Austausch von Arginin gegen Histidin führt.

Nach Einführung der Mutationen *mutp53^{R245W}* und *mutp53^{R270H}* über die U.S.E.-Mutagenese wurde der jeweils mutierte Abschnitt B wieder aus dem Plasmid herausgeschnitten und direkt hinter den Abschnitt A in pUC18 über die *DraIII* (Nukleotidposition 639 in *p53* Exon VI) und die *Sall* (in pUC18) Restriktionsschnittstellen kloniert, so dass schließlich zwei mutierte *p53* (*mutp53*) Minigenkonstrukte in voller Länge generiert wurden. Diese Plasmide wurden als pUC-*mutp53^{R245W}* und pUC-*mutp53^{R270H}* bezeichnet.

2.1.3 Einsatz der *Overlap-Extension-PCR*-Mutagenese zur Herstellung einer *mutp53^{R172H}* Mutante

Die Hot-Spot-Mutation, die zum Austausch der Aminosäure 172 Arginin zu Histidin führt, befindet sich in Exon V an Nukleotidposition 515 des murinen *p53*-Gens. Die für die vorherigen U.S.E.-Mutagenesen gewählte singuläre *Scal* Restriktionsschnittstelle konnte in diesem Fall nicht verwendet werden, da *Scal p53* an der Stelle 367 in Exon V schneidet, also in unmittelbarer Nähe der zu mutierenden Nukleotidposition 515. Zur Durchführung einer U.S.E.-Mutagenese muss eine singuläre Restriktionsschnittstelle verwendet werden, die demzufolge nur einmal in dem zu mutierenden Plasmid vorliegen darf. Dies konnte bei der vorherigen U.S.E.-Mutagenese durch Subklonierung der *p53*-DNS-Sequenz von Exon VI bis Exon XI umgangen werden. Aufgrund von fehlenden passenden singulären Restriktionsschnittstellen in dem murinen *p53*-Gen wurde anstelle der U.S.E.-Mutagenese eine *Overlap-Extension-PCR* zur Generierung dieser Mutation gewählt.

Für die *Overlap-Extension-PCR* wurde die chimäre *wtp53* DNS in voller Länge eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden die *p53*-Abschnitte A und B über die bereits beschriebene *Dralll* und *Sall* Klonierung in pUC18 wieder zu einem *wtp53*-Minigen in voller Länge zusammengefügt. Dieses *wtp53*-Minigen enthielt auch den bereits eingeführten terminalen HA-Tag am *p53*-3'-Terminus, um das spätere Transgen von endogenem *wtp53* in der transgenen Maus unterscheiden zu können. Der daraus resultierende Vektor wurde als pUC-*wtp53*-HA bezeichnet.

In der *Overlap-Extension-PCR* wurde pUC-*wtp53*-HA als Matrize eingesetzt und die Mutation an Nukleotidposition 515 durch den Primer FKR7 (501g gag gtc gtg aga cAc tgc ccc cac c₅₂₅) zur Erzeugung von *mutp53^{R172H}* eingeführt.

Sequenzierungen der Mutationsstelle und des *p53*-3' Terminus zeigten die erfolgreiche Einführung der Mutation an Nukleotidposition 515 (G → A) und des HA-Tags. Alle übrigen Sequenzen entsprachen wie erwartet der *wtp53*-DNS-Sequenz.

Bei der Klonierung des *mutp53^{R172H}* Minigenkonstruktes, das nach der *Overlap-Extension-PCR* als lineares, (sequenziertes) doppelsträngiges DNS-Fragment vorlag, ergaben sich erhebliche Schwierigkeiten. Weder eine direkte Klonierung des *mutp53^{R172H}* PCR-Produktes in ein *WAP*-Promotor tragendes Plasmid, noch eine Subklonierung in pUC18 konnten bisher erfolgreich durchgeführt werden.

Aus diesem Grund wurde, parallel zu weiteren Klonierungsversuchen des *mutp53^{R172H}* Minigens, mit der Herstellung der *WAP-mutp53^{R245W}* und *WAP-mutp53^{R270H}* transgenen Tiere begonnen.

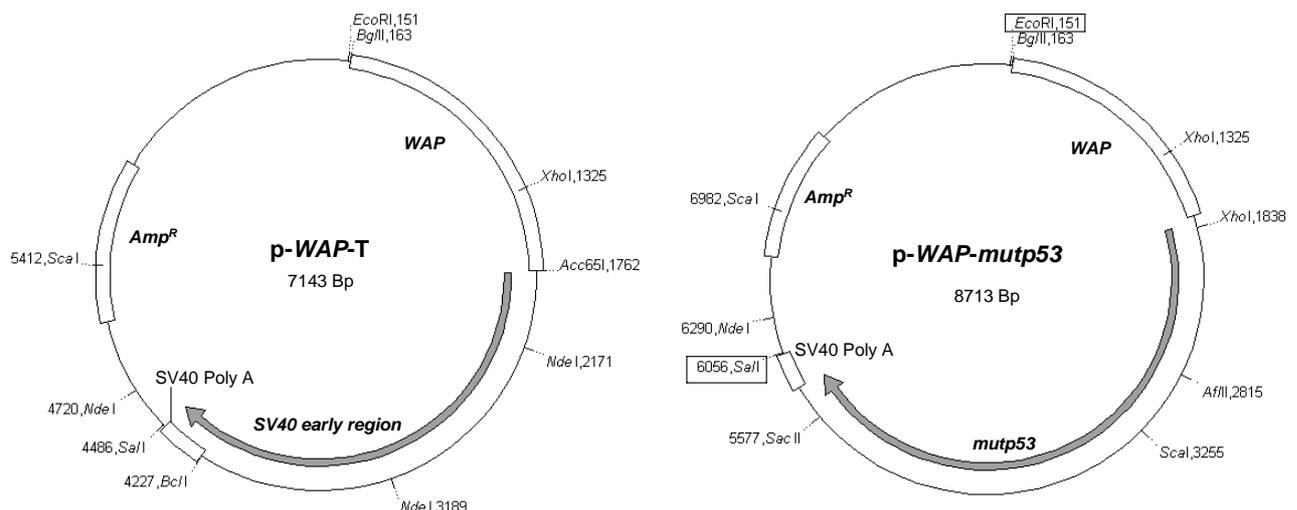
In der Zwischenzeit ist die von einer anderen Arbeitsgruppe generierte transgene Maus-Linie FVB *WAP-mutp53^{R172H}* (Li *et al.*, 1998) von uns erworben worden. Sie enthält ebenfalls ein murines *p53*-Minigenkonstrukt mit der gewünschten Mutation an Nukleotidposition 515 (G → A), welche in den Aminosäure-Austausch Arginin gegen

Histidin an Position 172 resultiert. Das Transgen befindet sich im Gegensatz zu den hier generierten Tieren nicht unter der Kontrolle eines murinen *WAP*-Promotors (GI: 1215721), sondern unter der Kontrolle eines *WAP*-Promotors aus *Rattus Norvegicus* (GI: X01153).

Der genetische Hintergrund eines Mausstammes ist für die Analyse bestimmter Krankheiten von entscheidender Bedeutung. BALB/c ist besonders anfällig für die Entwicklung von Mammakarzinomen (Kuperwasser *et al.*, 2000) und wurde deshalb als genetischer Hintergrund für die transgenen Mäuse gewählt. Da die *WAP-mutp53^{R172H}* transgene Maus als FVB-Stamm gezüchtet wurde, wird sie zur Zeit einen BALB/c -Hintergrund zurückgekreuzt, um mit den anderen transgenen BALB/c *WAP-mutp53* Tieren verglichen werden zu können.

2.1.4 Herstellung der *WAP-mutp53* Transgen-Konstrukte

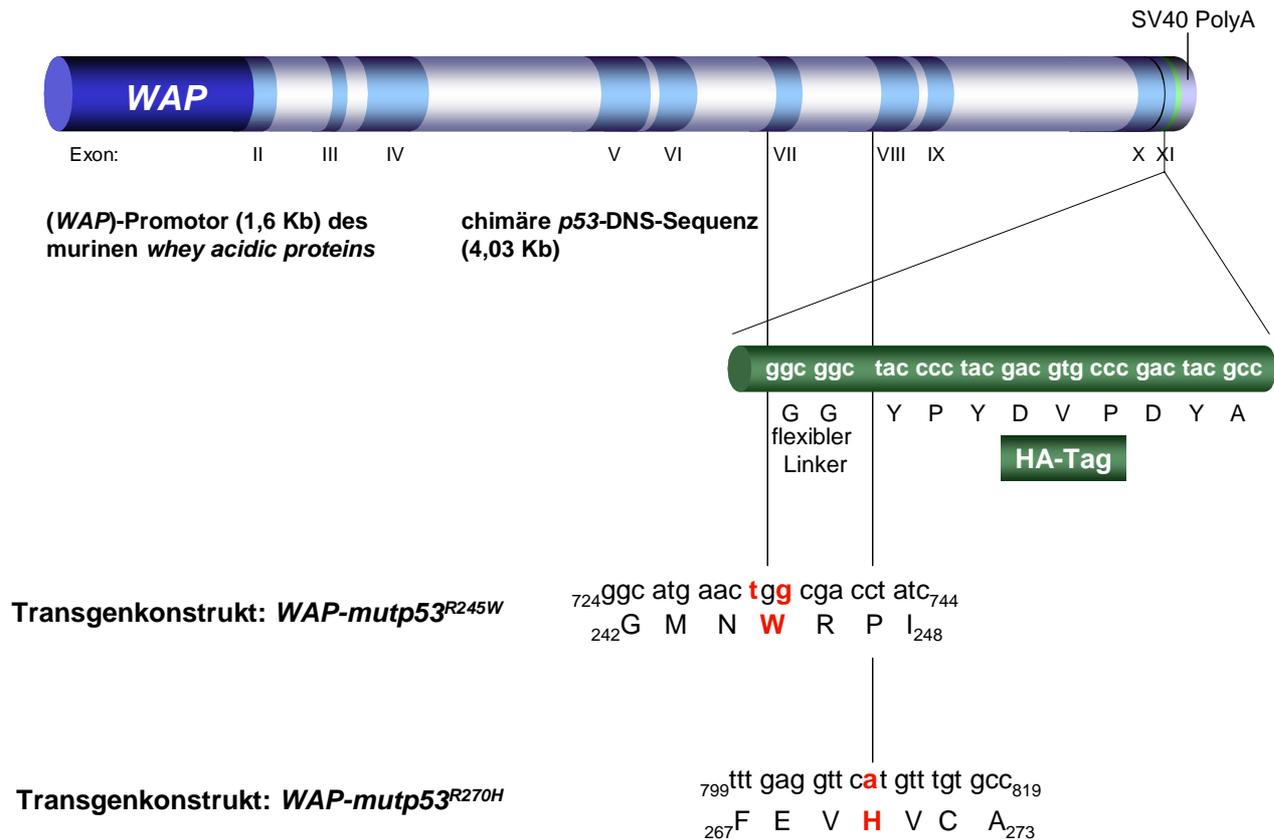
Als Ausgangskonstrukt für die Erzeugung der *WAP-mutp53* Transgen-Konstrukte diente das Plasmid pWAP-T. Dies enthält die frühe Genregion des SV40 Virus unter der Kontrolle des murinen *WAP*-Promotors. Die *WAP-mutp53* Transgen-Konstrukte wurden durch Austausch der frühen SV40 Genregion im pWAP-T (Tzeng *et al.*, 1993) mit den jeweiligen *mutp53* Minigenkonstrukten hergestellt (Abb.9).



A

Abb. 9 A: Plasmidkarte von *WAP-mutp53* Transgen-Konstrukten

A: pWAP-T enthält das 1,6 Kb DNS-Fragment des murinen *WAP*-Promotors (*BglII*₈₂₅ und *KpnI*₂₄₂₃) und die frühe SV40 Genregion (*BglII*₅₂₃₄ – *BamHI*₂₅₃₃, 2,7 Kb), kodierend für das große und für das kleine T-Antigen. Die SV40 Genregion (*Acc65I*₁₇₆₂–*BclI*₄₂₂₇) wurde in pWAP-T durch die *mutp53* Minigen-Konstrukte ersetzt. Daraus resultieren die pWAP-*mutp53* Vektoren, die jeweils die mutierten Transgen-Konstrukte mit C-terminalem HA-Tag enthalten. Sie sind in pUC18 kloniert und können durch *EcoRI*₁₅₁ und *SaI*₆₀₅₆ Restriktion für die Mikroinjektion präpariert werden.



B

Abb. 9 B: *WAP-mutp53* Transgen-Konstrukte

B: Die murinen *mutp53*-Minigenkonstrukte befinden sich unter der Kontrolle des murinen *whey acidic protein* (*WAP*)-Promotors, dem 1,6 Kb DNS-Fragment des *WAP*-Promotors (*Bgl*II₈₂₅ und *Kpn*I₂₄₂₃). Die *mutp53*-Minigene basieren auf der chimären *wtp53*-DNS (Exon II, Intron 2 – Intron 9, – Exon XI). Zur Unterscheidung von endogenem *wtp53* wurde ein HA-Tag (YPYDVPDYA) an das 3' Ende direkt vor das Stop-Codon fusioniert. Darauf folgt das SV40 Polyadenylierungssignal (*Bcl*I₂₇₆₉ – *Bam*HI₂₅₃₃, 0,24 Kb SV40 DNS-Fragment). Das *WAP-mutp53*^{R245W} Konstrukt enthält die Hot-Spot-Mutation 733 C zu T und 735 C zu G, wodurch Arginin 245 durch Tryptophan ersetzt wird. Das *WAP-mutp53*^{R270H} Konstrukt enthält die Hot-Spot-Mutation, Position 809 G zu A, wodurch Arginin 270 durch Histidin ausgetauscht wird.

Dafür geeignete Restriktionsenzyme waren *Eco*RI mit einer Restriktionsschnittstelle vor dem Start-Codon von *mutp53* und *Bgl*II mit einer Restriktionsschnittstelle hinter dem Stop-Codon von *mutp53*. Um diese Restriktionsschnittstellen nutzen zu können, musste in den pUC-*mutp53* Konstrukten erst eine zweite *Eco*RI Restriktionsschnittstelle hinter der *Bgl*II Restriktionsschnittstelle eliminiert werden. Dies geschah mittels PCR-Amplifizierung und einer Subklonierung in pUC18. Diese pUC-*mutp53*Δ*Eco*RI Plasmide wurden mit *Eco*RI an der noch in pUC18 enthaltenen *Eco*RI Restriktionsschnittstelle linearisiert. Die 5' überhängenden DNS Enden wurden mit Hilfe des Klenow-Fragments der Polymerase I aufgefüllt. Eine anschließende *Bgl*II Restriktion (a'gatct) ermöglichte eine gerichtete Klonierung in das pWAP-T Plasmid. Die frühe SV40 Genregion in diesem Plasmid wurde vorher durch *Acc*65I Restriktion, an-

schließender Auffüllung der Enden und folgender *Bcl*I Restriktion (t'gatct) eliminiert. Die durch *Bgl*II und *Bcl*I erzeugten überhängenden Enden sind kompatibel, so dass anschließend das *mutp53*-Minigen direkt in das pWAP Plasmid kloniert werden konnte. Die *mutp53*-Minigenkonstrukte wurden so hinter die regulatorischen Sequenzen des murinen WAP-Promotors kloniert. Die *Bcl*I Restriktionsschnittstelle befindet sich vor dem SV40 Polyadenylierungssignal in der frühen Genregion des SV40 (Position 2769 im SV40 Genom) im pWAP-T Plasmid (Abb. 9A). Durch dieses Polyadenylierungssignal konnte auch eine effiziente Expression dieses Transgens gewährleistet werden.

Die Plasmide, die die Transgen-Konstrukte enthalten, werden als pWAP-*mutp53*^{R245W} und pWAP-*mutp53*^{R270H} (Abb. 9A) bezeichnet.

Die dreimalige, bidirektionale Sequenzierung der WAP-*mutp53*^{R245W} und WAP-*mutp53*^{R270H} Konstrukte zeigte jeweils die gewünschte Mutation, den im Leserahmen befindlichen flexiblen Linker, sowie den HA-Tag direkt vor dem Stop-Codon, die anschließende SV40 Polyadenylierungsstelle, sowie die Ligationstelle zwischen *mutp53* und dem WAP-Promotor. Zusätzlich wurden alle übrigen Sequenzen als *p53*-Wildtyp-Sequenzen verifiziert, so dass diese Konstrukte der zu erwartenden Sequenz entsprechen und zur Generierung transgener Tiere genutzt werden konnten.

2.2 Erzeugung *WAP-mutp53* transgener Maus-Linien

WAP-mutp53 transgene Mäuse wurden durch Pronukleus-Mikroinjektion der *WAP-mutp53* DNS und anschließender Austragung dieser Embryonen von pseudoschwangeren Ammen generiert.

Für die Pronukleus-Injektion wurden die klonierten transgenen *WAP-mutp53* Minigenkonstrukte von ihrem bakteriellen Plasmid-Rückgrat getrennt, da Vektorsequenzen, insbesondere prokaryotische Promotorsequenzen die Expression von Transgenen beeinträchtigen.

Die *WAP-mutp53* Minigenkonstrukte (5,9 Kb) wurden durch *EcoRI* und *Sall* Restriktion von ihrem vektorialen Rückgrat (pUC18) getrennt (Abb. 10) und über Elektroelution und Affinitätschromatographie für die anschließende Mikroinjektion aufgereinigt.

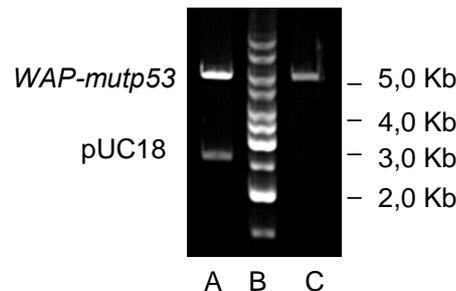


Abb. 10: p*WAP-mutp53* Restriktion für die Pronukleus-Mikroinjektion

0,7 % TAE-Agarosegelelektrophorese. Kontrollgel zur Überprüfung der *WAP-mutp53*-Fragment Aufreinigung.

A: Die *pWAP-mutp53* *EcoRI* und *Sall* Restriktion resultierte in einem 2,7 Kb großem pUC18 und einem 5,9 Kb großem *WAP-mutp53* DNS-Fragment (100 ng pro Agarosegeltasche).

B: 1 Kb DNS-Längenstandard, 500 ng.

C: 50 ng isoliertes, aufgereinigtes *WAP-mutp53* DNS-Fragment (5,9 Kb). Die fotometrische Messung ergab eine DNS-Konzentration von 50 ng/μl und einen Quotienten der OD_{260} / OD_{280} von 1,9.

Die linearisierte und isolierte transgene *WAP-mutp53* DNS wurde in einer Konzentration von 2,5 ng/μl für die Pronukleus-Injektion eingesetzt, wenn die Aufreinigung einem Quotienten OD_{260}/OD_{280} von mindestens 1,9 entsprach.

Parallel dazu wurden vier bis sechs Wochen alte CB6F1 Weibchen (aus einer BALB/c J x C57BL/6 J Zucht) als Zygotenspender für die Herstellung transgener Tiere vorbereitet. Die Superovulation dieser Weibchen wurde durch intraperitoneale Injektion der Hormone PMS und hCG eingeleitet. Nach Verpaarung mit fertilen CB6F1 Männchen wurden die CB6F2 Zygoten für die Mikroinjektion isoliert. Je nach Mikroinjektionsexperiment wurden aus fünf eingesetzten Zygotenspendern ca. 100 – 150 lebende Zygoten isoliert. Die isolierte *WAP-mutp53* DNS (2,5 ng/μl) wurde je-

weils in den männlichen Pronukleus der CB6F2 Zygoten mikroinjiziert. Vitale Embryonen (30-70), die die Mikroinjektion-Prozedur überlebt hatten, wurden im Zweizellstadium jeweils in Gruppen von ca. zweimal 10 Embryonen in die Ampullae der Ovidukte pseudoträchtiger Leihmütter implantiert.

21 Tage später wurden von jeweils einer Leihmutter bis zu acht Nachkommen geboren. Ab einem Alter von mindestens drei Wochen konnten diese Tiere auf die Integration des Transgens mit Hilfe von PCR-Analysen getestet werden.

2.3 Identifizierung *WAP-mutp53* transgener Maus-Linien

Nachkommen eines Mikroinjektions-Experimentes, die das Transgen enthalten, sind potentielle Ursprungstiere darauffolgender transgener Linien, aber erst wenn eine Keimbahnintegration durch Verpaarung dieser potentiellen Ursprungstiere bestätigt wird, liegt eine transgene Maus-Linie vor.

Die potentiellen Ursprungstiere wurden durch den Nachweis des Transgens über PCR-Analysen identifiziert. Dazu wurde genomische DNS aus Schwanzbiopsien aufgereinigt.

Die zur Identifizierung transgener Tiere verwendeten transgen-spezifischen Primer sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die Primerpaare sind so konstruiert, dass ein Primer spezifisch im Transgen, entweder im *WAP*-Promotor (*WAP*¹⁹⁵⁵) oder im HA-Tag (FKR4) und der zweite im Exon III, bzw. im Exon IX des *p53*-Gens (*p53EIII*, FKR 14) hybridisiert (Abb. 11).

Tabelle 1: Primer zur Identifizierung *WAP-mutp53* transgener Mäuse

Primer	Bp	Orien.	Org.	Beschreibung	Sequenz 5´ - 3´
<i>WAP</i> ¹⁹⁵⁵	23	⇒	Maus	muriner <i>WAP</i> -Promoter, Start bei Pos.: 1955	cca gga gaa gtc acc ctc aga tg
<i>p53EIII</i>	24	⇐	Maus	murines <i>p53</i> -Exon III; Pos.: 103-84 und 4 Nukleotide aus Intron 2	¹⁰³ g gat atc ttc tgg agg aag _{t84} ctgg
FKR14	24	⇒	Maus	murines <i>p53</i> -Exon IX; Pos.: 961 – 984	⁹⁶¹ gat gga gag tat ttc acc ctc aag ₉₈₄
FKR4	21	⇐	HA-Tag	letzten sechs Codons des HA-Tags (kodierend für Aminosäuren: AYDPVD)	ca ggc gta gtc ggg cac gtc g
<i>p53I9</i>	24	⇒	Maus	murines <i>p53</i> -Intron 9	gta agt gga gcc agc tta agt tgg
<i>p53EXI</i>	23	⇐	Maus	murines <i>p53</i> -Exon XI; Pos.: 1164 – 1142	¹¹⁶⁴ gtc agg ccc cac ttt ctt gac ca ₁₁₄₂

Bp.: Anzahl der Basenpaare des aufgeführten Primers.

Orien.: Orientierung des aufgeführten Primers, vorwärtsgerichteter Primer (⇒), rückwärtsgerichteter Primer (⇐).

Org.: Organismus, aus dem die DNS-Sequenz des aufgeführten Primers stammt.

Pos.: Nukleotidposition im murinen *p53* Gen (Eliyahou *et al.*, 1985).

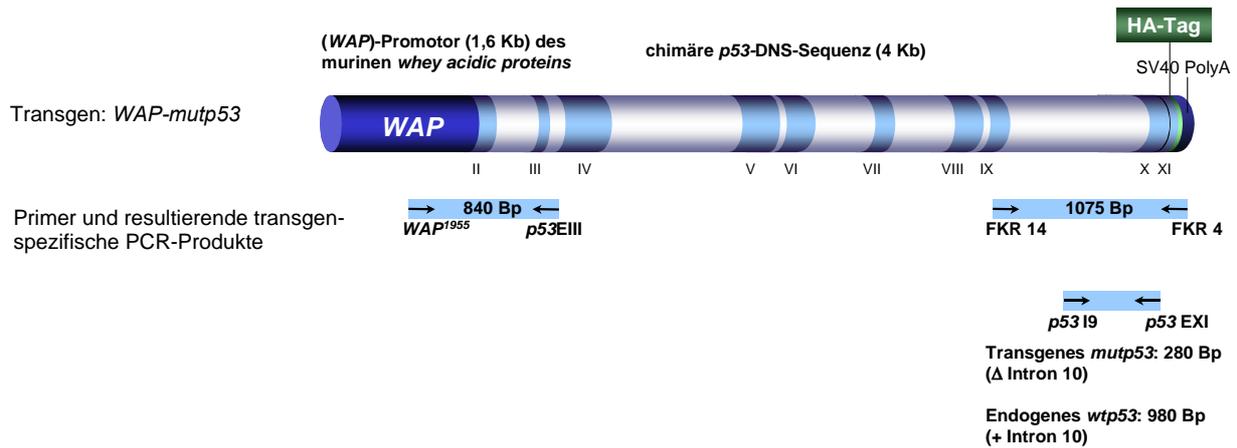


Abb. 11: Identifizierung transgener *WAP-mutp53* Tiere

Amplifizierung von DNS-Sequenzen zwischen transgen-spezifischen Primern, komplementär zum *WAP*-Promotor und *p53*-Exon III; zum HA-Tag und *p53*-Exon XI; sowie zu *p53*-Intron 9 und -Exon XI; führen zur Identifizierung transgener Tiere aus Schwanzbiopsien-DNS.

Abb. 12 zeigt das Ergebnis von drei unterschiedlichen PCR-Analysen genomischer DNS der Tiere 20-27 aus den ersten Mikroinjektionsexperimenten. Als Positiv-Kontrolle wurden für diese ersten Analysen 100 ng genomische BALB/c DNS mit 20 pg *pWAP-mutp53*^{R270H} in einem 50 μ l PCR-Ansatz eingesetzt.

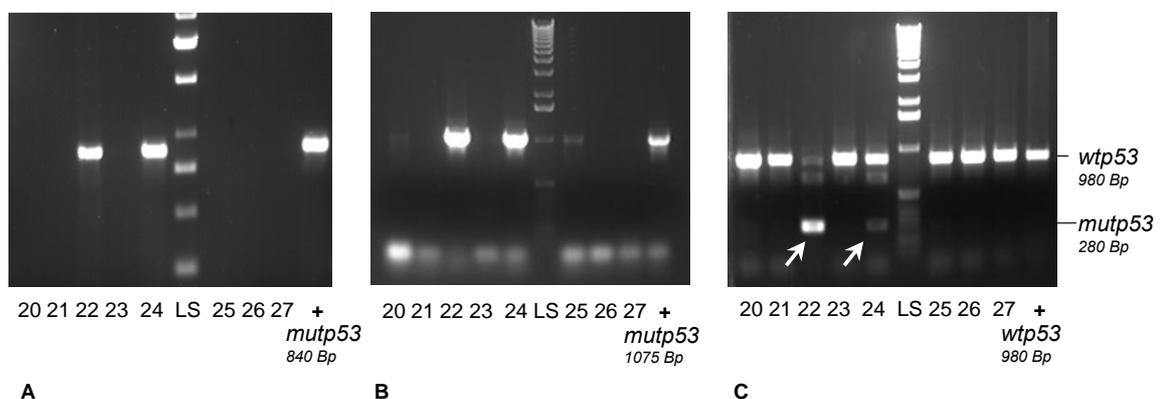


Abb. 12: PCR-Analyse potentiell *WAP-mutp53* transgener Tiere

1% TAE-Agarosegelelektrophorese, 10 μ l PCR-Amplifikat pro Geltasche.

A: PCR-Analyse der Biopsie-Proben # 20-27; Primer: WAP^{1955} und $p53EIII$; Positivkontrolle (+): 840 Bp Bande, 50 ng BALB/c DNS vermischt mit 20 pg *pWAP-mutp53* Plasmid-DNS; Proben 22 und 24 zeigen ebenso wie die Positivkontrolle (+) die transgen-spezifische 840 Bp Bande.

B: PCR-Analyse der Biopsie-Proben # 20-27; Primer: FKR 14 und FKR 4; Positivkontrolle (+): 1075 Bp Bande, 50 ng BALB/c DNS vermischt mit 20 pg *pWAP-mutp53* Plasmid-DNS; Proben 22 und 24 zeigen ebenso wie die Positivkontrolle (+) die transgen-spezifische 1075 Bp Bande.

C: PCR-Analyse der Biopsie-Proben # 20-27; Primer: $p53I9$ und $p53EXI$; Positivkontrolle für endogenes *wtp53* ohne transgenes *mutp53* (+): 980 Bp Bande, 50 ng BALB/c DNS; Proben 20 – 27 zeigen ebenso wie die Positivkontrolle (+) eine dem endogenen *wtp53* entsprechende 980 Bp Bande. Probe 22 zeigt zusätzlich sehr deutlich eine transgenspezifische 280 Bp, während bei Probe 24 diese transgen-spezifische 280 Bp Bande schwach zu sehen ist.

LS: 1 Kb DNS-Längenstandard.

Die Agarosegelelektrophorese zeigt deutlich für die Proben #22 und #24 transgen-spezifische PCR-Amplifikate, sowohl mit einem Primerpaar komplementär zum *WAP*-Promotor und *p53* (*WAP*¹⁹⁵⁵ – *p53EIII*; 840 Bp) (Abb. 12A), als auch mit einem Primerpaar komplementär zu *p53* und zum HA-Tag (FKR 14 – FKR 4; 1075 Bp) (Abb. 12B). Die transgen-spezifischen PCR-Amplifikate entsprechen der jeweiligen Positivkontrolle (50 ng BALB/c DNS vermischt mit 20 pg *pWAP-mutp53*^{R270H} Plasmid-DNS). Die dritte PCR mit einem Primerpaar komplementär zu *p53* (*p53I9* und *p53EXI*) diente der Qualitäts-Kontrolle der DNS-Aufreinigung, da jede Probe muriner genomischer DNS hier eine dem *wtp53*-Gen entsprechende Bande im Agarosegel zeigen sollte. Diese Primer binden sowohl im endogenen *wtp53* als auch im transgenen *mutp53*. Das PCR-Amplifikat erstreckt sich von Intron 9 bis Exon XI im murinen *p53*. Da Intron 10 im transgenen *mutp53* fehlt, wird zusätzlich in transgenen Tieren zur *wtp53*-Bande (980 Bp) ein um 700 Bp kleineres *mutp53* DNS-Fragment (280 Bp) amplifiziert. In Probe #22 fand sich ein deutliches und in Probe #24 ein schwaches Transgensignal (Abb. 12C). Wie sich nach Verpaarungen herausstellte, hatte von diesen zwei positiven Tieren nur #22 das Transgen in der Keimbahn integriert. Nach PCR-Identifizierung führten die ersten fünf durchgeführten Mikroinjektionen zur Generierung von sechs transgenen, potentiellen Ursprungstieren (Tabelle 2).

Tabelle 2 : Herstellung von *WAP-mutp53* transgenen Mäusen

Exp. #	% tg / Exp.	Transgen im Ursprungstier	Linien-Bezeichnung*	Keimbahn-Integration
1	0% (0/11)	<i>mutp53</i> ^{270H}	-	-
2	25% (2/8)	♂ <i>mutp53</i> ^{270H}	CB6-13	-
		♂ <i>mutp53</i> ^{270H}	CB6-14	-
3	6% (2/35)	♀ <i>mutp53</i> ^{270H}	CB6-22	+
		♂ <i>mutp53</i> ^{270H}	CB6-24	-
4	13% (1/8)	♂ <i>mutp53</i> ^{245W}	CB6-3	-
5	17% (1/6)	♀ <i>mutp53</i> ^{245W}	CB6-12	-

Exp. #: fortlaufende Nummer der Mikroinjektionsexperimente.

% tg / Exp.: prozentualer Anteil transgener Tiere in den Würfen.

♀

weibliches Ursprungstier.

♂

männliches Ursprungstier.

*

Bezeichnung transgener Linien, ausgehend von der fortlaufenden Nummerierung des transgenen Ursprungstieres.

Diese transgenen Linien sind chronologisch nach Mikroinjektions-Experimenten aufgelistet.

Die sechs transgenen, potentiellen Ursprungstiere wurden mit BALB/c Mäusen verpaart, um eine Keimbahnintegration nachzuweisen. Dabei konnten allerdings in fünf von sechs Fällen auch nach dreimaliger Verpaarung keine transgenen Nachkommen identifiziert werden, obwohl in den potentiellen Ursprungstieren mit unterschiedlichen transgen-spezifischen Primersets (komplementär zu *p53* Exon IX und zum HA-Tag,

bzw. zum *WAP*-Promotor und *p53* Exon III) *mutp53* DNS nachgewiesen werden konnte.

Als Ursache für die negativen PCR-Analysen der Keimbahn-Integations-Untersuchungen wurde zunächst eine schlechte Zugänglichkeit der transgenen DNS in der genomischen DNS vermutet, so dass die PCR zur Identifizierung der transgenen Tiere anhand der erhaltenen transgenen potentiellen Ursprungstiere optimiert wurde. Einerseits wurden verschiedene Aufreinigungsmethoden für genomische DNS getestet, wobei z.B. DNS-Aliquots vor jeder PCR ohne den PCR-Ansatz denaturiert wurden, um die Zugänglichkeit zu erhöhen. Außerdem wurden die Konzentrationen der genomischen Gesamt-DNS im PCR-Ansatz von 0,1 ng bis 500 ng variiert. Andererseits wurden unterschiedliche thermostabile DNS-Polymerasen mit verschiedenen Reaktionsansätzen, die in $MgCl_2$ -, DMSO-, dNTP- und Primer-Konzentrationen variieren, sowie Polymerase spezifische Verstärker der jeweiligen Herstellerfirmen, analysiert. Die Aufreinigungsmethoden, DNS-Konzentrationen und verschiedenen PCR-Ansätze wurden untereinander kombiniert und in verschiedenen PCR-Programmen analysiert. Innerhalb dieser Programme variierten die Hybridisierungs-Temperatur, Hybridisierungs- und Elongations-Zeit. Trotz dieser Optimierung konnte auch nach dreimaligen Würfen aus fünf der sechs transgenen, potentiellen Ursprungstiere kein transgenes Tier in der folgenden Generation identifiziert werden, so dass davon ausgegangen werden musste, dass hier keine Keimbahnintegration in den potentiellen Ursprungstieren stattgefunden hatte.

Die Verpaarung des transgenen *WAP-mutp53^{R270H}* Weibchens (CB6-22) mit wt BALB/c zeigte, dass dies Tier das Transgen in der Keimbahn integriert hatte, indem transgene Nachkommen durch PCR-Analysen identifiziert wurden. Weitere Verpaarungen mit BALB/c wt Tieren machten deutlich, dass das Transgen X-chromosomal vererbt wird, da alle Weibchen aus einer Verpaarung eines transgenen Männchens mit einem BALB/c wt Weibchen transgen waren, während bei einer Verpaarung von transgenen Weibchen mit BALB/c wt Männchen sowohl transgene Weibchen, als auch transgene Männchen entstanden.

Wegen der schlechten Keimbahn-Integration (Tabelle 2), wurden neue Mikroinjektions-Experimente mit den *WAP-mutp53^{R245W}* und *WAP-mutp53^{R270H}* Transgen-Konstrukten durchgeführt. Eine verbesserte Versuchsdurchführung führte schließlich zu transgenen Linien mit eindeutiger Keimbahn-Integration (Tabelle 3).

Tabelle 3 : Herstellung von WAP-*mutp53* transgenen Mäusen

Exp. #	% tg / Exp.	Transgen im Ursprungstier	Linien-Bezeichnung*	Keimbahn-Integration
6	5% (1/18)	♀ <i>mutp53</i> ^{245W}	CB6-4	+
7	6% (2/31)	♀ <i>mutp53</i> ^{270H}	CB6-5	+
		♀ <i>mutp53</i> ^{245W}	CB6-26	-
8	4% (1/26)	♀ <i>mutp53</i> ^{245W}	CB6-7	+
9	17% (5/29)	♂ <i>mutp53</i> ^{245W}	CB6-W1	+
		♂ <i>mutp53</i> ^{245W}	CB6-W2	+ Y-chromosomal vererbt
		♀ <i>mutp53</i> ^{245W}	CB6-W5	+
		♂ <i>mutp53</i> ^{245W}	CB6-W10	+
		♂ <i>mutp53</i> ^{245W}	CB6-W22	+
10	0% (0/16)	<i>mutp53</i> ^{245W}	-	-
11	0% (0/17)	<i>mutp53</i> ^{270H}	-	-
12	33% (5/15)	♀ <i>mutp53</i> ^{245W}	CB6-W4	-
		♀ <i>mutp53</i> ^{245W}	CB6-W8	+
		♀ <i>mutp53</i> ^{245W}	CB6-W11	+
		♀ <i>mutp53</i> ^{245W}	CB6-W12	+
		♀ <i>mutp53</i> ^{245W}	CB6-W15	+
13	13% (1/8)	♀ <i>mutp53</i> ^{270H}	CB6-H1	+
14	27% (3/11)	♂ <i>mutp53</i> ^{270H}	CB6-H2	+
		♀ <i>mutp53</i> ^{270H}	CB6-H3	+
		♀ <i>mutp53</i> ^{270H}	CB6-H10	+
15	22% (8/32)	♂ <i>mutp53</i> ^{270H}	CB6-H8	+
		♂ <i>mutp53</i> ^{270H}	CB6-H9	+
		♂ <i>mutp53</i> ^{270H}	CB6-H11	infertil
		♂ <i>mutp53</i> ^{270H}	CB6-H12	+
		♀ <i>mutp53</i> ^{270H}	CB6-H13	+
		♀ <i>mutp53</i> ^{270H}	CB6-H14	+
		♀ <i>mutp53</i> ^{270H}	CB6-H15	+
		♀ <i>mutp53</i> ^{270H}	CB6-H16	+

Exp. #: fortlaufende Nummer der Mikroinjektionsexperimente.

% tg / Exp.: prozentualer Anteil transgener Tiere in den Würfen.

♀

weibliches Ursprungstier.

♂

männliches Ursprungstier.

*

Bezeichnung transgener Linien, ausgehend von der fortlaufenden Nummerierung des transgenen Ursprungstieres.

Diese transgenen Linien sind chronologisch nach Mikroinjektions-Experimenten aufgelistet.

Wegen mangelnder Keimbahnintegrität oder Infertilität der Ursprungstiere können insgesamt vier (27%) von 15 WAP-*mutp53*^{R245W} und vier (24%) von 17 WAP-*mutp53*^{R270H} potentiellen, transgenen Linien das Transgen nicht weiter vererben (weil das Transgen entweder nicht in die Keimbahn integriert ist (z.B. CB6-13; CB6-14;

CB6-24; CB6-3; CB6-12; CB6-26; CB6-W4) oder weil das Ursprungstier infertil ist (CB6-H11).

Mehrmalige Verpaarungen des transgenen männlichen Ursprungstieres der Linie CB6-W2 (*WAP-mutp53^{R245W}*) weisen daraufhin, dass das Transgen im Y-Chromosom integriert sein muss, da alle männlichen Nachkommen transgen waren, aber kein Weibchen. Aus diesem Grunde ist diese Linie nicht für Untersuchungen von Mammakarzinomen geeignet.

Schließlich verbleiben 10 (66%) von 15 *WAP-mutp53^{R245W}* und 13 (76%) von 17 *WAP-mutp53^{R270H}* potentiellen, transgenen Linien für weitere Analysen.

Die Integration des kompletten *WAP-mutp53* Transgen-Konstruktes konnte mit Hilfe von PCR-Amplifizierungen gezeigt werden. Es wurden dafür Primer gewählt, die das gesamte *WAP-mutp53* Transgen-Konstrukt überspannen (Abb.11). Diese waren komplementär zum *WAP*-Promotor (*WAP¹⁹⁵⁵*) und zum HA-Tag (FKR 4). Abb. 13 zeigt exemplarisch das Ergebnis für die 13 *WAP-mutp53^{R270H}* transgenen Maus-Linien. Die 10 transgenen *WAP-mutp53^{R245W}* Maus-Linien hatten ebenfalls jeweils das Transgen in der gesamten Länge integriert.

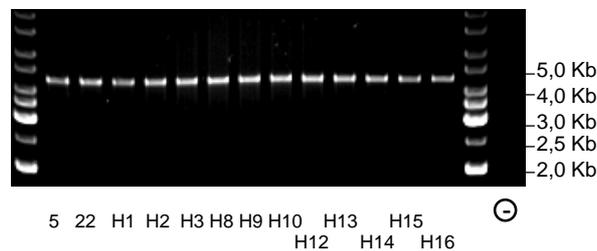


Abb. 13: PCR-Analyse *WAP-mutp53* transgener Tiere

1 % TAE-Agarosegelelektrophorese, 20 µl PCR-Amplifikat pro Geltasche.

PCR-Analyse der Biopsie-Proben *WAP-mutp53^{R270H}* transgener Maus-Linien (CB6-5, CB6-22, CB6-H1, CB6-H2, CB6-H3, CB6-H8, CB6-H9, CB6-H10, CB6-H12, CB6-H13, CB6-H14, CB6-H15, CB6-H16) Primer: *WAP¹⁹⁵⁵* und FKR 4. Jede der 13 Proben zeigt die erwartete 4,5 Kb Bande.

Auffällig erschien die unterschiedliche Wurfgröße der einzelnen Linien sowie die Häufigkeitsverteilung der Mutationen innerhalb der Würfe. Als Extrembeispiele können die Linien CB6-W1 und CB6-H1 aufgeführt werden. CB6-W1 Tiere generieren auffällig wenige transgene Weibchen. CB6-H1 Tiere hingegen haben sehr große Würfe mit vielen transgenen Tieren beider Geschlechter. Es wird zu untersuchen sein, ob diese Phänomene auf einen eventuell teratogenen Einfluss von spezifischen *mutp53*-Proteinen oder auf einen Positionseffekt zurückzuführen sind.

