Cytoplasmatische Sequestrierung von p53 in der Gliomzelllinie C6 aus *Rattus norvegicus* (Berkenhout): Interaktion mit dem Glucocorticoidrezeptor und Verankerung am Cytoskelett

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

am Fachbereich Biologie

der Universität Hamburg

Vorgelegt von

Dipl. Biol. Rudolph Reimer

Hamburg, 2005

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Priv.-Doz. Dr. H. QUADER
Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Priv.-Doz. Dr. W. BOHN

Tag der Disputation: 17. Dezember 2004

Hamburg, den 01. Dezember 2004

Universität Hamburg
Fachbereich Biologie
14/1

Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

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

Inhaltsverzeichnis 1

Abkürzungsverzeichnis 4

Zusammenfassung 6

1. Einleitung 8

1.1. Das Tumorsuppressorprotein p53 9

1.1.1. Relevanz für die Tumorgenese 9

1.1.2. Struktur des p53 Proteins 11

1.1.2.1. Aminoterminale Region. 12

1.1.2.2. Zentrale Region 12

1.1.2.3. Carboxyterminale Region 13

1.1.3. Funktionen und Regulation von p53 13

1.1.4. Inaktivierung von p53 18

1.2. Problemstellung 21

2. Materialien 23

2.1. Eukaryotische Zelllinien 23

2.2. Prokaryotische Zellen 23

2.3. Expressionsvektoren 24

2.4. Primäre Antikörper 25

2.5. Brückenantikörper und Normalseren 25

2.6. Gekoppelte, sekundäre Antikörper 26

2.7. Fluoreszenzverbindungen 26

2.8. Proteine und Enzyme 26

2.9. Chemikalien 27

2.10. Verbrauchsmaterialien 28

2.11. Geräte 29

2.12. Computer-Software 30

2.13. Puffer und Lösungen 30

3. Methoden 33

3.1. Zellbiologische Methoden 33

3.1.1. Zellkultur 33
3.1.2. Auftauen und einfrieren von Zellen 33
3.1.3. Behandlung mit chemischen Agenzien 34
3.1.4. Cytoplasmatische Extraktion 34
3.1.5. Immunfluoreszenzmarkierung 35
3.1.6. Bildbearbeitung 36
3.1.7. Kolokalisations-Analyse 37
3.1.7.1. Kolokalisationskoeffizient 37
3.1.7.2. Gewichteter Kolokalisationskoeffizient 37
3.1.7.3. Korrelationskoeffizient, Pearson´s Korrelationskoeffizient 38
3.1.8. BrdU Zellproliferations-Assay 38
3.1.9. Durchflußcytometrie (FACS-Analyse) 38

3.2. Nukleinsäure-analytische Methoden 39
3.2.1. Gewinnung transformationskompetenter Bakterien 39
3.2.2. Transformation kompetenter Bakterien 40
3.2.3. Präparation von Plasmid-DNS aus *E.coli*-Zellen 40
3.2.4. Transiente Transfektion 41

3.3. Proteinanalytische Methoden 41
3.3.1. Zelllyse 41
3.3.2. Proteinbestimmung 41
3.3.3. Immunpräzipitation 42
3.3.4. SDS-PAGE 42
3.3.5. Western Blot und Immundetektion 43
3.3.6. ECL-Reaktion 44

4. Ergebnisse 45

4.1. Die cytoplasmatische Verankerung von tsp53val135 an Vimentin erfolgt über den Glucocorticoidrezeptor 45
4.1.1. p53 kolokalisiert mit dem Glucocorticoidrezeptor am Cytoskelett 45
4.1.2. Die Verankerung des p53-Glucocorticoidrezeptor-Komplexes am Cytoskelett erfordert die Anwesenheit von Vimentin 48
4.1.3. p53, Glucocorticoidrezeptor, Hitzeschockproteine und Vimentin bilden einen Proteinkomplex *in vivo* 49
4.1.4. p53 und der Glucocorticoidrezeptor interagieren über die zentralen Domänen 50
4.1.5. Die Aktivierbarkeit des Glucocorticoidrezeptors wird durch den p53-Status determiniert 52

4.2. Die cytoplasmatische Verankerung des Glucocorticoidrezeptors an Vimentinfilamenten ist ein p53-unabhängiges Phänomen 55
4.2.1. Die cytoplasmatische Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors in C6 Zellen ist von der Anwesenheit von Vimentin abhängig 55
4.2.2. Der Glucocorticoidrezeptor bindet an Vimentinfilamente 56

4.2.3. Aktin ist an der Verankerung des Glucocorticoidrezeptors nicht beteiligt 59
4.2.3.1. Depolymerisation des Aktingerüstes mit Cytochalasin B 63
4.2.4. Tubulin ist an der Verankerung des Glucocorticoidrezeptors nicht beteiligt 66
4.2.4.1. Depolymerisation des Mikrotubuli-Netzwerkes mit Nocodazol 70
4.2.5. Das Hitzeschockprotein HSP70 kolokalisiert mit dem Glucocorticoidrezeptor 74
4.2.6. Das Immunophilin HSP56 kolokalisiert mit dem Glucocorticoidrezeptor 76
4.2.7. Der am Cytoskelett verankerte Glucocorticoidrezeptor ist aktivierbar 79
4.2.8. Über die Verankerung werden Kontrollfunktionen des Glucocorticoidrezeptors moduliert 80

4.3. Die Anwesenheit von Vimentin ist für die cytoplasmatische Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors allein nicht ausreichend 83
4.3.1. Die Verankerung des Glucocorticoidrezeptor-Komplexes erfolgt nicht über den Carboxyterminus von Vimentin 84
4.3.2. Die Verankerung des Glucocorticoidrezeptors am Cytoskelett erfordert die Anwesenheit des Intermediärfilamentproteins Nestin 86
4.3.3. Die cytoplasmatische Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors erfordert die Kopolymerisation von Nestin mit Vimentin 87
4.3.4. In nestin-negativen RAT1 Zellen lokalisiert der Glucocorticoidrezeptor im Zellkern 88
4.3.5. Die ektope Expression von Nestin in Rat1 Zellen führt zur Verankerung des Glucocorticoidrezeptors am Cytoskelett 89

4.4. Die nestin-abhängige Verankerung des Glucocorticoidrezeptors an Vimentin findet sich auch in Primärzellen 90
4.4.1. Fibroblasten aus Mausembryonen zeigen eine Glucocorticoidrezeptor-Verankerung am Cytoskelett 91

5. Diskussion 93

5.1. Bindung zwischen Glucocorticoidrezeptor und p53 94

5.2. "Reifungszustand" des Glucocorticoidrezeptors und Bindung von p53 97

5.3. Bindung von p53 und Aktivierbarkeit des "reifen" Rezeptors 98

5.4. Die Rolle von Cytoskelettkomponenten für die cytoplasmatische Verankerung des Glucocorticoidrezeptors 100

5.5. Relevanz der cytoplasmatischen Verankerung des Glucocorticoidrezeptors für die Zellproliferation 102

5.6. Modell des Verankerungsmechanismus 103

5.7. Ausblick 106

6. Literaturverzeichnis 107

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

- APS Ammoniumperoxodisulfat
- AS Aminosäuren
- ATP Adenosintriphosphat
- BrdU Bromodeoxyuridin
- BSA Bovines Serumalbumin
- Dex Dexamethason
- DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- DMSO Dimethyl sulfoxid
- DNS Desoxyribonukleinsäure
- DTAF Dichlor triazinyl aminofluoreszein
- DTT Dithiothreitol
- ECL Enhanced Chemoluminescence
- EDTA Ethylen diamin tetraessigsäure
- EGFP Enhanced Green Fluorescent Protein
- EGTA Ethylen glycol bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
- FACS Fluorescence activated cell sorter
- FCS Fötales Kälberserum
- GFAP glial fibrillary acidic protein
- GFP Green Fluorescent Protein
- GR Glucocorticoidrezeptor
- HEPES (N-2-hydroxyethyl)-piperazin-N'(2-ethan sulfonsäure)
- IgG Immunglobulin G
- IP Immunpräzipitation
- kb Kilobasen
- kDa Kilodalton
- NER Nukleotid Exzisions Reparatur

- Nes Nestin
- NES Nuclear Export Signal
- NLS Nuclear Import Signal
- NP 40 Nonidet P 40
- PAGE Polyacrylamid Gelelektrophorese
- PBS Phosphat gepufferte Salzlösung
- PEG Polyethylenglykol
- PGS Protein G Sepharose
- PI Propidiumiodid
- PIPES Piperazin-1,4-bis (2-ethan sulfonsäure)
- RNase Ribonuclease
- SDS Natriumdodecylsulfat
- SV40 Simian Virus 40
- TBST Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20
- TEMED N,N,N',N' Tetramethyl ethylen diamin
- Tris Trishydroxymethyl aminomethan
- $tsp53^{Val-135}$ temperatursensitives p53
- U enzymatische Aktivitätseinheit (Unit)
- UpM Umdrehungen pro Minute
- UV Ultrviolette Strahlung
- v/v Volumenprozent
- Vim Vimentin
- w/v Gewichtsprozent
- waf1 wildtype p53 activated fragment
- X-Gal 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat

ZUSAMMENFASSUNG

Das Tumorsuppressorprotein p53 verhindert eine maligne Transformation der Zellen, indem es die Integrität des Genoms überwacht und bei Auftreten von Schäden entweder einen Zellzyklusarrest oder den programmierten Zelltod (Apoptose) einleitet. Diese Fähigkeit begründete seinen Ruf als "Wächter des Genoms".

Die überwiegende Zahl der Tumoren ist entweder durch Verlust oder durch Inaktivierung von p53 gekennzeichnet. In den meisten Fällen ist p53 auf genetischer Ebene durch Mutationen inaktiviert; in einigen Tumorarten findet man jedoch strukturell intaktes wtp53 welches durch epigenetische Mechanismen, wie dem Kernausschluss, ausser Funktion gesetzt ist. Zu solchen Tumorarten gehören z.B. Glioblastome, Neuroblastome, Brust- und Dickdarm-Karzinome.

Cytoplasmatisch lokalisiertes wtp53 ist jedoch auch in einer Reihe von Geweben vorhanden, welche Differenzierungsprozesse durchlaufen. Vermutlich dient der Kernausschluss während der Differenzierung einer temporären Inaktivierung wachstumshemmender Eigenschaften von p53.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand eines experimentellen Zellsystems der Mechanismus der cytoplasmatischen Sequestrierung von p53 untersucht. Die Untersuchungen basieren auf C6 Rattengliomzellen, die mit einer temperatursensitiven Mutante von p53 ($tsp53^{Val135}$) stabil transfiziert worden waren. In diesem System wird p53 durch Bindung an Vimentinfilamente cytoplasmatisch verankert. Der Verlust der Verankerung bei permissiver Temperatur führt zur Kernwanderung von p53 und induziert einen Wachstumsarrest.

Es wird gezeigt, dass die Verankerung von p53 an die Vimentinfilamente durch den Glucocorticoidrezeptor vermittelt wird. Der Rezeptor ist mit Hitzeschockproteinen und Immunophilinen assoziiert und daher in dem „reifen“, aktivierbaren Status. Jedoch wird die Aktivierung des Rezeptors blockiert, solange er p53 gebunden hat. Löst sich p53 aus diesem Komplex, so kann der Rezeptor durch einen Liganden aktiviert werden und transloziert in den Zellkern. Durch die Bindung blockieren sich die beiden als Transkriptionsfaktoren wirksamen Moleküle p53 und Glucocorticoidrezeptor also gegenseitig.

Die cytoplasmatische Verankerung des Glucocorticoidrezeptors an Vimentin erfolgt unabhängig von p53 und ist so auch in p53-negativen Zelllinien

anzutreffen. Die Anwesenheit von Vimentin reicht aber allein nicht aus. Es wird gezeigt, dass nur solche Zellen den Glucocorticoidrezeptor im Cytoplasma verankern können, die neben Vimentin auch das Intermediärfilamentprotein Nestin exprimieren. Nestin ist ein Intermediärfilamentprotein, das auf einer niedrigen Differenzierungsstufe der Zellen exprimiert wird und in differenzierten Zellen fehlt. Die Anwesenheit von Nestin allein ist nicht ausreichend, um den Rezeptor zu verankern. D.h., die cytoplasmatische Verankerung des Glucocorticoidrezeptors ist nur möglich, wenn Nestin und Vimentin kopolymerisiert vorliegen. Die Nestin/Vimentin abhängige Verankerung des Glucocorticoidrezeptors findet sich auch in Primärzellen, die aus Mäusen oder Ratten isoliert wurden, ist also kein tumorspezifisches Ereignis.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass mit der zytoplasmatischen Verankerung des Glucocorticoidrezeptor-Komplexes an Vimentin/Nestin-Filamente ein Mechanismus vorliegt, mit dem Stressanworten des Rezeptors in der Differenzierung gesteuert werden können. Die Bindung von p53 an diesen Komplex blockiert nicht nur die Funktion des Tumorsuppressors, sie blockiert auch diese hormonabhängige Steuerung der Stressantwort und nimmt damit möglicherweise auch Einfluss auf die Differenzierung.

1. EINLEITUNG

Die Kontrolle der Zellteilung ist ein essentieller Prozess in allen *Metazoa*, um die Integrität der Individuen aufrechtzuerhalten. Während Mutationen in freilebenden, einzelligen Organismen (z.B. Prokaryonten) den Zellen eine hohe Flexibilität gegenüber äußeren Faktoren gewährleisten, führen Veränderungen im Genom höherer Organismen, sofern sie einzelnen Zellen Konkurrenzvorteile bieten, zu unkontrollierter, autonomer Zellteilung innerhalb der somatischen Zellpopulation. Dies bildet die Grundlage für die Entstehung von Tumoren und gefährdet damit die Existenz des gesamten Organismus (Alberts, 1995).

Die Gefahr einer den Organismus schädigenden somatischen Mutation besteht für die Zellen unentwegt, da sie permanentem endo- und exogenen genotoxischen Stress ausgesetzt sind. So finden endogen z.B. Depurinierungen oder Modifikationen der DNS durch Hydroxylradikale statt (Lindahl und Nyberg, 1972; Cathcart *et al.* 1984). Exogene Reize, wie ultraviolette oder ionisierende Strahlung, induzieren gravierende aberrante Strukturveränderungen in der DNS. Kanzerogene Agenzien, wie z.B. polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe oder Aflatoxine, tragen ebenfalls zur Modifikation des Genoms bei (Knippers, 1995).