2.4 Charakterisierung *WAP-mutp53* transgener Maus-Linien

Auf der Ebene der Transkription wurde die Expression von transgenem *WAP-mutp53* mit einer Reversen Transkription und anschließender PCR (RT-PCR) sowie auf translationeller Ebene mit Hilfe der Immunhistochemie an Gewebeschnitten untersucht.

Das Transgen *WAP-mutp53* befindet sich unter der Kontrolle des *whey acidic protein (WAP)*-Promotors und sollte daher im letzten Drittel der Schwangerschaft (ab Tag 16) und während der Laktation durch Freisetzung laktotropher Hormone induziert werden.

Transgene Weibchen der ersten Nachkommengeneration (F1) der transgenen Ursprungstiere wurden durch Verpaarung aufgrund endogener laktotropher Hormone induziert. Am Tag 2-5 der Laktation, an dem das Transgen theoretisch vom *WAP*-Promotor exprimiert werden sollte, wurde das transgene Weibchen präpariert und die Jungen von einer Amme versorgt.

2.4.1 Transkriptions-Analysen *WAP-mutp53* transgener Maus-Linien

Die *mutp53*-Expression in 23 (10 *WAP-mutp53*^{R245W} und 13 *WAP-mutp53*^{R270H}) *mutp53* vererbenden transgenen Maus-Linien wurde zuerst über eine RT-PCR mittels exon-spezifischer, intron-überlappender *mutp53* spezifischer Primer untersucht. Dadurch konnte aufgrund der in der mRNA fehlenden Introns eindeutig zwischen genomischer DNS und cDNS unterschieden werden. Die Primer waren komplementär zu *p53* DNS-Sequenzen in Exon VI und zu *mutp53* DNS-Sequenzen im HA-Tag. Die RNS wurde aus jeweils 50 mg zervikalem, aus beiden thorakalen, dem abdominalen und dem inguinalen Mammagewebe sowie aus der Leber, der Niere, der Milz, der Lunge und dem Herzen isoliert.

Mit Hilfe einer Kontroll-PCR wurde die RNS-Aufreinigung und die Reverse-Transkription für jede Probe überprüft. Da *wtp53* konstitutiv in jedem Gewebe transkribiert wird, wurden Primer komplementär zu endogenem *wtp53* genutzt. Diese Primer waren komplementär zu *p53*-DNS-Sequenzen in Exon VI und *p53*-DNS-Sequenzen in Exon XI. Abb. 14 B zeigt exemplarisch die Analyse der transgenen Maus-Linie CB6-4. Die RT-PCR-Amplifikate wurden entsprechend des Ausgangsmaterials für die zervikale, beide thorakalen, die abdominale und inguinale Mamma, sowie für die Leber, Niere, Milz, Herz und Lunge im Agarosegel aufgetragen. Die Kontroll-PCRs zeigten für jede der untersuchten Proben in Höhe der erwarteten 586 Bp eine Bande. Diese Kontroll-Untersuchungen wurden ebenfalls für die weiteren 22 transgenen *WAP-mutp53* Maus-Linien durchgeführt. Sie zeigten ebenfalls für alle

untersuchten Proben in Höhe der zu erwartenden 586 Bp eine Bande, so dass die RNS-Präparation und die Reverse-Transkription positiv bestätigt werden konnte. Die entsprechenden Ergebnisse sind hier nicht dargestellt.

Die transgen-spezifische PCR gab Aufschluss über das Expressionsmuster von *mutp53* in verschiedenen Geweben der einzelnen transgenen Maus-Linien.

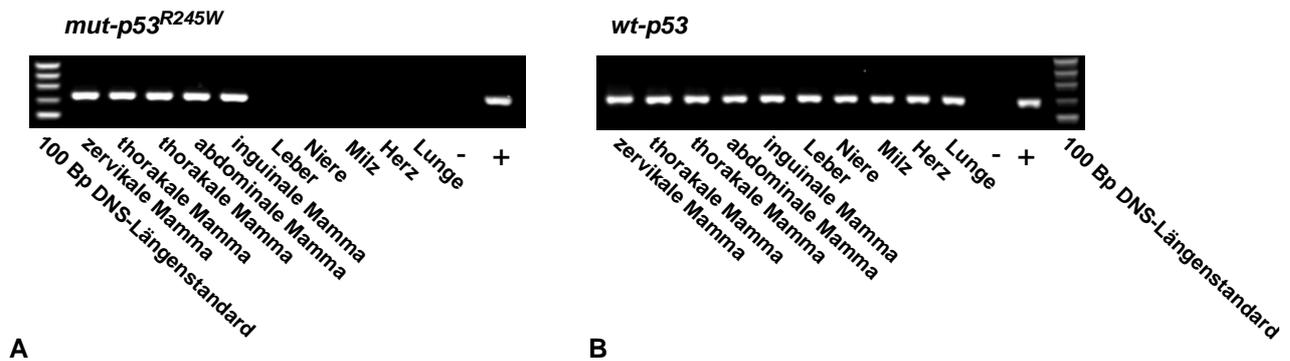


Abb. 14: RT-PCR-Analyse der *WAP-mutp53* transgenen Maus-Linie CB6-4

1% TAE-Agarosegelelektrophorese, 10 µl PCR-Amplifikat pro Geltasche

A: *mutp53* transgen-spezifische PCR, durchgeführt mit Primern komplementär zu *p53* Exon VI (FKR12) und zu *mutp53* im HA-Tag (FKR4). Spuren von links nach rechts: PCR-Amplifikate entsprechend dem Ausgangsmaterial für die zervikale, beide thorakalen, die abdominale und inguinale Mamma, sowie für die Leber, Niere, Milz, Herz, Lunge, Negativ-Kontrolle (Wasser statt cDNS), Positiv-Kontrolle (cDNS aus Mammagewebe einer *mutp53* exprimierenden Maus) 100 Bp DNS-Längenstandard (500 ng). 628 Bp Bande befindet sich ausschließlich in Präparationen aus Mammagewebe. Das Transgen wird spezifisch im Mammagewebe transkribiert.

B: Kontroll-PCR, durchgeführt mit Primern komplementär zu *p53* Exon VI (FKR12) und Exon XI (*p53EXI*). Spuren von links nach rechts: PCR-Amplifikate entsprechend dem Ausgangsmaterial für die zervikale, beide thorakalen, die abdominale und inguinale Mamma, sowie für die Leber, Niere, Milz, Herz, Lunge, Negativ-Kontrolle (Wasser statt cDNS), Positiv-Kontrolle (cDNS einer *wtp53* BALB/c Maus) 100 Bp DNS-Längenstandard (500 ng). Erwartete 586 Bp Bande in allen Spuren, bis auf die Negativ-Kontrolle.

Das Ergebnis der *mutp53*-spezifischen RT-PCR ist in Abb. 14 A exemplarisch für die transgene Maus-Linie CB6-4 dargestellt. Hier konnte eindeutig gezeigt werden, dass *mutp53* in der transgenen Maus-Linie CB6-4 spezifisch im Mammagewebe exprimiert wird. RNS aus der zervikalen, beiden thorakalen, der abdominalen und inguinalen Mamma zeigen eindeutig eine transgen spezifische Bande der erwarteten Höhe 628 Bp. Die untersuchten Proben für die Leber, Niere, Milz, Herz und Lunge zeigten kein Signal in dieser *mutp53* spezifischen PCR. Da dies Material bereits in der Kontroll-PCR überprüft wurde, ist ein Fehler während der RNS-Präparation oder der Reversen Transkription auszuschließen. Das Transgen *mutp53* wurde in der Linie CB6-4 spezifisch im Mammagewebe und nicht in anderem getesteten Gewebe exprimiert.

Transgene Weibchen der ersten Nachkommengenerationen der jeweiligen 23 transgenen Linien wurden induziert und auf transkriptioneller Ebene über RT-PCR analysiert. Tabelle 4 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 4: Transkriptions-Analyse von *WAP-mutp53* transgenen Mäusen

transgene Linie	Transgen	transgen spezifisches RT-PCR Ergebnis
CB6-4	mutp53 ^{245W}	pos. in 1-4
CB6-7	mutp53 ^{245W}	neg. in 1-9
CB6-W1	mutp53 ^{245W}	pos. in 1-4, schwach pos. in 6
CB6-W5	mutp53 ^{245W}	pos. in 1-9
CB6-W8	mutp53 ^{245W}	neg. in 1-9
CB6-W10	mutp53 ^{245W}	pos. in 1-4, schwach pos. in 8
CB6-W11	mutp53 ^{245W}	schwach pos. in 1-4
CB6-W12	mutp53 ^{245W}	pos. in 1-4, schwach pos. in 6, 8
CB6-W15	mutp53 ^{245W}	pos. in 1-4
CB6-W22	mutp53 ^{245W}	neg. in 1-9
CB6-5	mutp53 ^{270H}	neg. in 1-9
CB6-22	mutp53 ^{270H}	sehr schwach pos. in 1-4
CB6-H1	mutp53 ^{270H}	neg. in 1-9
CB6-H2	mutp53 ^{270H}	pos. in 1-4
CB6-H3	mutp53 ^{270H}	pos. in 1-4
CB6-H8	mutp53 ^{270H}	pos. in 1-4
CB6-H9	mutp53 ^{270H}	pos. in 1-4
CB6-H10	mutp53 ^{270H}	neg. in 1-9
CB6-H12	mutp53 ^{270H}	pos. in 1-4, schwach pos. in 6
CB6-H13	mutp53 ^{270H}	neg. in 1-9
CB6-H14	mutp53 ^{270H}	neg. in 1-9
CB6-H15	mutp53 ^{270H}	pos. in 1-4
CB6-H16	mutp53 ^{270H}	sehr schwach pos. in 1-4

Diese *WAP-mutp53* transgenen Linien sind nach Mutation und fortlaufender Nummerierung sortiert.

Zahlen 1-9 in Tabelle 4 (Spalte: transgen spezifisches RT-PCR Ergebnis) beziehen sich auf folgende Gewebe von transgenen, induzierten F1-Weibchen:

- | | |
|--------------------|----------|
| 1: Mamma zervikal | 6: Niere |
| 2: Mamma thorakal | 7: Milz |
| 3: Mamma abdominal | 8: Herz |
| 4: Mamma inguinal | 9: Lunge |
| 5: Leber | |

Nach dieser Analyse ergeben sich vier Kategorien. Einerseits existieren zehn transgene Maus-Linien, die das Transgen spezifisch im Mammagewebe exprimieren (CB6-4, CB6-W15, CB6-W11, CB6-22, CB6-H2, CB6-H3, CB6-H8, CB6-H9, CB6-

H15, CB6-H16), während vier transgene Linien das Transgen zwar spezifisch im Mammagewebe exprimieren, aber zusätzlich eine schwache Expression im Herzen (CB6-W10, CB6-W12) und in der Niere (CB6-W1, CB6-W12, CB6-H12) zeigen. Andererseits existieren acht transgene Linien, die das Transgen in keinem der getesteten Geweben exprimieren (CB6-7, CB6-W8, CB6-W22, CB6-5, CB6-H1, CB6-H10, CB6-H13, CB6-H14) oder aber in allen getesteten Geweben (CB6-W5). Diese beiden zuletzt genannten Kategorien werden daher nicht für weitere Analysen eingesetzt, da *mutp53* nicht spezifisch im Mammagewebe exprimiert wird.

2.4.2 Histologische und immunhistologische Analysen *WAP-mutp53* transgener Maus-Linien

2.4.2.1 Vergleich einzelner *WAP-mutp53* transgener Maus-Linien

Jede der erhaltenen *WAP-mutp53* transgenen Maus-Linien wurde in der F1-Generation durch Verpaarung induziert. Laktierende Mäuse wurden am Tag zwei, drei, vier oder fünf nach Geburt präpariert. Das Transgen sollte zu diesem Zeitpunkt unter der Kontrolle des *WAP*-Promotors optimal exprimiert werden.

Makroskopische Begutachtungen ergaben bei keinem der untersuchten Präparate einen von der Norm abweichenden Befund. Das Gewebe transgener Tiere wurde in einem Gemisch von 4% Formalin und 1% Essigsäure fixiert und parallel für RT-PCR und Protein-Analysen eingefroren. Nach der Fixierung wurden die Gewebeproben nach Standard-Labormethoden in Paraffin eingebettet. Histologisch und immunhistologisch wurden all die Linien untersucht, die nach RT-PCR Ergebnissen (2.4.1) das Transgen spezifisch in Mammageweben transkribierten. Nach Hematoxylin / Eosin H&E -Färbung (Tabelle 5 und Abb. 15-19) wurden die Gewebeschnitte mikroskopisch beurteilt. Dabei wurde die Transgen-Expression von *WAP-mutp53* mit Hilfe einer immunhistologischen HA-Tag- und einer p53-Markierung detektiert. Die histologischen und immunhistologischen Ergebnisse sind in den Tabellen 5a (*mutp53^{R245W}*) und 5b (*mutp53^{R270H}*) zusammengefasst.

Tabelle 5a: Phänotyp-Analyse laktierender *WAP-mutp53^{R245W}* transgener Maus-Linien

Transgene Linie	Präparation	Alter	RT-PCR Ergebnis	Morphologie	Immunhistologische HA-Tag- & p53-Markierung
BALB/c Kontrolle	Tag 5 pp	6 M	neg. in 1-9	normales, laktierendes Drüsengewebe, kein residuales Fettgewebe	negativ
CB6-4	Tag 5 pp	4 M	pos. in 1-4	normales, laktierendes Drüsengewebe, Fettgewebsanteil gering <1%	geringe, disseminierte Expression: 1 – 2 % der Zellen
CB6-W1	Tag 5 pp	8 M	pos. in 1-4, schwach in 6	20-30% residuales Fettgewebe, vermehrte Desquamation von Drüsenepithelien. Hypertrophes Drüsenepithel. Fokal Alveolen u. Milchgänge stark erweitert. Irreguläres Alveolenmuster in inguinaler und abdominaler Mamma.	mittelgradige Expression: ca. 50 - 60% der Zellen, Milchtröpfchen bzw. abgestoßene Zellen: HA und p53-positiv
CB6-W10	Tag 2 pp	4 M	pos. in 1-4, schwach in 8	normales, laktierendes Drüsengewebe, Fettgewebsanteil (ca. 20%)	hochgradige Expression: > 95% der Zellen
CB6-W11	Tag 3 pp	3 M	schwach pos. in 1-4	normales, laktierendes Drüsengewebe, Fettgewebsanteil gering (< 2%)	minimale Expression: <0,01% der Zellen
CB6-W12	Tag 4 pp	3 M	pos. in 1-4, schwach 6, 8	normales, laktierendes Drüsengewebe, Fettgewebsanteil gering (<1%)	hochgradige Expression: > 97% der Zellen
CB6-W15	Tag 4 pp	3 M	pos. in 1-4	normales, laktierendes Drüsengewebe, Fettgewebsanteil gering (< 2%)	mittelgradige, disseminierte Expression: ca. 20% der Zellen, fokal mehr

Tabelle 5b: Phänotyp-Analyse laktierender transgener *WAP-mutp53^{R270H}* Maus-Linien

Transgene Linie	Präparation	Alter	RT-PCR Ergebnis	Morphologie	Immunhistologische HA-Tag- & p53-Markierung
CB6-22	Tag 8 pp	8,5 M	sehr schwach pos. in 1-4	normales, laktierendes Drüsengewebe, kein residuales Fettgewebe	negativ
CB6-H2	Tag 5 pp	3,5 M	pos. in 1-4	normales, laktierendes Drüsengewebe, deutlich residuales Fettgewebe (ca.10%)	minimale Expression: <0,1% der Zellen, vorwiegend nukleäre Markierung
CB6-H3	Tag 3 pp	3,5 M	pos. in 1-4	normales, laktierendes Drüsengewebe, residuales Fettgewebe (ca. 5%)	hochgradige Expression: >90% der Zellen
CB6-H8	Tag 4 pp	3 M	pos. in 1-4	normales, laktierendes Drüsengewebe, erhöhter residueller Fettgewebean- teil (ca. 30-40%)	hochgradige Expression: >95% der Zellen
CB6-H9	Tag 3 pp	3 M	pos. in 1-4	normales, laktierendes Drüsengewebe, erhöhter residueller Fettgewebean- teil (ca. 20%)	geringe Expression: <1% der Zellen, fokal etwas mehr
CB6-H12	Tag 5 pp	3 M	pos. in 1-4, schwach in 6	normales, laktierendes Drüsengewebe, etwas residuales Fettgewebe (<5%)	mittelgradige Expression: ca. 40 - 50% der Zellen
CB6-H15	Tag 5 pp	3 M	pos. in 1-4	normales, laktierendes Drüsengewebe, sehr wenig residuales Fettgewebe (<1%)	minimale Expression: <0,1% der Zellen
CB6-H16	Tag 5 pp	4,5 M	sehr schwach pos. in 1-4	Drüsenepithelien etwas hypertroph. Acini mit abnormer Konfiguration. etwas residuales Fettgewebe (<5%)	minimale Expression: <0,05% der Zellen. Positive Zellen evtl. apoptotisch

Die *WAP-mutp53* transgenen Linien sind nach Mutation und fortlaufender Nummerierung sortiert.

pp: post partum; der Tag der Geburt wird als Tag 1 gezählt, M=Monat.

Zahlen 1-9 in Tabelle 5 a und b (Spalte: RT-PCR Ergebnis) beziehen sich auf eine transgen spezifische RT-PCR folgender Gewebe von transgenen, induzierten F1-Weibchen (Kapitel 2.4.1):

- | | |
|--------------------|----------|
| 1: Mamma zervikal | 6: Niere |
| 2: Mamma thorakal | 7: Milz |
| 3: Mamma abdominal | 8: Herz |
| 4: Mamma inguinal | 9: Lunge |
| 5: Leber | |

Histologie:

Bei mikroskopischer Betrachtung der H&E gefärbten Präparate zeigen die untersuchten transgenen *WAP-mutp53* Maus-Linien bis auf die Maus-Linie CB6-W1, auf die später detaillierter eingegangen wird, keine pathologischen Veränderungen. Das laktierende Mammagewebe zeigt eine dem jeweiligen Entwicklungsstand entsprechenden regelrechten Aufbau. Ausführungsgänge, Duktuli und Alveolen,

chenden regelrechten Aufbau. Ausführungsgänge, Duktuli und Alveolen, teilweise mit Milch gefüllt, sind meist mit einschichtigem, sekretorisch aktivem Drüsenepithel ausgekleidet und von einer Basalmembran sowie Myoepithelzellen umgeben. Zum Zeitpunkt der Präparation hatte das expandierte Drüsenparenchym das Fettgewebe fast vollständig verdrängt.

Unterschiede an residualen Fettgewebeanteilen erwiesen sich als unabhängig von der Transgen-Expression.

Immunhistologie:

Die Transgen-Expression von *WAP-mutp53* wurde auf Protein-Ebene anhand einer immunhistologischen HA-Tag- und einer p53-Markierung des Gewebes detektiert. Zu diesem Zweck wurden polyklonale Kaninchen Anti-HA-Tag Antikörper, die das transgene mutp53 über dessen HA-Tag detektieren und polyklonale Kaninchen Anti-p53 Antikörper, die sowohl das transgene mutp53 als auch das endogene wtp53 markieren, verwendet.

Es fällt auf, dass sich sowohl bei den *WAP-mutp53^{R245W}* als auch bei den *WAP-mutp53^{R270H}* transgenen Mäusen Linien mit geringer (<2%), intermediärer (40-60%) und hoher mutp53 Expression (>90%) befinden (Tabelle 6), die eine gewebespezifische Expression exklusiv in Drüsenepithelien der Mamma zeigen.

Tabelle 6: Grad der immunhistologisch detektierten Transgen-Expression in *WAP-mutp53* transgenen Mäusen

Transgen	geringe Expression	intermediäre Expression	starke Expression	keine Expression
<i>WAP-mutp53^{R245W}</i>	2 Linien: CB6-4 < 2% CB6-W11 < 0,01%	2 Linien: CB6-W1 ca. 50-60% CB6-W15 ca. 20%, fokal	2 Linien: CB6-W10 > 95% CB6-W12 > 97%	3 Linien: CB6-7 CB6-W8 CB6-W22
<i>WAP-mutp53^{R270H}</i>	4 Linien: CB6-H9 < 1% CB6-H15 < 0,1% CB6-H2 < 0,1% CB6-H16 < 0,05%	1 Linie: CB6-H12 ca. 40-50%	2 Linien: CB6-H3 > 90% CB6-H8 > 95%	6 Linien: CB6-5 CB6-22 CB6-H1 CB6-H10 CB6-H13 CB6-H14

Die histologischen und immunhistochemischen Befunde der gering, intermediär und stark exprimierenden transgenen Linien mit den Mutationen *WAP-mutp53^{R245W}* und *WAP-mutp53^{R270H}* sind in Abb. 15-18 dargestellt.

Gering und intermediär exprimierende *WAP-mutp53^{R245W}* Maus-Linien:

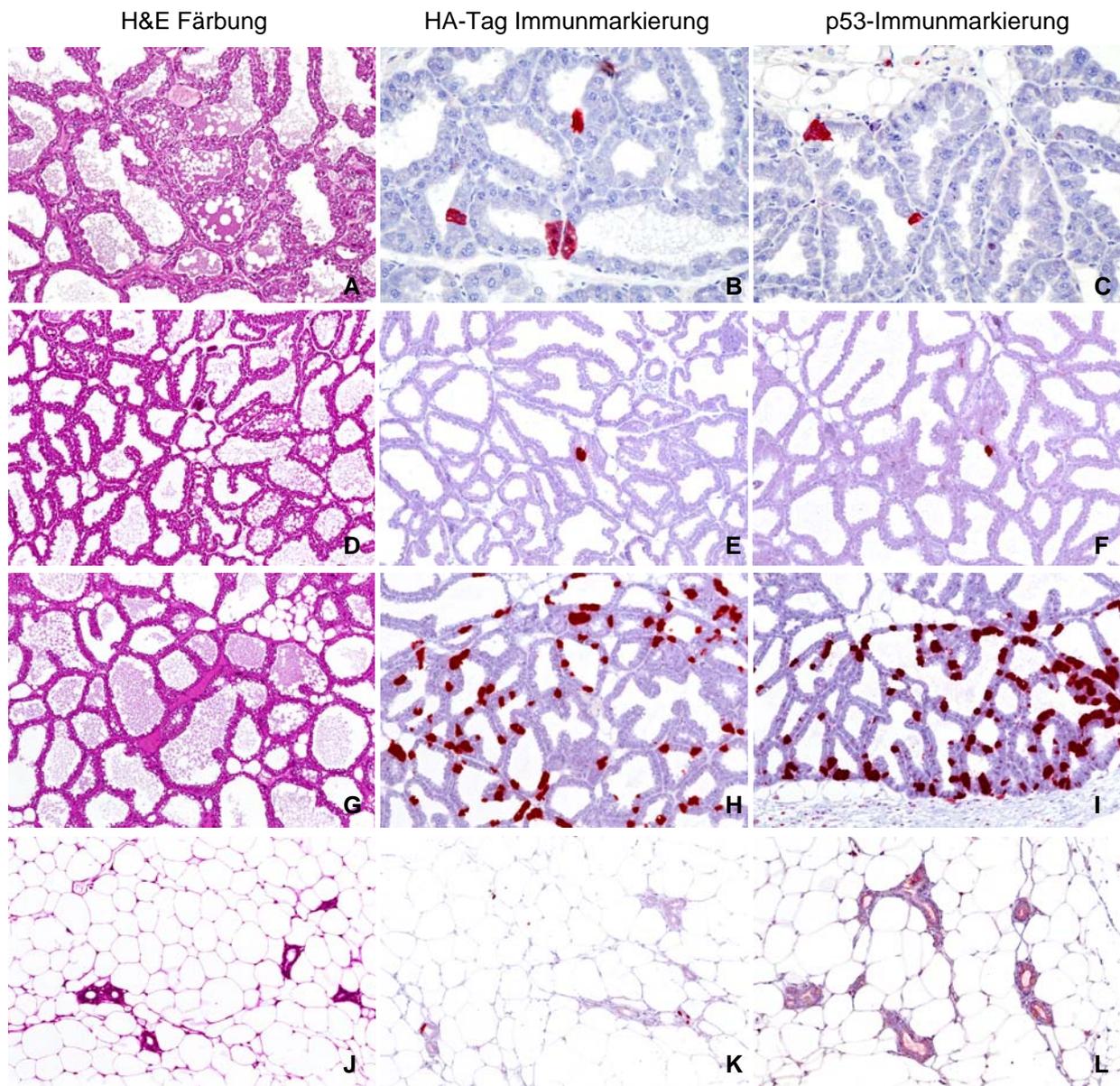


Abb. 15: Morphologie und Immunhistologie von murinem Mammagewebe transgener *WAP-mutp53^{R245W}* Linien mit geringer und intermediärer Transgen-Expression

Die Histologie muriner, laktierender Mammae wird durch H&E Färbung von Gewebeschnitten in der ersten Spalte dargestellt. Die zweite Spalte zeigt eine HA-Tag - und die dritte Spalte eine p53 - Immunmarkierung von Gewebeschnitten. Reihen: A-C: CB6-4, 5 Tage post partum (pp); D-F: CB6-W11, 3 Tage pp; G-I: CB6-W15, 4 Tage pp; J-L: CB6-W15, 127 Tage pp; Vergrößerung: A: x 90; B, C: x 140; D-L: x 70.

Die Linien CB6-4, CB6-W11 und CB6-W15 zeigten mikroskopisch normales, laktierendes Mammagewebe mit einem geringen Fettgewebeanteil von weniger als 1-2% (Abb. 15 A,D,G).

Sowohl die HA-Tag- (Abb. 15 B) als auch die p53- (Abb. 15 C) Immunmarkierungen des laktierenden Mammagewebes der Linie CB6-4 zeigten, dass ca. 2% disseminiert verteilte, alveolare Epithelzellen stark mutp53 positiv waren. Der p53-Antikörper

detektiert sowohl endogenes wtp53, als auch transgenes mutp53. Da wtp53 aber in geringer Konzentration in den Zellkernen vorliegt, wird es meistens immunhistologisch nicht dargestellt. Bei dem hier markierten p53 handelte es sich um das Transgenprotein, da das p53-Detektionsmuster identisch mit dem Muster der HA-Markierung war. Auffallenderweise war mutp53 nicht ausschließlich im Zellkern, sondern auch im Zytoplasma lokalisiert. Relativ wenige Zellen waren exklusiv im Nukleus gefärbt. Die mutp53 positiven Zellen lagen häufig zu zweit oder dritt nebeneinander. Viele der markierten Zellen, die auch apoptotische Veränderungen aufwiesen, wurden anscheinend aus dem Zellverband herausgelöst und befanden sich im Lumen der Alveolen, bzw. der Duktuli. Eine detaillierte Beschreibung der *WAP-mutp53^{R245W}* transgenen Maus-Linie CB6-4 in unterschiedlichen Lebensphasen folgt in Kapitel 2.4.2.2.

Die Linie CB6-W11 zeigte eine minimale mutp53 Expression in <0,01% der Drüsenepithelien (Abb. 15 E, F). Mutp53 war dabei sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma lokalisiert. Apoptotische Veränderungen, sowie abgestoßene mutp53 exprimierende Epithelzellen wurden hier nicht beobachtet.

Linie CB6-W15 wies ein intermediäres mutp53 Expressionsmuster auf, wobei insgesamt ca. 20% der Epithelzellen (Abb. 15 H,I) positiv waren und es teilweise zu einer fokalen Häufung der mutp53 Expression kam. Die Zellen exprimierten mutp53 im Nukleus und im Zytoplasma. 115 Tage post partum und somit nach vollständig abgeschlossener Involution wurde mutp53 (Abb. 15 K,L) in mikroskopisch normalem nicht-laktierendem Mammagewebe (Abb. 15 J) sehr selten mit weniger als 0,01% in einzelnen Epithelkernen festgestellt. Die temporäre Expression des mutp53 Transgens unterlag somit in dieser transgenen Maus-Linie der strikten Kontrolle des induzierbaren *WAP*-Promotors, da ohne laktotrophen Stimulus das Transgen nicht, bzw. zu <0,01% exprimiert wurde.

Intermediär exprimierende *WAP-mutp53^{R245W}* Maus-Linie:

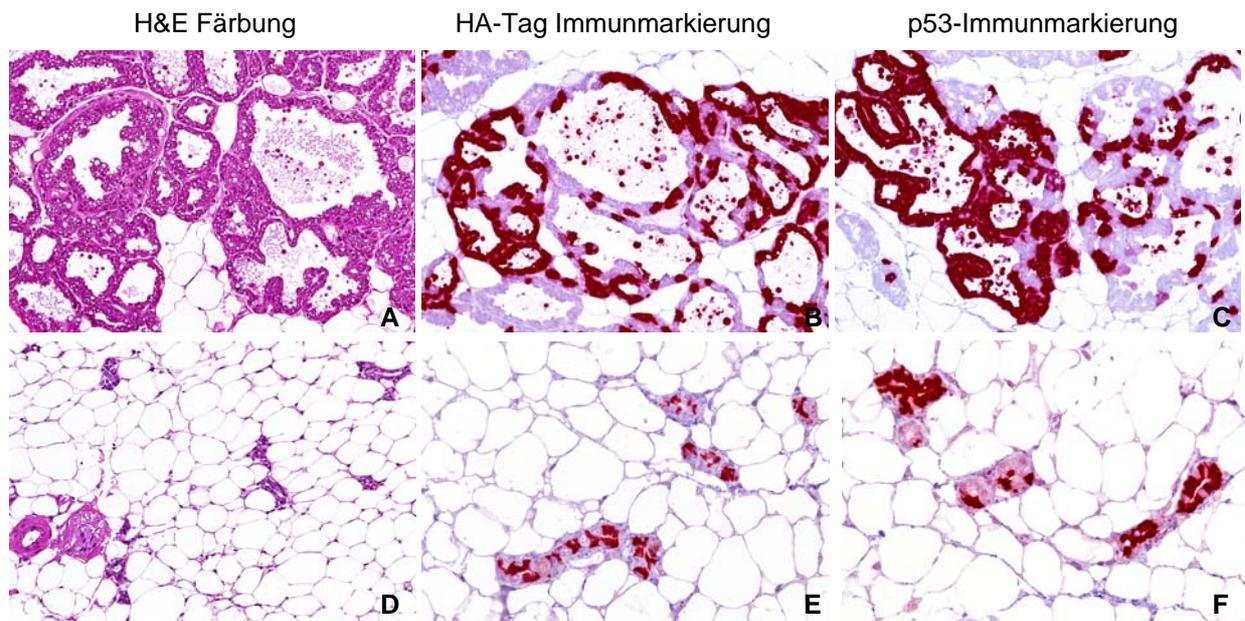


Abb. 16: Morphologie und Immunhistologie von murinem Mammagewebe einer transgenen *WAP-mutp53^{R245W}* Linie mit intermediärer Transgen-Expression

Die Histologie muriner, laktierender Mammae wird durch H&E Färbung von Gewebeschnitten in der ersten Spalte dargestellt. Die zweite Spalte zeigt eine HA-Tag - und die dritte Spalte eine p53 - Immunmarkierung von Gewebeschnitten. Reihen: A-C: CB6-W1, 5 Tage post partum (pp); D-F: CB6-W1, 110 Tage pp; Vergrößerung: A-D: x 70; E-F: x 140.

Von allen untersuchten transgenen Linien beider Mutationen zeigte nur die intermediär exprimierende Linie CB6-W1 morphologische Besonderheiten (Abb. 16 A-F). Am Tag 5 post partum war ein irreguläres Muster der laktierenden Acini zu erkennen. Fokal erschienen Alveolen und Milchgänge teilweise stark erweitert. Sie waren unregelmäßig geformt, das Drüsenepithel war hyperplastisch, teilweise mehrschichtig oder mikropapillär gestaltet. Eine vermehrte Desquamation war vorhanden, aber Zelltypen waren nicht erkennbar (Abb. 16 A-C). Eine *mutp53*-Markierung wurde in 50-60% der Mammaepithelzellen, aber auch in Milchtröpfchen und abgestoßenen Zellen detektiert (Abb. 16 B, C).

110 Tage post partum hatte sich in der Linie CB6-W1 das Drüsenepithel ohne morphologische Auffälligkeiten zurückgebildet (Abb. 16 D-F). Die HA-Tag- und p53-Immunmarkierungen zeigten aber in den TDLU's weiterhin dasselbe Expressionsmuster wie am Tag 5 post partum während der Laktation. Die Transgen-Expression persistierte und war bei dieser transgenen Linie anscheinend auch hormonunabhängig möglich.

Stark exprimierende *WAP-mutp53^{R245W}* Maus-Linien:

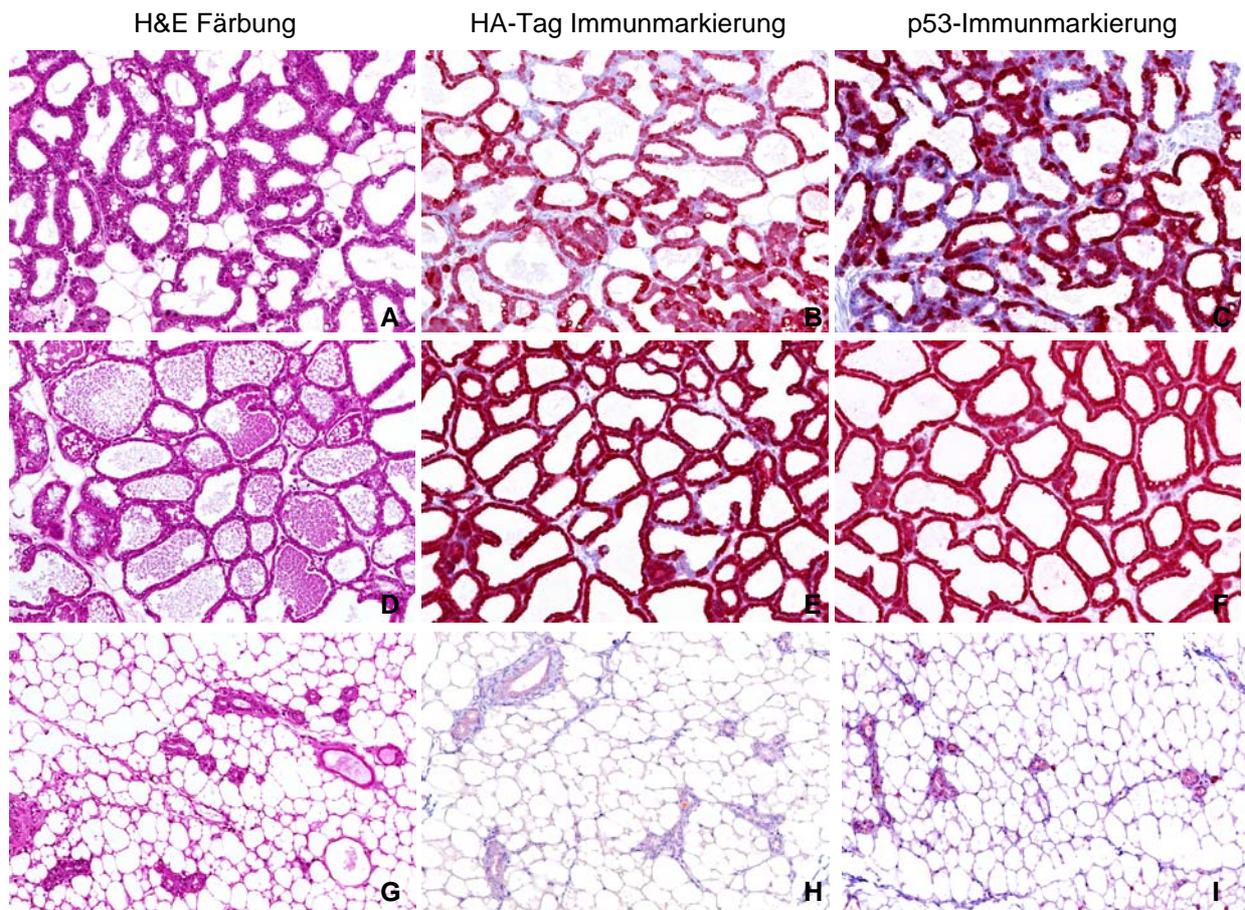


Abb. 17: Morphologie und Immunhistologie von murinem Mammagewebe transgener *WAP-mutp53^{R245W}* Linien mit starker Transgen-Expression

Die Histologie muriner, laktierender Mammae wird durch H&E Färbung von Gewebeschnitten in der ersten Spalte dargestellt. Die zweite Spalte zeigt eine HA-Tag - und die dritte Spalte eine p53 - Immunmarkierung von Gewebeschnitten. Reihen: A-C: CB6-W10, 2 Tage post partum (pp); D-F: CB6-W12, 4 Tage pp; G-I: CB6-W12, 116 Tage pp; Vergrößerung: A-I: x 70.

Die transgenen *WAP-mutp53^{R245W}* Linien CB6-W10 und CB6-W12 zeigten mikroskopisch normales, laktierendes Mammagewebe. Linie CB6-W10 (Abb. 17 A) hatte einen auf ca. 20% erhöhten Fettgewebeanteil und Linie CB6-W12 (Abb. 17 D) hatte einen geringen Fettgewebeanteil von <1%. Dies entsprach dem jeweiligen Entwicklungsstand des Drüsengewebes am Tag 2 post partum für die Linie CB6-W10 (Abb. 17 A) und am Tag 4 post partum für die Linie CB6-W12.

Sowohl die HA-Tag- (Abb. 17 B,E) als auch die p53- (Abb. 17 C,F) Immunmarkierung des laktierenden Mammagewebes der Linien CB6-W10 (Abb. 17 A-C) und CB6-W12 (Abb. 17 D-F) zeigten eine hohe *mutp53* Expression. In mehr als 95% der alveolaren Epithelzellen der Linie CB6-W10 (Abb. 17 B,C) und in mehr als 97% der Linie CB6-W12 (Abb. 17 E,F) wurde im Zellkern und im Zytoplasma *mutp53* markiert. Im Fett-, bzw. Bindegewebe war kein p53 erkennbar.

116 Tage post partum und somit nach vollständig abgeschlossener Involution wurde kein mutp53 im Mammagewebe der Linie CB6-W12 detektiert (Abb. 17 H,I). Nur vereinzelte Makrophagen enthielten wenige positive mutp53-Zellreste. Die Kontrolle der Transgen-Expression durch den *WAP*-Promotor war auch in diesen Linien spezifisch.

Gering exprimierende *WAP-mutp53^{R270H}* Maus-Linien:

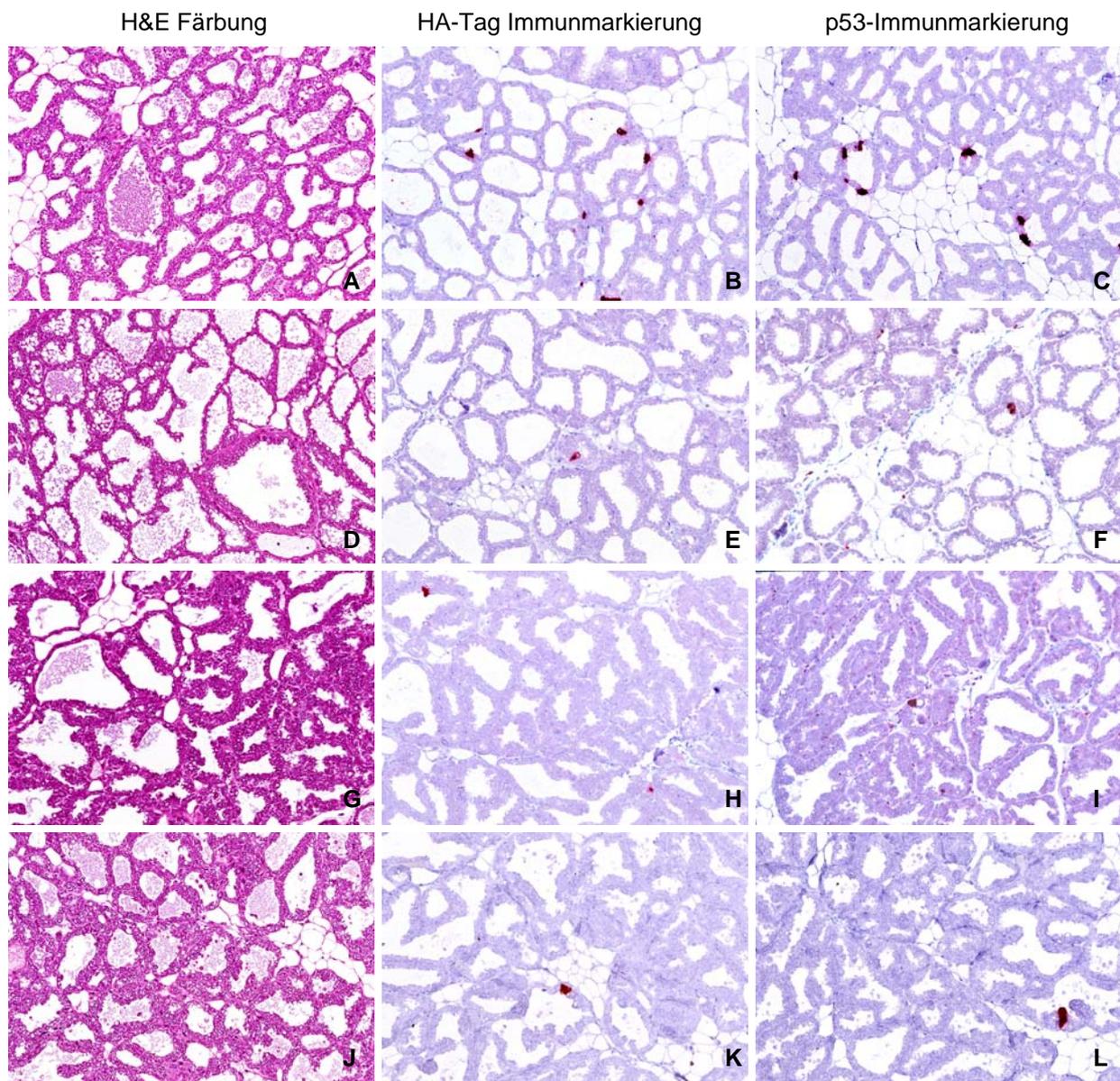


Abb. 18: Morphologie und Immunhistologie von murinem Mammagewebe transgener *WAP-mutp53^{R270H}* Linien mit geringer Transgen-Expression

Die Histologie muriner, lactierender Mammae wird durch H&E Färbung von Gewebeschnitten in der ersten Spalte dargestellt. Die zweite Spalte zeigt eine HA-Tag - und die dritte Spalte eine p53 - Immunmarkierung von Gewebeschnitten. Reihen: A-C: CB6-H9, 3 Tage post partum (pp); D-F: CB6-H15, 5 Tage pp; G-I: CB6-H2, 5 Tage pp; J-L: CB6-H16, 5 Tage pp; Vergrößerung: A-L: x 70.

Die Linien CB6-H9, CB6-H15 und CB6-H2 zeigten mikroskopisch normales, laktierendes Mammagewebe (Abb. 18 A,D,G). Entsprechend dem Entwicklungsstand des Drüsenepithels am Tag 3 post partum lag der Fettgewebeanteil in Linie CB6-H9 bei 20% und am Tag 5 post partum bei <5% in Linien CB6-H15, CB6-H16. Die Linie CB6-H2 zeigte am Tag 5 post partum einen erhöhten Fettgewebeanteil von 10%. Morphologisch auffällig waren hypertrophe Acini der Linie CB6-H16 (Abb. 18 J). Die Linien CB6-H9, CB6-H15, CB6-H2 und CB6-H16 zeigten eine niedrige mutp53 Expression spezifisch in Mammaepithelzellen (Abb. 18 B,C,E,F,H,I,K,L). Weniger als 1% der Mammaepithelzellen waren für die Linie CB6-H9 positiv HA-Tag - und p53 -immunmarkiert (B,C). In der Linie CB6-H15 waren weniger als 0,1% (Abb. 18 E,F), in der Linie CB6-H2 weniger als 0,1% (H,I) und in der Linie CB6-H16 weniger als 0,05% (Abb. 18 K,L) der Mammaepithelzellen mutp53 positiv. Einige der wenigen Zellen mit einer positiven mutp53 Immunmarkierung verloren den Kontakt zu Nachbarzellen und nahmen eine apoptotische Form an.

Intermediär und stark exprimierende *WAP-mutp53^{R270H}* Maus-Linien:

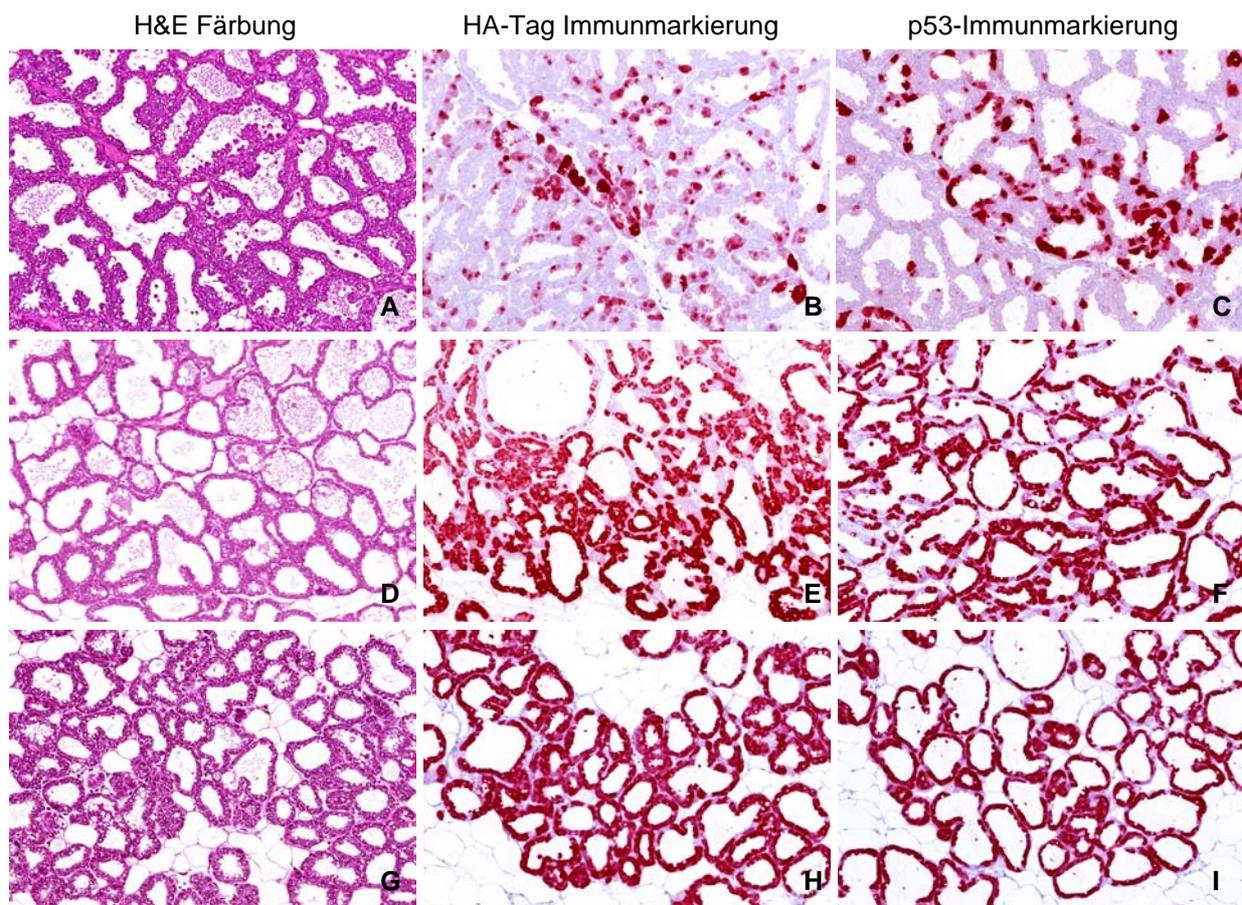


Abb. 19: Morphologie und Immunhistologie von murinem Mammagewebe transgener *WAP-mutp53^{R270H}* Linien mit intermediärer und starker Transgen-Expression

Die Histologie muriner, laktierender Mammae wird durch H&E Färbung in der ersten Spalte dargestellt. Die zweite Spalte zeigt eine HA-Tag - und die dritte Spalte eine p53 -Immunmarkierung. Reihen: A-C: CB6-H12, 5 Tage post partum (pp); D-F: CB6-H3, 3 Tage pp; G-I: CB6-H8, 4 Tage pp; Vergrößerung: A-I: x 70.

Die Linien CB6-H12, CB6-H3 und CB6-H8 zeigten mikroskopisch normales laktierendes Mammagewebe (Abb. 19 A,D,G). Linie CB6-H8 hatte am Tag 4 post partum einen erhöhten residualen Fettgewebeanteil von 30-40%, während dieser Anteil bei CB6-H12 und CB6-H3 wie zu erwarten bei < 5% lag.

Für die Linie CB6-H12 wurde eine intermediäre mutp53 Expression (Abb. 19 B,C) spezifisch im Zytoplasma und Nukleus von Mammaepithelzellen dargestellt.

Die Linien CB6-H3 zeigten mit mehr als 90% (Abb. 19 E,F) und CB6-H8 mit mehr als 95% (Abb. 19 H,I) eine hohe mutp53 Expression spezifisch in Mammaepithelzellen.

2.4.2.2 Detaillierte Phänotyp-Analyse der niedrig exprimierenden Maus-Linie CB6-4

Um den Einfluss mehrfacher Induktionen auf das Muster der Transgen-Expression im Detail zu untersuchen, wurde die niedrig exprimierende *WAP-mutp53^{R245W}* transgene Maus-Linie CB6-4 als eine der beiden ersten generierten transgenen Maus-Linien nach mehreren Induktionen (Verpaarungen) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten charakterisiert.

Vergleichend zur histologischen Beurteilung wurde in diesem Fall die Transgen-Expression molekular-biologisch und biochemisch detektiert.

Die mammaspezifische Expression in der CB6-4 F1-Generation wurde sowohl auf transkriptioneller Ebene anhand der RT-PCR (Abb. 14) als auch auf Ebene der Translation mit Hilfe der Immunpräzipitation (IP) und Western-Blot-Analysen spezifisch im Mammagewebe gezeigt. P53 konnte in Zell-Lysaten nicht detektiert werden, die vorher nicht einer Immunpräzipitation, also einer mutp53-, bzw. p53-Anreicherung unterzogen wurden. Die Translation wurde hier am Beispiel der thorakalen Mamma und der Milz gezeigt. Mutp53 wurde über unterschiedliche Immunpräzipitationsverfahren aus dem Gesamt-Protein-Zell-Lysat angereichert. Durch Verwendung des mutp53 transgen spezifischen Antikörpers 12CA5 α HA-Tag konnte nach einer SDS-Gelelektrophorese (in einem 10%igen SDS-Gel) und anschließender Western-Blot-Analyse sowohl mit einem polyklonalen Kaninchen α p53 Antikörper (SAPU) (Abb. 20 A Spur 6) als auch mit einem monoklonalen α HA-Tag Antikörper (Abb. 20 B Spur 6) das mutp53 Transgen im Mammagewebe, aber nicht im Milzgewebe (Abb. 20 B Spur 7), nachgewiesen werden.



Abb. 20: Nachweis von mutp53 in Immunpräzipitaten aus murinem Mammagewebe und muriner Milz der transgenen *WAP-mutp53^{R245W}* Linie CB6-4

A: Western-Blot unter Verwendung eines monoklonalen α -p53 Kaninchen Antikörpers (SAPU) zur wtp53 und mutp53 Detektion.

B: Western-Blot unter Verwendung eines monoklonalen α -HA-Tag Ratte Antikörpers zur mutp53 Detektion.

Spur 4: L= Protein-Längenmarker (7b)

Immunpräzipitationen mit einem Maus pAB-240 α p53 Antikörper (Abb. 20 B Spur 1) sowie mit einem Kaninchen α p53 Antikörper (SAPU) (Abb. 20 B Spur 10) zeigten in der Western-Blot-Analyse mit einem monoklonalen α HA-Tag Antikörper eine spezifische Bande, während im Milzgewebe kein mutp53 über den HA-Tag-Nachweis detektiert werden konnte.

Wurde für die Western-Blot-Analyse ein α p53 Antikörper (SAPU) verwendet, konnten in den Immunpräzipitaten auch geringe Mengen an wtp53 in Milzgewebe (Abb. 20 A Spuren 2, 7) nachgewiesen werden, aber nicht unter Verwendung eines α HA-Tag Antikörpers, der das mutp53 Transgen detektiert.

Als Positivkontrolle zum Nachweis von murinem wtp53 wurden murine Milzzellen mit γ -Strahlen bestrahlt. Diese DNS-Schädigung führte zu einer p53 Stabilisierung und Akkumulation in den Zellkernen. Aufgrund dieser Anreicherung war es möglich, wtp53 nach Bestrahlung (Abb. 20 A, Spur 9) im Gegensatz zu unbestrahlten Zellen (Abb. 20 A, Spur 8) mit dem α p53 Antikörper (SAPU) nachzuweisen.

Diese Ergebnisse bestätigten die der RT-PCR Experimente, die eine spezifische Transkription im Mammagewebe und nicht in anderen getesteten Geweben zeigten. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass das Transgen mutp53^{R245W} spezifisch im Mammagewebe transkribiert und auch translatiert wurde.

Die molekularbiologischen und biochemischen Experimente gaben Aufschluss über die Situation der mutp53-Expression in unterschiedlichen Geweben, sagen aber nichts über dessen Lokalisierung in den Geweben aus.

Mit immunhistologischen Analysen war es aber sehr gut möglich die mutp53^{R245W} Expression den Mammaepithelzellen zuzuordnen (Abb. 21 A-C). Die spezifische Kontrolle der Transgen-Expression durch den induzierbaren *WAP*-Promotor konnte dadurch belegt werden, dass bei nicht induzierten Tieren (Abb. 21 D) kein mutp53 nachgewiesen werden konnte. Während der Involution am Tag 29 post partum waren vereinzelt positive Mammaepithelzellen detektierbar (Abb. 21 E). Nach abgeschlos-

sener Involution 60 Tage post partum (Abb. 21 F) war entsprechend einer hormonabhängigen Induktion kein mutp53 mehr nachweisbar.

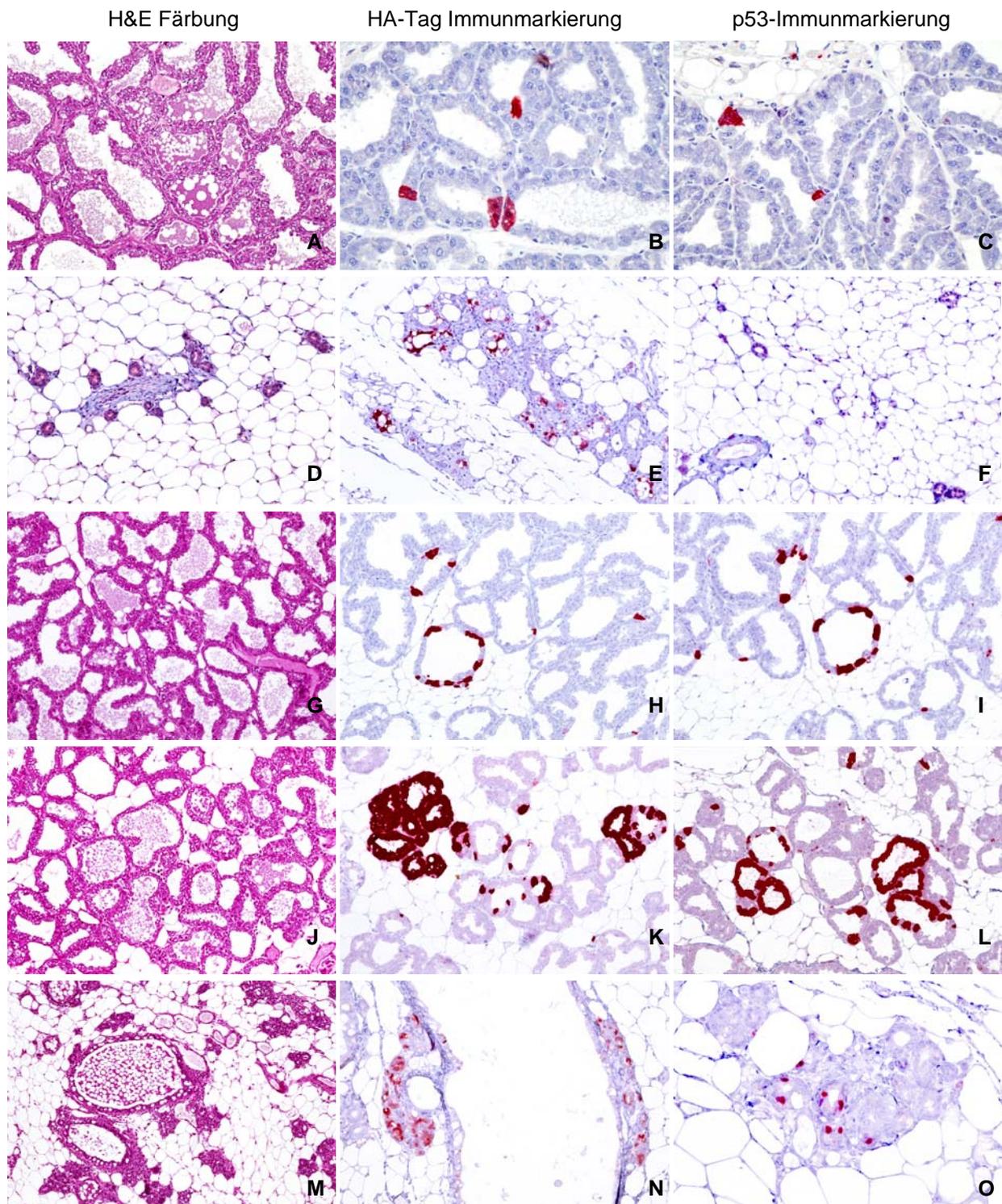


Abb. 21: Morphologie und Immunhistologie von murinem Mammagewebe der niedrig exprimierenden transgenen *WAP-mutp53^{R245W}* CB6-4 Linie

Die Histologie muriner, lactierender Mammae wird durch H&E Färbung von Gewebeschnitten in der ersten Spalte (außer in Reihe 2, D-F) dargestellt. Die zweite Spalte zeigt eine HA-Tag - und die dritte Spalte eine p53 -Immunmarkierung von Gewebeschnitten (außer in Reihe 2, D-F). Reihen: A-C: CB6-4, 1. Wurf, 5 Tage post partum (pp); D-F: HA-Tag Markierungen von D: CB6-4 nicht induziert; E: CB6-4, 2. Wurf, 29 Tage pp; F: CB6-4 1. Wurf, 60 Tage pp; G-I: CB6-4, 2. Wurf, 5 Tage pp; J-L: CB6-4, 4. Wurf, 5 Tage pp; M-O: CB6-4, multipara, 10 Monate pp.

Wie bereits in Kapitel 2.4.2.1 (zu Abb. 15) ausführlich beschrieben zeigten ca. 2% verstreut lokalisierte, acinäre Epithelzellen der Linie CB6-4 sowohl eine mutp53 positive HA-Tag- (Abb. 21 B) als auch eine p53- (Abb. 21 C) Immunmarkierung. Die mutp53 positiven Zellen fanden sich häufig zu zweit oder zu dritt nebeneinanderliegend. Nach zwei Geburten (Abb. 21 G-I) konnte eine mutp53-Expression in mehr als 5% der Epithelzellen gefunden werden.

Dieser Effekt wurde nach vier Geburten noch deutlicher (Abb. 21 J-L). Die mutp53 markierten Epithelzellen waren dabei nicht gleichmäßig auf das gesamte Mammaepithel verteilt, sondern schienen fokal gehäuft in bestimmten Alveoli aufzutreten. Diese fokale Akkumulation könnte auf eine präferentielle Transgen-Expression in einer epithelialen Stamm-oder Progenitorzelle hindeuten. Im Verlaufe der Involution setzt eine massive apoptotische Rückbildung des Drüsenparenchyms ein, wobei auch epitheliale Drüsen-Stammzellen zurück bleiben, um bei einer erneuten Schwangerschaft das Drüsengewebe wieder aufzubauen. Einige dieser epithelialen Vorläuferzellen könnten im Gegensatz zu anderen Epithelzellen die Eigenschaft besitzen, mutp53 zu exprimieren. Eine erneute Schwangerschaft führte dann zum Wiederaufbau des Drüsengewebes, präferentiell aus Abkömmlingen der mutp53 exprimierenden epithelialen Vorläuferzellen.

Da der *WAP*-Promotor von der Stimulierung durch laktotrophe Hormone abhängig ist, wurde nach abgeschlossener Involution (Abb. 21 F) kein mutp53 nachgewiesen. Transgene Tiere zeigten während (Abb. 21 E) und nach abgeschlossener Involution (Abb. 21 F) im Vergleich zu nicht-transgenen BALB/c Weibchen keine pathologischen Veränderungen.

In einer Langzeitstudie über 15 Monate wurde in einem Fall eine von der Hormon-Induktion unabhängige Transgen-Expression von mutp53 entdeckt. Dabei handelte es sich um ein transgenes Weibchen der F1 Generation der Linie CB6-4, welches insgesamt zwei durchschnittlich große Würfe mit 10 und 8 Jungen innerhalb der ersten fünf Lebensmonate großzog. Makroskopische, sowie mikroskopische Gewebs-Untersuchungen (Abb. 21 M) waren unauffällig. Aber sowohl die p53-, als auch die HA-Tag-Immunmarkierung zeigten fokal verstärkt mutp53 positive Mammaepithelzellen der TDLU's, obwohl der Promotor 10 Monate nach der letzten Laktation inaktiv sein sollte. Die Transgen-Expression schien in diesem Fall hormonunabhängig geworden zu sein.

2.4.2.3 Einfluss von *mutp53* Proteinen auf die Zell-Proliferation

Als Tumorsuppressor ist *wtp53* an der Regulation der Zell-Proliferation beteiligt. Erste immunhistologische Untersuchungen sollten Aufschluss über eine mögliche Dysregulation aufgrund der *mutp53* Expression in transgenen Tieren geben.

Proliferierende Zellen konnten mit Antikörpern des Hybridoms Mib-1 nachgewiesen werden. Mib-1 detektiert das nukleäre Ki-67 Protein, welches von der G₁-Phase bis zur Mitose im Nukleus akkumuliert. Unmittelbar nach Abschluß der Mitose erreicht das Ki-67 Protein sein Minimum und ist in ruhenden Zellen nicht nachweisbar (Gerdes *et al.*, 1984), (Schrape *et al.*, 1987), (Braun *et al.*, 1988), (Bruno and Darzynkiewicz 1992).

Die Ki-67 Immunmarkierung wurde sowohl für hoch als auch für niedrig exprimierende *WAP-mutp53^{R245W}* und *WAP-mutp53^{R270H}* transgene Linien zu verschiedenen Zeitpunkten der Laktation durchgeführt. Die mit Ki-67 Positivität assoziierte Proliferationsrate korrelierte nicht mit dem *mutp53* Expressionsgrad oder der Art der *p53*-Mutation.

Abb. 22 zeigt exemplarisch eine Ki-67 Immunmarkierung einer stark exprimierenden *WAP-mutp53^{R270H}* Linie CB6-H8 und einer nicht exprimierenden *WAP-mutp53^{R270H}* Linie CB6-H13, wobei die stark exprimierende Linie CB6-H8 eine geringe Ki-67 - und die nicht exprimierende Linie CB6-H13 eine gehäufte Ki-67 -Immunmarkierung von Epithelzell-Kernen zeigt.

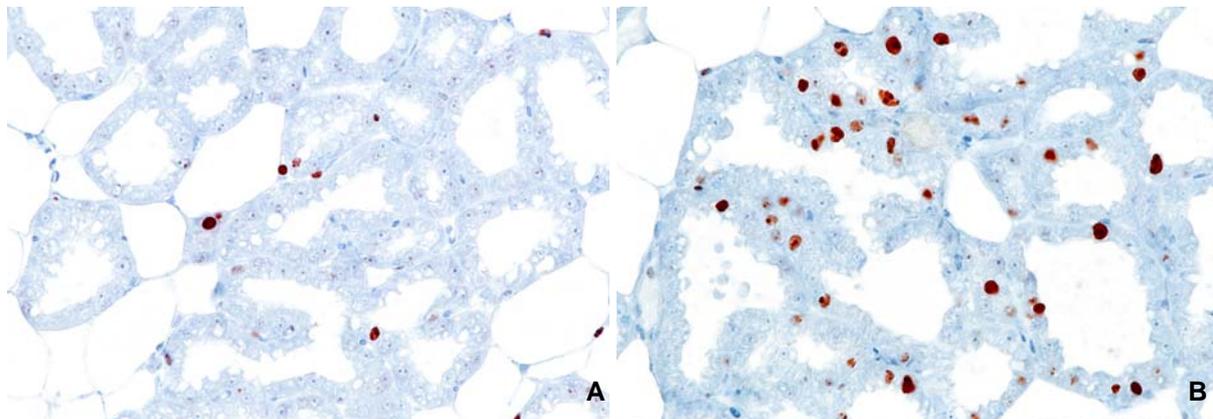


Abb. 22: Ki-67 Immunmarkierung von murinem, laktierendem Mammagewebe

Ki-67 Immunmarkierung von murinem, laktierendem Mammagewebe *WAP-mutp53^{R270H}* transgener Linien.

A: CB6-H8, 1. Wurf, 5 Tage post partum (pp); *mutp53* hoch exprimierend, geringe Ki-67 Immunmarkierung;

B: CB6-H13, 1. Wurf, 5 Tage pp, nicht *mutp53* exprimierend; verstärkte Ki-67 Immunmarkierung; Vergrößerung: A, B: x 220.

In anderen hoch-, bzw. niedrig exprimierenden Linien sah die Ki-67 Immunmarkierung genau andersherum aus, so dass die Transgen-Expression von mutp53 nach diesen Beobachtungen keinen Einfluss auf die Aktivität der Zell-Proliferation hat.

2.5 Bedingte Permissivität der mutp53-Expression

2.5.1 Expressionsanalyse *in vivo* und *in vitro*

Bei der Generierung und Charakterisierung der *WAP-mutp53* transgenen Mäuse wurden Besonderheiten beobachtet, die auf Komplikationen oder eine mögliche Toxizität des mutp53-Proteins hindeuten.

Nach der Mikroinjektion wurde bei vier Würfen aufgrund von Wehenschwäche eine Entbindung per Sektion notwendig. Dabei stellte sich heraus, dass ein hoher Prozentsatz (70%) der potentiellen *WAP-mutp53* Embryonen gestorben war. Obwohl dieses Phänomen auf Manipulationen bei der Herstellung transgener Tiere basieren könnte, kann auch eine *WAP*-Promotoraktivierung während der Embryogenese nicht ausgeschlossen werden (Deppert, nicht publizierte Daten). Eine dabei erfolgende Expression von mutp53 könnte zum Absterben der Embryonen führen, falls mutp53-Proteine unter bestimmten Bedingungen eine teratogene Wirkung entfalten würden. Auffallend war auch, dass in zwei transgenen Linien das Verhältnis Männchen zu Weibchen zu Ungunsten der letzteren verschoben war.

Nach sechs Verpaarungen des transgenen Ursprungsmännchen der Linie CB6-H8, starben zwei BALB/c Weibchen, ein BALB/c Weibchen war sichtbar schwanger, konnte die Jungtiere aber nicht gebären, ein Tier wurde nicht schwanger und nur zwei Weibchen hatten durchschnittlich große Würfe mit zehn und neun Tieren. Bei beiden Würfen waren männliche Nachkommen deutlich in der Überzahl mit einmal acht zu zwei und sechs zu drei, so dass auch die transgenen Nachkommen überwiegend männlich waren. Aus Verpaarungen transgener CB6-H8 Weibchen ergab sich zwar ein erster Wurf mit drei männlichen und sieben weiblichen Nachkommen, aber mit nur einem transgenen Männchen und zwei transgenen von insgesamt sieben Weibchen. Der zweite Wurf war mit drei Jungen auffällig klein. Obwohl diese acht Verpaarungen keine statistischen Aussagen erlaubten, ist die Wurfanzahl, die Wurfgröße und die Verteilung der transgenen Nachkommen im Vergleich mit anderen mutp53-Linien sehr auffällig und lässt den Schluss zu, dass es sehr schwierig zu sein scheint, transgene Weibchen dieser Linie zu bekommen. Ein transgenes CB6-H8 Männchen hatte nach Verpaarung auffällig wenig weibliche Nachkommen, üblicherweise ist die Zahl ausgeglichen. Das erwähnte transgene Weibchen hatte zwar beim

ersten Wurf sehr viele weibliche Nachkommen, von denen aber unterdurchschnittlich wenige transgen waren. Morphologisch waren bei dieser Linie nach einer Induktion der Transgen-Expression keine Besonderheiten zu erkennen. Mutp53 wird zu > 95% exprimiert (2.4.2.1). Demnach bleibt ein eventuell teratogener Effekt während der Embryogenese weiblicher Nachkommen eine Erklärungsmöglichkeit, deren Aufklärung zukünftigen Untersuchungen vorbehalten bleiben muss.

Die transgene Linie CB6-W1 zeigte ähnliche Züchtungsprobleme. Das transgene Ursprungsmännchen hatte nach vier unterschiedlichen Verpaarungen mit jeweils anderen BALB/c Weibchen nur einmal acht Nachkommen. Unter diesen acht Tieren waren nur ein transgenes Männchen und ein transgenes Weibchen. Weitere Verpaarungen dieser transgenen Nachkommen zeichneten sich durch geringe Nachkommenszahlen mit auffällig wenig transgenen Weibchen aus. Im Gegensatz zu der Linie CB6-H8 zeigte die Linie CB6-W1 bereits nach der ersten Induktion Veränderungen der Mammahistologie (2.4.2.1).

In den Fällen, in denen mutp53 eventuell in der Embryogenese exprimiert wurde, könnte aufgrund einer teratogenen Wirkung gegen mutp53 selektioniert worden sein. Bei der Transgen-Expression in Mammaepithelzellen könnten zelluläre Parameter einer mutp53-Expression entgegenstehen, so dass nur unter bestimmten zellulären Konstellationen mutp53 exprimiert werden konnte.

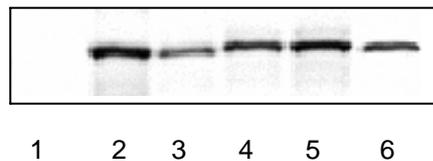
Aufgrund dieser Komplikationen wurden parallel Experimente in unterschiedlichen Zellsystemen durchgeführt. Dazu wurde die immortalisierte, p53-defiziente BALB/c Mausembryo-Fibroblasten-Zell-Linie 10-1 transient und stabil mit verschiedenen *mutp53*-Genen transfiziert. Es wurden sowohl verschiedene murine *mutp53*-Gene mit endogenen Mutationen, als auch mit exogen eingeführten Hot-Spot-Punktmutationen untersucht.

Die murinen, endogen mutierten *p53*-Gene stammten aus minimal (T3T3) und maximal transformierten (MethA) 3t3tx Zell-Linien und wurden unter die Kontrolle eines starken Promotors (CMV) in den Expressionsvektor pCI kloniert (Tabelle 7).

Tabelle 7: Zur Expressionsanalyse verwendete murine Wildtyp und Mutanten *p53* Gene

<i>p53</i> murine cDNS	Mutationen			Expressionsvektor
	Codon	Nukleotidsequenz	Aminosäure	
wtp53	–			pCI Neo
tsp53	135	TGC → GTC	Cys → Val	pCI Neo
Meth A	168 234	GAG → GGG ATG → ATC	Glu → Gly Met → Ile	pCMV Neo Bam
T3T3	230 287	TAC → GAC GAA → GAT	Tyr → Asp Glu → Asp	pCI Neo
3t3tx-1	230 237	TAC → GAC ATG → ATT	Tyr → Asp Met → Ile	pCI Neo
3t3tx-50	230	TAC → GAC	Tyr → Asp	pCI Neo
<i>p53</i> murine, chimäre DNS				
wtp53-HA	–			pCI Neo
mutp53 ^{R270H} -HA	270	CTG → CAT	Arg → His	pCI Neo

Diese Vektoren wurden sequenziert und auf ihre Funktionalität in *in vitro* Transkriptions- und Translations-Experimenten getestet.

**Abb. 23:** *in vitro* Translation von *p53* cDNS

Spur 1: pCINeo (ohne Insert, als Negativkontrolle), Spur 2: pCI-wtp53, Spur 3: pCI-tsp53, Spur 4: pCI-T3T3p53, Spur 5: pCI-3t3tx-1p53, Spur 6: pCI-3t3tx-50p53.

Die verwendeten Konstrukte konnten *in vitro* transkribiert und translatiert (Abb. 23) werden.

Nach Transfektion der Vektoren in *p53*-defiziente Maus 10-1 Fibroblasten wurde mit Immunfluoreszenz-Markierungen eine deutliche transiente Expression aller mutp53 Proteine nachgewiesen. Es konnten aber keine stabil mutp53 exprimierenden Klone hergestellt werden, obwohl PCR-Analysen zeigten, dass ein Drittel der erhaltenen Neomycin resistenten Klone *mutp53*-cDNS integriert hatten. Eine Expression war weder biochemisch in RT-PCR- oder Western-Blot -Analysen noch mit Immunmarkierung detektierbar.

Erst nach einer die *de novo* DNS-Methylierung inhibierenden 5'-Azacytidin-Behandlung der stabil transfizierten murinen 10-1 Fibroblasten konnte eine partielle mutp53-Expression nachgewiesen werden.

Weitere Transfektionen zeigten, dass mit den verwendeten Vektoren eine stabile mutp53-Expression in einer ganzen Reihe von normalen und minimal transformierten Zellen nicht möglich war. Andererseits konnte mutp53 ohne Probleme in verschiedenen Tumorzell-Linien, wie z.B. in humanen Osteosarkom-Zellen Saos-2 (p53^{-/-}; pRb^{-/-}) stabil exprimiert werden.

Eine effiziente stabile Expression von mutp53 scheint von zellulären Gegebenheiten abzuhängen, die z.B. in Saos-2 Zellen, aber nicht in (10-1) Zellen vorhanden sind. Da eine stabile Expression von mutp53 in p53^{-/-}, pRb^{-/-} Saos-2 Zellen möglich war, nicht aber in p53^{-/-} (10-1) Zellen, wurde untersucht, ob eventuell ein funktionelles Rb einer stabilen Expression von mutp53 entgegenwirkt. Für diesen Zweck wurden Zellsysteme benutzt, in denen pRb durch virale Proteine funktionell durch Protein-Interaktion eliminiert war:

- Hela Zellen, isoliert aus einem humanen Zervix-Karzinom. p53 ist funktionell durch das HPV Typ 16 E6 Protein, pRb durch das HPV E7 Protein eliminiert (p53^{-/-}, pRb^{-/-}).
- SV40 transformierte Zellen (murine und Affen-Zellen), in denen pRb und wtp53 funktionell durch das SV40 T Antigen eliminiert ist (p53^{-/-}, pRb^{-/-}).
- immortalisierte Ratten-Embryofibroblasten, die ein amino-terminales SV40 T Antigen Fragment (T₁₋₁₄₇) stabil exprimieren. T₁₋₁₄₇ bindet und inhibiert pRb, bindet jedoch nicht wtp53. Diese Zellen sind phänotypisch minimal transformiert (pRb^{-/-}).

In all diesen drei Zellsystemen konnte mutp53 exprimiert werden. Die Ergebnisse der transfizierten immortalisierten Ratten-Embryofibroblasten FR3 Zellen wurden hier exemplarisch dargestellt. Diese Zellen, die durch das stabil exprimierte aminoterminal SV40 T Antigen Fragment (T₁₋₁₄₇), welches pRb bindet und funktionell inhibiert, pRb defizient waren, konnte mutp53 stabil exprimiert werden. Die Immunfluoreszenz-Markierung und Western-Blot-Analyse wird in Abb. 24 A und B beispielhaft gezeigt.

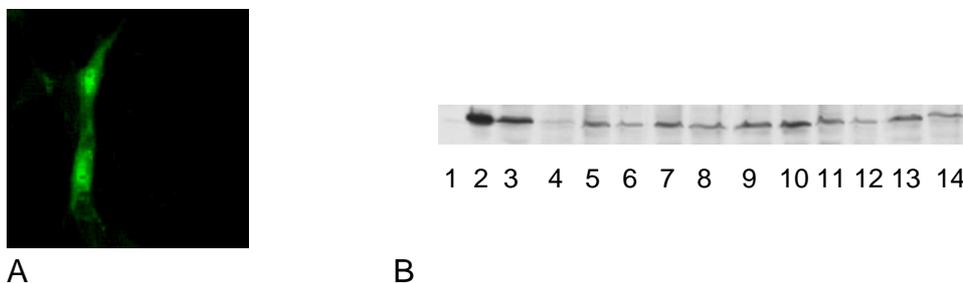


Abb. 24: Immunfluoreszenz-Markierung und Western-Blot stabil transfizierter FR3 Zellen

A: Immunfluoreszenz-Markierung, Maus PAb 248 anti-p53, Ziege anti-Maus-IgG; FITC konjugiert.
 B: Western-Blot: Spur 1: Zell-Lysat (Negativkontrolle), Spur 2: Meth A Zell-Lysat, Spur 3: Klon #9 pCI-tsp53, Spur 4: Klon #13 pCI-tsp53, Spur 5: Klon #3 pCI-T3T3p53, Spur 6: Klon #4 pCI-T3T3p53, Spur 7: Klon #6 pCI-T3T3p53, Spur 8: Klon #11 pCI-T3T3p53, Spur 9: Klon #1 pCI-3t3tx-1p53, Spur 10: Klon #7 pCI-3t3tx-1p53, Spur 11: Klon #10 pCI-3t3tx-1p53, Spur 12: Klon #11 pCI-3t3tx-1p53, Spur 13: Klon #8 pCMV-MethA, Spur 14: Klon #7 pCI-3t3tx-50p53.

Immunfluoreszenz- und Western-Blot-Analysen zeigten, dass mutp53 in all diesen drei aufgrund viraler Proteine (SV40 T Antigen, bzw. HPV E7) funktionell pRb-defizienten Zellsystemen stabil exprimiert werden konnte, was die Hypothese unterstützt, dass die mutp53 Expression von pRb negativ reguliert wurde.

SV40 T-Ag komplexiert pRb und wtp53 nicht aber mutp53 in SV40 transformierten Zellen, so dass die hohe Expressionsrate und Akkumulation von mutp53 in diesen Zellen nicht auf eine physische Inaktivierung von mutp53 durch Komplexbildung mit T-Ag zurückzuführen war.

Außerdem wurde der Einfluss von wtp53 auf die mutp53-Expression in primären Maus-Embryofibroblasten untersucht. Dazu wurden BALB/c Embryonen nach einer BALB/c p53+/- x BALB/c p53+/- Verpaarung kultiviert und genotypisiert. Primärzellen mit p53+/, p53+/- und p53-/- Genotyp wurden jeweils mit pCI-wtp53-HA, pCI-p53^{R270H}-HA und pCI-MethA transfiziert und nach Immunfluoreszenz-Markierung analysiert. Die Zahl der p53 exprimierenden Zellen war gering und unabhängig von dem jeweiligen p53 Status.

2.5.2 Re-Expression von *WAP-mutp53^{R270H}* in bi-transgenen Tieren

Die *WAP-mutp53^{R270H}* transgene Linie CB6-22 ist nach Induktion negativ für die Expression von mutp53, weder Transkripte noch mutp53-Proteine konnten detektiert werden (Tabelle 4). RT-PCR, Immunpräzipitationen, Western-Blot und Immunmarkierungen blieben ohne einen Nachweis von mutp53.

Verpaarungen mit einer SV40 T Antigen (T-Ag) transgenen BALB/c *WAP-T* Mauslinie (Schulze-Garg *et al.*, 2000) führte zu bi-transgenen Tieren mit den beiden Transgenen *WAP-mutp53^{R270H}* und *WAP-T*. Bi-transgene *WAP-mutp53^{R270H}* x *WAP-T* Weibchen wurden durch Verpaarung und anschließende Schwangerschaft induziert und am Tag 4 der Laktation präpariert.

RT-PCR Analysen ergaben eine mammaspezifische mutp53-Re-Expression in einem bi-transgenen Tier (Abb. 25 A), während in parentalen mono-transgenen Tieren mutp53 nicht exprimiert wurde. Auch SV40 T Antigen wurde mammaspezifisch in bi-transgenen *WAP-mutp53^{R270H}* x *WAP-T* Tieren exprimiert (Abb. 25 B).

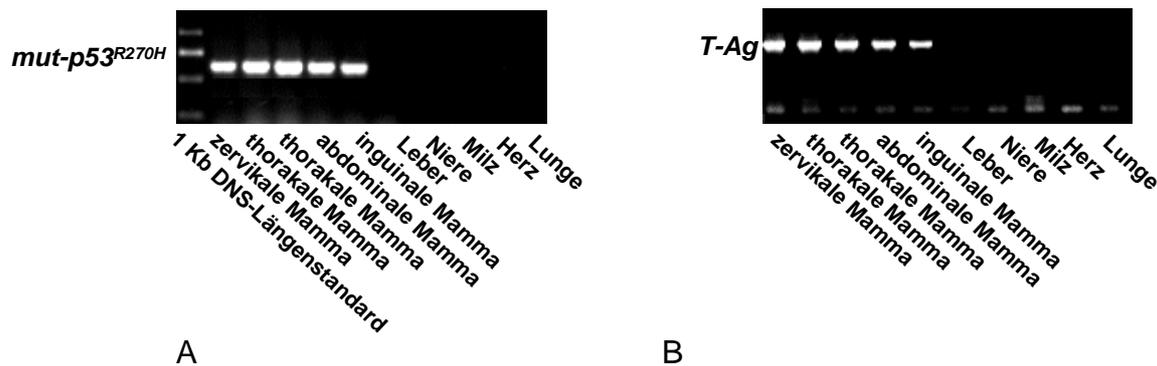


Abb. 25: RT-PCR von murinem, laktierendem, bi-transgenem *WAP-mutp53^{R270H}* x *WAP-T*, Mammagewebe

A: *mutp53* RT-PCR.

B: *T-Ag* RT-PCR.

1 % TAE-Agarosegelelektrophorese, 10 µl PCR-Amplifikat pro Geltasche.

A: *mutp53* transgen-spezifische PCR durchgeführt mit Primern komplementär zu *p53* Exon VI und zu *mutp53* im HA-Tag. Spuren von links nach rechts: 1Kb DNS-Längenstandard (500 ng) PCR-Amplifikate entsprechend dem Ausgangsmaterial für die zervikale, beide thorakalen, die abdominale und inguinale Mamma, sowie für Leber, Niere, Milz, Herz, Lunge. Eine 628 Bp Bande ist ausschließlich in Präparationen aus Mammagewebe vorhanden.