Um das Genom vor der Implementierung von DNS-Schäden zu schützen, existiert in der Zelle ein komplexes, regulatorisch wirkendes Netzwerk von Signalkaskaden, das in der Lage ist, die Proliferation geschädigter Zellen zu unterbinden und die Reparatur von DNS-Schäden einzuleiten, bevor diese sich als Mutationen manifestieren können. Ist der Schaden zu groß, wird die betroffene Zelle durch den programmierten Zelltod (Apoptose) eliminiert. Dennoch beträgt die mittlere Häufigkeit, mit der Mutationen von diesem Schutzsystem unentdeckt bleiben, bei ca. $1 \cdot 10^{-7}$ Mutationen pro Zellgeneration (Elmore *et al.*, 1983) oder $1{,}4 \cdot 10^{-10}$ Mutationen pro Nukleotid pro Zellgeneration (Loeb, 1991). Für die Entstehung von Tumorzellen müssen drei bis sieben solcher Zufallsereignisse pro Zelle unabhängig voneinander auftreten (Vogelstein *et al.*, 1988).

Mutationen in bestimmten Genen besitzen eine gewichtige Bedeutung für die Tumorgenese; dazu gehören die Proto-Onkogene und die Tumorsuppressorgene. Zur Gruppe der Proto-Onkogene gehören hochgradig konservierte Gene, deren Produkte direkt oder indirekt die Zellproliferation begünstigen. Sie kodieren z.B. für Transkriptionsfaktoren (wie *c-myc*), Wachstumsfaktor-Rezeptoren (wie *sis*)

oder für Proteine der intrazellulären Signalübertragung (wie *ras*). Durch Punktmutation, Deletion, Amplifikation oder chromosomales Rearrangement in diesen Genen kann es zu Veränderungen in der Struktur des entsprechenden Proteins oder dessen intrazellulärer Konzentration kommen. Führt dies zur erhöhten Aktivität, einer sog. "Hyperaktivierung" des entsprechenden Faktors, wird die Zelle zu unkontrollierter Proliferation angeregt und kann sich zu einer Tumorzelle entwickeln (Bishop, 1991).

Zur Gruppe der Tumorsuppressorgene gehören Gene, deren Produkte eine inhibitorische Wirkung auf die Zellproliferation haben. Dazu gehören einige DNA-Reparaturproteine (MSH1, MSH2), Zellzyklus-Regulatoren (Bax, pRb, p53), Transkriptionsfaktoren (E2F1) oder Kinase-Inhibitoren (INK4A). Punktmutationen in diesen Genen, oder Verlust dieser Allele führen zu einer drastisch erhöhten Wahrscheinlichkeit der Tumorentstehung.

1.1. Das Tumorsuppressorprotein p53

1.1.1. Relevanz für die Tumorgenese

Das Tumorsuppressorprotein p53 spielt eine zentrale Rolle in der Tumorgenese (Anklesaria, 2000). Dies wird allein schon durch die sehr hohe Mutationshäufigkeit des p53-Gens in humanen Tumoren von über 50 % deutlich (Hollstein *et al.*, 1991). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass der Verlust von p53 Allelen die Wahrscheinlichkeit einer Tumorbildung drastisch erhöht. In Abbildung 1 sind Überlebenskurven von Mäusen mit normalen p53 Wildtyp-Allelen ($p53^{+/+}$), mit nur einem p53 Wildtypallel ($p53^{+/-}$) und von Mäusen mit Verlust beider p53-Allele ($p53^{-/-}$) dargestellt. Der Verlust von nur einem Allel führt zu einer Erhöhung der Tumorhäufigkeit von 45 % auf 80 % und somit zu einer höheren Sterberate. Der Verlust von beiden Allelen führt zu einer drastischen Verringerung der Lebensdauer der Tiere durch eine Tumorwahrscheinlichkeit von nahezu 100 % (Lewin, 2004).

Auch für den Menschen sind die Auswirkungen vererbbarer Gendefekte in p53 bekannt. So zeigen Patienten, welche an dem sog. Li-Fraumeni-Syndrom leiden und nur eine funktionsfähige Kopie des p53-Gens in sich tragen, eine hohe Anfälligkeit für Krebs. Solche Personen bekommen häufig schon im jugendlichen

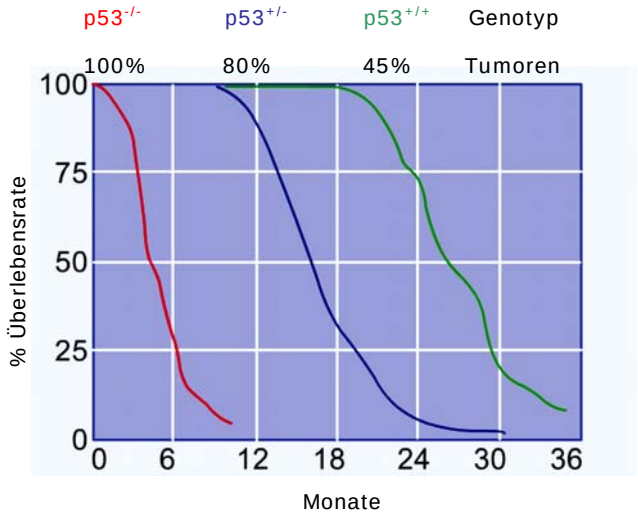


Abbildung 1:
P53-Allelverlust führt zur Tumorakkumulation und dadurch zur verringerten Überlebensrate im Mausmodell (Grafik aus Lewin, 2004)

Alter mehrere, voneinander unabhängige Tumoren in unterschiedlichen Geweben. In den Tumorzellen dieser Patienten ist dann auch das verbliebene p53-Allel defekt. Dies ist hauptsächlich auf Klasse I Mutationen wie 248W und 273H, bzw. Klasse II Mutationen wie 175H und 245D, welche alle die DNA-bindende Domäne des Proteins betreffen (s. 1.1.2), zurückzuführen (Malkin, 1993).

P53 wurde erstmals 1979 als Kopräzipitat des großen T-Antigens aus Lysaten von SV40 transformierten Nagerzellen isoliert (Kress *et al.*, 1979; Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979). Zunächst als Proto-Onkogen eingestuft (Crawford *et al.*, 1981; Eliyahu *et al.*, 1984; Wolf *et al.*, 1984), wurde es Ende der 80iger Jahre als Tumorsuppressorprotein reklassifiziert, da sich herausstellte, dass seine onkogenen Eigenschaften ausschließlich auf Mutationen in zurückzuführen waren (Hinds *et al.*, 1989). In den folgenden Jahren konnte gezeigt werden, dass wtp53 die Proliferation von *ras*- und E1A transformierten Rattenfibroblasten (Finlay *et al.*, 1989) und anderer Tumorzelllinien (Baker *et al.*, 1990; Casey *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1990, 1991) unterdrücken kann. Das p53 Protein besitzt somit die ungewöhnliche Fähigkeit, sowohl als dominantes Onkogen als auch als Tumorsuppressor aufzutreten.

1.1.2. Struktur des p53 Proteins

Das humane p53 Gen, welches sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17p13 befindet, kodiert für ein 43,5 kDa großes, aus 393 Aminosäuren bestehendes Phosphoprotein. Das abberante Laufverhalten im SDS-Polyacrylamidgel bei 53 kDa führte zur Namensgebung p53 (Oren, 1985). Funktionell und strukturell lässt sich p53 in drei Regionen unterteilen: die transkriptionell aktive aminoterminale Region, die zentrale DNS-bindende Region und die regulatorisch wirkende carboxyterminale Region.

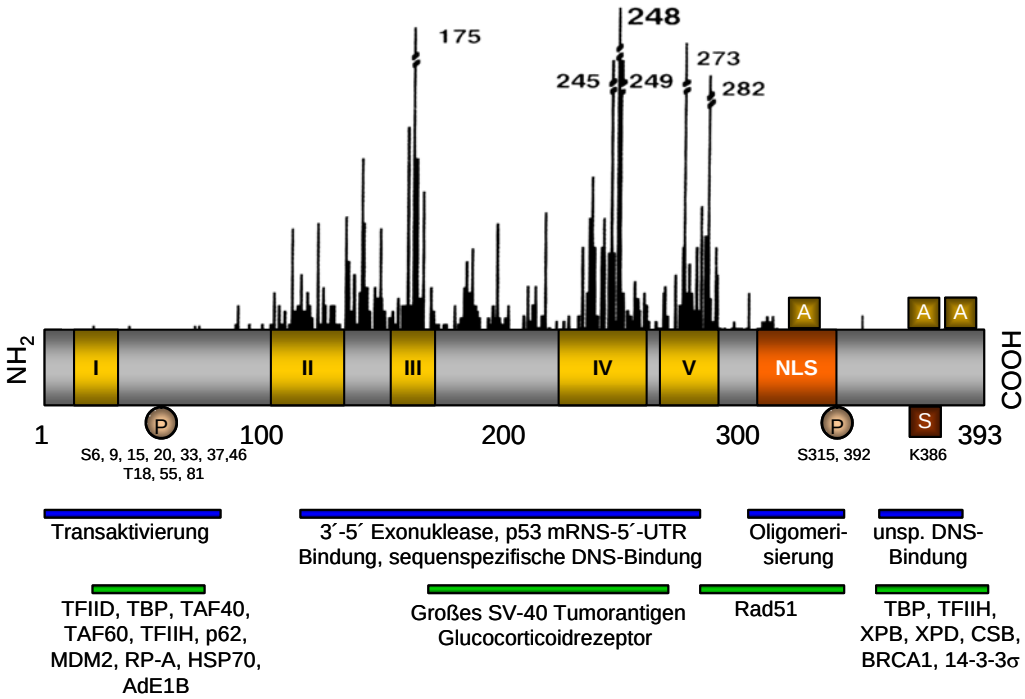


Abbildung 2:
Struktur des p53 Tumorsuppressorproteins. Domänen sind durch blaue Balken gekennzeichnet. Grüne Balken stellen die Interaktionsbereiche mit Proteinen dar. Modifikationen an den jeweiligen Aminosäuren sind durch P (Phosphorylierung), S (Sumoylierung) und A (Acetylierung) gekennzeichnet. Stark konservierte Proteindomänen sind römisch von I bis V durchnummeriert. Die Mutationshäufigkeit in den unterschiedlichen Bereichen ist als Histogramm über dem Protein zu sehen. NLS steht für Nukleäres Lokalisationssignal.

1.1.2.1. Aminoterminale Region.

Die aminoterminale Region erstreckt sich zwischen den Aminosäuren 1 bis 100 und ist durch einen hohen Anteil saurer Aminosäuren gekennzeichnet. Die ersten 42 Aminosäuren am N-Terminus stellen die Transaktivierungsdomäne dar, welche mit basalen Transkriptionsfaktoren interagiert und so die Transkription positiv reguliert. Die Aminosäuren 13 bis 23 sind phylogenetisch hoch konserviert. Über die Aminosäuren F19, L22 und W23 bindet p53 an die TAF-Untereinheiten von TFIID (Lu *et* Levine, 1995; Thut *et al.*, 1995). Die Transaktivierungsfunktion von p53 kann durch die aminoterminale Bindung von MDM2, des Hepatitis-Virus-proteins HBV-X, oder des adenoviralen E1B Proteins blockiert werden (Yew und Berk, 1992; Oliner *et al.*, 1993; Momand *et al.*, 1992).
Zwischen den Aminosäuren 61 und 94 der aminoterminalen Region liegt eine prolinreiche Sequenz mit dem sich fünfmal wiederholenden Motiv PXXP. Das Sequenzmotiv vermittelt die Bindung von p53 an SH3-Domänen regulatorischer Proteine, die an Vorgängen der Signaltransduktion beteiligt sind (Alexandropoulos *et al.*, 1995). Dem Sequenzmotiv wird eine funktionelle Relevanz bei der Regulation des Wachstums (Walker und Levine, 1996), der Induktion der Apoptose (Sakamuro *et al.*, 1997) und der Genrepression (Venot *et al.*, 1998) zugesprochen.

1.1.2.2. Zentrale Region

Die hydrophobe, proteolyse-resistente zentrale Region erstreckt sich zwischen den Aminosäureresten 102 und 292 und vermittelt die spezifische Bindung an eine DNS-Konsensussequenz in Zielgenen. Das Bindungsmotiv besteht aus einer doppelten, in sich invertierten Dekanukleotidsequenz (El-Deiry *et al.*, 1992). Strukturell ist die DNS-Bindungsdomäne als zwei große Loops und ein "Loop-Sheet-Helix" Motiv gefaltet, welche aus zwei Schichten antiparalleler β-Faltblätter gebildet werden (Cho *et al.*, 1994). Neben der sequenzspezifischen DNS-Bindung wurde auch die Bindung an superhelikale DNS (Palecek *et al.*, 2001) und, im Zusammenspiel mit dem Carboxyterminus, auch die Bindung an interne Sequenzen langer einzel- und doppelstrangiger DNS beschrieben (Bakalkin *et al.*, 1995; Yakovleva *et al.*, 2001). Weiterhin besitzt die Kerndomäne eine 3´-5´ Exonukleaseaktivität, welche durch den Carboxyterminus reguliert wird

(Mummenbrauer *et al.*, 1996; Janus *et al.*, 1999). Das bevorzugte Auftreten von Mutationen in den phylogenetisch konservierten Bereichen der zentralen Domäne (Soussi *et al.*, 1990; Cho *et al.*, 1994) verdeutlicht ihre Relevanz für die Funktionalität des Proteins. 90 % aller p53-Mutationen finden sich im DNS-bindenden Bereich (Levine *et al.*, 1994).

1.1.2.3. Carboxyterminale Region

Der Carboxyterminus von p53 erstreckt sich zwischen den Aminosäureresten 300 bis 393 und kann in funktionell unterschiedliche Bereiche unterteilt werden. Zwischen den AS 300 und 318 befindet sich eine Linker-Region, welche die DNS-bindende Domäne flexibel mit der C-terminalen Region verbindet. Diese Flexibilität verleiht dem Protein vermutlich die Fähigkeit, an manche Transkriptionsfaktoren sowohl mit dem Amino- als auch mit dem Carboxyterminus zu binden (Mundt *et al.*, 1997). Die Oligomerisierungsdomäne ist den Aminosäureresten 323 bis 356 zugeordnet (Kraiss *et al.*, 1988; Glore *et al.*, 1994; Jeffrey *et al.*, 1995). Sie formt ein "Faltblatt-Loop-Helix" Motiv und besitzt einen hohen Anteil an basischen Aminosäuren. Die Dimerisierung über diese Struktur führt anschließend durch hydrophobe Wechselwirkungen zur Bildung eines aktiven p53-Tetramers (Stürzbecher *et al.*, 1992; Glore *et al.*, 1994). Zwischen den Aminosäureresten 363 bis 393 befindet sich die regulatorische Domäne (Hupp *et al.*, 1992; Halazonetis *et al.*, 1993). Ebenfalls im Carboxyterminus liegen drei Kernlokalisationssignale NLS 1 bis 3, unter denen das NLS1 (AS 312 bis 318) das dominante ist (Shaulsky *et al.*, 1990, 1991). Das hydrophobe, Leucin-reiche Kernexportsignal NES liegt zwischen den Aminosäureresten 340 bis 351, also innerhalb der Tetramerisierungsdomäne, und nimmt ebenfalls Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation des Proteins (Stommel *et al.*, 1999).