B: *T-Ag* transgen-spezifische PCR durchgeführt mit Primern komplementär zu SV40 T-Ag. Spuren von links nach rechts: PCR-Amplifikate entsprechend dem Ausgangsmaterial für die zervikale, beide thorakalen, die abdominale und inguinale Mamma, sowie für Leber, Niere, Milz, Herz, Lunge. Eine 2120 Bp Bande ist ausschließlich in Präparationen aus Mammagewebe vorhanden.

Immunhistochemisch konnten beide Transgene spezifisch in Mammaepithelzellen nachgewiesen werden. Eine Ko-Lokalisierung von mutp53 und T-Ag wurde anhand von Immunfluoreszenzmarkierungen untersucht (Abb. 26).

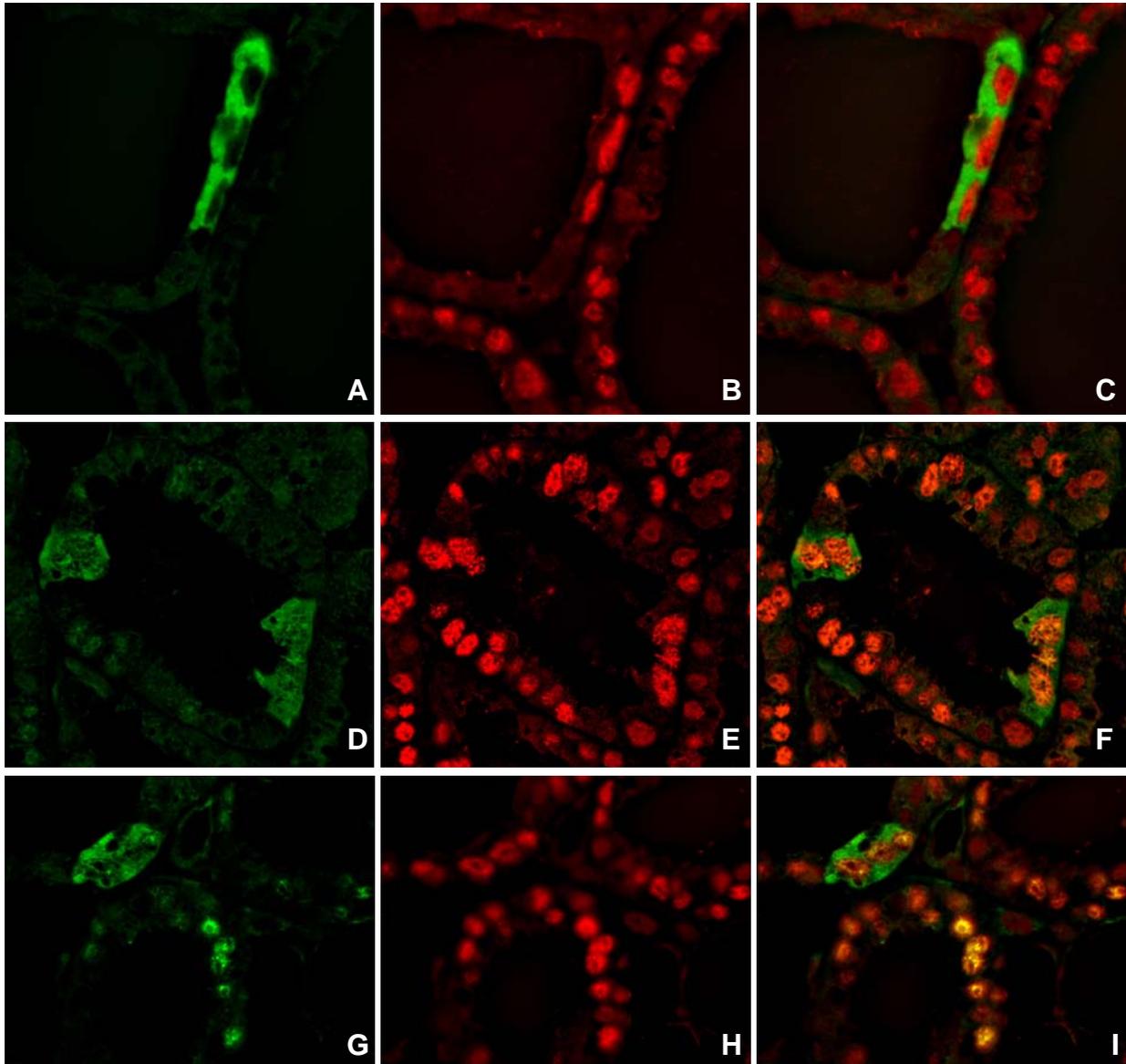


Abb. 26: Immun-Doppel-Markierung von murinem, laktierendem, bi-transgenem *WAP-mutp53^{R270H} x WAP-T*, Mammagewebe

A, D, G: mutp53^{R270H}, Kaninchen anti-HA-Tag Antikörper, (grün);
 B, E, H: T-Ag, Meerschweinchen anti-T-Ag Antikörper, (rot);
 C, F, I: Ko-Lokalisierung von mutp53^{R270H} und T-Ag in Mammaepithelzellen

T-Ag war in ca. 80% der Mammaepithelzellen im Nukleus lokalisiert, während mutp53^{R270H} gleichzeitig sowohl im Zytoplasma und im Nukleus als auch in jedem Kompartiment einzeln in ca. 2% der T-Ag exprimierenden Zellen vorhanden war.

Wie *in vitro* (Kapitel 2.5.1) so führte auch *in vivo* die gleichzeitige T-Ag Expression zu einer Expression von mutp53 in einem geringen Prozentsatz (ca. 1%) der Mammaepithelzellen.

Die *WAP-T* x *CB6-22* bi-transgenen Tiere sind schwer zu züchten, da die Weibchen anscheinend Schwierigkeiten haben, die Jungen zu säugen. Diese sterben, bevor sie von einer Amme ernährt werden können. Probleme, die Jungen zu säugen, sind ebenfalls von den parentalen *WAP-T* Mäusen bekannt. Allerdings können diese den ersten Wurf groß ziehen. Zu Schwierigkeiten kommt es erst bei den folgenden Würfen, weshalb ein Züchterhalt mit transgenen Männchen durchgeführt werden muss. Die Ursache hierfür sind sich schnell entwickelnde pathologische Veränderungen des Drüsengewebes (Schulze-Garg *et al.*, 2000).

Das Langzeitverhalten dreier weiterer *WAP-T* x *CB6-22* bi-transgenen Weibchen wurde in einer Dauerverpaarungs-Situation beobachtet. Sehr auffällig erschienen auch hier die Schwierigkeiten beim Säugen der Nachkommen. Ein bi-transgenes Weibchen konnte zwei Würfe gebären, aber davon nur den ersten Wurf großziehen. Zwei weitere bitransgene Weibchen konnten trotz vermehrten Verpaarungen nur jeweils einen Wurf austragen. Von diesen konnte ein Tier die Nachkommen säugen und großziehen, während das zweite Tier seine Nachkommen nicht großziehen konnte. Nach einem Zeitraum von acht Monaten entwickelten alle drei Tiere Mammakarzinome, wobei das Tier, das seinen einzigen Wurf nicht großziehen konnte, wesentlich größere, sichtbare (0,6-0,8 cm im Durchmesser) Tumore zeigte, als das andere (0,1-0,4 cm im Durchmesser), das seinen Wurf aufzuziehen vermochte. Das Tier mit zwei Würfen besaß einen makroskopisch sichtbaren Tumor von 0,4 cm. Bei der Präparation dieser Tiere fiel auf, dass alle Mammdrüsen viele kleine, makroskopisch sichtbare Knötchen (0,5-1 mm) aufwiesen.

Histologische und immunhistologische Untersuchungen des Mammagewebes zeigten unterschiedliche Stadien der Tumorentwicklung, von *ductalem Carcinoma in situ* (*DCIS*) bis hin zu invasiven Karzinomen (Abb. 27 A). Dabei war ganz besonders die Verteilung mutp53-immunmarkierter (HA-Tag⁺) Tumorzellen auffällig. In ausgedehnten und invasiven Karzinomen sind 80% oder mehr der Tumorzellen mutp53-positiv, während in sogenannten intraepithelialen Neoplasien oder *DCIS*-Strukturen keine oder eine geringe mutp53-Expression von ca. 1-2% zu beobachten war (Abb. 27 B). SV40 T-Ag (Abb. 27 D) und entsprechend wtp53 (Abb. 27 C) waren dagegen global in allen Arten von malignen Tumoren lokalisiert. Wie in mono-transgenen *WAP-T* Tieren beobachtet (Schulze-Garg *et al.*, 2000), konnte auch in diesen bi-transgenen Tieren die Tumorprogression in einem invasiven Karzinom unabhängig von T-Ag-Expression werden, so dass die Immunfärbung mit der Tumor-Progression abnahm. Hinsichtlich der p53-Immunmarkierung der invasiven Karzinome ist zu bedenken, dass auch mutp53 zur intensiven Immunfärbung des Karzinoms neben wtp53 beiträgt.

Es war auffällig, dass mutp53 offensichtlich bevorzugt in sehr weit fortgeschrittenen Tumoren exprimiert wurde. Hier könnte eventuell ein erster *in vivo* Hinweis vorlie-

gen, dass mutp53 T-Ag transformierten Zellen einen Wachstumsvorteil verleiht. Sie könnten dadurch einen Selektionsvorteil gegenüber nicht mutp53 exprimierenden Zellen haben.

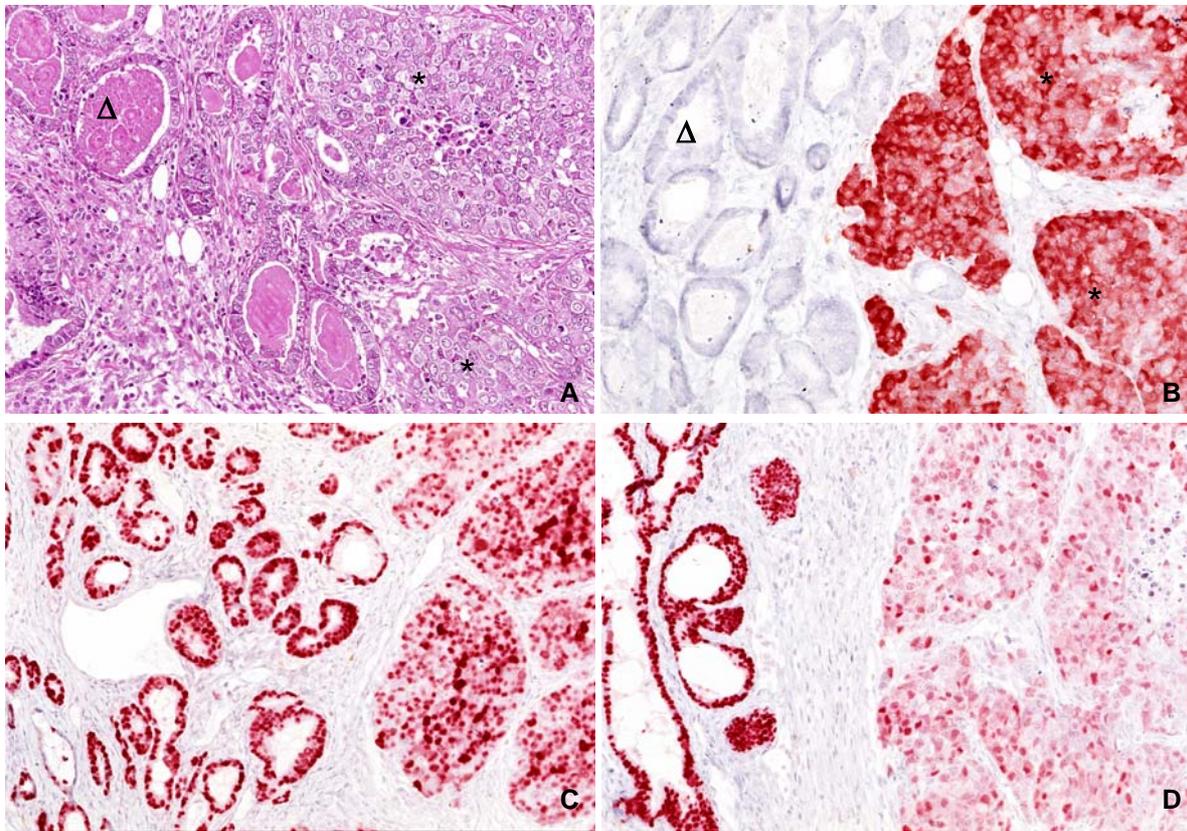


Abb. 27: Histopathologie und Immunhistologie von murinem Mammagewebe einer bi-transgenen $WAP-mutp53^{R270H}$ x WAP-T Linie

A: Rechts im Bild ist ein invasives Adenokarzinom (*) der murinen Mamma abgebildet, während in der linken Hälfte vorwiegend *in situ* Karzinome (Δ) dargestellt sind H&E.

B: Die HA-Tag – Immunmarkierung zeigt eine starke mutp53-Expression in dem invasivem Adenokarzinom (*), während der Bereich mit *in situ* Karzinomen negativ bleibt.

C+D: Die p53- (C) und T-Ag- (D) Immunmarkierung finden sich im Gegensatz zu HA-Tag (B) Darstellung sowohl in intraepithelialen Neoplasien wie in *in situ* Karzinomen.

Vergrößerung: A-D: x 100.

Es wurde ebenfalls die niedrig exprimierende Linie CB6-4 (*WAP-mutp53^{R245W}*) mit WAP-T verpaart. Am Tag vier post partum zeigten sich bei einem bi-transgenen Weibchen keine morphologischen Veränderungen. In diesem Fall konnte die mutp53-Expression durch die Ko-Expression von T-Ag nicht gesteigert werden. Nach drei Würfen entwickelten sich makroskopisch feststellbare Tumore.

In diesem bi-transgenen Tier entwickelten sich große aggressiv wachsende Adenokarzinome in der Brustdrüse (Abb. 28 A) neben intraepithelialen Neoplasien (DCIS) (Abb. 28 B). Auch hier war die Verteilung von mutp53-Proteinen sehr auffällig. Wie in der zuvor beschriebenen transgenen Linie wurde mutp53 mit Hilfe einer HA-Tag-Immunmarkierung detektiert. In Adenokarzinomen (Abb. 28 C) konnte eine generelle Immunmarkierung der Tumorzellen festgestellt werden, während DCIS-Strukturen nur zu einem sehr geringen Prozentsatz eine HA-Tag-Immunmarkierung zeigten (Abb. 28 D). Auch hier fiel auf, dass die mutp53-Expression vorzugsweise in den invasiven Adenokarzinomen erfolgte.

Wtp53 (Abb. 28 E) und T-Ag (Abb. 28 F) wurden in DCIS-Strukturen und in Adenokarzinomen detektiert.

Bei der mikroskopischen Untersuchung dieser Mammakarzinome fiel auf, dass im Gegensatz zur Situation bei den mono-transgenen WAP-T Linien ein Eindringen der Tumore in das Blut (Vene) – und Lymph – Gefäßsystem zu beobachten war.

Zusammengefasst könnte man aufgrund dieser Hinweise mit Vorbehalt schließen, dass Tumor -Differenzierung und -Progredienz durch mutp53 gefördert werden.

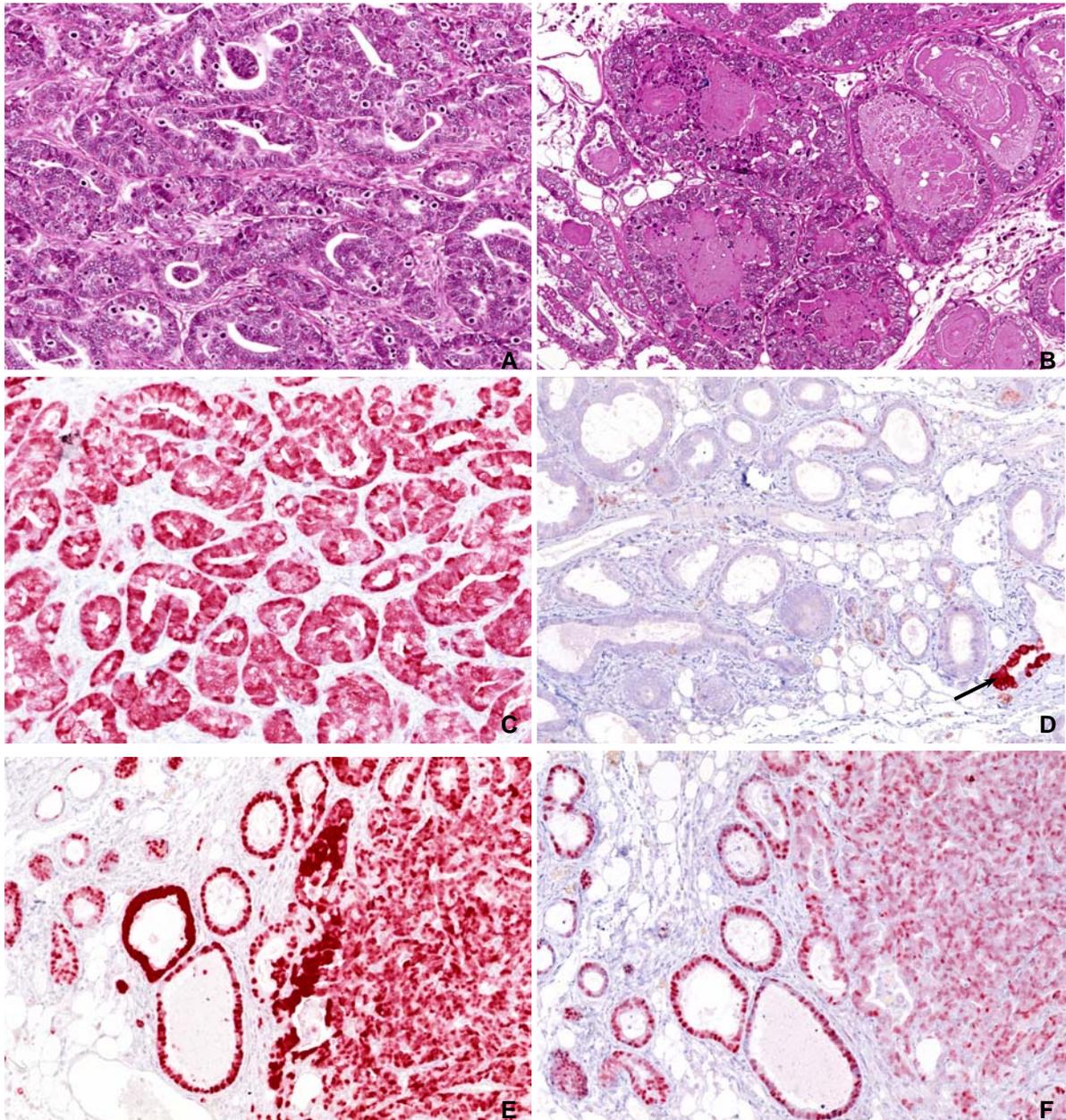


Abb. 28: Histopathologie und Immunhistologie von murinem Mammagewebe einer bi-transgenen $WAP-mutp53^{R245W}$ x $WAP-T$ Linie

A: Invasives, tubuläres Adenokarzinom der murinen Mamma mit einem hohen Kerngrading Index. H&E

B: Intraepitheliale Neoplasien und DCIS-Strukturen der murinen Mamma. H&E

C: Globale HA-Tag-Immunmarkierung im invasiven, tubulären Adenokarzinom der murinen Mamma.

D: Geringe HA-Tag-Immunmarkierung in intraepithelialen Neoplasien und DCIS-Strukturen der murinen Mamma (Pfeil).

E+F: Die p53- (E) und T-Ag- (F) Immunmarkierung finden sich im Gegensatz zur HA-Tag (C) Darstellung sowohl in intraepithelialen Neoplasien wie in in situ Karzinomen.

Vergrößerung: A-F: x 100.

3. Diskussion

In 50-60% aller Malignome des Menschen werden Mutationen im Gen des Tumorsuppressors *p53* gefunden. 90% dieser Mutationen sind Missense-Punktmutationen, die hauptsächlich in der zentralen DNS-Bindungs-Domäne des *p53*-Moleküls liegen und zur Expression eines *p53*-Proteins mit einem einzigen Aminosäure-Austausch führen (*mutp53*). Das spezifische *p53*-Mutationsspektrum, das sich durch überproportional häufige Hot-Spot-Punktmutationen auszeichnet, impliziert, dass während der Tumorentstehung und Tumorprogression auf genau diese Mutationen selektiert wird und sie den Tumorzellen somit einen selektiven Wachstumsvorteil verleihen. Durch bestimmte *p53*-Mutationen wird nicht nur die Tumorsuppressor-Aktivität des *wtp53*-Proteins ausgeschaltet (*loss of function*), sondern werden auch neue biochemische Aktivitäten (*gain of function*) hinzugewonnen. Sowohl aufgrund von *in vitro* Daten als auch aufgrund statistischer Korrelationsanalysen von Tumor-Datenbanken werden *mutp53*-Proteinen dominant-onkogene Eigenschaften zugeschrieben. Für das Mammakarzinom wurde gezeigt, dass die Expression bestimmter *mutp53*-Proteine mit einer schlechteren Prognose korreliert. Dabei gibt es Unterschiede zwischen einzelnen Punktmutationen (Hernandez-Boussard *et al.*, 1999). Mutations-Studien für das Mammakarzinom zeigen eine signifikante Abnahme der Überlebensrate in Abhängigkeit von bestimmten *p53*-Mutanten (Borresen-Dale 2003). Diesen Beobachtungen zu Folge scheint *mutp53* onkogenes Potential zu besitzen, welches die Tumorprogression fördert.

Um das postulierte onkogene Potential in einem experimentellen Ansatz zu testen, wurde in dieser Arbeit ein transgenes, induzierbares *mutp53*-Mausmodell generiert. Die Expression von mutierten *p53*-Proteinen wird in diesen transgenen Tieren spezifisch in Mammaepithelzellen induziert, um die Auswirkungen von *p53*-Mutationen am Beispiel der Tumorigenese eines Mammakarzinoms zu analysieren.

3.1 WAP-*mutp53* Maus-Modell

Die molekulargenetisch veränderten Tiere tragen als Transgen chimäre murine *p53*-DNS, die an Positionen äquivalent zu humanen Hot-Spot-Punktmutationen mutiert sind. Die Verwendung von chimärer *p53*-DNS, bestehend aus genomischer DNS und einem geringen Anteil cDNS ermöglicht eine effiziente Expression des Transgens, da in Intronsequenzen regulatorische Bereiche vorhanden sind (Brinster *et al.*, 1988), (Palmiter *et al.*, 1991).

In diesem Modell wurde unter der Kontrolle des *whey acidic protein (WAP)*-Promotors das Transgen nach laktotropher Hormoninduktion spezifisch in Epithelzellen des Mammagewebes exprimiert.

Das *WAP-mutp53* Transgen-Konstrukt wurde in den Pronukleus von CB6-F1 Zygoten mikroinjiziert. Die Zygoten wurden von pseudoschwangeren Mäusen ausgetragen und so 32 potentielle Ursprungstiere generiert. Die Effizienz der Transgen-Herstellung lag je nach Mikroinjektionsexperiment zwischen 5 und 33% und befand sich somit im Rahmen der in der Literatur beschriebenen 5-20% transgener Neugeborener nach einem Mikroinjektions-Experiment (Hirabayashi *et al.*, 2001). Das Transgen integrierte theoretisch größtenteils nicht im Ein-Zell-Stadium, sondern lag wahrscheinlich über einige Zellteilungen hinweg episomal als Ringstruktur aus Transgen-Konkatemeren vor und integrierte zu einem späteren Zeitpunkt, so dass nicht alle Zellen eines transgenen Ursprungstieres das Transgen enthielten. 72% (23 von 32) der potentiellen, transgenen *WAP-mutp53* Ursprungstiere gaben das Transgen an ihre Nachkommen weiter, was bei einer Pronukleus-Mikroinjektion der allgemein üblichen Keimbahnintegration von 70% entspricht (Bondioli and Wall, 1998).

Transkriptions-Analysen der 23 transgenen Maus-Linien zeigten, dass zehn Linien *mutp53* spezifisch im Mammagewebe exprimierten, sowie vier Linien schwach zusätzlich in den Nieren, bzw. im Herzen. Acht der *mutp53*-transgenen-Maus-Linien exprimierten das Transgen *mutp53* gar nicht und eine Linie exprimierte *mutp53* ubiquitär in zehn unterschiedlichen Geweben.

Dieses heterogene Transkriptionsmuster könnte auf einen Positionseffekt des Transgens zurückzuführen sein. Integrierte die Transgen-DNS beispielsweise in der Nähe von Enhancer-Elementen, so könnten diese Bereiche einen stärkeren Einfluss auf die Transgen-Expression haben als der vorgeschaltete *WAP*-Promotor. Dadurch könnte es zu einer induktions-unabhängigen, verstärkten ubiquitären Expression kommen. Dies könnte eventuell der Fall bei der Linie CB6-W5 sein, wobei der genaue Mechanismus dieser ubiquitären Expression nicht geklärt ist. Eine solche ubiquitäre Transgen-Expression wurde auch bei SV40 T-Antigen transgenen *WAP-T* Tieren beobachtet, wobei die Linie *WAP-T3* ein Bellinigung-Karzinom der Niere sowie Osteosarkome im Felsenbein der Schädelbasis und Gliadysplasien des Hirnstamms entwickelt (Löhler, nicht publizierte Daten).

Andererseits könnte die Transgen-DNS auch in nicht transkribierte Bereiche oder in Bereiche, die unter dem Einfluss von *gene-silencern* stehen, integriert haben, so dass möglicherweise jegliche Transkription unterdrückt wird.

Die immunhistologischen Analysen der generierten transgenen *WAP-mutp53* Maus-Linien zeigten große quantitative Unterschiede in der *mutp53*-Expression. Zwei der *WAP-mutp53*^{R245W} und vier der *WAP-mutp53*^{R270H} transgenen Linien exprimieren in nur wenigen Zellen *mutp53*, während zwei der *WAP-mutp53*^{R245W} und eine der *WAP-*

mutp53^{R270H} transgenen Linien in 30-60% und drei der *WAP-mutp53*^{R245W} und zwei der *WAP-mutp53*^{R270H} transgenen Linien in über 90% der Mammaepithelzellen mutp53-positiv sind.

Die Analysen der *WAP-mutp53* exprimierenden transgenen Maus-Linien zeigten aber auch, dass die mutp53-Expression größtenteils entsprechend der hormon-abhängigen Aktivität des *WAP*-Promotor erfolgte.

3.2 Einfluss epigenetischer Faktoren auf die Transgen-Expression

Die unterschiedliche mutp53-Expression könnte auf eine epigenetische Regulation zurückzuführen sein. Die lokale Chromatinstruktur kann entscheidenden Einfluss auf die Transkription besitzen. Veränderungen in der Chromatinstruktur können entweder durch *Chromatin-Remodeling Faktoren* hervorgerufen werden oder durch Chromatin-Auflockerung aufgrund der Integration großer Transgen-Konkatemere in die DNS. Die durch Integration hervorgerufenen Chromatin-Veränderungen ermöglichen eine Transgen-Expression, die von Chromatinstruktur beeinflussenden Faktoren unabhängig ist. Dies könnte bei den hoch exprimierenden transgenen *WAP-mutp53* Maus-Linien der Fall sein. Sie zeigen eine induktions-abhängige Transgen-Expression spezifisch in mehr als 90% der Mammaepithelzellen.

Da aber die Transgen-Integration innerhalb einer Linie identisch ist, beeinflussen wahrscheinlich unterschiedliche epigenetische Mechanismen in jeder einzelnen Zelle die Transgen-Expression. Allgemein wird die Transkription oder Repression von Genen während des Zellzyklus und der Differenzierung durch die Aktivität verschiedener *Chromatin-Remodeling Faktoren*, sowie durch Methylierungs- und Demethylierungsereignisse kontrolliert. Diese verändern die lokale Chromatinstruktur und ermöglichen oder unterdrücken über Interaktion mit Transkriptions-Faktoren und/oder Repressoren, die Transkription.

Im Genom von Säugetieren findet eine DNS-Methylierung nur an Cytosinen an sogenannten CpG-Dinukleotiden statt (Bird 2002). Diese Dinukleotide sind statistisch unterrepräsentiert. Sie werden aber als sogenannte CpG-Inseln gehäuft in proximalen Promotor-Regionen über eine Länge von 0,5-4 Kb gefunden und liegen im allgemeinen in Zellen nicht-methyliert vor (Takai and Jones 2002). Die Hypermethylierung von Promotor-Regionen wird in vielen humanen Neoplasien gefunden und ist assoziiert mit einer transkriptionellen Inaktivierung bestimmter Gene (Baylin *et al.*, 2000), (Jones *et al.*, 1999).

Diese Transkriptions-Inaktivierung wurde durch Zellkultur-Experimente mit mutp53 stabil transfizierten, murinen, p53-defizienten 10-1 Zellen bestätigt. Aufgrund der Plasmid-Integration in die Chromatinstruktur unterlag mutp53 der epigenetischen

Kontrolle der Genexpression. Erst Versuche, die zur Inhibierung der *de novo* DNS-Methylierung durch 5'-Azacytidin-Behandlung führten, resultierten in einer mutp53-Expression, welche anscheinend zuvor durch Methylierung unterbunden wurde. Diese Inhibierung der *de novo* DNS-Methylierung des Chromatins bewirkte eventuell globale Chromatinstruktur-Veränderungen, so dass eine regulierte Chromatin-Modulation die mutp53-Expression nicht mehr "unterdrücken" konnte. Daher konnte mutp53 von einem episomal vorliegenden Plasmid, das nicht ins Genom integriert war und nicht einer epigenetischen Kontrolle unterlag, transient exprimiert werden, während seine Expression nach Integration des mutp53-Plasmids abgeschaltet wurde.

Die DNS-Methylierung scheint ein dominantes Ereignis zu sein, das die Transkription verhindert. An methylierte CpG-Inseln binden Methyl-Cytosin-Bindungs-Proteine (MBPs) in einem Komplex mit Histon-Deacetylasen (HDACs). Aufgrund deacetylierter Histone liegen die Nucleosomen in komprimierter Form vor, so dass Transkriptionsaktivator-Komplexe bestehend aus Transkriptions-Faktoren, Ko-Aktivator-Proteinen und Histon-Acetyltransferasen keinen Zugang zur DNS haben (Jones 2002). Es wurde gezeigt, dass die Inhibierung der HDAC-Aktivität durch potente und spezifische Drogen wie Trichostatin (TSA) allein nicht ausreicht, um Gene zu transkribieren. Erst nach Inhibierung der *de novo* DNS-Methylierung durch 5'-Azacytidin-Behandlung, kann eine Gen-Expression durch TSA reaktiviert werden (Cameron *et al.*, 1999). Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass mutp53 nach Trichostatin-Behandlung in mit mutp53 stabil transfizierten murinen 10-1 Zellen ebenfalls nur in einem Teil der Zellen exprimiert werden kann.

Durch *Chromatin-Remodeling* kann pRb als ein entscheidender Faktor die Transkription während des Zellzyklus und der Differenzierung beeinflussen (Zhang and Dean 2001). Die spezifische Rekrutierung von Histon-Acetylasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs), sowie der DNS-Methyltransferase I (DNMT1) während des Zellzyklus und der Differenzierung durch pRb und pRb-verwandte Pocketproteine ist bekannt, ebenfalls deren Interaktion mit ATP-abhängigen SWI/SNF *Chromatin-Remodeling-Mechanismen*. Vermutet wird, dass pRb und seine Verwandten über solche Interaktionen Kontrolle über die Progression von Zellen durch den Zellzyklus und die Zelldifferenzierung ausübt (Ferreira *et al.*, 2001).

Unabhängig vom möglichen Mechanismus und einer möglichen Rolle des Retinoblastoma-Proteins, unterstützen diese Daten die Hypothese, dass die Expression von mutp53 mit der Physiologie einer „normalen“ Zelle interferiert.

Neben der entscheidenden Rolle der Chromatinstruktur auf eine Genexpression besitzt der verwendete Promotor wichtige regulatorische Elemente, die eine mutp53-Expression beeinflussen könnten.

Der *whey acidic protein (WAP)*-Promotor wird nicht nur durch einen einzelnen Transkriptions-Faktor reguliert, sondern durch kooperative Funktionen verschiedener Faktoren. Die Bindung und Interaktion verschiedener Transkriptions-Faktoren resultiert in Veränderungen der Chromatinstruktur und damit in einer Gen-Expression (Rosen *et al.*, 1996). Hormone können auch durch eine Veränderung der Chromatinstruktur ebenfalls die Gen-Expression beeinflussen. Dabei besitzen Glucocorticoide einen entscheidenden Einfluss auf die *WAP* Gen-Expression. Mehrere Glucocorticoid-Rezeptor-Bindungsstellen befinden sich in der distalen Region des *WAP*-Promotors und haben sich als entscheidend für die Gen-Expression in transgenen Tieren gezeigt. Eine Bindung von Glucocorticoid-Rezeptoren an diese Elemente resultiert in Steroidhormon abhängigen Veränderungen in der Chromatinstruktur (Li and Rosen 1994).

Der negative Einfluss der Chromatinstruktur auf eine *WAP*-Transgen-Expression kann vor allem durch Isolierung des Transgens und durch Verlängerung der regulatorischen Promotorsequenzen aufgehoben werden. Die Verwendung von *matrix attachment regions* (MARs) des aviären Lysozym-Gens führte zu einer mammaspezifischen *WAP*-Transgen-Expression in sieben von neun getesteten Maus-Linien, während dies ohne die MAR-Sequenzen in nur einer von 17 getesteten Linien der Fall war (McKnight *et al.*, 1996). MAR-Sequenzen isolieren aber nicht nur das Transgen von einem Positionseffekt, sondern sind beispielsweise in der 5'-Region des *WAP*-Gens vorhanden und enthalten zell-spezifische und nicht zell-spezifische HSSs (hypersensitive Stellen) (Razin *et al.*, 1999). HSSs sind wichtige regulatorische Elemente in DNS-Domänen, die hypersensitiv auf milde DNase-I-Behandlung reagieren (Krnacik *et al.*, 1995), (Whitelaw and Webster 1998). Ihre Präsenz variiert während der Entwicklung und reflektiert die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren (Montoliu 2002). Hormone binden in der Umgebung der HSS-Regionen und bewirken Änderungen in der Chromatinstruktur, die zur Bindung von Transkriptions-Faktoren führen. So ist beispielsweise HSS2 im *WAP*-Gen nach dem Absetzen der Nachkommen nicht mehr detektierbar und korreliert somit mit dem Abschalten der *WAP*-Genexpression (Millot *et al.*, 2003).

Große genomische Sequenzen (z.B. BAC, PAC oder YAC) garantieren meist eine starke positions-unabhängige Expression von heterologen Konstrukten in transgenen Tieren (Giraldo and Montoliu 2001).

Zusammenfassend zeigen all diese Daten, dass der *WAP*-Promotor sowie die *WAP-mutp53*-Expression stark durch die Chromatinstruktur und durch die Chromatinstruktur regulierenden Faktoren wie pRb, Methylasen, Demethylasen, Histon-Acetylasen sowie Histon-Deacetylasen individuell in den einzelnen Zellen reguliert wird. Jede Zelle eines Organismus ist zwar mit der gleichen genetischen Information ausgestattet, kann aber durch epigenetische Regulation aufgrund unterschiedlicher intra- und

extra-zellulärer Faktoren individuell die Gen-Expression beeinflussen. Dies könnte eventuell die Ursache der niedrig-gradigen (1-2%) und der mittel-gradigen (30-60%) mutp53-Expression sein.

Eine solche Regulation in einzelnen alveolaren Mammaepithelzellen zeigte sich in einem asynchronen Expressionsmuster, welches von lokalen Modifizierungen wie z.B. durch Wachstumsfaktoren, der extrazellulären Matrix oder von Genprodukten der einzelnen Zellen abhängt (Robinson *et al.*, 1995). Dieses asynchrone Expressionsmuster spiegelt sich besonders in niedrig und mittelgradig exprimierenden *WAP-mutp53* Maus-Linien wider. Jede Mammaepithelzelle scheint die mutp53-Expression trotz der gleichen Grundausstattung auf eine andere Art zu regulieren.

Auffällig erschien bei Zellkultur-Experimenten die Beobachtung, dass mutp53 nicht in minimal transformierten Zellen, wohl aber in Tumorzellen (wtp53^{-/-}, pRb^{-/-}) oder in T-Antigen transformierten Zellen (wtp53^{-/-}, pRb^{-/-}) exprimiert werden konnte. Die mutp53-Expression scheint in normalen Zellen unterdrückt zu sein, so dass erst funktionelle Veränderungen, wie beispielsweise das Ausschalten der Tumorsuppressoren p53 und pRb, eine mutp53-Expression erlauben. Diese Interpretation stimmt mit der Beobachtung überein, dass Mutationen im *p53*-Gen kein initiales Ereignis in der Entstehung eines Tumors sind, sondern eher im Verlauf einer Tumorphase auftreten. Der Expression von mutp53 müssen demnach zelluläre Veränderungen vorausgehen, die diese Expression erst ermöglichen.

3.3 Auswirkungen einer *WAP*-Promotor Aktivität während der Embryogenese

Einige Beobachtungen deuteten auf eine Selektion gegen eine mutp53-Expression hin. Dies war beispielweise in Zellkultur-Experimenten stabil integrierter mutp53-Plasmide, sowie in der relativ großen Zahl verstorbener Embryonen nach Mikroinjektions-Experimenten und in der auffällig geringen Zahl transgener Weibchen in zwei Linien der Fall. Bei Mikroinjektions-Experimenten ist allerdings ein Sterben aufgrund der generellen Mikroinjektionsprozedur nicht auszuschließen. Microarrays während der murinen Gastrulation (persönl. Mitteilung, Morkel, M.; MDC Berlin, Mai 2003) zeigten, dass Milchproteine α -, β - und γ -Casein, sowie das *whey acidic protein* für 12 Stunden am Tag 6,5-7 der Embryogenese exprimiert werden. Aus diesem Grund ist es sehr wahrscheinlich das auch Transgenkonstrukte unter der Kontrolle des *whey acidic protein (WAP)*-Promotors exprimiert werden. Daher könnte es sein, dass eventuell embryonal exprimiertes mutp53-Protein durch einen eventuell teratogenen Effekt zu einem Absterben der Embryonen in manchen Linien führt.

Indirekt wurde auch bei SV40 T-Antigen transgenen BALB/c *WAP-T* Maus-Linien eine Aktivität des *WAP*-Promotors während der Embryogenese beobachtet. Man

konnte zwar Antikörper gegen T-Antigen in *WAP-T* Tieren aber keine T-Zellen nachweisen, so dass T-Antigen während der T-Zell Reifung im Thymus präsentiert worden sein muss. Diese partielle Toleranz (*split tolerance*) führte dazu, dass transplantierte, intraperitoneal wachsende mKSA-Tumore nicht abgestoßen wurden (Löhler, Deppert, nicht publizierte Daten). Demgegenüber induzierte eine Immunisierung durch subkutane Injektion von SV40-Virus in BALB/c-Mäusen eine schützende Immunantwort gegen transplantierte, intraperitoneal wachsende mKSA-Tumore (Zerrahn *et al.*, 1996). Die Aktivität des *WAP*-Promotors während der Embryogenese könnte also zu einer *mutp53*-Expression führen, welches eventuell negative Auswirkungen auf den Embryo hat.

3.4 Induktions-unabhängige *mutp53*-Expression

Auffällig war bei der niedrig exprimierenden Linie CB6-W4, dass fokal in vereinzelt Alveoli die Zahl der exprimierenden Mammaepithelzellen mit jeder Schwangerschaft ansteigt. Eventuell blieben im Verlauf der Involution präferentiell epitheliale Vorläuferzellen zurück, die die Fähigkeit, bzw. die entsprechenden regulatorischen Mechanismen besitzen *mutp53* zu exprimieren. Nach erneuter Schwangerschaft waren fokal verstärkt *mutp53* exprimierende Mammaepithelzellen in manchen *terminal ductulo lobulären units* (TDLU) nachzuweisen. Dieses Verhalten konnte bis jetzt noch nicht bei anderen Linien beobachtet werden, zumal man bisher einen derartigen Effekt nur in niedrig und mittelgradig exprimierenden Linien erkennen kann, da die hoch exprimierenden Linien ohnehin in mehr als 95% der Mammaepithelzellen *mutp53* exprimieren.

In einer Langzeitstudie (15 Monate) eines transgenen, niedrig exprimierenden Weibchens der Linie CB6-W4 konnten 10 Monate nach dem zweiten Wurf fokal verstärkt *mutp53* positive Mammaepithelzellen der TDLU's immunmarkiert werden. Die *mutp53*-Expression ist in diesem Fall anscheinend induktions-unabhängig geworden. Eventuell beeinflusst *mutp53* an dieser Stelle seine eigene Expression, indem es mit MAR/SAR DNS-Elementen interagiert. Aufgrund ihrer Eigenschaft, zelluläre Chromatinschlaufen topologisch abzugrenzen, bilden S/MAR-Elemente die strukturelle Basis für eine räumlich und zeitlich unabhängige Expression und Replikation dieser Chromatinschlaufen. Über einen solchen Regulationsmechanismus höherer Ordnung könnte eine Kontrolle so komplizierter Prozesse wie Entwicklung und Differenzierung ermöglicht werden (Berezney 1991), (Boulikas 1995), (Gasser and Laemmli 1987), (Herbomel 1990). Aufgrund der spezifischen Interaktion von *mutp53* mit BUR-Elementen (Base Unpairing Region), die Bestandteile von S/MAR-Elementen sind, könnte *mutp53* an der „Öffnung“ von Chromatinschlaufen, und damit an deren

transkriptioneller bzw. replikativer Aktivierung beteiligt sein (Deppert 2000). Diese Aktivität könnte einer pRb-, DMNT- oder HAT-kontrollierten Regulation der Chromatinstruktur entgegenwirken, so dass p53 eventuell autoregulatorisch seine eigene Genexpression beeinflusst.