1.1.3. Funktionen und Regulation von p53

Das Tumorsuppressorprotein p53 erfüllt in der Zelle ein breites Spektrum an Funktionen. Zunächst ist p53 ein sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor welcher als Tetramer an die DNA bindet und somit eine Reihe von Zielgenen zu aktivieren vermag (El-Deiry, 1992). Neben der Transaktivierung wurde für p53 in Verbindung mit Histon-Deacetylasen aber auch eine Repressor-Funktion

beschrieben (Murphy *et al.*, 1999). Darüber hinaus zeigt p53 auch transkriptions-unabhängige Aktivitäten, wie z.B. die Beteiligung an der Relokalisation von Fas vom Golgi Apparat zur Zellmembran (Benett *et al.*, 1998) oder die direkte Interaktion mit mitochondrialen Komponenten (Marchenko *et al.*, 2000). Eine Übersicht über die wichtigsten Funktionen von p53 als Tumorsuppressor ist in Abbildung 3 dargestellt.

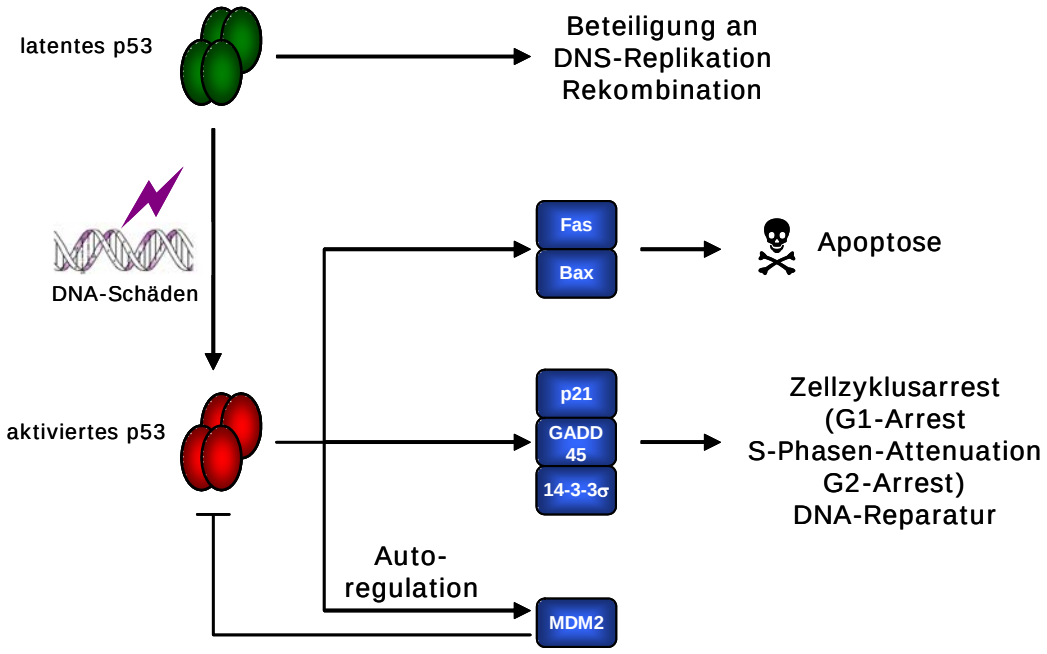


Abbildung 3:
Übersicht der p53-Funktionen. Das latente p53 kontrolliert die Genauigkeit von DNA-abhängigen Prozessen wie Replikation, Rekombination und Reparatur. Das durch DNA-Schäden aktivierte p53 transaktiviert eine Reihe von Genen, welche entweder den Zellzyklus beeinflussen oder, bei größeren Schäden, die Apoptose einleiten. Über die Transaktivierung von *mdm2* kommt eine autoregulatorische Schleife zustande.

Die Konzentration von p53 wird in der Zelle unter normalen Umständen durch die relativ kurze Halbwertszeit von ca. 20 min niedrig gehalten. Dabei befindet sich das Protein in seiner latenten Form und wird erst durch bestimmte Stress-Signale aktiv. Zu diesen Signalen gehören genotoxischer und metabolischer Stress oder das Auftreten aktivierter Onkogene (Levine, 1994). Im Detail wird dieses z.B. für DNS-Schäden (Kastan *et al.*, 1991), Schäden am mitotischen Spindelappatat (Cross *et al.*, 1995), Hypoxie (Graeber *et. al.*, 1994), Hitzeschock (Ohnishi *et al.*, 1996), Ribonukleotiddepletion (Linke *et al.*, 1996) oder Stickoxid-Einwirkung (Forrester

et al., 1996) beschrieben. Nach der Aktivierung führt p53 seine Suppressorfunktion aus, indem es entweder einen Wachstumsarrest oder die Apoptose induziert.

Die Induktion eines G_1/S-Wachstumsarrestes durch p53 erfolgt über die Transaktivierung des *p21*^{waf1}-Gens (El-Deiry *et al.*, 1993; Brugarolas *et al.*, 1995). P21 ist ein potenter Inhibitor von cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), welche als CyclinD-CDK4/6 bzw. CyclinE/CDK2-Komplexe das Retinoblastomprotein pRb phosphorylieren. Durch die Phosphorylierung von pRb werden Proteine der E2F-Familie frei, welche Gene transaktivieren, deren Produkte die S-Phase einleiten. Das von p53 transaktivierte p21 hält das Retinoblastomprotein im hypophosphorylierten Zustand, was eine E2F-Sequestrierung und somit einen G_1-Arrest zufolge hat (Levine, 1997). Darüber hinaus löst p21 eine S-Phasen-Attenuation aus, indem es an CyclinA-CDK2 (Ogryzko *et al.*, 1997; Rohaly *et al.*, 2004) und den Replikationsfaktor PCNA (Waga *et al.*, 1994) bindet.

Bei der Induktion des G2-Arrests durch p53 ist die Transaktivierung von 14-3-3σ der bedeutendste Schritt (Hermeking *et al.*, 1997). 14-3-3σ bindet an CyclinB-CDK1-Komplexe und an die Phosphatase Cdc25c und sequestriert sie im Cytoplasma (Chan *et al.*, 1999). Sowohl CyclinB-CDK1 als auch Cdc25c sind im Zellkern für den Übergang in die Mitose notwendig. Die cytoplasmatische Sequestrierung beider Proteine führt zur einem G_2-Arrest.

Durch Zellzyklusarrest in G1 oder G2 ermöglicht p53 der Zelle, eine Reparatur geschädigter DNS einzuleiten. Dabei fungiert p53 nicht nur als "Initiator" des Reparaturgeschehens, sondern ist möglicherweise auch selbst aktiv an den Reparaturprozessen beteiligt. So weisen humane p53$^{(+/-)}$ Fibroblasten aus Li-Fraumeni-Patienten nach UV-Bestrahlung einen deutlichen Rückgang der Nukleotid-Exzisionsreparatur und eine Verzögerung bei der Wiederaufnahme der Nukleinsäuresynthese auf (Ford *et al.*, 1995). Analoge Beobachtungen werden für Zellen aus Patienten mit DNA-Reparaturstörungen, wie *Xeroderma Pigmentosum* oder dem *Cockayne's Syndrom* beschrieben (Mirzayans *et al.*, 1996).

Nach dem Eintreten schwerer, irreparabler Schäden bietet das Einleiten des programmierten Zelltods (Apoptose) die wichtigste Möglichkeit, die Proliferation von Zellen mit Gendefekten zu vermeiden und damit die Integrität des Gesamtorganismus zu gewährleisten (Shaw *et al.*, 1992; Clarke *et al.*, 1993; Lowe *et al.*, 1993). P53 kann die Apoptose über zwei Wege einleiten. Einerseits stimuliert

p53 die sogenannte rezeptor-vermittelte Apoptose, indem es "Todesrezeptor"-Gene wie das *fas* transaktiviert (Owen-Shaub *et al.*, 1995) und den Fas-Rezeptor an die Zellmembran transloziert (Benett *et al.*, 1998). Andererseits ist p53 direkt an der durch Mitochondrien vermittelten Apoptose beteiligt, indem es Gene transaktiviert, welche die Integrität der Mitochondrien beeinflussen. Über das quantitative Verhältnis pro- (Bax bzw. Bak) und anti-apoptotischer (Bcl-2 bzw. Bcl-xl) Proteine der Bcl-2 Familie wird hier über die Aktivierung des "Apoptosoms" entschieden (Orrenius *et al.*, 2003).

Für eine schnelle Stress-Antwort ist die Erhöhung der p53 Menge in der Zelle über gesteigerte Transkription und Translation zu langsam. Die schnelle Stress-Antwort wird über die Aktivierung bzw. Stabilisierung des Proteins durch posttranslationale Modifikation ermöglicht (Brooks und Gu., 2003). So wird p53 durch eine Reihe stress-abhängiger Kinasen, wie ATM, ATR, Chk1 oder Chk2, am N-Terminus phosphoryliert. Sowohl ATM als auch ATR erhöhen die transkriptionelle Aktivität von p53 durch Phosphorylierung des Proteins an den Aminosäuren S15 und S37 (Sakaguchi *et al.*, 1998; Dumaz *et al.*, 1999). Darüber hinaus aktiviert ATM die Kinase Chk2, welche p53 innerhalb der MDM2-bindenden Domäne phosphoryliert und somit zur Stabilisierung beiträgt (Shieh *et al.*, 2000; Chehab *et al.*, 2000; Hirao *et al.*, 2000). In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass viele andere Kinasen, wie DNA-PK, JNK, p38, CK1 oder CAK ebenso den N-Terminus von p53 phosphorylieren können (Ljungman, 2000). Solche durch Stress induzierte oder vom Zellzyklus abhängige Phosphorylierungen des N-Terminus führen zu Veränderungen in der Interaktion von p53 mit MDM2, JNK und p300/CBP (Buschmann *et al.*, 2000). Phosphorylierungen am Carboxyterminus unterstützen die Aktivierung von p53. So erhöht die Phosphorylierung an Serin 392 durch Casein-Kinase II oder PKR (Hupp *et al.*, 1992; Blaydes *et al.*, 1998; Cuddihy *et al.*, 1999), bzw. an Serin 315 durch Cyclin abhängige Kinasen (Blaydes *et al.*, 2000) deutlich die DNS-Bindungsaffinität von p53 und verstärkt seine Transaktivierungseigenschaft.

Neben der posttranslationalen Modifikation durch Phosphorylierung spielt Acetylierung am Carboxyterminus eine entscheidende Rolle für die Aktivität von p53. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass die transkriptionelle Aktivität von p53 herabgesetzt ist, wenn seine Acetylierung durch Histon-Deacetylasen blockiert wird (Juan *et al.*, 2000). Die Acetylierung wird durch Phosphorylierung begünstigt.

So erhöht die Phosphorylierung von p53 durch ATM bzw. ATR die Bindungsaffinität für P300/CBP und führt damit zur Acetylierung von Lysin 382. Ein ähnlicher Effekt ist für die phosphorylierungs-abhängige Interaktion von p53 mit PCAF beschrieben (Sakaguchi *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999). Dabei wird Lysin 320 acetyliert.

Eine weitere Form der posttranslationalen Modifikation von p53 ist die Sumoylierung. SUMO ist ein kleines, mit Ubiquitin verwandtes Protein, welches p53 am Lysinrest 386 kovalent modifiziert (Gostissa *et al*, 1999). Dieses beeinflusst allerdings nicht die Stabilität von p53, sondern führt zu einer verstärkten transkriptionellen Aktivität des Proteins (Rodriques *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 2004). Auch die Sumoylierung von p53 wird durch die Phosphorylierung beeinflusst (Muller *et al.*, 2004). Dies demonstriert erneut die Komplexität des Netzwerkes, mit dem posttranslationale Modifikationen von p53 gesteuert werden.

Die genomische Instabilität und die erhöhte Rate der Tumorbildung bei Li-Fraumeni Patienten, sowie die aberrante Embryonalentwicklung in p53 Knockout-Mäusen sind durch den Verlust der transaktivierenden Eigenschaften von p53 allein nicht plausibel erklärbar. Es wird deshalb vermutet, dass p53 außer über seine Eigenschaft als Transaktivator auch in anderer Form die Funktionalität des Genoms beeinflussen kann (Malkin, 1993; Gordon, 1996). So wurde für p53 die Beteiligung an Kontrollprozessen der DNS-Replikation und der Rekombination beschrieben (Janus *et al.*, 1999). Um die genomische Integrität der somatischen Zellpopulation zu gewährleisten, wird während der Mitose im Gegensatz zur Meiose die homologe Rekombination unterdrückt. Fehlt p53, so führt dies zu einer erhöhten Rekombinationsrate (Bertrand *et al.*, 1997; Mekeel *et al.*, 1997). Dagegen verringert eine Überexpression von ektopem p53 die Rekombinationsrate um den Faktor 100 (Wiesmüller *et al.*, 1996,)

1.1.4. Inaktivierung von p53

Wie eingangs erwähnt, ist p53 in ca. 50 % aller humanen Tumore durch missense-Mutationen oder durch Deletionen in der DNS-bindenden Domäne inaktiviert (Hollstein *et al.*, 1991). Die Inaktivierung trifft auch auf heterozygote Mutanten zu, in denen nur ein Allel eine missense Mutation aufweist. Entweder wird wtp53 durch die Hetero-Oligomerisierung mit mtp53 inaktiv oder das Mutantenprotein titriert p53-bindende Proteine aus (Deppert, 1994).

Mutation und Deletion sind jedoch nicht der einzige Weg, die Funktionalität von p53 zu beeinträchtigen. In Tumoren, in welchen p53 ausschließlich in seiner Wildtypform vorliegt, ist oft die Balance zwischen p53-stabilisierenden und destabilisierenden Faktoren gestört. So kann z.B. die notwendige Stabilisierung von p53 in Antwort auf die Aktivierung von Onkogenen dadurch unterlaufen sein, dass das *Alternative Reading Frame* Gen (*ARF*) deletiert ist (Lindstrom *et al.,* 2001). ARF fungiert als Inhibitor der Ubiquitin Ligase MDM2, die den Kernexport und die Ubiquitinilierung von p53 vermittelt und führt so zur Stabilisierung von p53. Durch den Verlust von ARF bleibt MDM2 aktiv und induziert den Abbau von p53. Ebenso führt die in humanen Tumoren zu beobachtende Überexpression von MDM2 zur beschleunigten Degradation von p53 (Deb, 2002).