Eine induktions-unabhängige Transgen-Expression nach mindestens einmaliger Induktion wurde ebenfalls in *WAP-T* transgenen Tieren beobachtet (Schulze-Garg *et al.*, 2000). SV40 T-Antigen wird nach erfolgter Induktion kontinuierlich in Mammaepithelzellen und der sich daraus aufgrund der T-Antigen-Expression entwickelnden Tumorzellen induktions-unabhängig exprimiert.

3.5 Morphologische Auffälligkeiten einer *WAP-mutp53^{R245W}* Linie

Die mittelgradig exprimierende Linie CB6-W1 zeigte bisher als einzige Linie morphologische Veränderungen mit einem irregulären Muster der laktierenden Acini. Das sekretorisch aktive Drüsenepithel war hyperplastisch, teilweise mehrschichtig oder mikropapillär gestaltet. Nach erfolgter Involution zeigte das Drüsenepithel keine morphologischen Abweichungen von einer nicht-transgenen Maus, während aber die mutp53-Expression persistierte.

Die deutlichen morphologischen Veränderungen im laktierenden Mammagewebe und die persistierende mutp53-Expression nach erfolgter Involution lassen sich eventuell auf einen durch mutp53-Proteine hergerufenen Effekt zurückzuführen. Eventuell interferiert mutp53 mit der Regulation des epithelialen Wachstums, so dass abnorme Wachstumsmuster entstehen. Andererseits könnte aber auch ein entscheidendes Gen durch Insertions-Mutagenese aufgrund der Transgen-Insertion ausgeschaltet worden sein.

Als zusätzlicher Effekt könnten sich auch Mutationen im *Cdkn2a* Gen-Lokus auf den Phänotyp auswirken. Der genetische Hintergrund der *WAP-mutp53* Tiere basiert auf BALB/c-Mäusen, die Punktmutationen im *Cdkn2a* Gen-Lokus im Exon 1 α und im Exon 2 tragen. Alternatives Spleißen führt zu den Gen-Produkten der Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p16^{INK4a} (Exon 1 α Exon 2) und p19^{ARF} (Exon 1 und 2). Daraus folgt, dass ein nicht effizientes oder nicht funktionelles p16 Allel in BALB/c Mäusen eine Hyperphosphorylierung von pRb durch Cdk4/Cdk6 nicht mehr inhibieren kann. Dies könnte zu einer unkontrollierten Zell-Proliferation führen. Diese Punktmutationen in einem *Cdkn2a*-Allel wurden erstmals bei BALB/cAn Tieren beschrieben, die gehäuft Plasmozytome entwickelten (Zhang *et al.*, 1998).

In diesen Zellen treffen mehrere Ereignisse zusammen. P16 und p19 sind mutiert, SV40 T-Antigen wird nach Induktion exprimiert. T-Antigen bindet und inaktiviert funktionell die Tumorsuppressor-Funktionen von wtp53 und die Zell-Zyklus-Regulation

sowie die *Chromatin-Remodeling-Funktionen* der pRb-Familie. Zusätzlich zu diesen Effekten wird mutp53 exprimiert und könnte seine potentiell onkogene Wirkung entfalten.

3.6 Bi-Transgene *WAP-mutp53* x *WAP-T*

Zelluläre Netzwerke können durch virale Proteine wie beispielsweise das SV40 Virus große T-Antigen ausgeschaltet werden, indem T-Antigen pRb und wtp53 komplexiert und deren Aktivität damit funktionell inaktiviert. Mutp53 wird demgegenüber nicht von T-Antigen gebunden oder funktionell inaktiviert. Die Auswirkungen einer funktionellen Eliminierung von wtp53 und pRb wurde *in vivo* in T-Antigen transgenen BALB/c *WAP-T* Tieren untersucht. Sie tragen die frühe Gen-Region des SV40 Virus, kodierend für das große T- und das kleine t-Antigen, unter der Kontrolle *des whey acidic protein (WAP)*-Promotors. Nach Induktion durch laktotrophe Hormone wird das T-Antigen spezifisch in Mammaepithelzellen exprimiert. Unterschiedliche *WAP-T* Mauslinien entwickeln nach charakteristischen Latenzzeiten *ductale Karzinome in situ* und schließlich Mammakarzinome (Schulze-Garg *et al.*, 2000).

Erste Verpaarungen einer nicht exprimierenden *WAP-mutp53* Linie (CB6-22) mit einer *WAP-T* transgenen Linie resultierten in bi-transgenen Weibchen. In diesen bi-transgenen *WAP-mutp53* x *WAP-T* Weibchen ermöglichte anscheinend das T-Antigen eine mutp53-Expression, die in der entsprechenden parentalen mono-transgenen Ursprungslinie nicht stattfand. Die mutp53-Expression korrelierte nach der ersten Induktion quantitativ allerdings nicht mit der T-Antigen-Expression. 1-2% der Mammaepithelzellen waren mutp53-positiv, während 80% der Mammaepithelzellen T-Antigen-positiv waren. Dies Bild änderte sich grundlegend in T-Antigen induzierten Mammakarzinomen dieser bi-transgenen Tiere. Sie zeigten einen deutlich veränderten Phänotyp zu mono-transgenen parentalen Tieren mit einer bevorzugten mutp53-Expression in invasiven Adenokarzinomen der Mamma. Intraepitheliale Neoplasien sowie DCIS-Strukturen zeigten eine geringe mutp53-Expression von ca. 1-2%, während weit fortgeschrittene invasive Adenokarzinome der Brustdrüse in 80% und mehr der Tumorzellen mutp53-positiv waren. Die Expressions-Regulation war anscheinend soweit beeinflusst, dass mutp53 induktions-unabhängig exprimiert wurde. Die durch T-Antigen hervorgerufene genomische Instabilität in einem weitfortgeschrittenen Tumorstadium ermöglichten anscheinend eine mutp53-Expression, während die Veränderungen in frühen intraepithelialen Neoplasien nicht ausreichten, um mutp53 zu exprimieren. T-Antigen könnte einerseits durch Bindung an pRb mit der pRb-kontrollierten Zellzyklus-Regulation interferieren. Andererseits könnte T-Antigen auch mit der pRb-kontrollierten Gen-Expressions-Regulation interferieren, wobei pRb

an einer Interaktion mit *Chromatin-Remodelling*-Faktoren gehindert würde. Eine mutp53-Expression aufgrund einer T-Antigen-Koexpression konnte bereits in Zellkultur-Experimenten gezeigt werden. Im Gegensatz zum Mammagewebe und beispielweise primären Zellen haben sich in einer Zell-Linie aufgrund der Immortalisierung mehrere genetische Veränderungen angehäuft, die dort eine mutp53-Expression erlaubten. Daher reichte wahrscheinlich der Einfluss von T-Antigen in frühen Neoplasien der bi-transgenen Tiere nicht aus, so dass erst eine Vielzahl von Veränderungen zu einer mutp53-Expression führte. T-Antigen induzierte Veränderungen ermöglichten anscheinend eine mutp53-Expression, die wiederum mutp53 positiven Tumorzellen eventuell einen Wachstumsvorteil gegenüber mutp53 negativen Tumorzellen verliehen. Dieser Wachstumsvorteil könnte eventuell ein erster *in vivo* Hinweis auf das onkogene Potential von mutiertem p53 sein.

Die Beobachtungen in bi-transgenen Tieren spiegeln genau die humane Situation wieder. Beim Menschen tritt eine Mutation im *p53* erst während der späten Tumorprogression nach Anhäufung genetischer Veränderungen auf. Also eher in Adenokarzinomen als frühen Neoplasien. Genau dieses Phänomen mit einer späten Mutation im *p53*, bzw. mit einer späten Expression von mutp53-Proteinen wurden in bi-transgenen *WAP-mutp53* x *WAP-T* Tieren gezeigt. Mono-transgene *WAP-mutp53* Tiere entwickelten sich ohne pathologische Auffälligkeiten. Erst in bi-transgenen *WAP-mutp53* x *WAP-T* Tieren exprimierten sehr wenige Mammaepithelzellen in frühen Neoplasien mutp53. Demgegenüber exprimierten beinahe alle Tumorzellen der Adenokarzinome mutp53. Durch die histopathologischen Ähnlichkeiten des murinen und humanen Tumorgewebes und vor allem durch dieses beobachtete mutp53-Expressionsmuster kommt dieses bi-transgene Maus-Modell der humanen Mamma-Tumorprogression sehr nahe. Daher eignen sich diese bi-transgenen Linien hervorragend den Einfluss von p53-Mutanten auf die Tumorprogression im murinen Mammagewebe molekular zu untersuchen. Neue daraus resultierende Erkenntnisse sollen in humanem Mammagewebe verifiziert werden, um sie für die Prognose einsetzen zu können.

3.7 FVB *WAP-mutp53^{R172H}* transgene Maus-Linie

Untersuchungen einer FVB *WAP-mutp53^{R172H}* Maus-Linie haben gezeigt, dass diese Linie ohne zusätzlichen onkogene Stimuli kein Mammakarzinom entwickelt. Es entstehen in mono-transgenen Tieren erst nach DMBA-Behandlung Mammakarzinome, die schneller wachsen und aggressiver sind als bei FVB Kontroll-Tieren (Li *et al.*, 1998). Diese Linie wurde mit unterschiedlichen transgenen Tieren verpaart, *MMTV-neu* (erb-B2) (Li *et al.*, 1997), *WAP-des-IGF-1* (Hadsell 1997) oder *mit WAP-TGF α* . In

bi-transgenen Tieren findet meist eine schnellere Tumorentwicklung statt, als in den entsprechenden mono-transgenen Tieren. Darüber hinaus sind diese Tumore im Gegensatz zu denen der mono-transgenen Tiere häufig aneuploid (Murphy and Rosen 2000).

Möglicherweise entwickeln auch die BALB/c *WAP-mutp53* Tiere spontan keine Tumore, ebenso wie die FVB *WAP-mutp53^{R172H}* Linie. Das Auftreten und Manifestieren von Mutationen im Tumorsuppressor p53 ist häufig ein eher spätes Ereignis in humanen Tumoren. Dies wird dadurch unterstützt, dass anscheinend bisher noch unbekannte zelluläre Mechanismen einer mutp53-Expression entgegen wirken. Diese Problematik konnte sowohl in Zellkultur-Experimenten wie auch in einem heterogenen Expressionsmuster der transgenen *WAP-mutp53* Mäuse beobachtet werden. Für eine endgültige Aussage über die Tumorprogression in *WAP-mutp53* Mäusen ist bislang der Beobachtungszeitraum zu kurz. Im Unterschied zu dem FVB-Stamm zeichnet sich der BALB/c-Stamm durch eine Mutation im *Cdkn2a* Gen-Lokus und vor allem durch eine Prädisposition für die Entwicklung von Mammakarzinomen aus. Diese zusätzlichen Punkte könnten dann eventuell dazu führen, dass sich Mammakarzinome in BALB/c *WAP-mutp53* Tieren spontan nach einer mutp53-Expression entwickeln.

3.8 Eliminierung der wtp53-Funktion durch SV40 T-Antigen

SV40 T-Antigen kann durch Bindung an pRb und wtp53, nicht aber mutp53, deren Tumorsuppressor-Aktivität inhibieren. Durch Kreuzung mit BALB/c *WAP-T* Tieren werden in bi-transgenen *WAP-mutp53* x *WAP-T* Tieren die Tumorsuppressoren pRb und wtp53 funktionell inhibiert (siehe 3.6).

Neben der bereits durchgeführten Kreuzung mit nicht und niedrig exprimierenden *WAP-mutp53* Tieren (siehe 2.5.2) sollen bi-transgene Tiere mit mittelgradig exprimierenden *WAP-mutp53^{R245W}* Linien wie CB6-W1, CB6-W15 und der *WAP-mutp53^{R270H}* Linie CB6-H12 generiert werden. Dabei soll untersucht werden, ob auch hier T-Antigen zu einer gesteigerten (von bisher 20-50% auf >90%) mutp53-Expression in Mammaepithelzellen führt und wie sich eine mutp53-Expression auf eine T-Antigen induzierte Tumorprogression in der Brustdrüse auswirkt.

3.9 Eliminierung der wtp53-Funktion in BALB/c p53+/- Tieren

Die Auswirkungen der Eliminierung der p53 wt-Funktionen in BALB/c *WAP-mutp53* Tieren soll auf die Entstehung und Progression von Mammakarzinomen untersucht werden. Zu diesem Zweck werden die BALB/c *WAP-mutp53* Tiere mit BALB/c p53+/- Tieren (Donehower *et al.*, 1992) verpaart. Heterozygote BALB/c p53+/- Tiere entwickeln nach acht bis vierzehn Monaten zu ca. 40% Mammakarzinome, in denen sie das zweite *p53*-Allel verlieren (Kuperwasser *et al.*, 2000). Homozygote BALB/c p53-/- Tiere sterben so schnell an Lymphomen und Sarkomen, dass sich ein Mammakarzinom bis dahin nicht entwickeln kann. In heterozygoten BALB/c p53+/- x *WAP-mutp53* Tieren kann der Einfluss von mutp53-Proteinen auf die Mammakarzinom-Entwicklung analysiert werden. Für Verpaarungen mit BALB/c p53+/- eignen sich besonders die hoch-exprimierenden *WAP-mutp53^{R245W}* Linien CB6-W10, CB6-W12 und die *WAP-mutp53^{R270H}* Linien CB6-H3, CB6-H8. Da fast jede Mammapithelzelle mutp53 exprimiert und wtp53 heterozygot ist.

3.10 Modellsystem zur Analyse einer Mammakarzinogenese

In dieser Arbeit sind *WAP-mutp53* mammaspezifisch exprimierende transgene Maus-Linien hergestellt worden, die eventuell erste Hinweise auf das onkogene Potential von mutp53 in bi-transgenen (*WAP-mutp53* x *WAP-T*) Tieren geben. Diese Linien dienen als Basis, dass postulierte onkogene Potential von mutp53 in zukünftigen Studien detailliert zu untersuchen, so dass die aus Tumordatenbanken statistisch abgeleiteten Korrelationen zwischen einer bestimmten Hot-Spot-Punktmutationen und der klinischen Prognose im Bezug auf die R245W und die R270H p53-Mutationen verifiziert werden können. Gemessen wird die „Aggressivität“ der einzelnen Mutation an phänotypischen Faktoren, wie Tumorinzidenz, Latenzzeit, Tumorgad, Invasivität, Auftreten von Tumorzellen im Blut- und Lymphgefäß-System und metastatisches Potential. Auf molekularer Ebene könnten durch Gen-Expressionsanalysen Einflüsse von mutp53 analysiert werden, um bestimmte Expressionsprofile unterschiedlichen Verlaufsformen zuzuordnen. Dies könnte gegebenenfalls zu einer Definition molekularer Marker führen, die für verschiedene Verlaufsformen des Mammakarzinoms in Abhängigkeit von der Expression bestimmter mutp53-Proteine charakteristisch sind. Nach Verifizierung identifizierter Marker in humanen Tumoren, könnten diese eventuell zu einer verbesserten Diagnose bei humanen Mammakarzinomen führen.

Besonders wichtig für neue Therapieformen zur Behandlung humaner Mammakarzinome ist das testen neuer Präparate und Applikationen in *in vivo* Modellen, um nicht

nur den Einfluss auf isolierte Tumorzellen, sondern auf den Gesamtorganismus und damit die Verträglichkeit zu testen.

Diese mutp53-Modelle könnten so einen entscheidenden Beitrag leisten, um die Prognose und Therapie humaner Mammakarzinome voranzutreiben.

4. Material

4.1 Mammalia

Die Maus-Haltung und Maus-Zucht finden ausschließlich unter spezifisch pathogen freien SPF-Bedingungen statt. Folgende Mausstämme wurden verwendet:

BALB/c (Jackson SPF-Tierhaltung, USA)

C57BL/6 (Jackson SPF-Tierhaltung, USA)

CB6F1 die erste Generation aus einer BALB/c x C57BL/6 Verpaarung

BALB/c p53+/- (Jacks *et al.*, 1994)

BALB/c WAP-T: transgene SV40 T Antigen exprimierende Tiere (Schulze-Garg *et al.*, 2000)

BALB/c J WAP-mutp53^{R172H} Stock 2026 (Li *et al.*, 1998)

4.2 Eukaryotische Zellen

10-1	BALB/c p53 defiziente Maus-Embryofibroblasten-Zell-Linie [Harvey, 1991 #540]
Meth A	Methylcholantren-transformierte BALB/c 3T3 Maus-Fibroblasten (De Leo <i>et al.</i> , 1977)
FR3	Amino-terminales SV40 T Antigen Fragment (T ₁₋₁₄₇) exprimierende F111 Ratten-Zell-Linie (Zerrahn <i>et al.</i> , 1993)
COS-1	CV-1 Zell-Linie, die mit einer Mutante von SV40 transformiert wurde, deren SV40-Replikationsursprung eine 6 Bp Deletion besitzt (Gulzman, 1981); CV-1 ist eine SV40 permissive Affenienzell-Linie der Afrikanischen Grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiopicus</i>).
Saos-2	humane primäre Osteosarkom-Zell-Linie; p53-/-; pRb-/- (Fogh <i>et al.</i> , 1975)
Hela	humane Zell-Linie aus einem Epithelkarzinom der Cervix (Gey <i>et al.</i> , 1952)

4.3 Prokaryotische Zellen

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNS wurden folgende Bakterien-Stämme verwendet:

E.coli DH5 α	Genotyp: <i>endA1 hsdR17</i> (r_k-m_k+) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA</i> (Nal ^r) <i>relA1 (lacIZYA-argF) U169 deoR (80dlac(lacZ)M15)</i> (Woodcock <i>et al.</i> , 1989)
E.coli GM2163	Methylierungs-defizienter (Dam ⁻ , Dcm ⁻) Bakterien-Stamm: Genotyp: F ⁻ <i>ara-14 leuB6 thi-1 fhu A31 lacY1 tsx78 galk2 galT22 supE44 hisG4 rps L136(Str^r) xyl-5 mtl-1 dam13::Tn9(Cam^r) dcm-6 mcrB1 hsd R2</i> (r_k-m_k+) <i>mcrA</i> (Woodcock <i>et al.</i> , 1989), (Palmer and Marinus 1994)
E.coli NM522 mutS	Reparatur-defizienter Bakterien-Stamm Genotyp: <i>thi-1 supE Δ(hsdMS-mcrB)5 Δ(lac-proAB) (mutS::Tn10)</i> <i>F'[proAB⁺ lac^r lacZΔM15]</i> , (Woodcock <i>et al.</i> , 1989)

4.4 Molekularbiologisches Material

4.4.1 Plasmide

pLTRp53cGwt	die chimaere, murine <i>p53</i> DNS (4,03 Kb) steht unter der Kontrolle des murinen Harvey Sarcoma Virus Promotors, Enhancers und der <i>cap sites</i> (retroviraler 5'LTR); kloniert in pBR322, (Eliyahu <i>et al.</i> , 1985)
pWAP-T	die frühe Genregion des SV40 Virus steht unter der Kontrolle des murinen <i>wey acidic protein</i> (WAP)-Promotors; kloniert in pUC18 (Tzeng <i>et al.</i> , 1993)
pUC18	Klonierungsvektor; GI: 209210
pCMV-Neo-Bam	eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV-Promotor, Ampicillin- und Neomycin-Resistenz zur Etablierung stabil exprimierender Zell-Linien (Baker <i>et al.</i> , 1990)
pCI-Neo	Eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV Promotor, Ampicillin- und Neomycin-Resistenz zur Etablierung stabil exprimierender Zell-Linien (Fu <i>et al.</i> , 1991)

4.4.2 Enzyme

Die aufgelisteten Enzyme wurden jeweils mit dem dazugehörigen Puffer verwendet.

Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Shrimp alkalische Phosphatase	Roche, Basel
Klenow Fragment	MBI Fermentas
T4-Ligase	Roche, Basel
<i>Taq</i> -DNS-Polymerase	Eppendorf, Hamburg
<i>Herkulase</i> TM -DNS-Polymerase	Stratagene, La Jolla
RNase A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNase I	RNase-frei Promega, Madison, USA
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hyaluronidase, Embryonen getestet	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

4.4.3 Antikörper

Folgende Antikörper wurden für Western-Blot Analysen und immunhistologische Methoden verwendet.

- anti-HA Polyklonal, Code-Nr.: 561, Kaninchen-Antiserum (Mo Bi Tec, Göttingen)
- anti-p53 polyklonal, Kaninchen-Antiserum (Arbeitsgruppe Prof. Deppert, HPI, Hamburg)
- anti-T-Ag polyklonal, Meerschweinchen-Antiserum gegen denaturiertes SV40 T-Antigen (Arbeitsgruppe Prof. Deppert, HPI, Hamburg)

Zur Detektion der primären Antikörper wurden folgende sekundäre Antikörper eingesetzt:

Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	Peroxidase gekoppelt (Biomol, Hamburg)
Ziege anti-Meerschweinchen IgG (H+L)	Peroxidase gekoppelt (Dianova, Hamburg)
Esel anti-Kaninchen IgG (H+L)	Cy TM 2-gekoppelt (Dianova, Hamburg)
Esel anti-Meerschweinchen IgG (H+L)	Cy TM 3-gekoppelt (Dianova, Hamburg)

4.4.4 Primer

Die für die Klonierungen, Mutagenesen, Sequenzierungen und die Genotypisierung benötigten Primer sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Primer

Primer	bp	Orien.	Tm	Mod.	GC %	Org.	Beschreibung	Einsatz in	Sequenz 5' - 3'
FKR 2	20	⇒	68	-	70	Maus	murines <i>p53</i> Exon XI; Pos.: 987-1006	Sequenzierung	987C cgc ggg cgt aaa cgc ttc g ₁₀₀₆
FKR 4	21	⇐	72	-	71	HA-Tag	letzten sechs Codons des HA-Tag (A Y D P V D)	Transgen-Identifizierung	ca ggc gta gtc ggg cac gtc g
FKR 6	26	⇐	88	5'-P	69	Maus	murines <i>p53</i> Exon V; Pos.: 525-501; p53 ^{R172H} Hot Spot Mutation: Pos. 515 G → A	Mutagenese	525g gtg ggg gca gTg tct cac gac ctc C ₅₀₁
FKR 7	26	⇒	88	5'-P	69	Maus	murines <i>p53</i> Exon V; Pos.: 501-525; p53 ^{R172H} Hot Spot Mutation: Pos. 515 G → A	Mutagenese	501g gag gtc gtg aga cAc tgc ccc cac C ₅₂₅
FKR 10	37	⇒	70	5'-P	62	Maus	<i>Sma</i> I Restriktionsschnittstelle, murines <i>p53</i> Exon II; Pos. 1-23	Klonierung	gct cag tag ccc' ggg a1tg act gcc atg gag gag tca C ₂₃
FKR 11	70	⇐	70	5'-P	60	Maus	<i>Eco</i> RI, <i>Bgl</i> II Restriktionsschnittstellen, stop codon , HA-tag (AYDPVDYPY), linker (GG), murines <i>p53</i> Exon XI; Pos.: 1170 – 1149	Mutagenese	g'aattc agat'ct tca ggc gta gtc ggg cac gtc gta ggg gta gcc gcc 1170gtc tga gtc agg ccc cac ttt C ₁₁₄₉
FKR 12	24	⇒	72	5'-P	50	Maus	murines <i>p53</i> Exon VI; Pos.: 578 – 601	<i>p53</i> Subklonierung	578gg gtg gaa gga aat ttg tat ccc g ₆₀₁
FKR 13	23	⇐	74	5'-P	61	Maus	murines <i>p53</i> Exon VI; Pos.: 661 – 639	<i>p53</i> Subklonierung	661c ggg tgg ctc ata agg tac cac C ₆₃₉
FKR 14	24	⇒	70	-	46	Maus	murines <i>p53</i> Exon IX; Pos.: 961 – 984	Transgen-Identifizierung	961gat gga gag tat ttc acc ctc aag ₉₈₄
FKR 16	23	⇒	68	-	48	Maus	murines <i>p53</i> Exon VIII; Pos.: 797 – 819; p53 ^{R270H} Hot Spot Mutation: Pos. 809 G → A	Mutagenese	797gc ttt gag gtt cAt gtt tgt gCC ₈₁₉
FKR 17	22	⇒	70	5'-P	59	Maus	murines <i>p53</i> Exon VII; Pos.: 724 – 745; p53 ^{R245W} Hot Spot Mutation: Pos. 733 C → T, 735 C → G	Mutagenese	724ggc atg aac TgG cga cct atc C ₇₄₅
FKR 18	28	⇐	88	5'-P	57	pUC18	Selektionsprimer im pUC18 Pos. 2192 – 2165 <i>Sca</i> I (agt'act) wird durch <i>Mlu</i> I (a'cgcgt) ersetzt	Mutagenese	2192gac ttg gtt g a'cgcgt ca cca gtc aca g ₂₁₆₅
<i>p53-Bgl</i> II	33	⇐	70	5' P	52	HA-Tag	<i>Bgl</i> II Restriktionsschnittstelle; Stop Codon ; 4 Aminosäuren des HA-Tags (AYDP)	Klonierung; Eliminierung der <i>Eco</i> RI Schnittstelle aus FKR11	gca cag ata ata gat'ct tca ggc gta gtc ggg c
<i>p53</i> -I2	20	⇐	57	-	50	Maus	murines <i>p53</i> Intron 2	Sequenzierung Exon II	gaa tct cac tta tcc cag gc
<i>WAP</i> ¹⁹⁵⁵	23	⇒	72	-	55	Maus	muriner <i>WAP</i> - Promoter, Start bei Pos. 1955	Transgen-Identifizierung	cca gga gaa gtc acc ctc aga tg
<i>p53</i> EIII	24	⇐	72	-	50	Maus	murines <i>p53</i> Exon III; Pos.: 103-84 und 6 Nukleotide aus Intron 2	Transgen-Identifizierung	103g gat atc ttc tgg agg aag t ₈₄ ctgg
<i>p53</i> I9	24	⇒	72	-	50	Maus	murines <i>p53</i> Intron 9	Transgen-Identifizierung	gta agt gga gcc agc tta agt tgg
<i>p53</i> EXI	23	⇐	72	-	55	Maus	murines <i>p53</i> Exon XI; Pos.: 1164 – 1142	Transgen-Identifizierung	1164gtc agg ccc cac ttt ctt gac ca ₁₁₄₂
<i>mp53-VIII</i>		⇐		-		Maus	murines <i>p53</i> Exon VIII; Pos. : 889-867	Identifizierung stabiler Klone	gcagttcagggcaaag-gactcc
oIMR 013	20	⇒	62	-	55	Maus	Neo-Kassette; Pos.: 3905-3924	Identifizierung p53+/, +/-, -/-	ctt ggg tgg aga ggc tat tc
oIMR 014	20	⇐	60	-	50	Maus	Neo-Kassette; Pos.: 4185-4165	Identifizierung p53+/, +/-, -/-	agg tga gat gac agg aga tc
oIMR 336	17	⇐	52	-	53	Maus	murines <i>p53</i> Exon VII ; Pos. : 743-727	Identifizierung p53+/, +/-, -/-	ata ggt cgg cgg ttc at

oIMR 337	20	⇒	62	-	55	Maus	murines <i>p53</i> Exon VI ; Pos. : 598-617	Identifizierung <i>p53</i> +/, +/-, -/-	ccc gag tat ctg gaa gac ag
AC	28	⇒	65	-	46	SV40	Pos. 3666 – 3692 im SV40 Genom, bzw. Pos. 1133 – 1160 in der SV40 early region im <i>WAP-T</i> Plasmid	Transgen-Identifizierung: <i>WAP-T</i>	³⁶⁶⁶ tat gtc agc aga gcc tgt aga acc aaa C ₃₆₉₂
DC	22	⇐	60	-	50	SV40	Pos. 4431 – 4410 im SV40 Genom, bzw. Pos. 1898 – 1877 in der SV40 early region im <i>WAP-T</i> Plasmid	Transgen-Identifizierung: <i>WAP-T</i>	⁴⁴³¹ gag aaa ggt aga aga ccc caa G ₄₄₁₀
LT-Stop	22	⇒	70	-	59	SV40	Position 2695 – 2716 im SV40 Genom	für RT-PCR	²⁶⁹⁵ gtt tca ggt tca ggg gga ggt G ₂₇₁₆
LT-Start	27	⇐	72	-	33	SV40	Position 5161 – 5135 im SV40 Genom	für RT-PCR	⁵¹⁶¹ gga taa agt ttt aaa cag aga gga atc ₅₁₃₅

Bp.: Anzahl der Basenpaare des aufgeführten Primers.

Orien.: Orientierung des aufgeführten Primers, vorwärtsgerichteter Primer (⇒), rückwärtsgerichteter Primer (⇐).

Tm: Schmelztemperatur des Primers.

Mod.: 5' Modifizierung des Primers.

GC %: prozentualer Anteil von Guanosin und Cytosin im Primer.

Org.: Organismus, aus dem die DNS-Sequenz des aufgeführten Primers stammt.

Pos.: Nukleotidposition im murinen *p53* Gen (Eliyahu *et al.*, 1985), bzw. im SV40 Genom.

WAP-T: Transgenkonstrukt: frühe SV40 Genregion, kodierend für das große T-Antigen und das kleine t-Antigen unter der Kontrolle des *whey acidic protein (WAP)*-Promotors.

4.4.5 Molekulargewicht-Standards

Für die Größenordnung bei der gelelektrophoretischen Auftrennung von DNS und Proteinen wurden folgende Molekulargewicht-Standards benutzt:

1 Kb DNS-Standard	1 Kilo Basen DNS-Marker, Gene Ruler; MBI Fermentas
100 Bp DNS-Standard	100 Basen DNS-Marker, Gene Ruler; MBI Fermentas
Protein-Standard	SDS-7B Prestained Mixture Sigma-Aldrich, Taufkirchen

4.5 Kits

Jetsorb DNS Gel Extraktionskit	Genomed, Bad Oeynhausen
Nucleobond AX	Macherey-Nagel, Düren
Mutagenese-Kit	Pharmacia, Freiburg
ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing	PE Biosystems, Weiterstadt
<i>in vitro</i> -Transkription-Kit	Promega, Mannheim
Kaninchen-Retikulozyten-Lysat System	Promega, Mannheim
Superfect Transfections Kit	Qiagen, Hilden
Genomic DNA from Tissue, NucleoSpin® Tissue	Macherey-Nagel, Düren
peqGOLD RNAPure™	PEQLAB, Erlangen
ThermoScript™ RT-PCR-System	Invitrogen, Paisley, GB
ECL Western Blotting Kit	Amersham, Braunschweig

4.6 Chemikalien

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

Hormone, Lösungen, Geräte für Mikroinjektionsexperimente

PMS: Gonadotropin from Pregnant Mares Serum, Embryonen getestet	50 U PMS/ml in 0,9% NaCl; Sigma-Aldrich, Taufkirchen
hCG: humanes Chorionic Gonadotropin, Embryonen getestet	50 U hCG/ml in 0,9% NaCl; Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaCl 0,9 % zur Injektion	UKE Apotheke
Ketaminhydroxylchlorid, 1:10 in NaCl; 10 µl/g Körpergewicht	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
M2 Medium, Embryonen getestet	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
M16 Medium, Embryonen getestet	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mineralöl, Embryonen getestet	Fluka Biochemika, Neu-Ulm
3-Aminopropyltriethoxysilan	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aspirator Tube Assembly	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Einmalmikropipetten	Blaubrand, Wertheim
Microloader	Eppendorf, Hamburg
Femtotips II	Eppendorf, Hamburg
Glass GC, Type Pronukleus	Bio Medical Instr.
Halte-Kapillaren	Eppendorf, Hamburg
Perma Hand Seide	Ethicon, USA
Elutip D	Schleicher & Schüll, Dassel
Tierohrknipser	Fischer Scientific, Schwerte
Dulbeccos Modified Eagles Medium	PAA Laboratories GmbH, Linz
10 % Fötales Kälberserum	Roche, Basel
PVDF-Membran	Immobilon TM -P, Millipore
Röntgenfilm	Biomax, Kodak

4.7 Medien, Puffer und Lösungen

Ampicillin-Stocklösung

100 mg/ml in H₂O (x1000)

bei -20°C lagern

Aprotinin (100x)

5 mg/ml in 50 % Glycerin

bei -20°C bis zu 6 Monate

Blockpuffer

5 % Magermilchpulver

gelöst in Waschpuffer

Chloroform/Isoamylalkohol

24 ml Chloroform

1 ml Isoamylalkohol

DNS Probenpuffer 10x

50 % Glycerin (v/v)

0,1 % Bromphenolblau

0,1 % Xylen-Cyanol (w/v)

0,1 M EDTA

0,1 % SDS

dNTP-Mix (50x)

0,5 mM dATP

0,5 mM dGTP

0,5 mM dCTP

0,5 mM dTTP

E1A-Puffer

50 mM HEPES

150 mM NaCl

0,1%NP-40 ; pH 7-7,5 ; sterilfiltrieren

E1A + PI (Proteinase-Inhibitoren)

E1A

+ 5 µg/ml Aprotinin

+ 5 µg/ml Leupeptin

+ 5 µg/ml Pepstatin A

+ 125 µg/ml Pefabloc[®] SC

ECL-Lösung 1

2,5 mM Luminol

400 µM p-Coumarinsäure

100 mM Tris-HCl, pH 8,5

ECL-Lösung 2

13 mM H₂O₂

100 mM Tris-HCl, pH 8,5

Einfriermedium

50 % FCS

0,5 % NaHCO₃

10 % DMSO in DMEM

Einbettungsmedium

5 % Polyvinylalkohol (25/140)

10 % Glycerin in PBS

EtBr-Färbelösung

1 mg/ml Ethidiumbromid

in H₂O, lichtgeschützt lagern

Formalin (saures)

4 % Formaldehyd

1 % Essigsäure

Formalin

4 % Formaldehyd

2 x HEBS

274 mM NaCl

10 mM KCl

1,4 mM Na₂HPO₄

12 mM Glukose

42 mM HEPES

pH 7,04 frisch angesetzt und sterilfiltriert

Hygromycin-Stammlösung

50 mg Hygromycin B in PBS

LB-Medium

10 g Bacto-Trypton

5 g Bacto-Yeast-Extrakt

10 g NaCl ad 1000 ml H₂O

pH 7,5; autoklaviert

LBA-Medium

0,01 % Ampicillin (w/v)

in LB-Medium

LBA-Kulturplatten

1,5 % Agar (w/v)

in LBA-Medium

Leupeptin (1000x)

5mg/ml in PBS und 50 % Glycerin (v/v)

bei -20°C bis zu 6 Monate haltbar

Neomycin-(G418)-Stammlösung

40 mg G418-Sulfat in PBS

Mikroinjektions-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,6

0,1 mM EDTA

PBS

140 mM NaCl

3 mM KCl

8 mM Na₂HPO₄

1,5 mM KH₂PO₄

pH-Wert einstellen auf pH 7,4

PBS-Tween

0,05 % (v/v) Tween-20 in PBS

PCI-Mix

25 ml Phenol (Tris-gesättigt)

24 ml Chloroform

1 ml Isoamylalkohol

Pefabloc (200x)

25 mg/ml in 50 % Glycerin (v/v)

bei -20°C bis zu 2 Monate haltbar

Pepstatin A (200x)

1 mg/ml in Methanol

bei -20°C bis zu 2 Monate

RNase A

10 mg/ml RNase A

in 10 mM Tris-HCl pH 7,5

15 mM NaCl

15 Min. Kochen

Lagerung bei -20°C

SDS-Sammelgel

125 mM Tris/HCl pH 6,8
4 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5/1)
0,1 % SDS
0,75 % APS (10 % w/v)
0,075 % TEMED

SDS-Laufpuffer

25 mM Tris
200 mM Glycin
0,1 % SDS

SDS-Probenpuffer (6x)

350 mM Tris/HCl, pH 6,8
10 % SDS (w/v)
0,6 M DTT
30 % Glycerol (v/v)
0,012 % BPB (w/v)

SDS-Probenpuffer (2x)

125 mM Tris/HCl pH 6,8
4 % SDS (w/v)
0,2 M DTT
20 % Glycerol (v/v)
0,001 % BPB (w/v)

SDS-Trenngel

375 mM Tris/HCl pH 8,8
8-11,5 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5/1)
0,1 % SDS
0,75 % APS (10 % w/v)
0,075 % TEMED

TAE (50x)

2 M Tris Base, pH 7,8
0,5 M NaAc
0,05 M EDTA

TBE-Puffer (1x)

89 mM Tris-HCl, pH 8,0
89 mM Borsäure
2 mM EDTA

TBS

20 mM Tris-HCl, pH 7,6
140 mM NaCl

TCM-Puffer

10 mM Tris-HCl, pH 7,6
10 mM CaCl₂
10 mM MgCl₂

TE-Puffer

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

TfB-I

100 mM RbCl
50 mM MnCl₂
10 mM CaCl₂
30 mM KAc
15 % Glyzerin (v/v)
pH 5,8 eingestellt mit
0,2 M HAc sterilfiltriert

TfB-II

10 mM MOPS
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂
15 % Glyzerin (v/v)
pH 7,0 eingestellt mit NaOH,
sterilfiltriert

ΨLB-Medium

LB-Medium +
10 mM MgSO₄
10 mM MgCl₂
pH 7,6 mit KOH

Transferpuffer

50 mM Tris, pH 8,3
192 mM Glycin

Trypsin/EDTA-Lösung:

50 mM EDTA, pH 8,0
0,1 % Trypsin in PBS

TSC-Puffer (5x)

200 mM Tris/HCl, pH 7,5
30 mM MgCl₂
50 mM NaCl
10 mM Spermidin

Waschpuffer

0,2 % Tween 20 gelöst in TBS

5. Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Prokaryotische Zellen

Stammerhaltung von *E.coli*-Bakterien

Zur Langzeitlagerung von *E.coli*-Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden 4 ml LB-Medium mit 100 µl einer ÜNK angeimpft und bei 37°C als Schüttelkultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 angezogen. Dies entsprach der frühen logarithmischen Wachstumsphase. 800 µl Aliquots dieser Kultur wurden dann mit 200 µl steril-filtrierte Glyzerin (83 % v/v) versetzt und bei -70°C gelagert.

Transformationskompetente Bakterienzellen

Kompetente Bakterienzellen zeichnen sich dadurch aus, dass ihre Zellwand durchlässig für DNS-Moleküle ist, die im Verlauf der Transformation in die Zellen eingeschleust wurden. Dies kann durch eine Behandlung mit Rubidium-Chlorid erreicht werden (Hanahan 1983).

100 ml ΨLB-Medium wurden mit 1 ml einer ÜNK in LB-Medium des jeweiligen Bakterienstammes angeimpft und bei 37°C als Schüttelkultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Die Zellen wurden sedimentiert (Sorvall/SS34, 3000 Upm, 10 Min., RT), in 30 ml TfB I resuspendiert und 30 Min. bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Sediment in 5 ml TfB II resuspendiert. Die Suspension wurde 15 Min. bei 4°C inkubiert. 100 µl Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

Transformation kompetenter Bakterienzellen

Die bei -70°C gelagerten kompetenten Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut. 100 ng Plasmid-DNS (bzw. 10 - 20 µl eines Ligationsansatzes) wurden mit vorgekühltem TCM-Puffer auf 40 µl verdünnt, zu 100 µl kompetenten Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Während einer Inkubationszeit von 45 Min. auf Eis adsorbierte die DNS an die Bakterien. Anschließend wurden die Zellen für 60 Sek. auf 42°C erhitzt. Der Hitzeschock diente der erleichterten Aufnahme der DNS durch die Bakterien. Dem Ansatz wurde anschließend 1 ml LB-Medium zugefügt und dieser für 1 h bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit wurde die plasmidkodierte Antibiotikaresistenz exprimiert, die den Bakterien ein Wachstum auf Antibiotikanährböden ermöglicht. Die Zellen wurden sedimentiert (Mikrozentrifuge, 14000 Upm, 2 Sek.) und der Überstand

wurde bis auf 100 µl verworfen. In diesem Volumen wurden die Zellen resuspendiert und mit einem sterilen Drygalski-Spaltel auf einer LB-Platte, mit entsprechendem Antibiotikum, ausgestrichen. Kolonien transformierter Bakterien wurden nach einer Inkubationszeit von ca. 15 h bei 37°C sichtbar (Kaiser und Hogness, 1960). Einzelne Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und zur Vermehrung in neues Medium überführt.

5.1.2 Eukaryotische Zellen

5.1.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zell-Linien

Eukaryotische Zell-Linien wurden in Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) mit 10 % FCS unter 5 % CO₂ bei 37°C kultiviert. Etwa alle zwei Tage wurden die subkonfluent gewachsenen Kulturen passagiert. Hierfür wurden die adhärenenten Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml vorgewärmter Trypsin/EDTA-Lösung etwa drei Minuten bei 37°C inkubiert bis sich die Zellen vom Boden der Kulturschale ablösten. Sie wurden in einer Zentrifuge 5 Min. bei RT sedimentiert und in frischem Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen 1:10 verdünnt in frischem, vorgewärmtem Medium ausgesät.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum langfristigen Aufbewahren wurden Zellen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, in flüssigem Stickstoff eingefroren. $1 \cdot 10^6$ Zellen einer subkonfluent bewachsenen Kulturschale wurden abtrypsinisiert und in 10 ml Kulturmedium gewaschen und pelletiert (IEC-Zentrifuge, 2000 Upm, 2Min., RT). Das Zellpräzipitat wurde in 1,5 ml Einfriermedium resuspendiert und in vorgekühlte Kryoröhrchen auf Eis gegeben, da das Frostschutzmittel DMSO toxisch wirkt. Anschließend wurden die Einfrieröhrchen schrittweise in flüssigen Stickstoff abgesenkt. Zum Auftauen wurden die Proben schnell auf 37°C erwärmt, die Zellen einmal in 10 ml warmem Medium gewaschen und in frischem Medium in Kulturschalen ausgesät.

Ernte von eukaryotischen adhärenenten Zellen

Nach Entfernen des Kulturmediums wurde der Zellrasen zweimal mit kaltem PBS gewaschen, mit Hilfe eines Gummischabers abgekratzt und die Zellsuspension in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden 10 Min. bei 800 Upm in einer Kühlzentrifuge (Eppendorf) präzipitiert und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

5.1.2.2 Etablierung und Kultivierung von Primär-Zellkulturen

Primäre Maus-Embryo-Fibroblasten wurden aus 13,5-15,5 Tage jungen Embryonen etabliert. Schwangere Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und dorsal mit 70 % Ethanol desinfiziert (5.2.3 Zygoten Präparation). Weitere Arbeiten erfolgten unter einer sterilen Werkbank in der SPF-Tierhaltung. Entlang eines kleinen lateralen Schnittes (gestrichelte Linie) wurde die Haut zurückgezogen (Abb. 30 A). Der Peritonealschnitt erfolgte entlang der gestrichelten Linie (Abb 30 B). Nach Freilegen des Uterus wurden die Embryonen präpariert. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Präparationsbesteck frei von Ethanol war, da sich dieses negativ auf die Embryonen auswirkt. Die Embryonen wurden 2-3 x in PBS gespült. Der Kopf und der Schwanz wurden für eine Genotypisierung abgetrennt. Leber, Milz, Niere, Herz, Lunge wurden entfernt und verworfen. Der Embryo wurde in 300 µl 0,1 x TE in einer Vertiefung einer 24 Loch-Platte resuspendiert. Um Kontaminierungen zu vermeiden, wurde für jeden einzelnen Embryo desinfiziertes Präparierbesteck sowie frisches PBS verwendet. Diese Zell-Suspensionen wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde zu jeder Probe 200 µl 1x TE hinzugegeben und 30 Min. bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml DMEM und 10% FCS wurden sie nochmals resuspendiert und je ein Embryo auf eine 9 cm Platte ausgesät. Die primären MEFs wurden für weitere zwei bis drei Passagen in DMEM mit 10% FCS kultiviert. Die Zellen einer Platte wurden dann in einem Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Jeder Embryo wurde direkt nach Präparation genotypisiert und zur Verifizierung des Genotyps vor dem Einfrieren nochmals genotypisiert. Die hier verwendeten Embryonen stammten aus einer BALB/c p53+/- x BALB/c p53+/- Zucht.

Die PCR-Reaktion wurde in einem Volumen von 25 µl unter folgenden Bedingungen durchgeführt: PCR-Puffer (1x), dNTPMix (0,2 mM), Primer Mix: 2 µM (oIMR013, oIMR014, oIMR336, oIMR337), *Taq* DNS-Polymerase (0,02 U/µl). Das PCR-Programm wurde für die Reaktionen optimiert: Initiale Denaturierung (30 Sek., 94°C), 35 Zyklen: Denaturierung (40 Sek., 92°C), Annealing (30 Sek., 56 °C), Elongation (50 Sek., 72°C), eine abschließende Elongation (5 Min., 72°C).

Der Genotyp p53+/+ zeigt sich im Auftreten einer 600 Bp Bande, p53+/- resultiert in einer 600 Bp und einer 280 Bp Bande, während p53-/- in einer 280 Bp resultiert.

5.1.2.3 Transiente und stabile Transfektion eukaryotischer Zellen

Transiente Transfektion

$1 \cdot 10^5$ Zellen wurden in Zellkulturschalen (\varnothing 6 cm) ausgesät und über Nacht kultiviert, damit sie zum Zeitpunkt der Transfektion im logarithmischen Wachstum waren. 2 μ g der zu transfizierenden zirkulären DNS wurden in 100 μ l serumfreiem DMEM aufgenommen und mit 20 μ l Superfect Reagenz versetzt. Die Lösung wurde gut gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich Komplexe zwischen DNS und Superfect ausbilden konnten. Währenddessen wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die DNS/Superfect Komplexe wurden in 600 μ l Kulturmedium verdünnt und die Zellen damit überschichtet. Nach zwei Stunden Inkubation wurden die Komplexe entfernt und die Zellen in Kulturmedium für 24 h kultiviert. Anschließend könnten die Zellen geerntet und für weitere Versuche verwendet werden.

Transfektion mit Kalzium-Phosphat (Chen and Okayama 1988)

10 μ g Vektor DNS wurden mit 2,5 Vol. EtOH und 0,1 Vol. 3 M NaAc, pH 5,5 bei -20°C durch Zentrifugation (14000 Upm, 30 Min., 4°C) präzipitiert, mit 70% EtOH gewaschen, 30 Min. unter der Sterilwerkbank getrocknet, in 438 μ l 10 mM Tris-HCl, pH 7,6 gelöst und mit 62 μ l 2 M CaCl_2 versetzt. Zu dieser Lösung wurden langsam 500 μ l 2xHEBS zugetropft. Diese Lösung wurde 30 Min. bei RT inkubiert, um die Ausformung von Ca_3PO_4 -DNS Präzipitaten zu erlauben, die anschließend in den Zellkulturüberstand gegeben wurden. Nach 6-12 stündiger Inkubationszeit wurde das Medium erneuert.

Diese Methode erwies sich bei der stabilen Transfektion der 10-1 Zellen als die effizienteste.

Etablierung stabil-transfizierter Zell-Linien

Zwei Tage nach Kalzium-Phosphat-Transfektion wurden die Zellen 1:10 auf 10 cm-Gewebekulturschalen ausgesät. Einen weiteren Tag später wurde die Selektion der transfizierten Zellen begonnen, indem dem Kulturmedium G418, ein Antibiotikum vom Kanamycin-Typ oder G418 und Hygromycin zugesetzt wurde. Die Konzentration richtete sich nach der jeweils transfizierten Zell-Linie. Alle zwei Tage wurde das Selektionsmedium erneuert. Wenn auf den untransfizierten Kontrollschalen alle Zellen gestorben waren, konnte mit einer Einzel-Zell-Selektion zur Etablierung stabil transfizierter Zell-Linien begonnen werden.

Stabil transfizierte Zell-Linien wurden durch PCR-Amplifizierung von exogenen DNS-Fragmenten in den zuvor p53-defizienten Zell-Linien charakterisiert.

Die Reaktion fand in einem Volumen von 20 μ l unter folgenden Bedingungen statt: PCR-Puffer (1x), dNTPMix (0,2 mM), Primer 1 (0,5 μ M) (FKR7), Primer 2 (0,5 μ M)

(*mp53-VIII*), *Taq* DNS-Polymerase (0,02 U/ μ l). Das PCR-Programm wurde für die Reaktionen optimiert: Initiale Denaturierung (2 Min, 92°C), 30 Zyklen: Denaturierung (30 Sek., 92°C), Annealing (30 Sek., 66 °C), Elongation (1 Min., 10 Sek., 72°C), abschließende Elongation (5 Min., 72°C).

5.1.2.4 5'-Azacytidin-Behandlung eukaryotischer Zell-Linien

5'-Azacytidin leitet sich von dem Nukleotid Cytidin ab. 5'-Azacytidin kann allerdings am N-5 nicht von einer Methyltransferase methyliert werden. Der Einbau in die neu-synthetisierte DNS hat eine Änderung des Methylierungsmusters zu Folge, bzw. führt schließlich zu einer nicht methylierten DNS. Stabil transfizierte Klone wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von 5'-Azacytidin (0,5 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 5 μ M und 10 μ M) behandelt.

Die Zellen wurden einen Tag vor der Behandlung auf Deckgläschen ausgesät und über Nacht unter Standard-Bedingungen in Kultur gehalten. Am nächsten Tag wurde dem Medium die entsprechende Menge 5'-Azacytidin zugesetzt. Die Zellen wurden für 24, bzw. 48 Stunden kultiviert und anschließend über Immunfluoreszenzmarkierung analysiert.

5.1.2.5 Indirekte Immunfluoreszenz eukaryotischer Zellen

Um die Transfektions-Effizienz, die Proteinexpression von Zellen und die Lokalisation von Proteinen innerhalb der Zelle zu bestimmen, ist die indirekte Immunfluoreszenz (Weigele *et al.*, 1973; Weigele *et al.*, 1973) eine geeignete Methode.

Die zu untersuchenden Zellen wurden in Kulturschalen, die sterile Deckgläschen enthielten, ausgesät. 24 - 48 h nach Transfektion oder anderer Zellbehandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die Deckgläschen entnommen. Die Deckgläschen wurden nochmals mit PBS abgespült und für mindestens 30 Min. in eiskaltem Aceton bei - 20 °C fixiert und permeabilisiert. Die Zellen können bis zu einer Woche in Aceton gelagert werden. Falls es entscheidend war, die Faltung der Proteine für weitere Analysen aufrechtzuerhalten, wurden die Zellen 10 Minuten mit 2 % Paraformaldehyd in PBS fixiert und die Membranen anschließend mit 0,2 % Triton X100 permeabilisiert. Unspezifische Reaktionen der Antikörper mit freien Aldehydgruppen wurden unterdrückt, indem die fixierten Zellen zehn Minuten mit 50 mM Glycin in PBS inkubiert wurden. Alle Antikörperinkubationen erfolgten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit 60 μ l Antikörperlösung, mit der die Deckgläschen überschichtet wurden.

Die Deckgläschen wurden dann für 30 Min. in PBS gewaschen und anschließend auf

Parafilm bei RT mit dem entsprechenden ersten Antigen-spezifischen Antikörper (60 μ l, in PBS verdünnt) für 45 Min. inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen. Die gebundenen primären Antikörper wurden mit spezies-spezifischen Antikörpern, die mit einem Fluorochrom konjugiert sind, detektiert. Zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen der sekundären Antikörper wurden die Zellen vor der Markierung für 20 Min. mit normalem unspezifischen Serum aus der gleichen Spezies, aus der die sekundären Antikörper stammten, vorinkubiert.

Die sekundären Antikörper sind affinitätsgereinigt und gegen andere Spezies absorbiert, um Kreuzreaktionen bei einer Doppelmarkierung auszuschließen.

Die nun folgenden Schritte wurden im Dunkeln durchgeführt, um die Signalverstärkung durch den zweiten Antikörper nicht abzuschwächen. Der an FITC oder TR gekoppelte zweite Antikörper (60 μ l, in PBS verdünnt) wurde für 45 Min. bei RT auf die Zellen gegeben.

Im Anschluss an die Markierung wurden die Zellen zweimal für 20 Minuten in PBS gewaschen und in Einbettungsmedium auf einem Objektträger fixiert. Nach dem Trocknen des Einbettungsmediums wurden die Proben in einem Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskop analysiert.

5.1.3 Präparation, Analyse und Klonierung von DNS

5.1.3.1 Präparation von Plasmid-DNS aus *E.coli* Bakterienzellen

Die Plasmidpräparation aus Bakterienzellen basiert auf einer alkalischen SDS-Lyse der Zellen und der anschließenden Aufreinigung der Plasmid-DNS über einen Anionenaustauscher. Die chromosomale DNS wurde dabei zuvor durch Kaliumacetat präzipitiert (Birnboim and Doly 1979). Die Ausbeute bei *high copy* Plasmiden (z.B. pGEM, pUC) beträgt 100-500 μ g bei einem eingesetzten Kulturvolumen von 250 ml.

Diese Mengen Plasmid-DNS wurden mit dem Kit Nucleobond[®] AX 500 isoliert. Die Präparation wurde nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll durchgeführt.

Plasmidpräparationen im kleinen Maßstab (bis 5 ml) dienen dazu, Ligationen und Transformationen über Restriktionscharakterisierung zu analysieren. Einzelne Kolonien wurden von einer Agarplatte mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und in bis zu 5 ml neuem Medium und entsprechendem Antibiotikum über Nacht vermehrt. Die Bakterien wurden pelletiert (Mikrozentrifuge, 14000 Upm, 5 Min., RT), in 300 μ l ASL-Lösung 1 lysiert und für 10 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurden 450 μ l ASL-Lösung 2 zugegeben, invertiert und 10 Min. bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 350 μ l Lösung ASL-Lösung 3 wurde der Ansatz für 15 Min. auf Eis inkubiert

und anschließend abzentrifugiert (Mikrozentrifuge, 14000 Upm, 5 Min., 4°C). Zur Inaktivierung verbleibender Enzyme wurde der Überstand für 2 Min. bei 95 °C inkubiert. Dieser Ansatz wurde mit 400 µl ASL-Lösung 4 vermischt und 30 Min. bei –20°C präzipitiert. Die Plasmid-DNS wurde pelletiert und zweimal mit 70%-igem Ethanol (–20 °C) gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 30 µl 10 mM Tris, pH 8,0 oder in sterilem Wasser resuspendiert. Von dieser Plasmid-DNS können 2 µl für eine Restriktionscharakterisierung eingesetzt werden.

5.1.3.2 Fotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte fotometrisch. DNS und RNS zeigen ein charakteristisches Absorptionsspektrum im UV-Bereich mit einem Maximum bei 260 nm, das zur Konzentrationsbestimmung herangezogen wurde. Um Aussagen zur Qualität und Reinheit einer Probe zu machen, wurde das Spektrum von 220-320 nm aufgenommen.

Die Probe wurde in einer Quarzküvette (Volumen 100 µl) mit dH₂O verdünnt gemessen. Eine OD₂₆₀ von 1 entsprach einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNS, bzw. 40 µg/ml ssDNS/RNS. Aus der OD₂₆₀ kann dann die Konzentration bestimmt werden:

$$c_{RNS} [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \cdot 40 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$c_{DNS} [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \cdot 50 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Aufnahme eines Spektrums von 220-320 nm erfolgte nach Null-Abgleich bei 320 nm, da die Nukleinsäureabsorption an dieser Stelle null ist. Der charakteristische Kurvenverlauf wurde beispielsweise durch hohe Salzkonzentrationen oder Proteinverunreinigungen verändert. Zur Abschätzung der Reinheit wurde das sog. 260/280-Verhältnis berechnet (= OD₂₆₀ / OD₂₈₀). Für reine RNS-Proben resultiert ein Wert von 2,0 ± 0,1; reine DNS-Proben ergeben 1,8 ± 0,1.

5.1.3.3 Restriktionsspaltung von Nukleinsäuren

Restriktionsendonukleasen sind in der Lage, doppelsträngige DNS an für sie spezifischen, meist palindromen Sequenzen zu schneiden. Diese Restriktion dient u.a. der analytischen Charakterisierung unbekannter DNS-Sequenzen oder der Vorbereitung und Analyse von Klonierungen.

Eine Einheit (1 U) eines Restriktionsenzym katalysiert die Spaltung von 1 µg DNS in einer Stunde. Ein spezieller Puffer, je nach Restriktionsenzym, garantiert eine optimale Ionenstärke und einen optimalen pH-Wert. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 20-100 µl, mindestens aber im 10-fachen Volumen der eingesetzten En-

zymmenge, da das Glycerin in dem die Restriktionsenzyme aufbewahrt wurden, die enzymatische Aktivität beeinträchtigen könnte. Der Restriktionsansatz wurde für eine bis hin zu 16 Stunden bei der für das Restriktionsenzym optimalen Temperatur inkubiert.

5.1.3.4 Gelelektrophoretische Auftrennung und Extraktion von DNS-Fragmenten

Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der analytischen und präparativen Auftrennung, Reinigung und Identifizierung von DNS-Fragmenten. Lineare DNS-Fragmente wandern im Agarosegel umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts (Elder, 1983). Die Wanderungsgeschwindigkeit war dabei abhängig von der Fragmentlänge, der Potentialdifferenz im Gel, der Agarose-Konzentration und der angelegten Spannung. Je nach Fragmentgröße wurden Agarosegele von 0,8-1,5 % verwendet.

Die Agarose wurde durch Erhitzen in TAE-Puffer gelöst und nach Abkühlen auf 50°C in die Gelkammer gegossen. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen DNS-Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Der DNS-Probenpuffer enthält zwei verschiedene Farbstoffe, Bromphenolblau und Xylen-Cyanol. In einem 1%igen Gel läuft die Bromphenolblau-Bande auf der Höhe eines linearisierten DNS-Fragmentes von etwa 500 Bp und die Xylen-Cyanol-Bande auf der Höhe eines 2000 Bp-Fragmentes. Parallel zu den Proben wurde ein standardisierter DNS-Längenmarker aufgetragen, der eine Abschätzung der DNS-Fragment-Länge in der Probe erlaubt. Die Elektrophorese wurde in TAE-Puffer bei 100 V (konstant) durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel in einer EtBr-Lösung (40 µg/l) gefärbt und die Banden durch UV-Illumination sichtbar gemacht (Fluoreszenz bei Anregung im UV-Bereich, 312 nm).

Gelextraktion

DNS-Fragmente können mit Hilfe des Jetquick-Gel-Extraktionskits aus Agarosegelen extrahiert werden. Die DNS wurde hierbei nach Erwärmung auf 50 °C aus der Agarose eluiert, an Siliziumdioxid gebunden, pelletiert und mit 10 mM Tris-HCl pH 8,5 eluiert. Die benötigten Lösungen wurden gebrauchsfertig mitgeliefert. Die Aufreinigung richtet sich nach den Angaben des Herstellers.

Um im letzten Schritt das Siliziumdioxid-Rückstände vollständig zu entfernen, wurde der Ansatz zweimal für 1 Minute bei 14000 × g zentrifugiert und der DNS-haltige Überstand jeweils in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Siliziumdioxid-Rückstände könnten enzymatische Reaktionen inhibieren.

5.1.3.5 Klenow Fragment der DNS Polymerase I

Das große Fragment der DNS-Polymerase I, das Klenow Fragment, besitzt sowohl eine 5' → 3' Polymerase- als auch eine 3' → 5' Exonuklease-Aktivität. Diese Polymerase wurde dazu verwendet, den rezessiven 3' Terminus von doppelsträngiger DNS entlang einzelsträngiger 5' DNS-Überhänge aufzufüllen. 0,1 – 4 µg gespaltene DNS mit 3' rezessiven Enden wurde bei 37°C für 15 Min. in 1x Klenow-Reaktionspuffer mit 0,05 mM dNTP's und 1 – 5 Einheiten des Klenow Fragmentes inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Hitze für 10 Min. bei 75°C inaktiviert.

5.1.3.6 Shrimp alkalische Phosphatase

Die Shrimp alkalische Phosphatase (SAP), aus arktischen Garnelen (*P.borealis*) isoliert, ist eine Phosphohydrolase, die das 5'-Orthophosphat von RNS und von 5'-überhängenden, 5'-rezessiven sowie glatten DNS-Enden dephosphoryliert. Bis zu 1 pmol 5'-terminal phosphorylierte DNS-Fragmente wurden 10 Min. bei 37°C mit einer Einheit SAP in 1x SAP-Reaktionspuffer inkubiert. 0,2 pmol von DNS-Fragmenten mit glatten Enden, sowie bis zu 1 pmol von RNS-Fragmenten wurden für 60 Min. mit einer Einheit SAP bei 37°C inkubiert. Eine vollständige und irreversible Inaktivierung fand bei 65°C für 15 Min. statt.

5.1.3.7 Ligation

Ziel der Ligation war es DNS-Fragmente mit Hilfe der T4 DNS-Ligase kovalent über die endständige 5'-Phosphatgruppe mit der freien 3'-OH Gruppe zu verknüpfen. In einen Ligationsansatz wurden 5 fmol geschnittene Vektor-DNS und die 5-10 fache Menge geschnittener Insert-DNS eingesetzt. Die Ligation erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 20 µl mit 1 U T4 DNS-Ligase in 1x Ligasepuffer. Der Ansatz wurde 14 h bei 16°C inkubiert und danach ohne weitere Aufarbeitung zur Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt.

5.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ermöglicht die Amplifizierung von spezifischen DNS-Sequenzen *in vitro* (Saiki *et al.*, 1985). Das Prinzip dieser Reaktion beruht auf der komplementären Bindung und der Verlängerung zweier Oligonukleotidprimer, die die zu amplifizierende DNS flankieren. Die Verwendung einer thermostabilen Polymerase ermöglicht die zyklische Denaturierung von DNS und die anschließende Verlängerung der Oligonukleotidprimer.

Diese Ketten-Reaktion läßt sich in drei Schritte unterteilen, die 25-40 mal wiederholt wurden.

Im ersten Schritt wurde der zu amplifizierende DNS-Doppelstrang bei hohen Temperaturen von ca. 92°C bis 94°C denaturiert, so daß zwei Einzelstränge vorliegen. Anschließendes Abkühlen auf 40-70°C ermöglicht die Hybridisierung („annealing“) der Oligonukleotidprimer mit der komplementären DNS-Sequenz. Die Oligonukleotidprimer wurden im großen Überschuß (um den Faktor 10^6 gegenüber der Zielsequenz) eingesetzt. Die dafür verwendete Temperatur und Zeit war u.a. von der Sequenz der Oligonukleotidprimer abhängig. Im dritten Schritt, der sogenannten Elongationsphase, synthetisiert eine thermostabile DNS-Polymerase ausgehend von dem 3' terminalen Ende dieser Oligonukleotidprimer bei ca. 72°C in 5' → 3'- Richtung den komplementären DNS-Gegenstrang (Chien *et al.*, 1976).

Die Zahl der PCR-Amplifikate wächst exponentiell mit der Zykluszahl, da sich ihre Konzentration in jedem Zyklus verdoppelt. Nach 20 PCR-Zyklen ergibt sich eine theoretische Anreicherung um den Faktor 10^6 . Es wurde allerdings meist nur eine Ausbeute von ca. 85 % erreicht, da die Ausbeuten von Zyklus zu Zyklus variieren, so daß man eine durchschnittliche Amplifikationsrate von ungefähr 10^5 erhält (Linz *et al.*, 1990), (White *et al.*, 1989), (Saiki *et al.*, 1988), (Saiki *et al.*, 1985).

PCR- Oligonukleotidprimer

Die Oligonukleotidprimer wurden synthetisch hergestellt. Sie leiten sich aus den flankierenden Bereichen der zu amplifizierenden Sequenz ab. Die Oligonukleotidprimer haben eine mittlere Länge von 20 bis 30 Nukleotiden und sollten mit mindestens 20 Nukleotiden komplementär zu der zu amplifizierenden DNS sein. Bei der Festlegung der Oligonukleotidprimer wurde darauf geachtet, dass zwei parallel verwendete Primer eine ähnliche Hybridisierungstemperatur besitzen. Die Schmelztemperatur eines DNS-Doppelstranges, und damit auch die optimale Hybridisierungstemperatur der Oligonukleotidprimer, lässt sich in erster Näherung aus der Anzahl der Guanin (G) und Cytosin (C) sowie der Adenin (A) und Thymin (T) Nukleotide vorhersagen. Die Hybridisierungstemperatur eines Primers kann nach folgender Formel berechnet werden (Suggs *et al.*, 1981):

$$((G+C) \cdot 4 + (A+T) \cdot 2) - 10$$

Restriktionsschnittstellen am 5' Terminus von Oligonukleotidprimern, die nicht komplementär zu der zu amplifizierenden DNS sind, erlauben nach einem Restriktionsverdau die ortsgerichtete Klonierung der PCR-Produkte in ein Plasmid.

5.1.4.1 PCR-Amplifizierung und Sub-Klonierung der Transgen-Konstrukte

Die PCR-Amplifizierungen zur Herstellung des Transgen-Konstruktes wurden mit der Herkulase™ Enhanced DNS-Polymerase durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Kombination aus vornehmlich *Pfu* DNS-Polymerase, einem *PfuTurbo*® PCR-„enhancing factor“ und einer kleinen Menge an *Taq2000*™ DNS-Polymerase. Die *Pfu* DNS-Polymerase hat eine der niedrigsten Fehlerraten thermostabiler DNS-Polymerasen. Sie besitzt mit $1,3 \times 10^{-6}$ eine wesentlich geringere Fehlerrate als die *Taq* DNS-Polymerase mit 8×10^{-6} . Zusätzlich haben alle anderen thermostabilen Polymerasen, außer der *Pfu* DNS-Polymerase, eine terminale Deoxynukleotid-Transferase-Aktivität (TdT). Diese Aktivität ist durch die Addition von Nukleotiden am 3' Terminus von PCR generierten Fragmenten charakterisiert, die unabhängig von einem komplementären DNS-Strang sind. Die *Pfu* DNS-Polymerase generiert exklusiv PCR-Produkte mit glatten Enden, ohne jeglichen Überhang.

Der *PfuTurbo*® PCR-„enhancing factor“ ist ein optimierter Puffer, der eine hohe Ausbeute und Spezifität für die Amplifizierung von sehr langen Ziel-Sequenzen ermöglicht.

Eine terminale PCR-Mutagenese diente beispielsweise zur Einführung von Restriktionsschnittstellen oder zur Markierung mit einem *Tag* an einem oder an beiden Termini. Bei einem kurzen bis zu acht Nukleotiden langen nicht zur Ziel-Sequenz komplementären Nukleotidbereich weicht das PCR-Programm nicht von dem üblichen Protokoll ab. Bei längeren Sequenzen wie z.B. bei der Einführung eines HA-Tags mit zusätzlichen Sequenzen für einen flexiblen Linker und zwei Restriktionsschnittstellen, sind 48 von 70 Nukleotiden nicht komplementär zur Ziel-Sequenz (Primer: FKR11, Primerliste). In den ersten Zyklen hybridisieren z.B. bei Oligonukleotidprimer FKR11 nur 22 Nukleotide mit der DNS-Ziel-Sequenz, während 48 Nukleotide keine komplementäre Sequenz zur Verfügung haben. Nach erfolgreicher Amplifizierung entstehen ab der dritten Runde DNS-Fragmente, zu denen der Primer vollständig komplementär ist. Diese ersten Runden der Amplifizierung sind sehr kritisch, dementsprechend wurde die Hybridisierungszeit verlängert.

Ausgehend von dem Vektor pLTRp53cGwt wurden die *p53*-Abschnitte A (mit Primer: FKR10, FKR13) und B (mit Primer: FKR12, FKR11) von der Herkulase™ Enhanced DNS-Polymerase folgendermaßen hergestellt.

Die Reaktion fand in einem Volumen von 50 µl unter folgenden Bedingungen statt: PCR-Puffer (1x), dNTPMix (0,2 mM), Primer 1 (0,5 µM) (FKR10, bzw. FKR12), Primer 2 (0,5 µM) (FKR13, bzw. FKR11), Herkulase DNS Polymerase (0,05 U/µl). Als Ausgangs-DNS wurden ca. 100 ng Plasmid-DNS (pLTRp53cGwt) eingesetzt. Das PCR-Programm wurde für die Reaktionen optimiert: Initiale Denaturierung (3 Min, 92°C), 35 Zyklen: Denaturierung (30 Sek., 92°C), Annealing (1 Min. 30 Sek., 60 °C), Elongation (3 Min., 72°C), abschließende Elongation (5 Min., 72°C).

Im Anschluß an die PCR wurden die amplifizierte PCR-Produkte in einem Agarosegel analysiert und extrahiert. Ein Aliquot des extrahierten PCR-Produktes wurde zusätzlich durch *Sma*I (für *p53*-Abschnitt A) bzw. *Hind*III (für *p53*-Abschnitt B) Restriktion charakterisiert. Anschließend wurden die extrahierten PCR-Produkte in die *Ava*I Restriktionsschnittstelle von pUC18 kloniert. Vor der Ligation wurde pUC18 mit dem Klenow Fragment und anschließend mit der Shrimp Alkalischen Phosphatase inkubiert, um die Enden zu glätten und den Vektor zu dephosphorylieren.

Eliminierung einer *Eco*RI Restriktionsschnittstelle im mutiertem Transgen-Konstrukt

Für die Eliminierung der *Eco*RI Restriktionsschnittstelle wurde ebenfalls die Herkulase™ Enhanced DNS-Polymerase verwendet, weil es für die Herstellung des Transgen-Konstruktes von entscheidender Bedeutung war, die Fehlerrate der Polymerase auf ein Minimum zu beschränken. Das Transgen-Konstrukt musste bis auf die gezielt eingeführten Mutationen Wildtyp Sequenzen enthalten. Für diese PCR wurden die Vektoren pUC-mutp53^{R245W} und pUC-mutp53^{R270H} eingesetzt. Die *Eco*RI Restriktionsschnittstelle hinter der *Bgl*II Restriktionsschnittstelle wurde durch die Herkulase™ Enhanced DNS-Polymerase folgendermaßen entfernt.

Die Reaktion fand in einem Volumen von 50 µl unter folgenden Bedingungen statt: PCR-Puffer (1x), dNTPMix (0,2 mM), Primer 1 (FKR10) (0,5 µM), Primer 2 (*p53Bgl*II) (0,5 µM), Herkulase DNS-Polymerase (0,02 U/µl). Das PCR-Programm wurde für die Reaktionen optimiert: Initiale Denaturierung (3 Min, 92°C), 35 Zyklen: Denaturierung (30 Sek., 92°C), Annealing (30 Sek., 62 °C), Elongation (4 Min., 15 Sek., 72°C), abschließende Elongation (5 Min., 72°C).

5.1.4.2 Unique site elimination (U.S.E.) Mutagenese

Die *unique site elimination* (U.S.E.) Mutagenese ermöglicht eine schnelle und effiziente positionsspezifische Mutagenese (Deng and Nickoloff 1992). Die U.S.E. Mutagenese basiert auf dem Prinzip zusätzlich zu der gewünschten, oft nicht selektionierbaren Mutation eine zweite selektionierbare Mutation auf einem DNS-Strang einzuführen. Die zweite Mutation eliminiert eine singuläre nicht-essentielle Restriktions-

schnittstelle in dem Plasmid (unique site elimination); hier wurde die *Scal* Restriktionsschnittstelle in pUC18 durch eine *MluI* Restriktionsschnittstelle ersetzt.

Da beide Primer zur Einführung der Mutation an den gleichen Strang der denaturierten Plasmid-DNS banden, war es durch die Verwendung einer T4 DNS-Polymerase möglich einen neuen DNS-Strang zu synthetisieren, der beide Mutationen enthielt. Eine Voraussetzung dafür ist die fehlende 5'→3' Exonuklease-Aktivität der T4 DNS-Polymerase, so dass sie die Primer während der Polymerisation nicht ersetzen (oder verdrängen) kann.

In einer anschließenden Selektion wurde mit dem Restriktionsenzym, dessen Schnittstelle eliminiert wurde, geschnitten. In dem Restriktionsansatz aus mutierten und nicht-mutierten Plasmiden wurden dadurch nicht-mutierte Plasmide linearisiert. Lineare DNS Fragmente wurden mit einer 100 – 1000 fach geringeren Effizienz als die zirkulären mutierten Plasmide in Reparatur-defiziente *E.coli* NM522 *mutS* Bakterien transformiert. Eine weitere *Scal* Restriktion, der aus diesen Bakterien wieder isolierten Plasmide, führte nach nochmaliger Transformation zu einer hohen Ausbeute an mutierten Plasmiden.

Die praktische Durchführung dieser Mutagenese richtete sich nach den Angaben des Herstellers (Pharmacia Biotech).

Die Mutagenese-Primer FKR17 (724ggc atg aac TgG cga cct atc c₇₄₅ im *p53* Exon VII) zur Erzeugung der mutp53^{R245W} Mutation und FKR16 (797gc ttt gag gtt cAt gtt tgt gcc₈₁₉ im *p53* Exon VIII) zur Erzeugung der mutp53^{R270H} Mutation wurden jeweils mit dem Selektionsprimer FKR18 (2192gac ttg gtt g a'cgcgt ca cca gtc aca g₂₁₆₅ im pUC18) kombiniert, um die Mutationen in pUC-wtp53-B einzuführen. Der Selektionsprimer FKR18 eliminierte die *Scal* Restriktionsschnittstelle in pUC18 und ersetzt sie durch eine *MluI* Restriktionsschnittstelle. FKR16 musste zuvor für eine mögliche Ligation in *E. coli* kinasiert werden. FKR 17 und FKR18 sind am 5'Terminus phosphoryliert.

Nach der zweiten Transformation wurde zur Identifizierung mutierter Plasmide die Plasmid DNS verschiedener Klone mit *MluI* und *EcoRI* geschnitten. *EcoRI* schneidet das 2,2 kb p53 Fragment (Abschnitt B) heraus. War das Plasmid mutiert, teilt *MluI* das 2,6 kb pUC18 Fragment in ein 900 Bp und ein 1700 Bp Fragment.

5.1.4.3 *Overlap extension PCR Mutagenese*

Das Prinzip der *Overlap-Extension-PCR-Mutagenese* besteht darin, im ersten Schritt zwei PCR-Produkte in unabhängigen Reaktionen zu erzeugen (Abb. 29). Über die verwendeten Primer wurden die gewünschten Mutationen eingeführt. Jeweils ein Ende der erzeugten PCR-Produkte muß hierbei überlappen (Rychlik 1995), (Ge and Rudolph 1997).

Diese PCR-Produkte wurden (über das JetSorb-Kit der Firma Genomed) isoliert. Anschließend wurden die isolierten Fragmente zusammen mit dNTP's, der HerkulaseTM Enhanced DNS Polymerase und Herkulase PCR-Puffer ohne die Zugabe von Primern inkubiert. Nach Denaturierung hybridisieren die überlappenden Enden der PCR-Produkte. Anhand der überhängenden 5'-Termini verlängert die HerkulaseTM Enhanced DNS Polymerase die 3'-Termini zu einem komplementären DNS-Doppelstrang. Nach 5 PCR-Zyklen wurden die außen liegenden Primer des gewünschten Fusionsproduktes zugegeben und eine PCR durchgeführt.

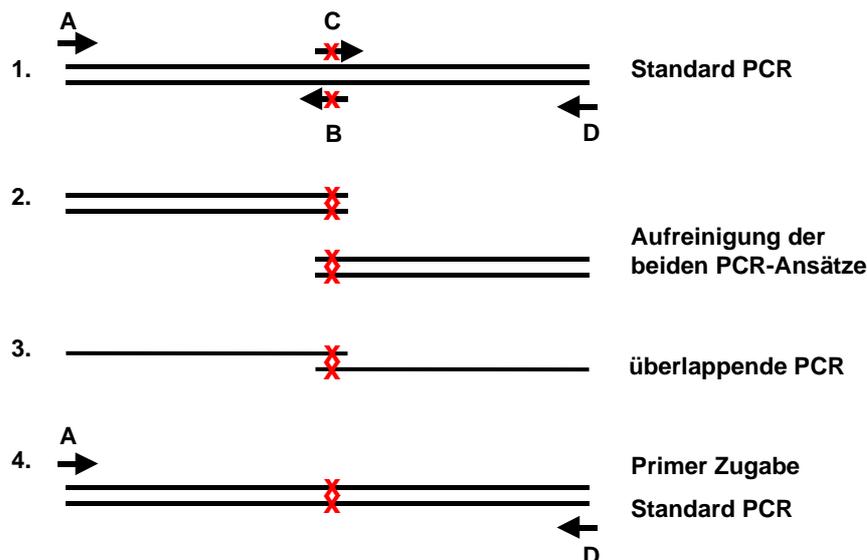


Abb. 29: *Overlap-Extension-PCR-Mutagenese*

1. Durchführung zweier unabhängiger PCR-Mutagenesen mit den Primerpaaren A, B und C, D. Die Primer B und C enthalten jeweils die einzuführende Mutation. 2. Gelextraktion der PCR-Amplifikate. 3. Durchführung der *Overlap-Extension-PCR*. 4. Zugabe der äußeren Primer A und D. Amplifizierung des Fragmentes in gesamter Länge.

Aufgrund der *proofreading*-Aktivität der *Pfu*-Polymerase wurden für den Mutagenese-Primer sowohl auf der 5'- als auch auf der 3'-Seite mindestens zehn korrekt gepaarte Basen empfohlen.

Zur Erzeugung der Mutation *mutp53^{R172H}* wurde in der *Overlap-Extension*-PCR pUC-*wtp53*-HA als Matrize eingesetzt. In den ersten zwei getrennten PCR Ansätzen wurden überlappende PCR-Produkte erzeugt. Die Mutation im murinen *p53* an Nukleotidposition 515 wurde dabei durch die Primer FKR7 (₅₀₁g gag gtc gtg aga cAc tgc ccc cac _{C525}, *p53* Exon V) in Kombination mit FKR10 (gct cag tag ccc' ggg a₁tg act gcc atg gag gag tca _{C23}, *p53* Exon II), bzw. durch Primer FKR6 (₅₂₅g gtg ggg gca gTg tct cac gac ctc _{C501}, *p53* Exon V) in Kombination mit *p53*-*Bgl*III (gca cag ata ata gat'ct tca *ggc gta gtc ggg c*) eingeführt.

Der erste Schritt fand in einem Volumen von 50 µl unter folgenden Bedingungen statt: PCR-Puffer (1x), dNTPMix (0,2 mM), Herkulase DNS Polymerase (0,02 U/µl), Primer A (0,5 µM), Primer B (0,5 µM), bzw. Primern C und D. Als Ausgangs-DNS wurden ca. 100 ng Plasmid-DNS (pUC-*wtp53*-HA) eingesetzt. PCR-Programm: Initiale Denaturierung (3 Min, 92°C), 35 Zyklen: Denaturierung (30 Sek., 92°C), Annealing (20 Sek., 66 °C), Elongation (2 Min. 10 Sek., 72°C), abschließende Elongation (5 Min., 72°C).

Nach der anschliessenden Agarosegelelektrophorese (1 % Gel), wurden die beiden PCR-Banden aus dem Gel extrahiert.

Der zweite Schritt fand in einem Volumen von 50 µl unter folgenden Bedingungen statt: PCR-Puffer (1x), dNTPMix (0,2 mM), DMSO 5%, Herkulase DNS Polymerase (0,02 U/µl), 20 ng des PCR-Isolates (A-B), 20 ng des PCR-Isolates (C-D). PCR-Programm: Initiale Denaturierung (2 Min, 92°C), 5 Zyklen: Denaturierung (30 Sek., 92°C), Annealing (60 Sek., 50°C), Elongation (3 Min., 72°C), Pause für ca. 5 Min., 4°C).

Zugabe der außenliegenden Primer in diesen PCR-Ansatz. 0,5µl Primer A (50 µM) und 0,5µl Primer B (50 µM)

PCR-Programm für dritten Schritt: Initiale Denaturierung (2 Min, 92°C), 35 Zyklen: Denaturierung (30 Sek., 92°C), Annealing (40 Sek., 62°C), Elongation (4 Min. 15 Sek., 72°C), abschließende Elongation (5 Min., 72°C).

Der PCR-Ansatz wurde in einer Agarosegelelektrophorese analysiert und das Amplifikat aufgereinigt.

5.1.5 Nukleinsäure-Sequenzierung

Die Didesoxy-Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977) basiert auf dem statistischen Kettenabbruch einer Polymerase-Reaktion durch Zusatz von Didesoxynukleotiden (ddNTPs) zu den Desoxynukleotiden (dNTPs). Eine Variante dieser Methode stellt das *cycle sequencing* (Sears *et al.*, 1992) dar, das PCR-basiert mit einer Mutante der Taq-Polymerase abläuft. Die Reaktion wurde mit dem ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Biosystems) durchgeführt. In diesem System dienen Fluoreszenz markierte ddNTPs als Reaktionsterminatoren. Der Ansatz enthielt in einem Volumen von 20 µl folgende Komponenten: 400 ng Plasmid-DNS, 10 pmol Primer, 3 µl BigDye (Kit). Die Reaktion erfolgte mit folgendem Zyklusprogramm (25 Zyklen): Initiale Denaturierung (1 Min., 96°C), Denaturierung (10 Sek., 96°C), Annealing (5 Sek., 50°C), Elongation (4 Min., 60°C). Anschließend wurde die DNS mit 3 M Natriumacetat, pH 5,4 und Ethanol (ohne Waschschrift) gefällt und getrocknet. Die Gelanalyse erfolgte in einem ABI-Sequenator 377 (PE Biosystems). Die Ergebnisse können als Text-Datei mit Hilfe von Blast 2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) analysiert werden. Die dazugehörige Graphik kann mit Hilfe des Programms „Chromas“ (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) analysiert werden.

Die zur Sequenzierung eingesetzten Primer können der Tabelle 8 entnommen werden.

5.1.6 *In vitro* Transkription

Die *in vitro*-Transkription wurde entsprechend der Beschreibung des Kit-Herstellers (Promega) mit den mitgelieferten Polymerasen und Puffern durchgeführt. Die DNS-Fragmente sind ausnahmslos in den Vektor (pCI) kloniert, so dass eine Transkription mittels der T7-RNS-Polymerase die gewünschte mRNS ergibt. Dazu wurden 2,5 - 10 µg linearisierte Plasmid-DNS in 100 µl Gesamtvolumen mit 1x TSC-Puffer (5x), 5 mM DTT (100 mM), 0,1 mM rNTP-Mix (je 2,5 mM), 3 µl CAP-Analagon als Initiationsstelle, 2,5U/µl RNasin Ribonuklease Inhibitor (100 U) und 0,8 U/µl T7-RNA-Polymerase (40 U) für 90 Min. bei 37 °C inkubiert.

Zur Analyse wurden 2 µl der Probe auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Die CAP-mRNS wurde anschließend durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt.