In verschiedenen Tumorarten, wie z.B. in undifferenzierten Neuroblastomen (Moll *et al.*, 1995), in Astrocytomen (Sembritzki *et al.*, 2002), entzündlichen Brustkarzinomen (Moll *et al.*, 1992), Retinoblastomen (Schlamp *et al.*, 1997), Dickdarm-Adenocarcinomen (Bosari *et al.*, 1995) und in Tumorvorstufen, wie z. B. Leukoplakien (Kovesi und Szende, 2003), findet man wtp53, das nicht, wie in den meisten malignen Zellen, durch Mutation oder Deletion, sondern durch Kernausschluss inaktiviert wird. Die cytoplasmatische Sequestrierung von p53 ist jedoch nicht ausschließlich auf Tumoren begrenzt. Auch in primären Zellen, wie z.B. in Ratten-Oligodendrocyten, Neuronen, Balb/c 3T3 Zellen (Shaulsky *et al.*, 1990), in normalen embryonalen Maus-Stammzellen (Aladjem *et al.*, 1998) oder in Zelllinien wie den PC12 Pheochromocytom-Zellen (Eizenberg *et al.*, 1996) und den Neuroblastomzellen (Moll *et al.*, 1996) wurde eine cytoplasmatische Akkumulation von p53 beobachtet. Durch diesen Kernausschluss kann p53 seine tumorsuppressiven Eigenschaften nicht entfalten.

Prinzipiell ist der Ausschluss von p53 aus dem Zellkern auf unterschiedlichen Wegen denkbar, die in Abb. 4 zusammengefasst sind.

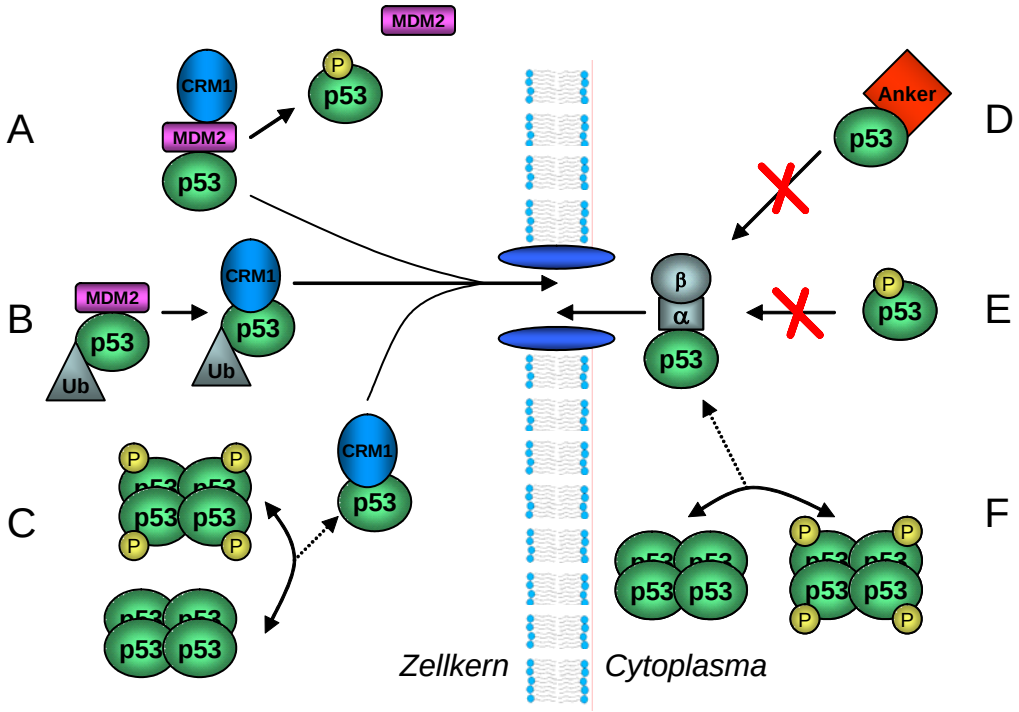


Abbildung 4:
Regulation des Kern-Cytoplasma-Transports von p53 (nach Liang und Clarke, 2001). (**A**): Der p53/MDM2 Komplex wird durch Bindung an CRM1 aus dem Kern transportiert. (**B**): Durch die MDM2-vermittelte Ubiquitinilierung wird das NES von p53 demaskiert. Dies führt zur CRM1-Bindung und dem Transport aus dem Zellkern. (**C**): Die Tetramerisierung von p53, die durch Phosphorylierung von Ser392 verstärkt wird, verdeckt das NES in der Oligomerisierungsdomäne von p53 und verhindert somit den Kernexport. Die Aufspaltung der Oligomere in Monomere macht das NES zugänglich, ermöglicht die CRM1-Bindung und den Transport aus dem Kern. (**D**) Durch die Bindung an cytoplasmatische "Ankerproteine" wird das NLS von p53 maskiert und damit der Kernimport verhindert. (**E**): Die Phosphorylierung von Ser315 maskiert das NLS von p53 und verhindert die Bindung an Kernimportproteine (**F**): Die Tetramerisierung von p53 im Cytoplasma maskiert das NLS, verhindert die Bindung an Kernimportproteine und die Translokation in den Kern.

So kann durch verstärkte Aufspaltung des kernständigen p53 in Monomere, durch Bindung an MDM2, Ubiquitinilierung und Dephosphorylierung das nukleäre Exportsignal (NES) in p53 demaskiert werden. Dies ermöglicht die Bindung des zur Importinfamilie gehörenden Kernexportfaktors CRM1 (*chromosome region maintenance 1*) und bedingt einen beschleunigten Kernexport (Stommel *et al.*, 1999; Abb. 4A-C).

Eine Maskierung des Kernlokalisationssignals (NLS) durch Tetramerisierung oder Phosphorylierung an Serin 315 verhindert die Bindung der Importine α/β an p53

(Liang und Clarke, 1999). Auch eine Bindung an cytoplasmatische Proteine kann p53 im Cytoplasma sequestrieren. Entweder wird dadurch das NLS von p53 maskiert (Sengupta *et al.*, 2000), oder p53 wird durch Verankerung physisch an der Kernwanderung gehindert (Klotzsche *et al.*, 1999) (Abb. 4D-F).

Seit geraumer Zeit wird eine Beteiligung von Cytoskelettkomponenten als potenzielle Ankerproteine für p53 diskutiert (Rotter *et al.*, 1983; Maxwell *et al.*, 1991; Knippschild *et al.*, 1996). An einem Modellsystem konnte ein direkter Zusammenhang zwischen cytoplasmatischer Akkumulation von p53 und der Anwesenheit einer bestimmten Komponente des Cytoskeletts, des Klasse III Intermediärfilamentproteins Vimentin, beobachtet werden (Klotzsche *et al.*, 1998; Klotzsche, 2000). In verschiedenen Subklonen der C6 Rattengliom Zelllinie, die sich in der Expression von Vimentin unterscheiden, wurde die temperatur-sensitive Mutante tsp53^{Val135} exprimiert. Vimentin-positive Zellen verankerten tsp53^{Val135} im Cytoplasma am Cytoskelett sowohl bei nicht-permissiver als auch bei permissiver Temperatur. Zellen, welchen das Intermediärfilamentprotein fehlte, wiesen keinen Kernausschluss von p53 auf. Die Verankerung an Vimentin beeinflusste entscheidend die wachstumskontrollierenden Eigenschaften von tsp53^{Val135}. Vimentin-negative Zellen gingen nach Überführen auf die permissive Temperatur von 32 °C in einen stabilen Zellzyklusarrest und akkumulierten in G1. Vimentin-positive C6 Zellen durchliefen nach der Aktivierung von tsp53^{Val135} nur einen transienten Zellzyklusarrest und proliferierten dann weiter, da sie imstande waren, das Tumorsuppressorprotein im Cytoplasma zu verankern.

Eine eindeutige Korrelation zwischen der Vimentinexpression und der cytoplasmatischen p53-Lokalisation konnte vor kurzem auch in in primären Glioblastomen des Menschen beobachtet werden (Sembritzki, *et al.*, 2002).

Ein weiteres experimentelles System, an dem Mechanismen der Inaktivierung von p53 durch Kernausschluss analysiert wurde, stellen Neuroblastom-Zelllinien dar (Moll *et al.*, 1992; 1995). In diesen Zellen wurde der Glucocorticoidrezeptor als cytoplasmatischer Interaktionspartner von p53 identifiziert (Sengupta *et al.,* 2000). Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass p53 und der Glucocorticoid-rezeptor in Neuroblastomzellen einen Komplex formen können, welcher beide Proteine im Cytoplasma sequestriert. *In vitro* GST-Bindungsstudien zeigten, dass der Glucocorticoidrezeptor an die zentrale Domäne und das benachbarte Kernlokalisationssignal (NLS) von p53 bindet und somit den Kernimport

unterbindet (Sengupta *et al.*, 2001).

Die Ergebnisse von Sengupta *et al.* stützen die seit längerem propagierte Hypothese, dass cytoplasmatisches p53 in Neuroblastomzellen in einem großen Proteinkomplex vorliegt (Moll *et al.*, 1996). Der genaue Mechanismus dieser Verankerung und die daran beteiligten Komponenten sind jedoch bislang weitgehend unbekannt.

1.2. Problemstellung

Untersuchungen an Neuroblastomzellen des Menschen, in denen wtp53 konstitutiv im Cytoplasma verankert wird, haben gezeigt, dass p53 mit dem Glucocorticoidrezeptor interagiert und dies zur cytoplasmatischen Sequestrierung des Tumorsuppressors beiträgt. Andererseits wurde an C6 Rattengliomzellen, die mit der temperatursensitiven Mutante $p53^{Val\text{-}135}$ transfiziert worden waren, die Interaktion von p53 mit dem Cytoskelett als Ursache für seine Sequestrierung beschrieben. $p53^{Val\text{-}135}$ ist eine temperatursensitive Mutante, die bei restriktiver Temperatur (39 °C) Mutantenkonformation und bei permissiver Temperatur (30 °C) Wildtypkonformation aufweist. Nicht nur die Mutanten- auch die Wildtypkonformation wird im Cytoplasma verankert und damit in seinen Kontrollfunktionen blockiert. Daraus stellte sich die Frage, ob in den beiden Systemen, den wt exprimierenden Neuroblastomzellen und den $tsp53^{Val\text{-}135}$ exprimierenden Gliomzellen, zwei unterschiedliche und voneinander unabhängige Kontrollmechanismen die cytoplasmatische Sequestrierung von p53 bedingen, oder ob hier speziesübergreifend zwei verschiedene Aspekte des gleichen Mechanismus angesprochen werden.

Wie in der Einleitung angesprochen, ist die cytoplasmatische Sequestrierung von p53 auch in normalem, undifferenziertem Gewebe des Menschen anzutreffen, das sich durch starke Proliferation auszeichnet, fehlt aber in differenzierten Zellen. Dies lässt vermuten, dass die Sequestrierung einen Mechanismus darstellt, mit dem wachstumssuppressive Funktionen des Tumorsuppressors im Verlauf der Differenzierung moduliert werden können. D.h., die cytoplasmatische Sequestrierung von p53 ist wahrscheinlich ein Prozess, der durch epigenetische Ereignisse reguliert wird. In der Tumorgenese wird folglich auf Zellen hin selektiert, in denen dieser Kernausschluss konstitutiv ist; d.h. in diesen Zellen wird

entweder auf einen dominanten Verankerungsmechanismus oder alternativ auf einen Verlust bzw. die Inaktivierung eines Mechanismus hin selektiert, mit dem die subzelluläre Lokalisation des Tumorsuppressors dynamisch kontrolliert werden kann. Insofern sind an solchen Tumorzelllinien die Möglichkeiten, die subzelluläre Lokalisation von p53 zu modulieren, stark eingeschränkt.

Die Untersuchungen gingen deshalb von den Subklonen der C6 Rattengliomzelllinie aus, die mit der temperatursensitiven Mutante $p53^{Val-135}$ transfiziert sind. Die C6 Subklone unterscheiden sich in der Expression des Intermediärfilamentproteins Vimentin (Röser *et al.*, 1991; Bohn *et al.*, 1993; Bohn *et al.*, 1996), einem Cytoskelettelement, das sich in diesen Zellen als essentiell für die cytoplasmatische Sequestrierung von $p53^{Val-135}$ erwies (Klotzsche *et al.*, 1998; Klotzsche, 2000). In C6 Subklonen, welche endogenes Vimentin exprimieren, wird das p53 im Cytoplasma sequestriert; Zellen mit fehlendem Vimentingerüst akkumulieren p53 im Zellkern. Nach Transfektion vimentin-negativer Zellen mit murinem Vimentin lokalisiert p53 erneut im Cytoplasma. Dies trifft sowohl auf die Mutanten- als auch auf die Wildtypkonformation von $p53^{Val-135}$ zu. $p53^{Val-135}$ ist an Vimentinfilamente gebunden und wird somit durch aktive Verankerung an diese Cytoskelettkomponente zurückgehalten.

Es gab keine Hinweise, die die These einer direkten Bindung von $p53^{Val-135}$ an das Vimentinprotein unterstützten. Vielmehr sprach das Auftreten von $p53^{Val-135}$ in Form größerer Aggregate an den Filamenten dafür, dass hier zusätzliche, bisher nicht identifizierte Proteine beteiligt sein könnten. Da der Glucocorticoidrezeptor auch in C6 Rattengliomzellen vorhanden ist (Vielkind *et al.*, 1990), konnte eine Beteiligung des Rezeptors durchaus in Betracht gezogen werden.

Ziel der Arbeit war es, in diesem System die Zusammensetzung des p53-Ankerkomplexes genauer zu definieren, die Arbeitsweise des Verankerungsmechanismus zu analysieren und anhand verschiedener Zellsysteme seine generelle Gültigkeit zu überprüfen.

2. MATERIALIEN

2.1. Eukaryotische Zelllinien

C6D8: Subklon der Rattengliomzellinie C6. Die Zellen exprimieren Vimentin als einziges cytoplasmatisches Intermediärfilamentprotein (Röser *et al.*, 1991).

C6D10: Subklon der Rattengliomzellinie C6. Die Zellen exprimieren keine cytoplasmatischen Intermediärfilamentproteine und stellen einen Zustand der fortgeschrittenen Differenzierung dar (Röser *et al.*, 1991).

VimWT3B4: Eine auf dem vimentinfreien Subklon C6D10 basierende Zellinie, in der durch Transfektion mit dem Expressionsvektor pMB-Vim2 (Bohn *et al.*, 1992) ein Vimentingerüst rekonstituiert wurde. pMB-Vim2 kodiert für ein Vimentinprotein, das durch einen Aminosäureaustausch ein Epitop ausprägt, welches von dem monoklonalen Antikörper Vim3B4, nicht aber von V9 erkannt wird.

C6D8-1: $tsp53^{Val-135}$ exprimierende Zellinie, die nach stabiler Transfektion von C6D8 Zellen mit dem Vektor pLTRcG9 etabliert wurde (Klotzsche, 1996).

C6D10 5: $tsp53^{Val-135}$ exprimierende Zellinie, die nach stabiler Transfektion von C6D10 Zellen mit dem Vektor pLTRcG9 etabliert wurde (Klotzsche, 1996).

VWT16: $tsp53^{Val-135}$ exprimierende Zellinie, die nach stabiler Transfektion von VimWT3B4 Zellen (Etzrodt, 1996) mit dem Vektor pLTRcG9 etabliert wurde (Klotzsche, 1996).

10-1: Balb/c p53-defiziente Mausembryofibroblasten (Harvey und Levine, 1991).

MEF: primäre Mausembryofibroblasten (Heinlein, 2004)

2.2. Prokaryotische Zellen

E.coli DH5α (Woodcock *et al.*, 1989).

2.3. Expressionsvektoren

- pNH64: eukaryotischer Expressionsvektor für das murine Intermediärfilament-protein Nestin. Die Nestin cDNA steht unter der Kontrolle des viralen CMV-Promotors (Abb. 9, Yang *et al.*, 2001) Das Plasmid wurde freundlicherweise von Jing Yang, Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai, zur Verfügung gestellt.

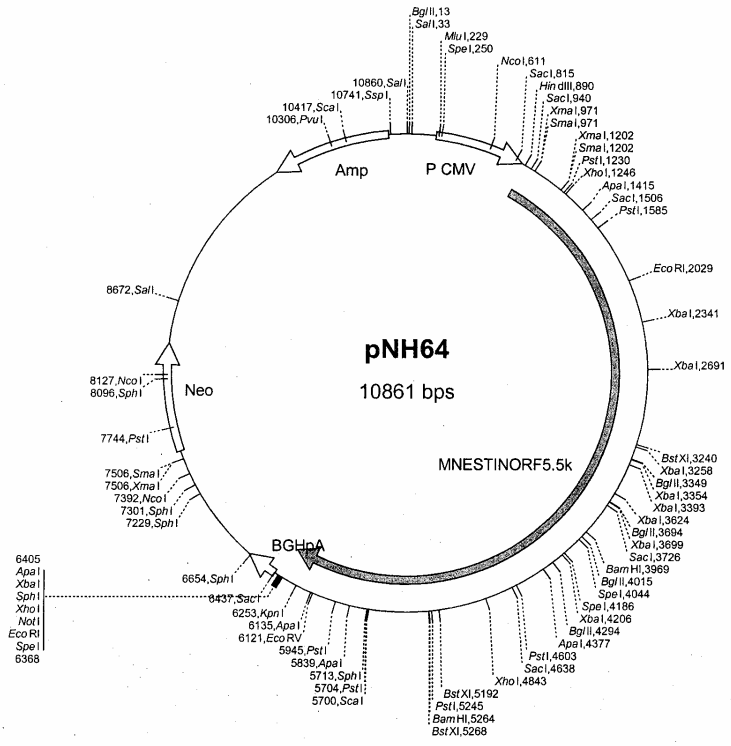


Abbildung 5:
Genkarte des Nestin-Expressionsvektors pNH64 (Yang *et al.*, 2001)

- pGFP: Expressionsvektor (5,5 kb) für GFP mit Amp-Resistenz (Tsien, 1998).

2.4. Primäre Antikörper

PAb248: IgG Maus anti p53; monoklonal, Hybridoma (Yewdell *et al.*, 1986).

PAb246: IgG Maus anti Wildtyp p53; monoklonal, Hybridoma (Yewdell *et al.*, 1986).

PAb240: IgG Maus anti Mutanten p53; monoklonal, Hybridoma (Gannon *et al.*, 1990).

V9: IgG Maus anti Vimentin; monoklonal (Boehringer, Mannheim).

Bu20a: IgG Maus anti BrdU; monoklonal (DAKO, Glostrup, Dänemark).

C-19: IgG Ziege anti HSP 56; polyklonal (Santa Cruz, Heidelberg).

F-8: IgG Maus anti HSP 90α/β; monoklonal (Santa Cruz, Heidelberg).

W27: IgG Maus anti HSP70; monoklonal (Santa Cruz, Heidelberg).

M-20: IgG Kaninchen anti GR, polyklonal (Santa Cruz, Heidelberg).

Ab-1: IgG Maus anti-Tubulin; monoklonal (Calbiochem, San Diego, USA).

IgG Maus anti Masern-Virus-Hämagglutinin; monoklonal, Aszitisflüssigkeit.

2.5. Brückenantikörper und Normalseren

Ziegen-Normalserum, polyklonales Präimmunserum (DAKO, Glostrup, Dänemark).

Esel-Normalserum, polyklonales Präimmunserum (DAKO, Glostrup, Dänemark).

IgG Kaninchen anti Maus IgG; polyklonal, affinitätsgereinigt (DAKO, Glostrup, Dänemark).

IgG Kaninchen anti Ziege IgG; polyklonal, affinitätsgereinigt (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, USA).

2.6. Gekoppelte, sekundäre Antikörper

IgG Maus anti Peroxidase; monoklonal, in Lösung mit Meerrettich-Peroxidase (DAKO, Glostrup, Dänemark).

IgG Kaninchen anti Peroxidase; polyklonal, affinitätsgereinigt; in Lösung mit Meerrettich-Peroxidase (DAKO, Glostrup, Dänemark).

IgG Esel anti Maus IgG (H+L); affinitätsgereinigt; konjugiert mit Alexa 633, (Molecular Probes, Leiden, Niederlande).

IgG Esel anti Kaninchen IgG (H+L); affinitätsgereinigt; konjugiert mit Alexa 488, (Molecular Probes, Leiden, Niederlande).

IgG Esel anti Ziege IgG (H+L); affinitätsgereinigt; konjugiert mit Alexa 568, (Molecular Probes, Leiden, Niederlande).

IgG Esel anti Maus IgG (H+L); affinitätsgereinigt; konjugiert mit Alexa 555, (Molecular Probes, Leiden, Niederlande).

IgG Esel anti Ziege IgG (H+L); affinitätsgereinigt; konjugiert mit Alexa 633, (Molecular Probes, Leiden, Niederlande).

2.7. Fluoreszenzverbindungen

Phalloidin, TRITC-konjugiert (Sigma, Deisenhofen).

Phalloidin, FITC-konjugiert (Sigma, Deisenhofen).

DAPI, 4,6-Diamidino-2-phenylidol (Sigma, Deisenhofen).

TO-PRO®-3 Iodid (Molecular Probes, Leiden, Niederlande).

DRAQ5™ (Biostatus Limited, Leicestershire, England).

2.8. Proteine und Enzyme

RNase A (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

GR (M-20) Blokierpeptid (Santa Cruz, Heidelberg)

BSA (New England Biolabs, USA)

Proteinstandard 7B (Sigma, Deisenhofen):

α2-Makroglobulin:	193 kDa
β-Galaktosidase:	112 kDa
Fruktose-6-P-Kinase:	86 kDa
Rinderalbumin:	70 kDa
Pyruvatkinase:	57 kDa
Laktatdehydrogenase:	39 kDa
GAPDH:	36 kDa

2.9. Chemikalien

2-Propanol	Merck, Darmstadt
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	National Diagnostics, Atlanta, USA
4-Cumarsäure	Sigma, Deisenhofen
Aceton	Merck, Darmstadt
Ampicillin	USB, Cleveland, USA
APS	Merck, Darmstadt
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Hefeextraxt	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
DABCO	Sigma, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMEM Pulver	Gibco/BRL Life Technologies,
DMSO	Sigma, Deisenhofen
DTT	Serva, Heidelberg
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethanol (p.a.)	Merck, Darmstadt
FCS	PAA, Pasching, Österreich
Geneticin-Sulphat (G418)	Gibco/BRL Life Technologies,
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycin	Serva, Heidelberg
HEPES	Serva, Heidelberg
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt

Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Biomol, Hamburg
Luminol	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Neuform, Lüneburg
Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Nonidet®P40 (NP-40)	Fluka, Neu-Ulm
Pefablock®SC	Biomol, Hamburg
PMSF	Serva, Heidelberg
SDS	Serva, Heidelberg
Steriles Wasser	DeltaSelect, Pfullingen
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Trasylol®	Bayer, Leverkusen
Triton X-100	Fluka, Neu-Ulm
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween® 20	Fluka, Neu-Ulm
Wasserstoffperoxid	Fluka, Neu-Ulm

2.10. Verbrauchsmaterialien

Filterpapier Whatman 3 MM	Schleicher und Schüll, Dassel
Gewebekulturschalen	Nunclon™ Surface, Nunc Roskilde, Dänemark
Immobilion™-P Membran	Millipore, Eschborn
Kryoröhrchen	Nunclon™ Surface, Nunc Roskilde, Dänemark
Membranfilter (0,2 µm)	Renner GmbH, Dannstadt
Parafilm “M”	American National Can, Greenwich
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm Super RX	FUJI, Düsseldorf

2.11. Geräte

Analysenwaagen	PE360; P1210 (Mettler, Gießen)
Brutschränke	Heraeus, Hanau
Deckgläser	Ø 12 mm mm (Menzel-Gläser, Braunschweig)
Fluoreszenzmikroskope	Axiovert 35 (Zeiss, Jena) DMRA (Leica, Bensheim) IX-70 (Olympus, Hamburg)
Heizblock	Dri-Block DB 2A (Techne Inc., Burlington, USA)
Horizontalschüttler	Heidolph, Schwabach
Konfokale Laser-Scanning Mikroskope	TCS-NT (Leica, Bensheim) LSM 510 Meta (Zeiss, Jena)
Minigel-Elektrophorese-Apparatur	Hoefer Mighty Small II (Hoefer, San Francisco, USA)
Objektträger	(Menzel-Gläser, Braunschweig)
pH-Meter	PHM 82 (Radiometer, Kopenhagen – Dänemark)
Photometer	BioSpec-1601 E (Shimadzu, Duisburg)
Schüttler	Certomat BS-T (B. Braun Biotech, Melsungen)
Spannungsquelle	EPS 2A 200 (Hoefer, San Francisco – USA)
Sterilwerkbank	Lamin Air® HA2448GS (Heraeus, Hanau)
Wasserbad	GFL (Haake, Karlsruhe)
Zentrifugen	Omnifuge 2.0 RS (Heraeus, Hanau) Sorvall RC 5C Plus (Kendro, Hanau) 5415C (Eppendorf, Hamburg) 5415D (Eppendorf, Hamburg)

2.12. Computer-Software

Text und Abbildungen:	Office 2002 SP3 (Microsoft, Redmond, USA) Sigmaplot 8.0 (SSI, Richmond, USA)
Bildverarbeitung:	Photoshop 7.1 (Adobe, Unterschleißheim) ImageJ 1.33 (NIH, public domain) Image Browser 3.2 (Zeiss, Jena) LCS Lite (Leica, Bensheim)
Kolokalisations-Analyse	AIM 3.2 (Zeiss, Jena)
FACS-Analyse	WinMDI 2.8 (Joseph Trotter) Cylchred 1.0.2 (Cardiff, England)

2.13. Puffer und Lösungen

Agarose-Gellösung

1,0-2,0 % (w/v) Agarose
in 1 x TAE-Puffer
0,5 µg/ml Ethidiumbromid

Ampicillin-Stocklösung (1000 x)

100 mg/ml in H_2O
Lagerung: -20 °C

APS (10 %)

0,1 g/ml Ammoniumperoxodisulfat
in H_2O; Lagerung: -20 °C

Block-Puffer

5 % Magermilchpulver
in TBS-Tween

4-Cumarsäure (227 x)

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

DMEM

13,4 g/l DMEM-Pulver
3,7 g/l NaHCO3
in H_2O, pH 7,3
sterilfiltriert

ECL-Lösung A

2,5 mM Luminol
400 µM 4-Cumarsäure
100 mM Tris-HCl pH 8,5

ECL-Lösung B

13,2 mM Wasserstoffperoxid
100 mM Tris-HCl pH 8,5

E1A-Lysepuffer

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

Einfriermedium

40 % DMEM
50 % FCS
10 % DMSO

Laufpuffer

25 mM Tris, pH 8,3
200 mM Glycin
0,1 % (w/v) SDS

LB-Agar

1 % (w/v) Bacto-Trypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
1 % (w/v) NaCl
1,5 % (w/v) Bacto-Agar
pH 7,0 mit 10 mM NaOH
autoklaviert

LB-Medium

1 % (w/v) Bacto-Trypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
1 % (w/v) NaCl
pH 7,0 mit 10 mM NaOH
autoklaviert

Luminol (100 x)

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

Mounting Medium:

2,4 g Polyvinylalkohol
6 g Glycerol
6 ml H2O
12 ml 0,2 M PBS, pH 7,4
2,4 % DABCO
Zentrifugation: 5000 rpm, 15 min
Lagerung bei -20 °C

10 x PBS

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
10 mM Na_2HPO4
1,8 mM KH_2PO4
pH 7,4 mit HCl
autoklaviert

Pefablock (200 x)

25 mg/ml in 50 % (v/v) Glycerol
Lagerung bei -20 °C

Pepstatin A (200 x)

1 mg/ml in Methanol
Lagerung bei -20 °C

6 x Sample-buffer

1 M Tris-HCl pH 6,8
34 % (v/v) Glycerol
1 % (w/v) SDS
0,9 % (w/v) DTT
0,01 % (w/v) Bromphenolblau

SDS-Sammelgel (für 5 Gele)

3,9 ml Acrylamid/Bisacrylamid
7,5 ml 4 x Tris/SDS-Puffer pH 6,8
18,3 ml H_2O
150 µl 10 % (w/v) APS
30 µl TEMED

SDS-Trenngel (13 %) (für 5 Gele)

19,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid
11,25 ml 4 x Tris/SDS-Puffer pH 8,8
14,25 ml H_2O
150 µl 10 % (w/v) APS
30 µl TEMED

TAE (50 x)

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

TBS-Tween

10 mM Tris-HCl pH 8,0
150 mM NaCl
0,2 % (v/v) Tween-20

TE-Puffer

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

4 x Tris/SDS Puffer pH 6,8

0,5 M Tris-HCl
0,4 % (w/v) SDS

4 x Tris/SDS Puffer pH 8,8

1,5 M Tris-HCl
0,4 % (w/v) SDS

3. METHODEN

3.1. Zellbiologische Methoden

3.1.1. Zellkultur

Bei allen verwendeten eukaryotischen Zellinien, embryonalen Mausfibroblasten und Ratten-Hippocampus-Explantaten handelt es sich um adhärent wachsende Kulturen. C6D8, C6D10 und VimWT3B4 Rattengliomzellen wurden bei 37 °C in Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM) mit 5 % FCS bei 5 % CO_2 und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Stabil mit murinem Vimentin (VWT16, VimWT3B4) oder $tsp53^{Val-135}$ (C6D8-1, C6D10-5 und VWT16) transfizierten Zellen wurde in regelmäßigen Abständen 80 g/ml Hygromycin B bzw. 400 g/ml Neomycin (G418) ins Medium zugesetzt, um den Selektionsdruck aufrechtzuerhalten. $Tsp53^{Val-135}$ exprimierende Zellen wurden bei der für $tsp53^{Val-135}$ nicht-permissiven Temperatur von 39 °C gehalten und zu Versuchszwecken auf die permissive Temperatur von 30 °C gebracht.