5.1.7 *In vitro* Translation

Die *in vitro* Translation wurde in einem Kaninchen-Retikulozyten-Lysat System (Promega) durchgeführt. In Anwesenheit von radioaktiv-markiertem ³⁵S-Methionin können anschließend neu synthetisierte Proteine autoradiographisch detektiert werden.

Ein Translations-Ansatz enthielt 10 ng der gewünschten CAP-mRNS mit 16,5 µl Kaninchen-Retikulozyten-Lysat, 20 µCi ³⁵S-TransLabel, 1 µl Aminosäure-Mix ohne Methionin und 1U RNasin Ribonuklease Inhibitor in 25 µl H₂O und wurde für 30 Min. bei 30 °C inkubiert. 5 µl der Proben wurden in einem 11,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt und die synthetisierten, radioaktiv-markierten Proteine über Autoradiographie analysiert.

5.2 Herstellung transgener Tiere

5.2.1 Vorbereitung der Transgen-DNS

Zur Trennung der Transgenkonstrukte von Vektorsequenzen wurden ca. vier mal 10 µg Plasmid-DNS über Nacht mit je 50 Einheiten *Eco*RI und *Sa*II Restriktionsenzymen geschnitten. Die vollständige Restriktion wurde in einem Kontroll-Gel überprüft, da Reste unverdauter DNS schwer abtrennbar sind und das Präparat kontaminieren könnten. Ein 1% TAE-Agarose Gel ohne Ethidiumbromid wurde für die Gelelektrophorese verwendet. Trotz intensiver DNS Reinigung könnten kleinste Reste von Ethidiumbromid in der Transgen-DNS verbleiben und eventuell unerwünschte Mutationen im Transgen verursachen. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 60 V für ca. 3,5 Stunden durchgeführt. Ein 1 Kb DNS-Längenstandard, der rechts und links der Probe aufgetragen wurde, wurde abgeschnitten und mit Ethidiumbromid gefärbt. Durch zusätzliches Abschneiden von 2 mm der Probenspur, konnte exakt die zu isolierende Bande markiert werden. Nach Wiederanlegen dieser Gelstücke, konnte die Position der zu isolierenden Bande im präparativen Gel markiert und ausgeschnitten werden.

Die Transgen-DNS wurde über eine Elektroelution aus dem Gelstück isoliert. Dazu wurde das Transgen-DNS enthaltene Gelstück in TAE in einem Dialyseschlauch platziert. Dieser Dialyseschlauch wurde in einer Gelelektrophorese-Laufkammer parallel zur Laufrichtung befestigt. Die DNS wurde über Nacht bei 16 V eluiert. Danach wurde die Polarisierung für 30 Sekunden bei 80 V umgekehrt, um die eluierte DNS von der Wand des Dialyseschlauches in die freie Lösung zu lenken. Dieses Eluat wurde mit Hilfe von Elutip D Säulen nach dem entsprechenden Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Weil die DNS für eine Mikroinjektion in Zygoten sehr rein sein muss, wurde bei der Pufferherstellung darauf geachtet, jegliche Substanzen zur DNS-Verunreinigung zu vermeiden! Aus diesem Grund sollten keine Glasgefäße oder Pipetten verwendet werden, da diese oft noch Spülmittelrückstände enthalten. Zur Herstellung der Puffer wurden deshalb sterile 50 ml Polypropylen-

Reaktionsgefäße, Zellkultur-Plastikflaschen und Einmalpipetten sowie Zellkultur-Wasser verwendet. Das Pellet der präzipitierten DNS wurde in 30–50 µl Mikroinjektions-Puffer gelöst. Die Konzentration sollte für die Mikroinjektion auf 2,5 – 3 ng DNS / µl Mikroinjektionspuffer eingestellt werden.

5.2.2 Vorbereitung der Tiere

Fünf bis zehn ca. 4-5 Wochen alte CB6F1 Weibchen (aus einer BALB/c J x C57BL/6 J Zucht) wurden superovuliert. Optimal sind dafür 3-4 Wochen alte Mäuse, da nur präpubertäre Mäuse superovuliert werden können. Die Hormoninjektion leitet die erste Ovulation ein, so dass alle Oozyten zum Heranreifen stimuliert wurden. Reife Mäuse, älter als 5-6 Wochen, hatten bereits einige Zyklen und können durch die Hormongabe nur noch synchronisiert werden. Die transgenen Tiere sollen in einem genetischen BALB/c Hintergrund untersucht werden. Versuche in unserem Labor zeigten allerdings, dass sich BALB/c Weibchen als Zygotenspender nicht eignen. Die Zygoten lysierten sehr schnell, der männliche Pronukleus, in den mikroinjiziert wurde, war sehr klein und schlecht zu sehen. Die CB6F1 Hybride aus einer BALB/c J x C57BL/6 J Zucht stellten sich als wesentlich stabiler heraus.

Zum Einleiten der Superovulation wurden 5 internationale Einheiten (IU), Embryonen getestetes Gonadotropin aus Serum von schwangeren Stuten (PMS 50 IU PMS/ml in 0,9 % NaCl) pro Maus intraperitoneal injiziert. Zwischen 42 bis max. 48 Stunden post PMS-Injektion wurden 5 IU Embryonen getestetes humanes Chorionicgonadotropin (hCG 50 IU hCG/ml in 0,9 % NaCl) pro Maus intraperitoneal injiziert. Die Einhaltung des Abstandes zwischen PMS- und hCG-Injektionen war wichtig, weil die Verpaarungszeiten vom hell-dunkel Rhythmus der Tiere abhängen. In der SPF-Tierhaltung ist mit 6 – 18 Uhr ein 12 Stundenzyklus vorhanden. Zwei bis drei Stunden post hCG-Injektion wurden diese superovulierten Weibchen mit CB6F1 Männchen (ab 6 Wochen bis max. 1 Jahr alt) im Verhältnis 1:1 oder 2:1 verpaart. Aufgrund des Lichtzyklus wurde mit einer Superovulation und Befruchtung in der Mitte der Nacht gerechnet. Am darauffolgenden Tag wurde eine erfolgreiche Verpaarung mit Hilfe einer vaginalen Plaquekontrolle festgestellt. Der nach einer Befruchtung zu erkennende Plaque besteht aus koagulierten Proteinen der Spermienflüssigkeit.

5.2.3 Zygoten Präparation

Befruchtete CB6F1 Weibchen wurden durch zervikale Dislokation getötet und dorsal mit 70 % Ethanol desinfiziert. Entlang eines kleinen lateralen Schnittes (gestrichelte Linie) wurde die Haut zurückgezogen (Abb. 30 A). Der Peritonealschnitt erfolgte entlang der gestrichelten Linie (Abb. 30 B). Nach zur Seite legen des Darms, sind Uterus, Ovidukt, Ovar, Fettpolster und Niere zu sehen (Abb. 30 C).

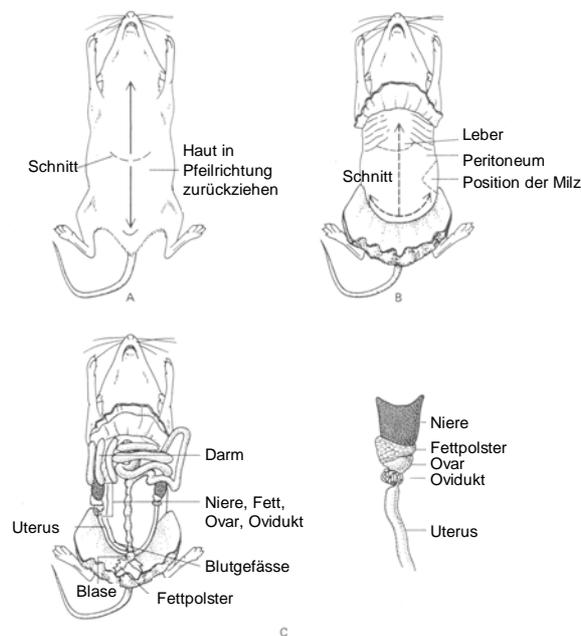


Abb. 30: Ovidukt-Präparation

(verändert nach Hogan *et al.*, 1986)

A. Entlang eines kleinen lateralen Schnittes (gestrichelte Linie) wurde die Haut zurückgezogen

B. Der Peritonealschnitt erfolgte entlang der gestrichelten Linie

C. Nach zur Seitelegen des Darms, sind Uterus, Ovidukt, Ovar, Fettpolster und Niere zu sehen

Das Ovar, Ovidukt und das Uterusende wurden vorsichtig mit feinen Pinzetten vom Mesometrium getrennt (Abb.31). Der erste Schnitt erfolgte mit einer feinen Pinzette zwischen Ovar und Ovidukt, der zweite zwischen Ovidukt und Uterus, möglichst in der Nähe des Ovidukts ohne dieses zu zerstören. Anschließend wurde das Ovidukt in M2 Medium in 3 cm Zellkultur-Petrischalen transferiert (Hogan *et al.*, 1986).

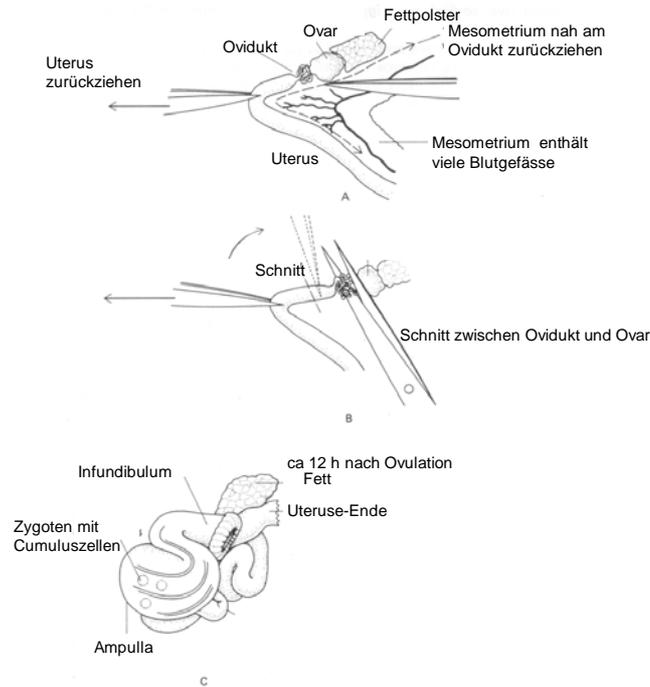


Abb. 31: Präparation der Zygoten aus dem Ovidukt

(verändert nach Hogan *et al.*, 1986)

A. Das Ovar, Ovidukt und das Uterusende mussten von dem Mesometrium getrennt werden.

B. Der erste Schnitt erfolgte zwischen Ovar und Ovidukt, der zweite zwischen Ovidukt und Uterus.

Das Ovidukt wurde in M2 Medium transferiert.

C. Die Zygoten befinden sich mit den Cumuluszellen in der geschwollenen, durchsichtigen und glänzenden Ampulla, die vorsichtig geöffnet wurde.

Die Zygoten befinden sich zusammen mit den Cumuluszellen in der geschwollenen, durchsichtigen und glänzenden Ampulla. Während der Präparation mehrerer Mäuse war darauf zu achten, dass das Präparierbesteck nach Ethanol-Desinfektion vollständig trocken und ethanol-frei ist, da Zygoten sehr empfindlich sind und durch Ethanol möglicherweise lysieren könnten.

Unter dem Stereomikroskop wurde vorsichtig die deutlich geschwollene Ampulla mit sehr feinen Pinzetten geöffnet. Die von Cumuluszellen umgebenen Zygoten quollen aus der Ampulla heraus, so dass das Ovidukt entsorgt werden konnte. Um die Zygoten von den Cumuluszellen zu trennen, wurden diese mit einer Hyaluronidase, inkubiert. Diese Hyaluronoglucosaminidase spaltet β -N-acetylhexosamine-1 \rightarrow 4 glykosidische Verbindungen in Hyaluronsäuren, Chondroitin und Chondroitinsulfate. Die Cumuluszellen und Zygoten wurden in eine neue 3 cm Zellkultur-Petrischale mit 2 ml M2 Medium und 60 μ l Hyaluronidase (10 mg/ml) transferiert.

Unter stereomikroskopischer Kontrolle, nach maximaler Inkubation von 1-2 Minuten, wurden die Zygoten mit Hilfe einer mit M2 Medium gefüllten Kapillare in eine neue 3 cm Zellkultur-Petrischale mit 2 ml M2 Medium überführt. Die Zygoten sollten so kurz wie möglich im M2 verweilen, so dass die Ernte möglichst zügig abgeschlossen

werden kann. In drei anschließenden Waschschritten in M2 Medium wurden nur die Zygoten gesammelt, nicht die Oozyten, welche keine Polkörper hatten und bei denen der Vorkern nicht sichtbar war. Der Spalt zwischen Zona Pellucida und der Zellmembran war weiter als bei Zygoten, die Polkörper besaßen und bei denen der männliche und weibliche Vorkern sichtbar waren. Tote Oozyten sehen körnig und trüb aus, haben keine Polkörper und füllten die Zona Pellucida ganz aus, so dass kein Spalt zu sehen war.

Anschließend wurden die Zygoten in M16 pH7,0 gewaschen, welches zuvor im Brutschrank auf eine Temperatur von 37°C äquilibriert wurde. In einer 10 cm Zellkulturschale wurden 80 µl M16-Medium pipettiert, das anschließend mit Mineralöl überschichtet wurden. In jeden Tropfen wurden ca. 10-15 Zygoten platziert. Die Zygoten wurden bis zur Pronukleus-Mikroinjektion im Brutschrank bei 37°C und einem CO₂ Partialdruck von 5 % inkubiert. Da M16 sehr schnell alkalisch wurde, sollte es nur kurz bei atmosphärischen CO₂ Partialdruck stehen gelassen werden.

Die eigentliche Mikroinjektion und der Re-Transfer in pseudoträchtige Ammen wurde in Kooperation mit Dr. Michael Bösl und Tina Mordhorst am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) in einem standardisierten Verfahren durchgeführt. Die Ammen wurden nach dem Re-Transfer im ZMNH in einer SPF-Tierhaltung gehalten und schwanger in der darauffolgenden Woche in den SPF-Tierstall des HPI gebracht.

5.3 Identifizierung transgener *WAP-mutp53* Tiere

5.3.1 Aufreinigung muriner genomischer DNS aus Schwanzbiopsien

Zur Unterscheidung der einzelnen Tiere wurden diese, unter kurzer Ethernarkose, am Ohr (Hogan *et al.*, 1986) markiert. Zusätzlich wurde mit einem sterilem Skalpell eine etwa 3 mm lange Schwanzbiopsie genommen und die Wunde verödet.

Die Schwanzbiopsien wurden bei -20°C bis zur Aufreinigung gelagert. Die genomische DNS wurde mit Hilfe des NucleoSpin[®] Tissue Kit gemäß der Herstellerangaben isoliert. 100 ng der eluierten DNS wurden für die nachfolgenden PCR-Analysen zur Identifizierung transgener Tiere eingesetzt.

5.3.2 Identifizierung transgener Tiere

Transgene *mutp53* Tiere wurden mit Hilfe von drei Primerkombinationen nach folgendem Schema identifiziert.

Die PCR zur Identifizierung des p53 und *WAP*-Promotors fand in einem Volumen von 50 µl unter folgenden Bedingungen statt: PCR-Puffer (1x), dNTPMix (0,2 mM), Primer *WAP*¹⁹⁵⁵ (0,5 µM), Primer *p53EIII* (0,5 µM), Taq DNS Polymerase (0,02 U/µl). Als Ausgangs-DNS wurden ca. 100 ng genomische DNS aus Schwanzbiopsien eingesetzt. PCR-Programm: Initiale Denaturierung (3 Min, 92°C), 35 Zyklen: Denaturierung (30 Sek., 92°C), Annealing (30 Sek., 62 °C), Elongation (1 Min., 72°C), abschließende Elongation (5 Min., 72°C).

Das theoretische PCR-Amplifikat von der transgenen *mutp53* DNS nach Verwendung der *WAP*¹⁹⁵⁵ und *p53EIII* Primer war 840 Bp groß.

Die PCR zur Identifizierung des p53 und HA-Tags fand in einem Volumen von 50 µl unter folgenden Bedingungen statt: PCR-Puffer (1x), dNTPMix (0,2 mM), Primer FKR 14 (0,5 µM), Primer FKR 4 (0,5 µM), Taq DNS Polymerase (0,02 U/µl). Als Ausgangs-DNS wurden ca. 100 ng genomische DNS aus Schwanzbiopsien eingesetzt. PCR-Programm: Initiale Denaturierung (3 Min, 92°C), 35 Zyklen: Denaturierung (30 Sek., 92°C), Annealing (45 Sek., 62 °C), Elongation (1 Min. 10 Sek., 72°C), abschließende Elongation (5 Min., 72°C).

Das theoretische PCR-Amplifikat von der transgenen *mutp53* DNS nach Verwendung der FKR14 und FKR4 Primer war 1075 Bp groß.

Die PCR zur Identifizierung des endogenen *wtp53* und gleichzeitig des transgenen *mutp53* fand in einem Volumen von 50 µl unter folgenden Bedingungen statt: PCR-Puffer (1x), dNTPMix (0,2 mM), Primer *p53I9* (0,5 µM), Primer *p53EXI* (0,5 µM), Taq DNS Polymerase (0,02 U/µl). Als Ausgangs-DNS wurden ca 100 ng genomische DNS aus Schwanzbiopsien eingesetzt. PCR-Programm: Initiale Denaturierung (3 Min, 92°C), 35 Zyklen: Denaturierung (30 Sek., 92°C), Annealing (30 Sek., 62 °C), Elongation (1 Min., 72°C), abschließende Elongation (5 Min., 72°C).

Das theoretische PCR-Amplifikat von der transgenen *mutp53*-DNS war nach Verwendung der *p53I9* und *p53EXI* Primer 280 Bp, das der endogenen *wtp53*-DNS war 980 Bp groß,

Die Primerkombination *p53I9* – *p53EXI* hatte den Vorteil, eine interne Kontrolle zu liefern. Unabhängig vom Genotyp des Tieres wurde in dieser PCR stets ein 980 Bp großes *p53* DNS-Fragment amplifiziert. Im Falle eines transgenen Tieres wurde eine zusätzliche 280 Bp große Bande amplifiziert. Das Transgen befand sich, im Gegen-

satz zum endogenen *wtp53*, meist in einer Kopienzahl von mehr als zwei Kopien im Genom, so dass sich die Anzahl an Matrizen in der PCR erhöhte. Dadurch, dass das Intron 10 mit 700 Bp im Transgen-Konstrukt fehlte, konnte die *wtp53* PCR-Bande (980 Bp) von der transgenen *mutp53* PCR-Bande (280 Bp) unterschieden werden. Bei transgenen Tieren befanden sich daher eine schwache 980 Bp *wtp53* Bande und eine deutliche 280 Bp *mutp53* Bande im Gel.

Alle drei Primerkombinationen wurden am Anfang zur Identifizierung der ersten transgenen Tiere benutzt. Als Standard-Identifizierung transgener *WAP-mutp53* Tiere wurde die Primerkombination *p53I9* – *p53EXI* eingesetzt.

5.3.3 Nachweis einer Keimbahnintegration des Transgenkonstruktes

Potentielle Ursprungstiere wurden im Alter von mindestens 10 Wochen verpaart. Die Nachkommen wurden im Alter von vier Wochen markiert. Aus einer Schwanzbiopsie wurde die genomische DNS aufgereinigt. Das Transgen wurde in einer PCR mit den Primern *p53I9* und *p53EXI* nachgewiesen.

5.4 Charakterisierung transgener Tiere

Die Expression von mutp53 wurde in transgenen Weibchen im Alter von mindestens 10 Wochen durch Verpaarung und anschließende Laktation induziert. Am Tag vier der Laktation wurden diese Weibchen von ihren Jungen getrennt, die von Ammentieren aufgezogen wurden.

Das induzierte transgene Weibchen wurde unter Ethernarkose eingeschläfert.

Die zervikalen, thorakalen, abdominalen und inguinalen Mammae wurden dazu vorsichtig ohne Beschädigung des zu analysierenden Gewebes präpariert (zur Lage der Mammae siehe Einleitung Abb. 5).

Die gesamte linke Seite der Mammae wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C für spätere RNS und Protein-Analysen gelagert. Die rechte Seite der Mammae wurde in saurem Formalin (4% Formalin, 1% Essigsäure) über Nacht fixiert und bei 4°C in 4% Formalin für spätere histologische und morphologische Untersuchungen gelagert. Zusätzlich wurden jeweils ein Teil der Leber, der Milz, der Niere, der Lunge und des Herzens in Stickstoff, bzw. Formalin für weitere Analyse aufbewahrt.

5.4.1 Transgen-Transkription

5.4.1.1 RNS-Präparation

Die Hydrolyse von RNS Molekülen durch Ribonukleasen (RNasen) ist ein kritischer Faktor während der RNS-Präparation. Ribonukleasen sind sehr stabile Enzyme, die keine Kofaktoren benötigen. Der erste Schritt der Präparation bestand in einer Zelllyse unter Bedingungen, die zur weitgehenden Denaturierung der RNasen führten. Die RNS wurde dann durch eine saure Phenolextraktion von anderen zellulären Makromolekülen abgetrennt.

Guanidinthiocyanat ist eine effektive Protein-denaturierende Substanz. Die verwendete Methode zur RNS Präparation basiert auf der Eigenschaft von RNS Molekülen, in einer wässrigen Phase mit 4 M Guanidinthiocyanat bei einem pH-Wert von 4,0 in Gegenwart einer organischen Phenol/Chloroform-Phase zu verbleiben (Chomczynski and Sacchi 1987). Unter diesen sauren Bedingungen reichern sich DNS Fragmente (bis 10 kb) und Proteine in der organischen Phase an. Daher war die Fragmentierung der DNS im Zuge der Zelllyse notwendig (Homogenisation). Die RNS wurde nach der Extraktion aus der wässrigen Phase mit Isopropanol gefällt. Das RNS-Pellet wurde mit Ethanol (70% v/v) gewaschen, getrocknet und in 50 μl H_2O resuspendiert. Die RNS wurde bei -70°C gelagert.

Alle verwendeten Materialien wurden vor Gebrauch mindestens 2 Stunden autoklaviert. Um sicherzustellen, dass auch alle verwendeten Lösungen und Puffer RNase-frei sind, wurden diese mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt. DEPC reagiert mit den Histidin-Resten von Proteinen und inaktiviert auf diese Weise RNasen; da DEPC jedoch auch mit RNS interagieren kann, muss es durch Autoklavieren wieder entfernt werden, dabei zerfällt DEPC zu CO₂ und Ethanol. Alle Lösungen und Puffer wurden mit 0,05 bis 0,1% DEPC versetzt, für einige Stunden bei 37°C geschüttelt und anschließend autoklaviert.

Aus 50 mg Gewebe wurde Gesamt-RNS aufgereingt. Das Gewebe wurde in 1 ml einer einphasigen Phenol und Guanidinisothiocyanat Lösung mit einem Polytron-Homogenisator lysiert. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich das Homogenat in drei Phasen. In der oberen wässrigen Phase befand sich die nicht-degradierte RNS frei von DNS und Proteinen. Die Aufreinigung wurde mit Hilfe von peqGOLD RNSPure™ nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das RNS-Pellet wurde in 50 µl DEPC-dH₂O resuspendiert.

5.4.1.2 Reverse Transkription

In der reversen Transkription wurde RNS in cDNS transkribiert. Die Reaktion kann mit viralen Polymerasen z.B. der ThermoScript RT erfolgen, die Oligo (dT) in 5' - 3' Richtung komplementär zur RNS verlängern .

Der erste Schritt der reversen Transkription fand in einem Volumen von 11 µl unter folgenden Bedingungen statt: DEPC behandeltes dH₂O, Oligo (dT)₂₀ (5 µM), 1 µg RNS; Inkubation für 10 Min. bei 72°C; Pause bei 4°C; Zugabe zu einem Endvolumen von 20 µl: cDNS Synthese-Puffer (1x), dNTPMix (1 mM), DTT (5 mM), RNase OUT™ (2 U/µl), ThermoScript RT (0,75 U/µl), Inkubation für 50 Min. bei 52°C, 15 Min. bei 75°C, Zugabe von 0,1 U/µl *E.coli* RNase H, Inkubation für 30 Min. bei 37°C. Diese Präparation und reverse Transkription wurden in einer Kontroll-PCR mit Exon-p53 spezifischen, intron-überlappenden, Primern überprüft.

Die Kontroll-PCR wurde in einem Volumen von 20 µl unter folgenden Bedingungen analysiert: PCR-Puffer (1x), dNTPMix (0,2 mM), DTT (2 mM) Primer FKR12 (0,5 µM), Primer p53EXI (0,5 µM), 2 µl cDNS, *Taq* DNS Polymerase (0,05 U/µl). PCR-Programm: Initiale Denaturierung (3 Min, 92°C), 35 Zyklen: Denaturierung (30 Sek., 92°C), Annealing (30 Sek., 62 °C), Elongation (40 Sek., 72°C), abschließende Elongation (5 Min., 72°C).

Die Expression von mutp53 wurde durch Verwendung transgenspezifischer Primer untersucht. Dies wurde in einem Volumen von 20 µl unter folgenden Bedingungen analysiert: PCR-Puffer (1x), dNTPMix (0,2 mM), DTT (2 mM) Primer FKR12 (0,5 µM),

Primer FKR4 (0,5 μ M), 2 μ l cDNS, *Taq* DNS Polymerase (0,05 U/ μ l). PCR-Programm: Initiale Denaturierung (3 Min, 92°C), 35 Zyklen: Denaturierung (30 Sek., 92°C), Annealing (20 Sek., 66 °C), Elongation (35 Sek., 72°C), abschließende Elongation (5 Min., 72°C).

5.4.2 Transgen-Expression

Die Expression, bzw. Translation des *WAP-mutp53* Transgens wurde einerseits in Protein-Gesamtzell-Lysaten, andererseits in Gewebeschnitten auf zellulärer Ebene in der Immunhistologie untersucht. Für diese Analysen wurden die in Kapitel 5.4 beschrieben in Stickstoff gefrorenen Gewebe und die in Formalin eingebetteten Gewebe verwendet.

5.4.2.1 Proteinbiochemische Methoden

5.4.2.1.1 Gesamtzell-Extrakt

50 mg Gewebe wurden in 300 μ l E1A-Puffer mit Proteinase-Inhibitoren (PI) versetzt. Die Probe wurde auf Eis mit Hilfe eines Homogenisators lysiert, durch Zentrifugation (14000 Upm, 20 Min., 4 °C) pelletiert und der Überstand in vorgekühlte Eppendorfgläser überführt.

5.4.2.1.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

In einer Einmalküvette wurden zu 2 μ l Probenvolumen 200 μ l Bradford-Reagenz und 800 μ l H₂O gegeben, zehn Min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Extinktion bei 595 nm gegen eine Referenz, die kein Zell-Extrakt enthält, gemessen. Die Proteinkonzentration wurde aus einer Eichkurve, die mit BSA-Konzentrationen zuvor angefertigt wurde, im linearen Bereich definiert (Bradford 1976).

5.4.2.1.3 Herstellung von Antikörpersäulen

Zur Äquilibrierung einer Protein G-Sepharose (PGS) wurde das zehnfache Volumen an sterilem H₂O (4 °C) zugegeben. Die Suspension wurde bis zum Absetzen der PGS auf Eis inkubiert. Dieser Vorgang wurde 4-5 mal mit jeweils frischem H₂O und anschließend mit zweimal mit E1A-Puffer wiederholt. Zur Herstellung einer 10%igen Suspension wurde der Überstand abgesaugt und ein entsprechendes Volumen E1A

zugefügt. Für die nicht-kovalente Bindung von Immunglobulinen an die Trägermatrix wurden je 100 µl der 10%igen PGS-Suspension mit 500 µl E1A-Puffer und Proteinase-Inhibitoren (PI) gewaschen. Die PGS wurde mit 300 µl des entsprechenden Hybridomaüberstandes bzw. 1-2 µg Immunglobulin in 300 µl E1A + PI für 1 Stunde auf einem Horizontalschüttler bei 4 °C inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit je 500 µl E1A entfernt. Die an PGS gebundenen Antikörper wurden anschließend in der Immunpräzipitation eingesetzt.

5.4.2.1.4 Immunpräzipitation von Proteinen aus Gesamtzell-Extrakten

Entsprechende Antikörper wurden eine Protein G-Sepharose (PGS) gekoppelt. 0,5-1,5 mg Zell-Lysat wurden in 300 µl E1A + PI auf die PGS mit gebundenen Antikörpern gegeben. 1-2 Stunden wurde diese Suspension auf einem Horizontal-Schüttler bei 4 °C inkubiert. Nicht gebundenes Antigen wurde durch dreimaliges Waschen mit 500 µl E1A entfernt. Die Immunpräzipitate wurden in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt.

5.4.2.1.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine aus Gesamtzell-Lysaten, bzw. aus Immunpräzipitaten wurden in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen in einer diskontinuierlichen Elektrophorese aufgetrennt (Laemmli 1970). Das Gel setzte sich aus einem 4%igen Sammelgel (4% Acrylamid; 125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 0,1% SDS, 0,75% APS (10%), 0,075% TEMED), das die Proteine fokussierte und je nach Proteingröße einem 8-11,5%igen Trenngel (8-11,5% Acrylamid, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,75% APS (10%), 0,075% TEMED) zusammen, das die Proteine in der Reihenfolge ihrer molaren Massen trennte.

Gesamtzell-Extrakte wurden mit dem 0,2fachen Volumen an 6 x SB versetzt und 5 Min. bei 95 °C denaturiert. Die aus Gesamtzell-Extrakten immunpräzipitierten Antigen-Antikörperkomplexe wurden durch Zugabe des doppelten Volumens von 2xSB von der PGS-Matrix eluiert und für 5 Min. bei 95 °C denaturiert. Durch Zentrifugation (10000 Upm, RT, 20 Sek.) wurde die PGS abgetrennt. Anschließend wurden die Proben direkt in der SDS-PAGE eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

Als Größenmarker wurde ein 7b *prestained marker* (Sigma) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA pro Gel für 1-2 Stunden.

5.4.2.1.6 Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran

Die Proteine wurden im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran im Nassblot-Verfahren transferiert (Towbin *et al.*, 1979).

Die PVDF-Membran wurde 2 Min. in Methanol inkubiert, fünfmal mit H₂O gewaschen und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Die angefeuchtete Membran mit dem darauf liegenden Gel wurde beiderseits von drei Lagen ebenfalls feuchten Whatman-Papieres bedeckt. Der Transfer erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Elektroblot-Apparatur für 1 Stunde bei 100 V unter Kühlung.

5.4.2.1.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen

Elektrophoretisch aufgetrennte und auf eine Membran transferierte Proteine wurden mittels Antikörpernachweis detektiert.

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurden diese für eine Stunde bei RT in einer PBS-Tween (0,1%)-Lösung mit 5% Milchpulver unter leichtem Schwenken inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran mit PBS-Tween gewaschen (3x, je 15 Min.) und der spezifische Erst-Antikörper in einer entsprechenden Verdünnung in PBS-Tween mit 5% Milchpulver auf die Membran gegeben. Nach einer Stunde bei RT, bzw. über Nacht bei 4 °C wurde die Membran erneut gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurde ein Peroxidase gekopplerter Zweit-Antikörper zugegeben, der spezifisch gegen das F_c-Fragment des ersten Antikörpers gerichtet war. Dieses Enzym war in der Lage, den Farbstoff Luminol zu spalten, so dass über eine Chemilumineszenz-Reaktion Photonen frei wurden, die zur Schwärzung eines auf die Membran aufgelegten Röntgenfilmes führten und damit die Protein-Banden sichtbar werden liessen.

Nach einstündiger Inkubation wurde die Membran erneut gewaschen. Die Zugabe von gleichen Teilen luminolhaltigem ECL-Entwicklungsreagenz I und II löste die Chemilumineszenz-Reaktion aus. Die Membran wurde zwischen Klarsicht-Folien platziert und nach einer Minute wurden die Protein-Banden mittels eines Röntgenfilmes (Biomax, Kodak) sichtbar.

5.4.2.2 Immunhistologische Methoden

Die immunhistologischen Arbeiten und die Beurteilung wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Löhler (HPI) durchgeführt.

Das zu analysierende Gewebe wurde wie in Kapitel 5.4 beschrieben präpariert und in Formalin fixiert.

Die weitere Behandlung des fixierten Gewebes wurde von Frau Heigl (HPI) nach etablierten Protokollen durchgeführt.

Das in Formalin fixierte Gewebe wurde in Paraffin eingebettet. Deparaffinierte Gewebeschnitte wurden mit Hematoxylin und Eosin gefärbt und morphologisch von Herrn Dr. Löhler beurteilt.

Um das Transgen auf zellulärer Ebene immunhistochemisch zu detektieren, wurden die Gewebeschnitte mit Antikörpern gegen murines p53 (polyklonaler Kaninchen α -p53 Antikörper, SAPU), gegen den transgenspezifischen HA-Tag (polyklonaler Kaninchen α -HA Antikörper, MoBiTec) und gegen SV40 TAg (polyklonaler Meerschweinchen α -SDS-TAg Antikörper, Deppert 1982) inkubiert. Die immunhistochemische Detektion wurde mit Hilfe eines Peroxidase-gekoppelten markierten Ziege α -Kaninchen Antikörpers, bzw. Ziege α -Meerschweinchen Antikörper durchgeführt.

Um eine Kolo-kalisierung untersuchen zu können, wurden die primären transgenspezifischen HA-Tag Antikörper (polyklonaler Kaninchen α -HA Antikörper, MoBiTec) und die SV40 TAg Antikörper (polyklonaler Meerschweinchen α -SDS-TAg Antikörper, Deppert 1982) eingesetzt. Als sekundäre fluoreszenz-markierte Antikörper wurden Esel α -Kaninchen Cy2 (Jackson-Dianova) und Esel α -Meerschweinchen Cy3 (Jackson-Dianova) verwendet.

6. Literaturverzeichnis

Aas, T., A. L. Borresen, *et al.* (1996). "Specific P53 mutations are associated with de novo resistance to doxorubicin in breast cancer patients." *Nat Med* **2**(7): 811-4.

Ahn, J. and C. Prives (2001). "The C-terminus of p53: the more you learn the less you know." *Nat Struct Biol* **8**(9): 730-2.

Akyuz, N., G. S. Boehden, *et al.* (2002). "DNA substrate dependence of p53-mediated regulation of double-strand break repair." *Mol Cell Biol* **22**(17): 6306-17.

Albrechtsen, N., I. Dornreiter, *et al.* (1999). "Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53." *Oncogene* **18**(53): 7706-17.

Alsner, J., M. Yilmaz, *et al.* (2000). "Heterogeneity in the clinical phenotype of TP53 mutations in breast cancer patients." *Clin Cancer Res* **6**(10): 3923-31.

Arenberg, D. A., A. Zlotnick, *et al.* (2001). "The murine CC chemokine, 6C-kine, inhibits tumor growth and angiogenesis in a human lung cancer SCID mouse model." *Cancer Immunol Immunother* **49**(11): 587-92.

Bakalkin, G., G. Selivanova, *et al.* (1995). "p53 binds single-stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the middle domain." *Nucleic Acids Res* **23**(3): 362-9.

Baker, S. J., S. Markowitz, *et al.* (1990). "Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53." *Science* **249**(4971): 912-5.

Bates, S., A. C. Phillips, *et al.* (1998). "p14ARF links the tumour suppressors RB and p53." *Nature* **395**(6698): 124-5.

Baylin, S. B., S. A. Belinsky, *et al.* (2000). "Aberrant methylation of gene promoters in cancer---concepts, misconcepts, and promise." *J Natl Cancer Inst* **92**(18): 1460-1.

Bell, D. W., J. M. Varley, *et al.* (1999). "Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome." *Science* **286**(5449): 2528-31.

Berezney, R. (1991). "The nuclear matrix: a heuristic model for investigating genomic organization and function in the cell nucleus." *J Cell Biochem* **47**(2): 109-23.

Bernards, R. and R. A. Weinberg (2002). "A progression puzzle." *Nature* **418**(6900): 823.

Berns, E. M., J. A. Foekens, *et al.* (2000). "Complete sequencing of TP53 predicts poor response to systemic therapy of advanced breast cancer." *Cancer Res* **60**(8): 2155-62.

Berns, E. M., J. G. Klijn, *et al.* (1996). "TP53 and MYC gene alterations independently predict poor prognosis in breast cancer patients." *Genes Chromosomes Cancer* **16**(3): 170-9.

- Bird, A. (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." *Genes Dev* **16**(1): 6-21.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-23.
- Bishop JM., *Cell* 1991 Jan 25;64(2):235-48 Molecular themes in oncogenesis.
- Bode, J., Stengert-Iber, M., Kay, V., Schlake, T. and Dietz-Pfeilstetter, A. (1996) Scaffold/Matrix-attached regions: Topological switches with multiple regulatory functions. *Crit. Rev. Euk. Gene Express.*, 6(2-3):115-38.
- Bode, J., T. Schlake, *et al.* (1995). "Scaffold/matrix-attached regions: structural properties creating transcriptionally active loci." *Int Rev Cytol*: 389-454.
- Bondioli, K.R. and Wall, R.J. (1998), Transgenic livestock. In *Agricultural Biotechnology*. A. Altmann, eds (Marcel Dekker, Inc., New York) pp. 458-472.
- Borresen, A. L., T. I. Andersen, *et al.* (1995). "TP53 mutations and breast cancer prognosis: particularly poor survival rates for cases with mutations in the zinc-binding domains." *Genes Chromosomes Cancer* **14**(1): 71-5.
- Borresen-Dale, A. L. (2003). "TP53 and breast cancer." *Hum Mutat* **21**(3): 292-300.
- Boulikas, T. (1995b) How enhancers work: Juxtapositioning of DNA control elements by synergistic interaction of MARs. *Int. J. Oncol.*, 6, 1313-1318.
- Boulikas, T. (1995). "Chromatin domains and prediction of MAR sequences." *Int Rev Cytol*: 279-388.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-54.
- Braun, N., T. Papadopoulos, *et al.* (1988). "Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells." *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **56**(1): 25-33.
- Brinster, R. L., J. M. Allen, *et al.* (1988). "Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(3): 836-40.
- Brown, D. R., S. Deb, *et al.* (1993). "The tumor suppressor p53 and the oncoprotein simian virus 40 T antigen bind to overlapping domains on the MDM2 protein." *Mol Cell Biol* **13**(11): 6849-57.
- Brugarolas, J., C. Chandrasekaran, *et al.* (1995). "Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency." *Nature* **377**(6549): 552-7.

- Bruno, S. and Z. Darzynkiewicz (1992). "Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells." *Cell Prolif* **25**(1): 31-40.
- Bunz, F., A. Dutriaux, *et al.* (1998). "Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage." *Science* **282**(5393): 1497-501.
- Buschmann, T., T. Minamoto, *et al.* (2000). "Analysis of JNK, Mdm2 and p14(ARF) contribution to the regulation of mutant p53 stability." *J Mol Biol* **295**(4): 1009-21.
- Cameron, E. E., K. E. Bachman, *et al.* (1999). "Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer." *Nat Genet* **21**(1): 103-7.
- Chan, T. A., H. Hermeking, *et al.* (1999). "14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage." *Nature* **401**(6753): 616-20.
- Chen, C. A. and H. Okayama (1988). "Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA." *Biotechniques* **6**(7): 632-8.
- Chen, J., V. Marechal, *et al.* (1993). "Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains." *Mol Cell Biol* **13**(7): 4107-14.
- Chien, A., D. B. Edgar, *et al.* (1976). "Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*." *J Bacteriol* **127**(3): 1550-7.
- Cho, Y., S. Gorina, *et al.* (1994). "Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations." *Science* **265**(5170): 346-55.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction." *Anal Biochem* **162**(1): 156-9.
- Clarke, A. R., C. A. Purdie, *et al.* (1993). "Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways." *Nature* **362**(6423): 849-52.
- Coles, C., A. Condie, *et al.* (1992). "p53 mutations in breast cancer." *Cancer Res* **52**(19): 5291-8.
- Costanzo, A., P. Merlo, *et al.* (2002). "DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes." *Mol Cell* **9**(1): 175-86.
- Crook, T., D. Wrede, *et al.* (1992). "Clonal p53 mutation in primary cervical cancer: association with human- papillomavirus-negative tumours." *Lancet* **339**(8801): 1070-3.
- Cross, S. M., C. A. Sanchez, *et al.* (1995). "A p53-dependent mouse spindle checkpoint." *Science* **267**(5202): 1353-6.
- Deb, S. P. (2002). "Function and dysfunction of the human oncoprotein MDM2." *Front Biosci* **7**: d235-43.