Die zu etwa 80 % konfluent gewachsenen Kulturen wurden alle zwei bis vier Tage passagiert. Hierfür wurden die adhärenten 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 gelöst hatten. Die Zellen wurden anschließend 1:10 bis 1:5 verdünnt und in 10 ml frischen, vorgewärmten Medium in einer neuen Kulturschale aufgenommen.

3.1.2. Auftauen und Einfrieren von Zellen

In flüssigem Stickstoff oder bei -80° C gelagerten Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C oder in der Hand aufgetaut und in einer Kulturschale mit 15 ml vorgewärmten Medium aufgenommen. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen frisches gewechselt, um DMSO-Rückstände aus dem Einfriermedium und tote Zellen zu entfernen.

Zum Einfrieren adhärent wachsender Zellen, wurden sie zweimal mit je 2 ml vorgewärmter Trypsin/EDTA Lösung gewaschen und anschließend etwa drei Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen sofort in 2 ml Einfriermedium aufgenommen, resuspendiert und bei -80 °C eingefroren. Für die

Langzeit-lagerung wurden die Einfriergefäße mit den Zellen nach 24 Std. in flüssigen Stickstoff überführt.

3.1.3. Behandlung mit chemischen Agenzien

Zur Behandlung der Zellen mit chemischen Agenzien (Tab.1) wurde das Kulturmedium vollständig entfernt und durch frisches Medium ersetzt, welches das Agens enthielt. Als Negativkontrolle diente frisches Medium, das mit der entsprechenden Menge Solvenz versetzt war. Nach erfolgter Behandlung wurden die Zellen fixiert und mit Immunfluoreszenztechniken untersucht.

Tabelle 1: Konzentrationen und Inkubationszeiten

Agens	*Stammlösung*	*Endkonzentration*	*Inkubationszeit*
Cytochalasin B	5 mg/ml in DMSO	5 µg/ml	15 Minuten
Nocodazol	10 mg/ml in DMSO	10 µg/ml	30 Minuten
Dexamethason	1 mM in Ethanol	100 nM bis 1µM	60 Minuten
Mephipreston	1 mM in Ethanol	100 nM bis 1µM	60 Minuten

3.1.4. Cytoplasmatische Extraktion

Auf Deckgläschen (für Immunofluoreszenzfärbungen) oder in 10 cm Kulturschalen (für Western Blot oder Immunopräzipitazion) gezüchtete Zellen wurden kurz in PBS gewaschen und zwei Minuten im Extraktionspuffer lysiert. Dadurch wurden alle Membransysteme und alle mit nicht ionischen Detergentien löslichen cytoplasmatischen Anteile entfernt, das Cytoskelett mit assoziierten Proteinen blieb aber erhalten (Hartwig, 1992; Bohn *et al.*, 1993). Anschließend wurden die Deckgläser bzw. die Kulturschalen zweimal für fünf Minuten mit physiologischem Waschpuffer gewaschen, um die Präparate von restlichen löslichen Zellbestandteilen und dem Detergenz zu befreien.

Für Western Blot wurden die extrahierten Zellen in 500 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen, für fünf Minuten bei 95 °C aufgekocht und gegebenenfalls bei -20 °C gelagert.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die extrahierten Zellen auf den Deckgläsern mit 2 % Paraformaldehyd in physiologischem Waschpuffer für 20 Minuten fixiert. Vor einer Immunfluoreszenzmarkierung wurden die Deckgläser zehn Minuten mit 50 mM Glycin in PBS inkubiert, um freie Aldehydgruppen des Fixativs, die unspezifisch mit Antikörpern reagieren können, abzusättigen.

Alle Schritte inklusive Fixierung erfolgten bei 37 °C mit vorgewärmten Lösungen.

Extraktionspuffer:	*physiologischer Waschpuffer:*
80 mM PIPES (pH6,8)	25 mM HEPES (pH 7,4)
130 mM NaOH	29 mM NaCl
4 % PEG 6000	100 mM KCl
1 mM $MgCl_2$	0,96 mM NaH_2PO_4
0,5 % Triton X-100	5 mM $MgCl_2$
4 mM EGTA	4 mM EGTA
1 % Trasylol	
10 g/ml Leupeptin	

3.1.5. Immunfluoreszenzmarkierung

Für die Immunfluoreszenzmarkierung (Weigele *et al.*, 1973) wurden die Zellen auf sterilen Deckgläschen mit 12 mm ∅ angezüchtet. Nach dem Erreichen einer 50 %igen Konfluenz wurde das Medium aus den Kulturschalen abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläser zur Fixierung der Zellen entweder in -20 °C kaltes Aceton oder, um die Faltung der Proteine für weitere Analysen aufrechtzuerhalten, in 1% Paraformaldehyd in PBS für 20 Minuten überführt. Nach der Paraformaldehyd-Fixierung wurden die Membranen mit 0,2 % Triton X-100 permeabilisiert und unspezifische Reaktionen der Antikörper mit freien Aldehydgruppen durch zehnminütige Inkubation der fixierten Zellen in 50 mM Glycin in PBS blockiert.

Nach der Fixierung wurden die Zellen zehn Minuten in PBS gewaschen. Zur

Unterdrückung unspezifischer Bindungen der sekundären Antikörper wurden die Zellen vor der Markierung für 20 Minuten mit normalem unspezifischen Serum aus der gleichen Spezies wie die sekundären Antikörper vorinkubiert.

Die Markierung der untersuchten Antigene erfolgte für 30 Minuten mit entsprechenden primären Antikörpern. Anschließend wurden die Proben 20 Minuten lang in PBS gewaschen. Die gebundenen primären Antikörper wurden mit speziesspezifischen, Fluorochrom-konjugierten Antikörpern detektiert. Dazu wurden die Zellen 20 Minuten lang mit den sekundären Antikörpern inkubiert.

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

Alle Antikörperinkubationen wurden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit 100 µl Antikörperlösung durchgeführt. Für eine Doppelmarkierung wurden die Zellen sukzessive mit beiden primären und anschließend mit den entsprechenden sekundären Antikörpern inkubiert.

Aktinfilamente wurden mit FITC bzw. TRITC gekoppeltem Phalloidin markiert. Zellkerne ließen sich mit dem in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen TO-PRO3 bzw. DRAQ5 anfärben. Hierfür wurden die Zellen nach den Immunfluoreszenzmarkierungen mit 100 µl der entsprechenden Lösung überschichtet und 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert.

Im Anschluß an die Markierung wurden die Zellen einmal für 30 Minuten in PBS gewaschen und in Einbettungsmedium auf Polyvinylalkohol-Basis auf einem Objektträger fixiert. Nach dem Trocknen des Einbettungsmediums wurden die Proben in einem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop analysiert.

3.1.6. Bildbearbeitung

Die Rohdaten von den Laser-Scan Mikroskopen wurden mit den Programmen LCS Lite (Leica, Bensheim) bzw. Image Browser 3.2 (Zeiss, Jena) aufbereitet. Weitere Bearbeitung erfolgte unter Photoshop v. 7.01 (Adobe, Unterschleißheim) bzw. ImageJ 1.33 (NIH, public domain).

Es wurden, wenn nötig, folgende Bildbearbeitungsschritte durchgeführt:

- Tonwertkorrektur inkl. Schwellenwertanpassung und Gammakorrektur

- Filterung mit isotropen Faltungsfiltern:
  a) Rauschunterdrückung mit Tiefpassfiltern (Sigma)
  b) Schärfung durch Addition des hochpass- (Laplace) bzw. bandpassgefilterten Originalbildes
- Überlagerung mehrerer Kanäle mittels Negativmultiplikation in Photoshop zur Kolokalisationsdarstellung

3.1.7. Kolokalisations-Analyse

Zur quantitativen Kolokalisationsanalyse wurden die Rohdaten des Zeiss LSM 510 Meta-Mikroskops einer Auswertung mit der Software AIM 3.2 (Zeiss, Jena) unterzogen. Die dabei erhaltenen Größen sind im Folgenden einzeln beschrieben.

3.1.7.1. Kolokalisationskoeffizient

$$c_1 = \frac{pixels_{Ch1,coloc}}{pixels_{Ch1,total}} \qquad c_2 = \frac{pixels_{Ch2,coloc}}{pixels_{Ch2,total}}$$

- relative Anzahl der kolokalisierenden Pixel der Kanäle 1 und 2 verglichen mit der Anzahl der Gesamtpixel über dem Schwellenwert
- Wertebereich von 0 bis 1 (0: keine Kolokalisation, 1: alle Pixel kolokalisieren)
- alle Pixel über dem Background werden berücksichtigt, unabhängig von deren Intensität

3.1.7.2. Gewichteter Kolokalisationskoeffizient

$$M_1 = \frac{\sum_i Ch1_{i,coloc}}{\sum_i Ch1_{i,total}} \qquad M_2 = \frac{\sum_i Ch2_{i,coloc}}{\sum_i Ch2_{i,total}}$$

- Summe der Intensitäten der kolokalisierender Pixel in Kanal 1 und 2 verglichen mit der Gesamtsumme der Pixelintensitäten des jeweiligen Kanals über dem Schwellenwert
- Wertebereich von 0 bis 1 (0: keine Kolokalisation, 1: alle Pixel kolokalisieren)
- helle Pixel tragen mehr bei als schwache Pixel

3.1.7.3. Korrelationskoeffizient, Pearson´s Korrelationskoeffizient

$$R_p = \frac{\sum_i (Ch1_i - Ch1_{aver}) \cdot (Ch2_i - Ch2_{aver})}{\sqrt{\sum_i (Ch1_i - Ch1_{aver})^2 \cdot \sum_i (Ch2_i - Ch2_{aver})^2}}$$

- gibt Information über die Intensitätsverteilung innerhalb der Kolokalisationsregion
- Wertebereich: -1 bis +1
- -1, +1: alle Pixel in dem Scatterdiagramm befinden sich auf einer Geraden
- 0: die Pixel im Scatterdiagramm bilden eine Wolke

3.1.8. BrdU Zellproliferations-Assay

Auf Deckgläsern gewachsene Zellen wurden 30 Minuten lang in 3 ml Kulturmedium kultiviert, dem Bromodeoxyuridin (BrdU) in einer Konzentration von 30 µg/ml zugesetzt worden war.

Die BrdU markierten Zellen wurden 20 Minuten in -20 °C kaltem Aceton fixiert. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten mit 4N HCl in PBS inkubiert, wodurch die DNS denaturierte. Das nun für Antikörper zugängliche BrdU konnte durch Immunfluoreszenzmarkierung nachgewiesen werden.

Mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops wurden Übersichts-aufnahmen BrdU-positiver Zellen dokumentiert. Die Aufnahmen wurden anschließend mit der Software ImageJ analysiert und der prozentualer Anteil proliferierender Zellen bestimmt.

3.1.9. Durchflußcytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflußcytometrie wurde benutzt, um quantitative Aussagen über den DNS-Gehalt der Zellen innerhalb einer Population zu machen und daraus die prozentualen Anteile der distinkten Zellzyklusphasen zu bestimmen.

Hierfür wurden ca. $5x10^5$ Zellen trypsiniert, in 1 ml 10 % DMSO, 1 % BSA in eiskaltem PBS aufgenommen und abzentrifugiert (10 min bei 2000 Upm, kalt). Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Pellets bei -80 °C gelagert.

Für die Färbung der DNS wurden die Proben aufgetaut und je 1 ml Färbe-Puffer (Tate *et al.*, 1983) dazugegeben. Anschließend wurden die Proben gevortext, 30 min bei 37 °C inkubiert und in einem Coulter Epics XL-MCL-Gerät analysiert.

Die Rohdaten vom Epics XL (Beckmann-Coulter) wurden mit der Software WinMDI 2.8 (J. Trotter) in Single-Parameter Histogramme umgewandelt und als FCS-Dateien gespeichert. Die quantitative Zellzyklusanalyse erfolgte anschließend mit dem Programm Cylchred 1.0.2 (Universität Cardiff).

Hypotonischer Färbe-Puffer:

4 mM	Natriumcitrat
30 U/ml	RNase
0,1 %	Triton X-100 (bzw. 0,6% NP40)
50 g/ml	Propidiumiodid

3.2. Nukleinsäure-analytische Methoden

3.2.1. Gewinnung transformationskompetenter Bakterien

Zur Gewinnung kompetenter Bakterien wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml Übernachtkultur des DH5α *E.coli*-Stammes angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD_{595} von 0,6 als Schüttelkultur (180 Upm) angezogen. Die Zellen wurden abzentrifugiert (3000 Upm, 10 min, SS34-Rotor, Sorvall), das Pellet in 30 ml TfB I resuspendiert und 30 bis 60 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut sedimentiert (s.o.) und in 5 ml TfB II resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 min bei 37 °C erfolgte eine Aufteilung der Zellen in 150 µl Aliquote, die sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Zur weiteren Aufbewahrung wurden die Zellen bei -70 °C gelagert.

TfB I:

100 mM RbCl

50 mM $MnCl_2$

10 mM $CaCl_2$

30 mM KAc

15% (w/v) Glyzerin

pH 5,8 eingestellt mit 0,2 M HAc

TfB II

10 mM MOPS

10 mM RbCl

75 mM $CaCl_2$

15% (w/v) Glyzerin

pH 7,0 eingestellt mit NaOH

3.2.2. Transformation kompetenter Bakterien

Die bei -70 °C gelagerten kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Danach wurden zu 150 µl kompetenten Zellen mit TCM-Puffer auf 30 bis 40 µl verdünnte 100 ng Plasmid-DNS gegeben und vorsichtig gemischt. Während einer 45-minütigen Inkubationzeit auf Eis adsorbierte die DNS an die Bakterien. Im Anschluß daran wurden die Zellen für 60 Sekunden bei 42 °C inkubiert. Dieser Hitzeschock sollte der Plasmid-DNS das Eindringen in die Zellen erleichtern. Den Zellen wurde 1 ml LB-Medium ohne Antibiotika zugefügt und der Ansatz eine Std. bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit prägten die transformierten Bakterien die plasmidcodierte Antibiotikaresistenz aus, die ihnen ein Wachstum auf Antibiotika-Nährböden ermöglichte. Anschließend wurden 150 µl der Zellen mit einem sterilen Drygalski-Spatel auf einer LBA-Platte ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von rund 18 Std. bei 37 °C wurden einzelne Kolonien, die jeweils einen Klon darstellen, mit einem sterilen Zahnstocher entnommen und in neues Medium überführt.

3.2.3. Präparation von Plasmid-DNS aus *E.coli*-Zellen

Für die Maxipräparation der Plasmid-DNS wurden zunächst 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum in einem Glasröhrchen mit einer einzelnen Bakterienkolonie inokuliert und ca. 6 h bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Von dieser Startkultur wurden ca. 50 µl für das Animpfen einer 200 ml Kultur verwendet, welche anschließend über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert wurde. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (Sorvall Methoden 58 RC-5B-Zentrifuge, GSA-Rotor, 5000 rpm, 10 min, 4 °C), und die Plasmid-DNS mit Hilfe eines NUCLEOBOND® AX Kits (Macherey-Nagel) gemäß den Angaben des Herstellers präpariert. Abschließend wurde sie mit 70 %igem Ethanol gewaschen

und nach kurzem Trocknen in TE-Puffer aufgenommen.

3.2.4. Transiente Transfektion

Zur transienten Expression von Nestin bzw. GFP wurden RAT1 Zellen mit den Plasmiden pNH64 resp. pGFP mit Hilfe des *Nucleofector* (Amaxa, Köln) transfiziert. Dabei wurden das *Nucleofector Kit V* und das Programm U-30 gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wurden für die Transfektion von ca. $1x10^6$ Zellen 5µg Plasmid DNA eingesetzt.

3.3. Proteinanalytische Methoden

3.3.1. Zelllyse

Für die Herstellung von Gesamtzelllysaten wurden die Zellen einer subkonfluent bewachsenen Gewebekulturschale vom Medium befreit und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden sie von den Kulturschalen abgeschabt, in 200 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und durch Ultraschall homogenisiert.

3.3.2. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehalts in den Lysaten erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry *et al.*, 1951; Smith *et al.*, 1985) mit dem BCA Protein Assay. Hierfür wurden 5 µl der Lysate 1:10 mit H_2O verdünnt, mit 1 ml der frisch hergestellten BCA-Arbeitslösung gemischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Das BCA-Reagenz bildet in Anwesenheit von Protein einen violetten Farbkomplex, dessen Intensität proportional zum Proteingehalt der Probe ist. Die Intensität wurde anhand der Extinktion bei 562 nm im Photometer bestimmt. Als Referenz diente eine Eichreihe von Rinderserum-Albumin in Konzentrationen von 100 µg/ml bis 1 mg/ml. Die Gesamtzelllysate wurden mit doppelt konzentriertem SDS-Probenpuffer auf eine Proteinkonzentration von 1 µg/µl eingestellt und mit Bromphenolblau und β-Mercaptoethanol komplettiert.

BCA-Arbeitslösung:	2 %ige Lösung B in Lösung A
BCA Lösung A:	BCA und Natriumtatrat in basischem Carbonatpuffer (Pierce, Rockford, USA)
BCA Lösung B:	4% CuSO4 (Pierce, Rockford, USA)

3.3.3. Immunpräzipitation

100 µg natives Protein wurden mit IP-Lysispuffer auf 300 µl aufgefüllt. Das verdünnte Lysat wurde mit 100 µl einer 10 %igen Protein G-Sepharose Suspension (PGS) und mit den Präzipitationsantikörpern gemischt. Die Proben wurden zwei Stunden bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Das an Sepharose gekoppelte Protein G bindet spezifisch an den Fc-Teil der Antikörper, so daß diese mit dem gebundenen Antigen angereichert werden konnten. Als Präzipitationskontrolle diente entweder ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen Hämagglutinin oder ein polyklonales Serum gegen SV40 T-Antigen, das keine Proteine aus den Lysaten präzipitieren sollte. Die beladene PGS wurde fünfmal mit 1 ml kaltem IP-Lysispuffer gewaschen, indem die Sepharose durch kurzes Anzentrifugieren sedimentiert und der Überstand verworfen wurde. Es folgten zwei Waschschritte mit IP-Lysispuffer ohne NP40, um die Probe von dem Detergenz zu befreien. Nach dem Waschen wurde die mit Antikörper und Antigen beladene PGS in 50 µl doppelt konzentriertem SDS-Probenpuffer aufgekocht und abzentrifugiert. Der Überstand wurde unter denaturierenden Bedingungen in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die präzipitierten Proteine im Westernblot analysiert.

3.3.4. SDS-PAGE

10 µl der in SDS-Puffer aufgenommenen Proben wurden unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Acrylamidkonzentration des Trenngels richtete sich nach der Größe der analysierten Proteine und lag zwischen 8 und 15 %. Der Gellauf erfolgte bei konstanter Stromstärke von 20 mA, bis die Bromphenolblau-Bande das Ende des Gels erreicht hatte. Neben den Proben wurden 10 µl des Proteinmarkers B7 aufgetragen, um die Größen der Proteine abzuschätzen.

Trenngel:

375 mM	Tris / HCl (pH 8,8)
8-15 %	Acrylamid-Stammlösung
0,1 %	SDS
0,05 %	TEMED
0,075 %	Ammoniumpersulfat

Sammelgel:

125 mM	Tris / HCl (pH 6,8)
4 %	Acrylamid-Stammlösung
0,1 %	SDS
0,2 %	TEMED
0,1 %	Ammoniumpersulfat

Acrylamid-Stammlösung:

30 % Acrylamid / Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1 (National Diagnostics, Atlanta, USA)

Laufpuffer:

25 mM	Tris/base
200 mM	Glycin
1 %	SDS

3.3.5. Western Blot und Immundetektion

Nach dem Gellauf wurden die Proteine aus dem Gel elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das Gel und die Membran wurden hierfür zwischen je drei Lagen in Transfer Puffer getränktem Whatman 3MM Papier eingespannt. Der Transfer erfolgte für 60 Minuten bei 60 V in einer mit Transfer Puffer gefüllten Naßblot Apparatur.

Eine anschließende Färbung der transferierten Proteine mit 500 µl Amidoschwarz-Färbelösung in etwa 200 ml H_2O ermöglichte es, den Erfolg der Übertragung zu kontrollieren. Die Membran wurde bei Raumtemperatur getrocknet.

Vor der Immundetektion bestimmter Proteine auf der Membran (Burnette, 1981) wurde diese dreimal für zehn Minuten in TBST-Puffer geschwenkt, um das Amidoschwarz auszuwaschen. Um unspezifische Bindungsstellen der Membran abzusättigen, wurde diese anschließend für 30 Minuten in TBST-Puffer mit 5 %iger Magermilch inkubiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit monoklonalen bzw. affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörpern. Für die Markierung wurden die Antikörper in 10 ml TBST-Puffer verdünnt und die Membran in den Antikörperlösungen geschwenkt. Die primären Antikörper wurden mit 5 %iger Magermilch über Nacht, die Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper für 60 Minuten mit der Membran inkubiert. Nach jedem

Markierungsschritt wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in 20 ml TBS/Tween gewaschen.

3.3.6. ECL-Reaktion

Die Detektion der Antikörperkomplexe erfolgte durch eine enzymatische Reaktion der Peroxidase, bei der Chemolumineszenz freigesetzt wird. Die Membran wurde eine Minute lang in frischem ECL-Reagenz inkubiert, kurz abgetropft und zwischen zwei Folien gegen einen Röntgenfilm exponiert. Die Expositionszeiten lagen je nach Intensität der Chemolumineszenz zwischen einer und fünf Minuten.

ECL-Reagenz: 50 % Lösung A; 50 % Lösung B

ECL Lösung A:	*ECL Lösung B:*
100 mM Tris/HCl (pH 8,5)	100 mM Tris/HCl (pH 8,5)
2,5 mM Luminol	10 mM H_2O_2
400 µM p-Coumarsäure	

4. ERGEBNISSE

4.1. Die cytoplasmatische Verankerung von tsp53$^{val-135}$ an Vimentin erfolgt über den Glucocorticoidrezeptor

Um eine mögliche Interaktion der drei Komponenten p53, Glucocorticoid-rezeptor und Zytoskelett aufzuzeigen, wurden zwei experimentelle Ziele verfolgt: zum einen sollten Aussagen über die strukturelle Wechselwirkung der verschiedenen Komponenten *in situ* erhalten werden, zum anderen sollte die strukturelle Zusammensetzung isolierter Komplexe analysiert, und ihre interagierende Domänen bestimmt werden.

4.1.1. p53 kolokalisiert mit dem Glucocorticoidrezeptor am Cytoskelett

Untersuchungen zur strukturellen Interaktion von p53 und Glucocorticoid-rezeptor wurden an p53$^{Val-135}$ transfizierten (C6D8-1) Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden dazu bei nicht-permissiver Temperatur kultiviert, einer Bedingung, unter welcher p53$^{Val-135}$ im Cytoplasma sequestriert wird. Um die Beziehung zu Cytoskelettstrukturen *in situ* aufzuzeigen, wurden die adhärenten Zellen mit Triton X-100 unter physiologischen Salzkonzentrationen lysiert (Hartwig, 1992; Bohn *et al.*, 1993). Unter diesen Bedingungen werden die löslichen cytoplasmatischen Bestandteile sowie Lipide herausgelöst, während die in Filamenten organisierten Cytoskelettproteine Tubulin, Aktin und Intermediär-filamentproteine, in ihrer strukturellen Organisation erhalten bleiben. In C6D8-1 Zellen wurde bisher als einziges cytoplasmatisches Intermediärfilamentprotein Vimentin nachgewiesen (Röser *et al.*, 1991).

Nach der Lyse wurden die erhaltenen Zytoskelette mit dem monoklonalen Antikörper PAb240 gegen p53 und einem affinitätsgereinigten Kaninchenserum (M20) gegen den Glucocorticoidrezeptor für die Immunfluoreszenzmikroskopie markiert und im konfokalen Mikroskop analysiert (Abb. 6). Zur Lokalisation der Zellkerne wurde die DNA mit dem Interkalatorfarbstoff DRAQ5 angefärbt.

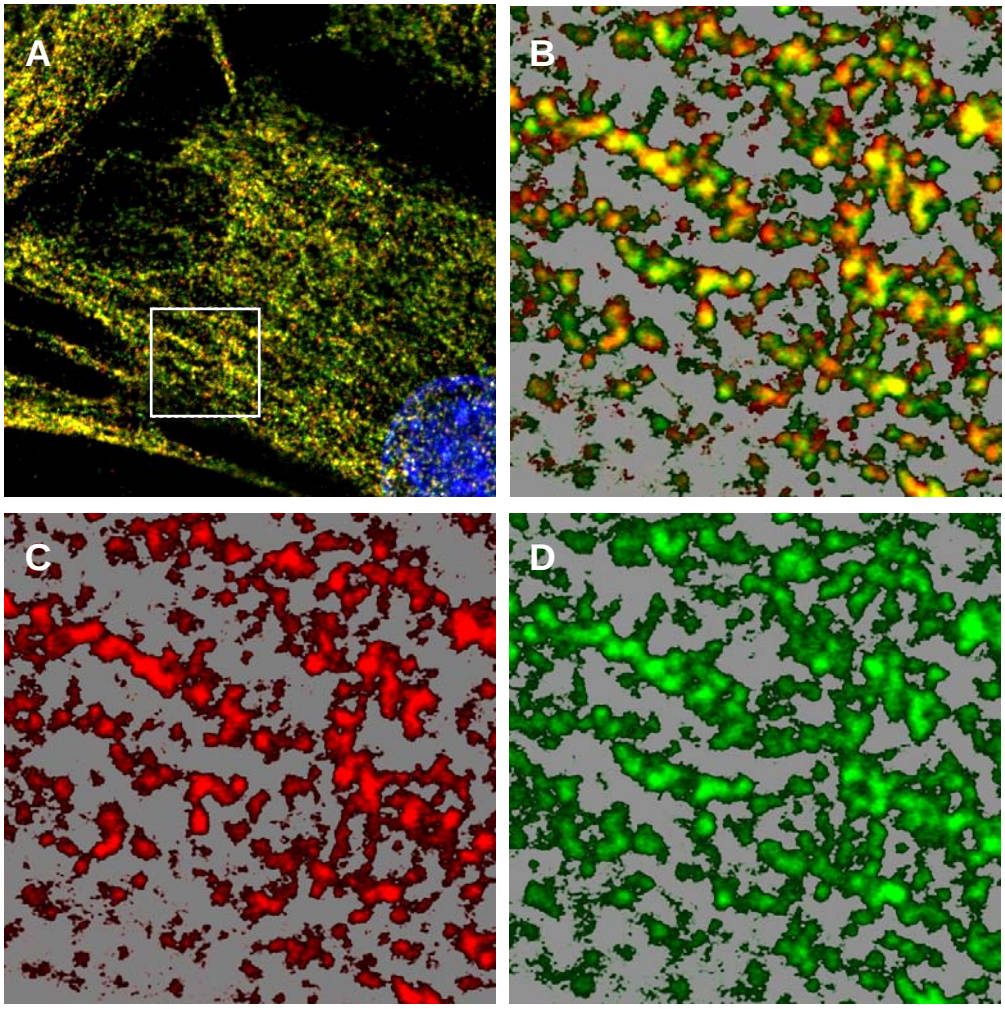


Abbildung 6:
p53 und der Glucocorticoidrezeptor kolokalisieren an Cytoskelettstrukturen. (**A**) Übersichtsaufnahme einer Immunfluoreszenzmarkierung von p53 (rot), GR (grün); DNA (blau). (**B**) zeigt einen vergrößerten Ausschnitt von (**A**). In (**C**) und (**D**) sind jeweils p53 (rot) und GR (grün) einzeln dargestellt. Zur besseren Visualisierung wurde in (**B**), (**C**) und (**D**) der Intensitätswert 0 (absolutes Schwarz) gegen 50 % grau getauscht.