- DeLeo AB, Shiku H, Takahashi T, John M, Old LJ. (1977). Cell surface antigens of chemically induced sarcomas of the mouse. I. Murine leukaemia virus-related antigens and alloantigens on cultured fibroblasts and sarcoma cells: description of a unique antigen on BALB/c Meth A sarcoma. *J Exp med.* 146(3):720-734.
- Deng, C., P. Zhang, *et al.* (1995). "Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control." *Cell* **82**(4): 675-84.
- Deng, W. P. and J. A. Nickoloff (1992). "Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site." *Anal Biochem* **200**(1): 81-8.
- Deppert, W. (1994). "The yin and yang of p53 in cellular proliferation." *Semin Cancer Biol* **5**(3): 187-202.
- Deppert, W. (1996). "Binding of MAR-DNA elements by mutant p53: possible implications for its oncogenic functions." *J Cell Biochem* **62**(2): 172-80.
- Deppert, W. (2000). "The nuclear matrix as a target for viral and cellular oncogenes." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **10**(1): 45-61.
- Dittmer, D., S. Pati, *et al.* (1993). "Gain of function mutations in p53." *Nat Genet* **4**(1): 42-6.
- Donehower, L. A. and A. Bradley (1993). "The tumor suppressor p53." *Biochim Biophys Acta* **1155**(2): 181-205.
- Donehower, L. A., M. Harvey, *et al.* (1992). "Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours." *Nature* **356**(6366): 215-21.
- Dornan, D., H. Shimizu, *et al.* (2003). "DNA-dependent Acetylation of p53 by the Transcription Coactivator p300." *J Biol Chem* **278**(15): 13431-41.
- Dowdy, S. F., P. W. Hinds, *et al.* (1993). "Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins." *Cell* **73**(3): 499-511.
- Dulic, V., W. K. Kaufmann, *et al.* (1994). "p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest." *Cell* **76**(6): 1013-23.
- Dulic, V., G. H. Stein, *et al.* (1998). "Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition." *Mol Cell Biol* **18**(1): 546-57.
- el-Deiry, W. S., S. E. Kern, *et al.* (1992). "Definition of a consensus binding site for p53." *Nat Genet* **1**(1): 45-9.
- el-Deiry, W. S., T. Tokino, *et al.* (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." *Cell* **75**(4): 817-25.
- Eliyahu, D., D. Michalovitz, *et al.* (1985). "Overproduction of p53 antigen makes established cells highly tumorigenic." *Nature* **316**(6024): 158-60.

- Ewen, M. E., H. K. Sluss, *et al.* (1993). "Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D- type cyclins." *Cell* **73**(3): 487-97.
- Faille, A., P. De Cremoux, *et al.* (1994). "p53 mutations and overexpression in locally advanced breast cancers." *Br J Cancer* **69**(6): 1145-50.
- Ferreira, R., I. Naguibneva, *et al.* (2001). "The Rb/chromatin connection and epigenetic control: opinion." *Oncogene* **20**(24): 3128-33.
- Ferrero, J. M., A. Ramaioli, *et al.* (2000). "P53 determination alongside classical prognostic factors in node- negative breast cancer: an evaluation at more than 10-year follow-up." *Ann Oncol* **11**(4): 393-7.
- Fields, S. and S. K. Jang (1990). "Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein." *Science* **249**(4972): 1046-9.
- Forrester, K., S. Ambs, *et al.* (1996). "Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(6): 2442-7.
- Forrester, K., S. E. Lupold, *et al.* (1995). "Effects of p53 mutants on wild-type p53-mediated transactivation are cell type dependent." *Oncogene* **10**(11): 2103-11.
- Friedman, P. N., X. Chen, *et al.* (1993). "The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(8): 3319-23.
- Fu, L. N., R. Q. Ye, *et al.* (1991). "Translational potentiation of messenger RNA with secondary structure in *Xenopus*." *Science* **251**(4995): 807-10.
- Gasser, S. M. and U. K. Laemmli (1987). "Improved methods for the isolation of individual and clustered mitotic chromosomes." *Exp Cell Res* **173**(1): 85-98.
- Gasser, S.M. and Laemmli, U.K. (1987) A glimpse at chromosomal order. *Trends Genet.*, **3**, 16-22.
- Ge, L. and P. Rudolph (1997). "Simultaneous introduction of multiple mutations using overlap extension PCR." *Biotechniques* **22**(1): 28-30.
- Gerdes, J., H. Lemke, *et al.* (1984). "Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67." *J Immunol* **133**(4): 1710-5.
- Giraldo, P. and L. Montoliu (2001). "Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals." *Transgenic Res* **10**(2): 83-103.
- Goh, H. S., J. Yao, *et al.* (1995). "p53 point mutation and survival in colorectal cancer patients." *Cancer Res* **55**(22): 5217-21.

- Gohler, T., M. Reimann, *et al.* (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): 41192-203.
- Golub, T. R. (2003). "Mining the genome for combination therapies." *Nat Med* **9**(5): 510-1.
- Graeber, T. G., J. F. Peterson, *et al.* (1994). "Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1- phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status." *Mol Cell Biol* **14**(9): 6264-77.
- Hadsell, D. D. (1997). "MAMMARY-SPECIFIC TRANSGENES AS TOOLS IN SCIENCE AND INDUSTRY (Invited Paper)." *Endocr Regul* **31**(4): 175-185.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J Mol Biol* **166**(4): 557-80.
- Harper, J. W., G. R. Adami, *et al.* (1993). "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin- dependent kinases." *Cell* **75**(4): 805-16.
- Hartmann, A., H. Blaszyk, *et al.* (1996). "High frequency of p53 gene mutations in primary breast cancers in Japanese women, a low-incidence population." *Br J Cancer* **73**(8): 896-901.
- Haupt, Y., R. Maya, *et al.* (1997). "Mdm2 promotes the rapid degradation of p53." *Nature* **387**(6630): 296-9.
- Heinrichs, S. and W. Deppert (2003). "Apoptosis or growth arrest: modulation of the cellular response to p53 by proliferative signals." *Oncogene* **22**(4): 555-71.
- Herbomel, P. (1990). "From gene to chromosome: organization levels defined by the interplay of transcription and replication in vertebrates." *New Biol* **2**(11): 937-45.
- Hermeking, H., C. Lengauer, *et al.* (1997). "14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression." *Mol Cell* **1**(1): 3-11.
- Hernandez-Boussard, T., R. Montesano, *et al.* (1999). "Analysis of somatic mutations of the p53 gene in human cancers: a tool to generate hypotheses about the natural history of cancer." *IARC Sci Publ* **146**: 43-53.
- Hernandez-Boussard, T., R. Montesano, *et al.* (1999). "Sources of bias in the detection and reporting of p53 mutations in human cancer: analysis of the IARC p53 mutation database." *Genet Anal* **14**(5-6): 229-33.
- Hernandez-Boussard, T., P. Rodriguez-Tome, *et al.* (1999). "IARC p53 mutation database: a relational database to compile and analyze p53 mutations in human tumors and cell lines. International Agency for Research on Cancer." *Hum Mutat* **14**(1): 1-8.
- Hinds, P., C. Finlay, *et al.* (1989). "Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation." *J Virol* **63**(2): 739-46.

- Hinds, P. W., S. Mitnacht, *et al.* (1992). "Regulation of retinoblastoma protein functions by ectopic expression of human cyclins." *Cell* **70**(6): 993-1006.
- Hirabayashi, M., R. Takahashi, *et al.* (2001). "A comparative study on the integration of exogenous DNA into mouse, rat, rabbit, and pig genomes." *Exp Anim* **50**(2): 125-31.
- Hogan, B., Costantini, F., Lacy, E. (1986), "Manipulating the Mouse Embryo." Cold Spring Harbor Laboratory
- Hollstein, M., K. Rice, *et al.* (1994). "Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines." *Nucleic Acids Res* **22**(17): 3551-5.
- Hollstein, M., D. Sidransky, *et al.* (1991). "p53 mutations in human cancers." *Science* **253**(5015): 49-53.
- Innocente, S. A., J. L. Abrahamson, *et al.* (1999). "p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(5): 2147-52.
- Jacks, T., Remington, L., Williams, B. O., Schmitt, E. M., Halachmi, S., Bronson, R. T. and Weinberg, R. A. (1994). Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol* **4** (1): 1-7.
- Janus, F., N. Albrechtsen, *et al.* (1999). "The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity." *Cell Mol Life Sci* **55**(1): 12-27.
- Janz, C. and L. Wiesmuller (2002). "Wild-type p53 inhibits replication-associated homologous recombination." *Oncogene* **21**(38): 5929-33.
- Jeffrey, P. D., S. Gorina, *et al.* (1995). "Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms." *Science* **267**(5203): 1498-502.
- Jones, L., A. J. Hamilton, *et al.* (1999). "RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing." *Plant Cell* **11**(12): 2291-301.
- Jones, P. A. (2002). "DNA methylation and cancer." *Oncogene* **21**(35): 5358-60.
- Jurgensmeier, J. M., Z. Xie, *et al.* (1998). "Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(9): 4997-5002.
- Kaczmarek, L., B. Ferguson, *et al.* (1986). "Induction of cellular DNA synthesis by purified adenovirus E1A proteins." *Virology* **152**(1): 1-10.
- Khorana, H. G., H. Buchi, *et al.* (1966). "Polynucleotide synthesis and the genetic code." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **31**: 39-49.
- Knoop, A. S., S. M. Bentzen, *et al.* (2001). "Value of epidermal growth factor receptor, HER2, p53, and steroid receptors in predicting the efficacy of tamoxifen in high-risk postmenopausal breast cancer patients." *J Clin Oncol* **19**(14): 3376-84.

- Koga, H. and W. Deppert (2000). "Identification of genomic DNA sequences bound by mutant p53 protein (Gly245-->Ser) in vivo." *Oncogene* **19**(36): 4178-83.
- Korach, K. S. and J. A. McLachlan (1995). "Techniques for detection of estrogenicity." *Environ Health Perspect* **103 Suppl 7**: 5-8.
- Krnacik, M. J., S. Li, *et al.* (1995). "Position-independent expression of whey acidic protein transgenes." *J Biol Chem* **270**(19): 11119-29.
- Kubbutat, M. H., S. N. Jones, *et al.* (1997). "Regulation of p53 stability by Mdm2." *Nature* **387**(6630): 299-303.
- Kuperwasser, C., G. D. Hurlbut, *et al.* (2000). "Development of spontaneous mammary tumors in BALB/c p53 heterozygous mice. A model for Li-Fraumeni syndrome." *Am J Pathol* **157**(6): 2151-9.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(259): 680-5.
- Lane, D. P. and L. V. Crawford (1979). "T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells." *Nature* **278**(5701): 261-3.
- Levine, A. J. (1993). "The tumor suppressor genes." *Annu Rev Biochem* **62**: 623-51.
- Levine, A. J., J. Momand, *et al.* (1991). "The p53 tumour suppressor gene." *Nature* **351**(6326): 453-6.
- Levine, A. J., M. C. Wu, *et al.* (1995). "The spectrum of mutations at the p53 locus. Evidence for tissue-specific mutagenesis, selection of mutant alleles, and a "gain of function" phenotype." *Ann N Y Acad Sci* **768**: 111-28.
- Li, B., K. L. Murphy, *et al.* (1998). "A transgenic mouse model for mammary carcinogenesis." *Oncogene* **16**(8): 997-1007.
- Li, B., J. M. Rosen, *et al.* (1997). "neu/ERBB2 cooperates with p53-172H during mammary tumorigenesis in transgenic mice." *Mol Cell Biol* **17**(6): 3155-63.
- Li, R., S. Waga, *et al.* (1994). "Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair." *Nature* **371**(6497): 534-7.
- Li, S. and J. M. Rosen (1994). "Glucocorticoid regulation of rat whey acidic protein gene expression involves hormone-induced alterations of chromatin structure in the distal promoter region." *Mol Endocrinol* **8**(10): 1328-35.
- Lin, J., J. Chen, *et al.* (1994). "Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein." *Genes Dev* **8**(10): 1235-46.
- Lin, J., A. K. Teresky, *et al.* (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): 2387-90.

- Lindstrom, M. S., U. Klangby, *et al.* (2001). "p14ARF homozygous deletion or MDM2 overexpression in Burkitt lymphoma lines carrying wild type p53." *Oncogene* **20**(17): 2171-7.
- Linke, S. P., K. C. Clarkin, *et al.* (1996). "A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage." *Genes Dev* **10**(8): 934-47.
- Linz, U., U. Delling, *et al.* (1990). "Systematic studies on parameters influencing the performance of the polymerase chain reaction." *J Clin Chem Clin Biochem* **28**(1): 5-13.
- Linzer, D. I., W. Maltzman, *et al.* (1979). "The SV40 A gene product is required for the production of a 54,000 MW cellular tumor antigen." *Virology* **98**(2): 308-18.
- Liu, G., T. J. McDonnell, *et al.* (2000). "High metastatic potential in mice inheriting a targeted p53 missense mutation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(8): 4174-9.
- Lowe, S. W., E. M. Schmitt, *et al.* (1993). "p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes." *Nature* **362**(6423): 847-9.
- Lozano, G. and A. J. Levine (1991). "Tissue-specific expression of p53 in transgenic mice is regulated by intron sequences." *Mol Carcinog* **4**(1): 3-9.
- Lu, H. and A. J. Levine (1995). "Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(11): 5154-8.
- Lutzker, S. G. and A. J. Levine (1996). "A functionally inactive p53 protein in teratocarcinoma cells is activated by either DNA damage or cellular differentiation." *Nat Med* **2**(7): 804-10.
- Lydon, J. P., F. J. DeMayo, *et al.* (1995). "Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities." *Genes Dev* **9**(18): 2266-78.
- Maltzman, W. and L. Czyzyk (1984). "UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells." *Mol Cell Biol* **4**(9): 1689-94.
- Matas, D., A. Sigal, *et al.* (2001). "Integrity of the N-terminal transcription domain of p53 is required for mutant p53 interference with drug-induced apoptosis." *Embo J* **20**(15): 4163-72.
- McKnight, R. A., M. Spencer, *et al.* (1996). "Severe position effects imposed on a 1 kb mouse whey acidic protein gene promoter are overcome by heterologous matrix attachment regions." *Mol Reprod Dev* **44**(2): 179-84.
- Medema, R. H., R. Klompaker, *et al.* (1998). "p21waf1 can block cells at two points in the cell cycle, but does not interfere with processive DNA-replication or stress-activated kinases." *Oncogene* **16**(4): 431-41.

- Melendy, T. and B. Stillman (1991). "Purification of DNA polymerase delta as an essential simian virus 40 DNA replication factor." *J Biol Chem* **266**(3): 1942-9.
- Midgley, C. A. and D. P. Lane (1997). "p53 protein stability in tumour cells is not determined by mutation but is dependent on Mdm2 binding." *Oncogene* **15**(10): 1179-89.
- Millot, B., L. Montoliu, *et al.* (2003). "Hormone-induced modifications of the chromatin structure surrounding upstream regulatory regions conserved between the mouse and rabbit whey acidic protein genes." *Biochem J* **372**(Pt 1): 41-52.
- Milner, J. and E. A. Medcalf (1991). "Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation." *Cell* **65**(5): 765-74.
- Miyashita, T., S. Krajewski, *et al.* (1994). "Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo." *Oncogene* **9**(6): 1799-805.
- Miyashita, T. and J. C. Reed (1995). "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene." *Cell* **80**(2): 293-9.
- Moll, U. M., M. LaQuaglia, *et al.* (1995). "Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10): 4407-11.
- Momand, J., G. P. Zambetti, *et al.* (1992). "The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation." *Cell* **69**(7): 1237-45.
- Montoliu, L. (2002). "Gene transfer strategies in animal transgenesis." *Cloning Stem Cells* **4**(1): 39-46.
- Mosner, J., T. Mummenbrauer, *et al.* (1995). "Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis." *Embo J* **14**(18): 4442-9.
- Muller, B. F., D. Paulsen, *et al.* (1996). "Specific binding of MAR/SAR DNA-elements by mutant p53." *Oncogene* **12**(9): 1941-52.
- Mummenbrauer, T., F. Janus, *et al.* (1996). "p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity." *Cell* **85**(7): 1089-99.
- Murphy, K. L. and J. M. Rosen (2000). "Mutant p53 and genomic instability in a transgenic mouse model of breast cancer." *Oncogene* **19**(8): 1045-51.
- Niculescu, A. B., 3rd, X. Chen, *et al.* (1998). "Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication." *Mol Cell Biol* **18**(1): 629-43.
- Ohnishi, T., X. Wang, *et al.* (1996). "p53-dependent induction of WAF1 by heat treatment in human glioblastoma cells." *J Biol Chem* **271**(24): 14510-3.

- Oliner, J. D., J. A. Pietenpol, *et al.* (1993). "Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53." *Nature* **362**(6423): 857-60.
- Oren, M. (1985). "The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties." *Biochim Biophys Acta* **823**(1): 67-78.
- Oren, M., W. Maltzman, *et al.* (1981). "Post-translational regulation of the 54K cellular tumor antigen in normal and transformed cells." *Mol Cell Biol* **1**(2): 101-10.
- Ory, K., Y. Legros, *et al.* (1994). "Analysis of the most representative tumour-derived p53 mutants reveals that changes in protein conformation are not correlated with loss of transactivation or inhibition of cell proliferation." *Embo J* **13**(15): 3496-504.
- Overgaard, J., M. Yilmaz, *et al.* (2000). "TP53 mutation is an independent prognostic marker for poor outcome in both node-negative and node-positive breast cancer." *Acta Oncol* **39**(3): 327-33.
- Owen-Schaub, L. B., W. Zhang, *et al.* (1995). "Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression." *Mol Cell Biol* **15**(6): 3032-40.
- Palmer, B. R. and M. G. Marinus (1994). "The dam and dcm strains of *Escherichia coli*--a review." *Gene* **143**(1): 1-12.
- Palmiter, R. D., E. P. Sandgren, *et al.* (1991). "Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(2): 478-82.
- Patschinsky, T. and W. Deppert (1990). "Phosphorylation of p53 in primary, immortalised and transformed Balb/c mouse cells." *Oncogene* **5**(7): 1071-6.
- Peng, C. Y., P. R. Graves, *et al.* (1997). "Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216." *Science* **277**(5331): 1501-5.
- Perry, M. E., J. Piette, *et al.* (1993). "The mdm-2 gene is induced in response to UV light in a p53-dependent manner." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(24): 11623-7.
- Picksley, S. M., B. Vojtesek, *et al.* (1994). "Immunochemical analysis of the interaction of p53 with MDM2;--fine mapping of the MDM2 binding site on p53 using synthetic peptides." *Oncogene* **9**(9): 2523-9.
- Pittius, C. W., L. Hennighausen, *et al.* (1988). "A milk protein gene promoter directs the expression of human tissue plasminogen activator cDNA to the mammary gland in transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(16): 5874-8.
- Pohl, J., N. Goldfinger, *et al.* (1988). "p53 increases experimental metastatic capacity of murine carcinoma cells." *Mol Cell Biol* **8**(5): 2078-81.
- Poon, R. Y., W. Jiang, *et al.* (1996). "Cyclin-dependent kinases are inactivated by a combination of p21 and Thr-14/Tyr-15 phosphorylation after UV-induced DNA damage." *J Biol Chem* **271**(22): 13283-91.

- Powell, B., R. Soong, *et al.* (2000). "Prognostic significance of mutations to different structural and functional regions of the p53 gene in breast cancer." *Clin Cancer Res* **6**(2): 443-51.
- Prives, C. and P. A. Hall (1999). "The p53 pathway." *J Pathol* **187**(1): 112-26.
- Rahko, E., G. Blanco, *et al.* (2003). "A mutant TP53 gene status is associated with a poor prognosis and anthracycline-resistance in breast cancer patients." *Eur J Cancer* **39**(4): 447-53.
- Ramaswamy, S., K. N. Ross, *et al.* (2003). "A molecular signature of metastasis in primary solid tumors." *Nat Genet* **33**(1): 49-54.
- Raycroft, L., H. Y. Wu, *et al.* (1990). "Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene." *Science* **249**(4972): 1049-51.
- Razin, S. V., K. Shen, *et al.* (1999). "Functional analysis of DNA sequences located within a cluster of DNase I hypersensitive sites colocalizing with a MAR element at the upstream border of the chicken alpha-globin gene domain." *J Cell Biochem* **74**(1): 38-49.
- Robinson, G. W., R. A. McKnight, *et al.* (1995). "Mammary epithelial cells undergo secretory differentiation in cycling virgins but require pregnancy for the establishment of terminal differentiation." *Development* **121**(7): 2079-90.
- Rosen, J. M., S. Li, *et al.* (1996). "The mammary gland as a bioreactor: factors regulating the efficient expression of milk protein-based transgenes." *Am J Clin Nutr* **63**(4): 627S-32S.
- Rosen, P. P., M. L. Lesser, *et al.* (1995). "p53 in node-negative breast carcinoma: an immunohistochemical study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis." *J Clin Oncol* **13**(4): 821-30.
- Ryan, J. J., R. Danish, *et al.* (1993). "Cell cycle analysis of p53-induced cell death in murine erythroleukemia cells." *Mol Cell Biol* **13**(1): 711-9.
- Rychlik, W. (1995). "Priming efficiency in PCR." *Biotechniques* **18**(1): 84-6, 88-90.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, *et al.* (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**(4839): 487-91.
- Saiki, R. K., S. Scharf, *et al.* (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* **230**(4732): 1350-4.
- Saitoh, S., J. Cunningham, *et al.* (1994). "p53 gene mutations in breast cancers in midwestern US women: null as well as missense-type mutations are associated with poor prognosis." *Oncogene* **9**(10): 2869-75.
- Sanger, F., S. Nicklen, *et al.* (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-7.

Schraper, S., D. B. Jones, *et al.* (1987). "A comparison of three methods for the determination of the growth fraction in non-Hodgkin's lymphoma." *Br J Cancer* **55**(3): 283-6.

Schulze-Garg, C., J. Lohler, *et al.* (2000). "A transgenic mouse model for the ductal carcinoma in situ (DCIS) of the mammary gland." *Oncogene* **19**(8): 1028-37.

Sears, L. E., L. S. Moran, *et al.* (1992). "CircumVent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase." *Biotechniques* **13**(4): 626-33.

Serrano, M. and M. A. Blasco (2001). "Putting the stress on senescence." *Curr Opin Cell Biol* **13**(6): 748-53.

Sharpless, N. E. and R. A. DePinho (1999). "The INK4A/ARF locus and its two gene products." *Curr Opin Genet Dev* **9**(1): 22-30.

Shaulsky, G., N. Goldfinger, *et al.* (1990). "Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis." *Mol Cell Biol* **10**(12): 6565-77.

Shaulsky, G., N. Goldfinger, *et al.* (1991). "Involvement of wild-type p53 protein in the cell cycle requires nuclear localization." *Cell Growth Differ* **2**(12): 661-7.

Shaulsky, G., N. Goldfinger, *et al.* (1991). "Alterations in tumor development in vivo mediated by expression of wild type or mutant p53 proteins." *Cancer Res* **51**(19): 5232-7.

Shaw, P., R. Bovey, *et al.* (1992). "Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(10): 4495-9.

Sherr, C. J. (1998). "Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway." *Genes Dev* **12**(19): 2984-91.

Siegel, J., M. Fritsche, *et al.* (1995). "Enhanced p53 activity and accumulation in response to DNA damage upon DNA transfection." *Oncogene* **11**(7): 1363-70.

Soussi, T. and C. Beroud (2001). "Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome." *Nat Rev Cancer* **1**(3): 233-40.

Steeg, P. S., G. Bevilacqua, *et al.* (1988). "Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential." *J Natl Cancer Inst* **80**(3): 200-4.

Steinmeyer, K. and W. Deppert (1988). "DNA binding properties of murine p53." *Oncogene* **3**(5): 501-7.

Stott, F. J., S. Bates, *et al.* (1998). "The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2." *Embo J* **17**(17): 5001-14.

- Strano, S., G. Fontemaggi, *et al.* (2002). "Physical interaction with human tumor-derived p53 mutants inhibits p63 activities." *J Biol Chem* **277**(21): 18817-26.
- Sturzbecher, H. W., R. Brain, *et al.* (1992). "A C-terminal alpha-helix plus basic region motif is the major structural determinant of p53 tetramerization." *Oncogene* **7**(8): 1513-23.
- Suggs, S. V., R. B. Wallace, *et al.* (1981). "Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(11): 6613-7.
- Susse, S., C. Janz, *et al.* (2000). "Role of heteroduplex joints in the functional interactions between human Rad51 and wild-type p53." *Oncogene* **19**(39): 4500-12.
- Takai, D. and P. A. Jones (2002). "Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6): 3740-5.
- Thut, C. J., J. L. Chen, *et al.* (1995). "p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60." *Science* **267**(5194): 100-4.
- Tooze, J. (1981) *Molecular Biology of the Tumor Viruses. Part 2, DNA Tumor Viruses.* Cold Spring Harbor, NY.
- Topper, Y. J. and C. S. Freeman (1980). "Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland." *Physiol Rev* **60**(4): 1049-106.
- Towbin, H., T. Staehelin, *et al.* (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(9): 4350-4.
- Turner, B. C., A. A. Gumbs, *et al.* (2000). "Mutant p53 protein overexpression in women with ipsilateral breast tumor recurrence following lumpectomy and radiation therapy." *Cancer* **88**(5): 1091-8.
- Tzeng, Y. J., E. Guhl, *et al.* (1993). "Breast cancer formation in transgenic animals induced by the whey acidic protein SV40 T antigen (WAP-SV-T) hybrid gene." *Oncogene* **8**(7): 1965-71.
- Utermohlen, O., C. Schulze-Garg, *et al.* (2001). "Simian virus 40 large-T-antigen-specific rejection of mKSA tumor cells in BALB/c mice is critically dependent on both strictly tumor-associated, tumor-specific CD8(+) cytotoxic T lymphocytes and CD4(+) T helper cells." *J Virol* **75**(22): 10593-602.
- Waga, S., G. J. Hannon, *et al.* (1994). "The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA." *Nature* **369**(6481): 574-8.
- Waldman, T., K. W. Kinzler, *et al.* (1995). "p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells." *Cancer Res* **55**(22): 5187-90.
- Weigele, M., S. De Bernardo, *et al.* (1973). "Fluorescent labeling of proteins. A new methodology." *Biochem Biophys Res Commun* **54**(3): 899-906.

- Weigele, M., S. DeBernardo, *et al.* (1973). "Fluorometric assay of secondary amino acids." *Biochem Biophys Res Commun* **50**(2): 352-6.
- Weissker, S. N., B. F. Muller, *et al.* (1992). "Specific and complex interactions of murine p53 with DNA." *Oncogene* **7**(10): 1921-32.
- White, T. J., N. Arnheim, *et al.* (1989). "The polymerase chain reaction." *Trends Genet* **5**(6): 185-9.
- Whitelaw, B. and J. Webster (1998). "Chromatin heterogeneity within multicopy transgene arrays." *Transgenic Res* **7**(5): 401-2.
- Will, K., G. Warnecke, *et al.* (1998). "High affinity MAR-DNA binding is a common property of murine and human mutant p53." *J Cell Biochem* **69**(3): 260-70.
- Will, K., G. Warnecke, *et al.* (1998). "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): 13681-6.
- Woodcock, D. M., P. J. Crowther, *et al.* (1989). "Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants." *Nucleic Acids Res* **17**(9): 3469-78.
- Wu, X., J. H. Bayle, *et al.* (1993). "The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop." *Genes Dev* **7**(7A): 1126-32.
- Xiong, Y., G. J. Hannon, *et al.* (1993). "p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases." *Nature* **366**(6456): 701-4.
- Yonish-Rouach, E., D. Resnitzky, *et al.* (1991). "Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6." *Nature* **352**(6333): 345-7.
- Zerrahn, J., W. Deppert, *et al.* (1992). "Correlation between the conformational phenotype of p53 and its subcellular location." *Oncogene* **7**(7): 1371-81.
- Zerrahn, J., U. Knippschild, *et al.* (1993). "Independent expression of the transforming amino-terminal domain of SV40 large T antigen from an alternatively spliced third SV40 early mRNA." *Embo J* **12**(12): 4739-46.
- Zerrahn, J., O. Utermohlen, *et al.* (1996). "Protective immunity in BALB/c mice against the simian virus 40-induced mKSA tumor resulting from injection of recombinant large T antigen. Requirement of CD8+ T lymphocytes." *J Immunol* **156**(10): 3919-24.
- Zhan, Q., M. J. Antinore, *et al.* (1999). "Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45." *Oncogene* **18**(18): 2892-900.
- Zhang, H. S. and D. C. Dean (2001). "Rb-mediated chromatin structure regulation and transcriptional repression." *Oncogene* **20**(24): 3134-8.

Zhang, S., E. S. Ramsay, *et al.* (1998). "Cdkn2a, the cyclin-dependent kinase inhibitor encoding p16INK4a and p19ARF, is a candidate for the plasmacytoma susceptibility locus, Pctr1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(5): 2429-34.

Zink, D., C. Mayr, *et al.* (2002). "Association of p53 and MSH2 with recombinative repair complexes during S phase." *Oncogene* **21**(31): 4788-800.

7. Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des Tumorsuppressors p53	4
Abb. 2: p53 Stabilisierung nach DNS-Schäden und Onkogenexpression	9
Abb. 3: p53-Mutationsspektrum in humanen Tumoren und im Mammakarzinom	15
Abb. 4: p53-Kerndomäne im Komplex mit DNS-Doppelhelix	16
Abb. 5: Schematische Darstellung der Topographie muriner Mammas	18
Abb. 6: Schematische Darstellung der verwendeten murinen <i>wtp53</i> -DNS	22
Abb. 7: Schematische Darstellung der p53-DNS-Teilkonstrukte	24
Abb. 8: Vergleich der humanen und murinen p53-DNS-Sequenz zur Einführung einer Hot-Spot-Punktmutation	26
Abb. 9 A: Plasmidkarte von <i>WAP-mutp53</i> Transgen-Konstrukten	28
Abb. 9 B: <i>WAP-mutp53</i> Transgen-Konstrukte	29
Abb. 10: p <i>WAP-mutp53</i> Restriktion für die Pronukleus-Mikroinjektion	31
Abb. 11: Identifizierung transgener <i>WAP-mutp53</i> Tiere	33
Abb. 12: PCR-Analyse potentiell <i>WAP-mutp53</i> transgener Tiere	33
Abb. 13: PCR-Analyse <i>WAP-mutp53</i> transgener Tiere	37
Abb. 14: RT-PCR-Analyse der <i>WAP-mutp53</i> transgenen Maus-Linie CB6-4	39
Abb. 15: Morphologie und Immunhistologie von murinem Mammagewebe transgener <i>WAP-mutp53^{R245W}</i> Linien mit geringer und intermediärer Transgen-Expression	45
Abb. 16: Morphologie und Immunhistologie von murinem Mammagewebe einer transgenen <i>WAP-mutp53^{R245W}</i> Linie mit intermediärer Transgen-Expression	47
Abb. 17: Morphologie und Immunhistologie von murinem Mammagewebe transgener <i>WAP-mutp53^{R245W}</i> Linien mit starker Transgen-Expression	48
Abb. 18: Morphologie und Immunhistologie von murinem Mammagewebe transgener <i>WAP-mutp53^{R270H}</i> Linien mit geringer Transgen-Expression	49
Abb. 19: Morphologie und Immunhistologie von murinem Mammagewebe transgener <i>WAP-mutp53^{R270H}</i> Linien mit intermediärer und starker Transgen-Expression	50
Abb. 20: Nachweis von mutp53 in Immunpräzipitaten aus murinem Mammagewebe und muriner Milz der transgenen <i>WAP-mutp53^{R245W}</i> Linie CB6-4	52
Abb. 21: Morphologie und Immunhistologie von murinem Mammagewebe der niedrig exprimierenden transgenen <i>WAP-mutp53^{R245W}</i> CB6-4 Linie	54
Abb. 22: Ki-67 Immunmarkierung von murinem, laktierendem Mammagewebe	56

Abb. 23: <i>in vitro</i> Translation von <i>p53</i> cDNS	59
Abb. 24: Immunfluoreszenz-Markierung und Western-Blot stabil transfizierter FR3 Zellen	60
Abb. 25: RT-PCR von murinem, laktierendem, bi-transgenem <i>WAP-mutp53^{R270H}</i> x <i>WAP-T</i> , Mammagewebe	62
Abb. 26: Immun-Doppel-Markierung von murinem, laktierendem, bi-transgenem <i>WAP-mutp53^{R270H}</i> x <i>WAP-T</i> , Mammagewebe	63
Abb. 27: Histopathologie und Immunhistologie von murinem Mammagewebe einer bi-transgenen <i>WAP-mutp53^{R270H}</i> x <i>WAP-T</i> Linie	65
Abb. 28: Histopathologie und Immunhistologie von murinem Mammagewebe einer bi-transgenen <i>WAP-mutp53^{R245W}</i> x <i>WAP-T</i> Linie	67
Abb. 29: <i>Overlap-Extension</i> -PCR-Mutagenese	104
Abb. 30: Ovidukt-Präparation	109
Abb. 31: Präparation der Zygoten aus dem Ovidukt	110

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primer zur Identifizierung <i>WAP-mutp53</i> transgener Mäuse	32
Tabelle 2: Herstellung von <i>WAP-mutp53</i> transgenen Mäusen	34
Tabelle 3: Herstellung von <i>WAP-mutp53</i> transgenen Mäusen	36
Tabelle 4: Transkriptions-Analyse von <i>WAP-mutp53</i> transgenen Mäusen	40
Tabelle 5a: Phänotyp-Analyse laktierender <i>WAP-mutp53^{R245W}</i> transgener Maus-Linien	42
Tabelle 5b: Phänotyp-Analyse laktierender transgener <i>WAP-mutp53^{R270H}</i> Maus-Linien	43
Tabelle 6: Grad der immunhistologisch detektierten Transgen-Expression in <i>WAP-mutp53</i> transgenen Mäusen	44
Tabelle 7: Zur Expressionsanalyse verwendete murine Wildtyp und Mutanten <i>p53</i> Gene	59
Tabelle 8: Primer	84

7.3 Abkürzungen

°C	Grad Celsius	CMV	Cytomegalo Virus
μ	mikro	ConA	Concanavalin A
5'-UTR	5'-untranslatierte Region	cpm	Impulse („counts“) pro Minute
α	anti	CSB	Cockayne´s Syndrom B Protein
A	Adenin	Cys	Cystein
Ac	Acetylierung	d.h.	das heißt
APS	Ammoniumperoxodisulfat	dATP	Desoxyadenosintriphosphat
ARF	alternative reading frame gene	DCIS	<i>ductales Carcinoma in situ</i>
Arg	Arginin	dCTP	Desoxycytidintriphosphat
AS	Aminosäure	ddNTPs	Didesoxynukleotide
Asp	Asparagin	DEPC	Diethylpyrocarbonat
AT	Annealing-Temperatur	dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
ATM	ataxia telangiectasia mutated	DMBA	Dimethylbenzanthrazen
ATP	Adenosintriphosphat	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
BAC	Bacterial Artificial Chromosome	DNS	Desoxyribonukleinsäure
Bp	Basenpaar	dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
BrCN-	Bromcyan-	ds	Doppelstrang
BrdUTP	5 -Bromo-2'-desoxyuridintriphosphat	DTAF	Dichlor-triazinyl-aminofluoreszein
BSA	Rinderserumalbumin	DTT	Dithiothreitol
BUR	Base Unpairing Region	dTTP	Desoxythymidintriphosphat
bzw.	beziehungsweise	<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
c	Centi-	ECL	verstärkte Chemilumineszenz
C	Cytosin	EDTA	Ethylendiamin-tetra-Essigsäure
ca.	circa	EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
CAK	Cdk activating kinase	EGTA	Ethylenglykoldiamintetraessigsäure
CAP	7-Methyl-Guanosin Kappe, Erkennungstelle des eukaryotischen Initiationsfaktor(eIF) 4e auf der mRNA	FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase	G	Guanin
cdk	Cyclin abhängige Kinase	g	Gramm
cDNA	<i>copy</i> DNA	g	Gravitationskonstante
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation	GAPDH	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase
Chk2	cell cycle checkpoint kinase 2	GFAP	glial fibrillary acidic protein
Ci	Curie	GFP	Green Fluorescent Protein
cip1	cdk interacting protein		
CK 2	Casein Kinase 2		
cm	Zentimeter		

Glu	Glutamin	MDR1	mutidrug transport resis- tance protein
Gly	Glycin		
GTP	Guanosintriphosphat	Min.	Minute
Gy	Gray	MOPS	Morpholinopropansulfon säure
h	Stunde		
H	Histidin	mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
HAT	Histon-Acetylasen	mut	Mutante
HCG	humanes Chorionic Gonadotropin	mutp53	Mutanten p53
HDAC	Histon-Deacetylasen	n	Nano
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin- N'-2-ethan-sulfonsäure	neg.	negativ
His	Histidin	Neo	Neomycin Resistenz
Hsc 70	Heat Shock Protein 70	NER	Nukleotid Exzisions Repara- tur
iCre	verbesserte (improved) Cre- Rekombinase	NES	Nuclear Export Signal
IgG	Immunglobulin G	NF-kB	nuclear factor kB
Ile	Isoleuzin	NLS	Nukleus Lokalisierungssignal
Iono	Ionomycin	NP 40	Nonidet P-40
IP	Immunpräzipitation	OD	optische Dichte
IPTG	Isopropyl-b-D- thiogalaktopyranosid	ORF	„open reading frame“, offener Leserahmen
IRE	„iron response element“	P	Phosphorylierung
IRES	„internal ribosome entry site“	PAC	ein auf den Phagen P1 basierendes artifizielles Bakterien-Chromosom
Kb	Kilobasen	PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
kDa	Kilodalton		
konz.	konzentriert	PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
l	Liter		
LB- Medium	Luri-Bertani-Medium	PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
Leu	Leucin	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Lsg	Lösung	PE	Phycoerythrin
LTR	long terminal repeat	PEG	Polyethylenglykol
m	milli	pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration
M	Molar (mol/l)		
MaCa	Mammakarzinom	PI	Proteinase-Inhibitoren
MAR/SAR	matrix attachment region	PIPES	Piperazin-1,4-bis (2-ethan sulfonsäure)
MBP	Methyl-Cytosin-Bindungs- Proteine		
MDM2	murine double minute chromosome-2	PKC	Protein Kinase C

PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat	TCA	Trichloressigsäure
PMS	Gonadotropin from Pregnant Mares´ Serum	TDLU	terminal duktulo lobuläre Einheit
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid	TE	Tris-EDTA
PO	Peroxidase	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
pos.	positiv	TF	Transkriptionsfaktor
Pos.	Nukleotid-Positon	TFIID	Transkriptionsfaktor II D
pp	post Partum	TFIIH	Transkriptionsfaktor II H
PPO	2, 5,-Diphenyloxazol	Tfx	Transfektion
PVDF	Polyvinylidenfluorid	TR	Texas Red (Sulforhodamin-101-säurechlorid)
R	Arginin	Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
RFC	Replikationsfaktor C	tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
RGC	Ribosomal Gene Cluster	Trp	Tryptophan
RNA	Ribonukleinsäure	Trp53	transformation related tumorsupressor p53
RNase	Ribonuklease	TSA	Trichostatin
ROS	<i>reactive oxygen species</i>	tsp53Val ¹³⁵	temperatursensitives p53
RP-A	Replikations-Protein A	TTP	Thymidintriphosphat
RT	Raumtemperatur	TUNEL	TdT-mediated dUTP <i>nick end labeling</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptionsgekoppelte PCR	U	internationale, enzymatische Aktivitätseinheit (Unit)
S	Sumolierung	ÜNK	Über-Nacht-Kultur
SDS	Natriumdodecylsulfat	Upm	Umdrehungen pro Minute
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	UTP	Uridintriphosphat
SH3	src-Homologie-Domäne	UTR	„untranslated region“
siRNA	synthetic, short interfering RNA	UV	Ultrviolette Strahlung
SPF	spezifisch pathogen frei	v/v	Volumenprozent
ss	Einzelstrang	Val	Valin
SV 40	Simian Virus 40	W	Tryptophan
T	Thymidin	w/v	Gewicht pro Volumen
TAF	Transkriptions-Aktivierungsfaktor	waf1	wildtype p53 activated fragment
T-Ag	großes Tumor-Antigen	WAP	<i>whey acidic protein gene</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>	wt	Wildtyp
TBE	Tris-Borsäure-EDTA	wtp53	Wildtyp p53
TBP	TATA-Box Bindungs-Protein	X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
TBq	Terabecquerel		
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung		
TBST	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20		

XPB, XPD Xeroderma Pigmentosa B /D
Protein
YAC Yeast Artificial Chromosome

7.4 Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Professor Dr. Wolfgang Deppert für die Möglichkeit dieses interessante Thema im Bereich der Mammakarzinom-Forschung zu bearbeiten. Darüber hinaus möchte ich Herrn Professor Dr. Wolfgang Deppert auch für die Diskussionsbereitschaft, Motivation und Unterstützung im Laufe dieser Promotionsarbeit herzlich danken.

Herrn Professor Dr. Horst Lörz danke ich ausdrücklich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Bei Herrn Dr. Jürgen Löhler möchte ich mich besonders für zahlreiche Diskussionen und die intensive Betreuung in allen pathologischen und immunhistologischen Aspekten dieser Arbeit bedanken, sowie für das kritische und produktive Korrekturlesen dieser Arbeit.

Frau Karin Heigl danke ich für ihre exzellente technische Arbeit der Gewebe-Untersuchungen.

Herrn Roland Gugel danke ich für eine ausführliche Einweisung in den Umgang mit Labortieren und seine Unterstützung während dieser Arbeit.

Herrn Dr. Michael Bösl und Frau Tina Mordhorst, am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH), möchte ich für die Kooperationsbereitschaft und die Durchführung der Pronukleus-Mikroinjektionsexperimente danken.

Allen Mitarbeitern der Tierhaltung, Herrn Hasso Münd, Frau Beate Miksche, Frau Anke Dorendorf und Herrn Matthias Timmermann, ohne deren Arbeit dies Projekt nicht zu verwirklichen gewesen wäre, möchte ich danken.

Simone Profittlich und Christian Bauer danke ich für das aufmerksame Korrekturlesen dieser Arbeit und ihre sinnvollen und hilfreichen Verbesserungsvorschläge.

Kai Habben danke ich für Anregungen und Motivationen während dieser Promotionsarbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Christian Bauer, Nina Heinlein und Andrea Hermannstädter!

Zu guter Letzt möchte ich meinen Freunden und meiner Familie, ganz besonders meiner Mama und meiner Schwester Ute danken, die mich all die Jahre hindurch unterstützt, an mich geglaubt und mich in meinen Plänen bestärkt haben.