Wie die Übersichtsaufnahme (Abb. 6 A) zeigt, überlagern sich die Signale der p53- (rot) und der GR-Färbung (grün) und lassen eine Kolokalisation beider Proteine vermuten. Um diese Kolokalisation abzusichern, wurden die Rohdaten mit dem Kolokalisationsmodul der Zeiss-LSM Software einer statistischen Analyse unterzogen (Abb. 7, Tab. 2). Für die Auswertung wurde eine Region im Bereich des Cytoplasmas gewählt, die nicht durch residuale Kernstrukturen überlagert wird.

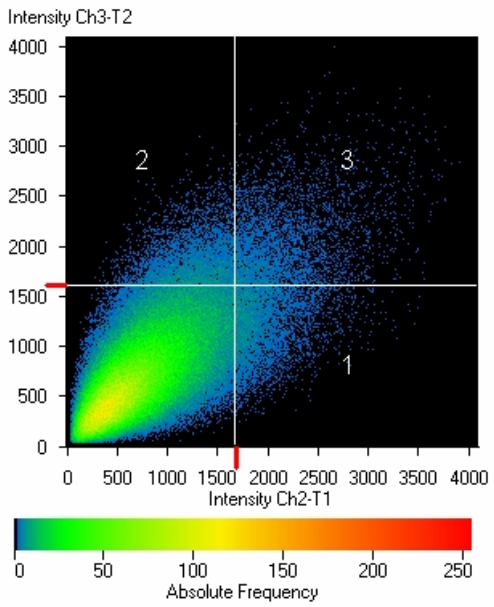


Abbildung 7:
Streuungsdiagramm der Signalintensitäten des Glucocorticoidrezeptors (Ch2-T1) und p53 (Ch3-T2) zu Abb. 6

Tabelle 2: statistische Auswertung der Signale zu Abb. 6

Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch2-T1)	0,426
Kolokalisationskoeffizient des p53-Kanals (Ch3-T2)	0,435
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch2-T1)	0,560
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des p53-Kanals (Ch3-T2)	0,573
Pearson´s Korrelationskoeffizient	0,34

Die bei 50 % liegenden Kolokalisationskoeffizienten und der relativ hohe Korrelationskoeffizient von 0,34 sprechen für eine partielle Kolokalisation beider Proteine.

Das Ergebnis machte deutlich, dass nicht nur $p53^{Val\text{-}135}$ sondern auch der Glucocorticoidrezeptor in C6D8-1 Zellen am Cytoskelett gebunden ist, und dass beide Proteine offensichtlich einem gemeinsamen Proteinkomplex angehören.

4.1.2. Die Verankerung des p53-Glucocorticoidrezeptor-Komplexes am Cytoskelett erfordert die Anwesenheit von Vimentin

In C6 Zellen ist die zytoplasmatische Lokalisation von $p53^{Val-135}$ nur dann gegeben, wenn das Intermediärfilamentprotein Vimentin exprimiert wird (Klotzsche *et al.*, 1999; Klotzsche 2000). In vimentin-negativen C6 Zellen lokalisiert p53 überwiegend im Zellkern. Ursprünglich vimentin-negative, mit murinem Vimentin retransfizierte Zellen zeigen wiederum eine cytoplasmatische Lokalisation von $p53^{Val-135}$ (Klotzsche, 2000).

Um zu überprüfen, ob auch die Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors in diesen Zellen mit der Anwesenheit von Vimentin korreliert, wurden die $p53^{Val-135}$ transfizierten Zellen mit einem Kaninchenserum (M-20) gegen den Glucocorticoidrezeptor und mit einem Ziegenserum gegen Vimentin für die Immunfluoreszenz doppelmarkiert und im konfokalen Mikroskop analysiert.

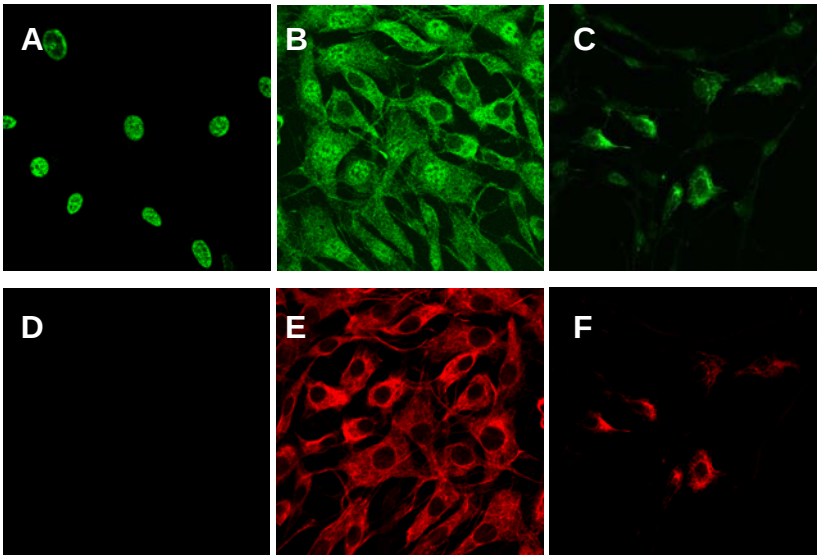


Abbildung 8:
Die subzelluläre Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors (grün) in $tsp53^{Val-135}$ transfizierten Subklonen der C6 Zelllinie wird durch die Anwesenheit von Vimentin (rot) determiniert. In vimentin-negativen C6D10-5 Zellen (**A** und **D**) ist der Glucocorticoidrezeptor im Kern lokalisiert, in vimentin-positiven C6D8-1 (**B** und **E**) und mit murinem Vimentin retransfizierten VWT16 (**C** und **F**) überwiegend cytoplasmatisch

Das Ergebnis (Abb. 8) zeigt, dass die Zellen, abhängig von der Anwesenheit von Vimentin, deutliche Unterschiede in der subzellulären Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors aufweisen: vimentin-negative Zellen (C6D10-5) zeigen eine Kernlokalisation des Rezeptors (Abb.8A und D), vimentin-positive Zellen

(C6D8-1) (Abb.8B und E) und die mit Vimentin retransfizierten Zellen (VWT16) (Abb.8C und F) zeigen eine cytoplasmatische Lokalisation. Die subzelluläre Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors in C6 Subklonen folgt also exakt der von Vimentin und $p53^{Val-135}$. Dieser Befund lässt den Schluss zu, dass Vimentin auch für den Glucocorticoidrezeptor als Ankerprotein fungieren kann.

4.1.3. p53, Glucocorticoidrezeptor, Hitzeschockproteine und Vimentin bilden einen Proteinkomplex *in vivo*

Um zu überprüfen, ob der Glucocorticoidrezeptor, p53 und Vimentin einen gemeinsamen Komplex bilden, wurde der Glucocorticoidrezeptor aus Zelllysaten von C6D8-1 Zellen immunpräzipitiert und die Immunkomplexe auf die Kopräzipitation von p53 und Vimentin hin untersucht. Wie Abb.9 deutlich macht, konnten beide Proteine mit dem Glucocorticoidrezeptor kopräzipitiert werden.

Der im Cytoplasma lokalisierte Glucorticoidrezeptor liegt normalerweise im Komplex mit Chaperonen (Hsp70, Hsp90) vor, welche den Funktionsstatus des Rezeptors definieren (Pratt *et al.*, 1997). Es stellte sich deshalb die Frage, inwieweit diese Proteine im p53-Glucocorticoidrezeptorkomplex enthalten sind.

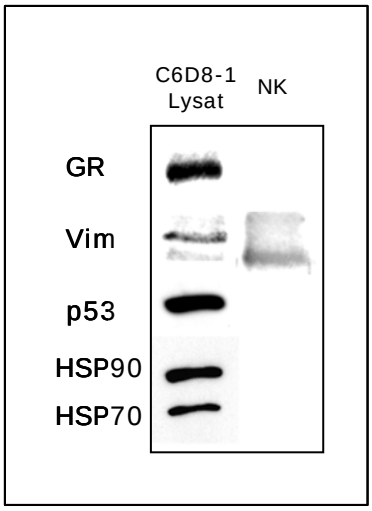


Abbildung 9:
Die cytoplasmatische Fraktion des Glucocorticoidrezeptors ist in C6D8-1 Zellen mit Vimentin, p53 und Hitzeschockproteinen assoziiert.

Wie Abb. 9 zeigt, ergab die Überprüfung der Immunkomplexe, dass die Hitzeschockproteine HSP70 und HSP90 kopräzipitiert worden waren. Das bedeutet, dass der mit Vimentin assoziierte p53-Ankerkomplex neben dem

Glucocorticoidrezeptor Komponenten des "reifen", aktivierbaren Glucocorticoidrezeptor-Komplexes enthält.

4.1.4. p53 und der Glucocorticoidrezeptor interagieren über die zentralen Domänen

Mit Hilfe von GST-Konstrukten konnte in *in vitro*-Bindungsstudien gezeigt werden, dass der Glucocorticoidrezeptor mit der zentralen Domäne und dem NLS-Bereich von p53 interagiert (Sengupta und Wasylyk 2001). Um zu überprüfen, welche Domänen von $p53^{Val-135}$ an der Komplexbildung mit dem Glucocorticoidrezeptor in C6D8-1 Zellen *in vivo* beteiligt sind, wurde p53 aus Lysaten dieser Zellen mit Antikörpern präzipitiert, die unterschiedliche Epitope des Proteins erkennen (Abb. 10A und B). Die verschiedenen Präzipitate wurden im Westernblot auf die erfolgreiche Präzipitation von p53 und die Kopräzipitation des Rezeptors hin überprüft. Die Antikörper wurden so eingesetzt, dass sie im Überschuss vorlagen.

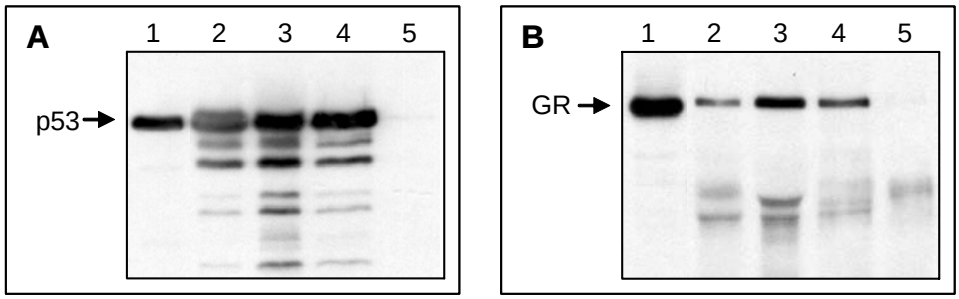


Abbildung 10:

*Immunpräzipitation (IP) von $p53^{Val-135}$ aus einem Zelllysat von C6D8-1 Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen unterschiedliche Epitope von p53 und Überprüfung des Immunkomplexes im Western Blot (**A**) auf p53 und (**B**) auf den Glucocorticoidrezeptor*

1. Zelllysat (positive Kontrolle)
2. IP mit PAb240 (Epitop: mtp53, zentrale Domäne)
3. IP mit PAb248 (Epitop: p53-Aminoterminus)
4. IP mit PAb421 (Epitop: p53-Carboxyterminus)
5. negative Kontrolle

Wie in Abb. 10 zu sehen ist, konnte p53 mit allen drei Antikörpern gefällt werden. Die p53 Menge, die mit PAb240 präzipitiert wurde (Abb.10A, Spur2), war deutlich niedriger als diejenige, die mit dem aminoterminalen Antikörper PAb248 (Abb.10,

Spur 3) oder dem carboxyterminalen Antikörper PAb421 (Abb.10, Spur 4) erhalten wurde. Das PAb240 Präzipitat enthielt auch deutlich weniger an kopräzipitiertem Glucocorticoidrezeptor (Abb. 10 B, Spur 2). Die Ergebnisse ließen vermuten, dass der Glucocorticoidrezeptor an die zentrale Domäne von p53 gebunden sein könnte und daher den Zugang des Antikörpers PAb240 zu diesem Epitop blockierte. Diese Vermutung deckt sich mit den Daten aus *in vitro*-Bindungsexperimenten mit p53-GST-Konstrukten (Sengupta *et al.*, 2001).

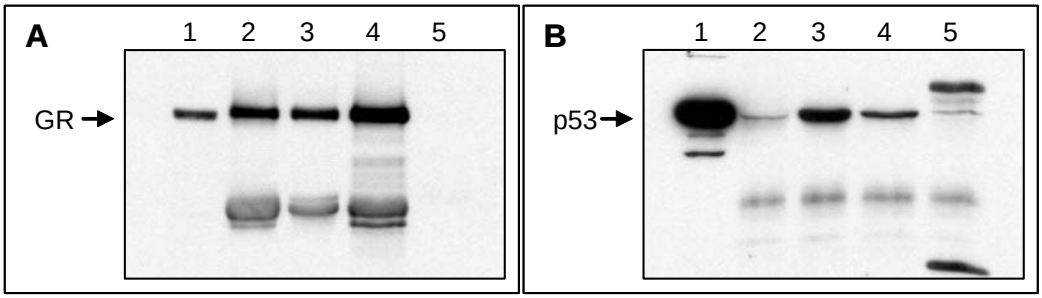


Abbildung 11:
*Immunpräzipitation des Glucocorticoidrezeptors aus einem Zelllysat von C6D8-1 Zellen mit Antikörpern gegen unterschiedliche GR-Epitope; Überprüfung der Immunpräzipitate im Western Blot auf Präzipitation von Rezeptor (**A**) und p53 (**B**).*

1. Zelllysat (positive Kontrolle)
2. IP mit H-300 (Epitop: GR, zentrale Domäne)
3. IP mit P-20 (Epitop: GR-Carboxyterminus)
4. IP mit M-20 (Epitop: GR-Aminoterminus)
5. Kontroll-IP mit monoklonalem Antikörper gegen ein virales Glykoprotein (Hämagglutinin des Masernvirus)

Alternativ zu dem obigen Ansatz wurde die Immunpräzipitation mit Antikörpern durchgeführt, die unterschiedliche Epitope des Glucocorticoidrezeptors erkennen. In allen Fällen konnte der Glucocorticoidrezeptor erfolgreich präzipitiert werden (Abb. 11 A). In dem mit dem Antikörper H-300 erhaltenen Präzipitat konnte allerdings nur sehr wenig kopräzipitiertes p53 nachgewiesen werden (Abb. 11 B). Die größte Menge an kopräzipitiertem p53 wurde mit dem Antikörper P20 erhalten, welcher gegen den Carboxyterminus des Glucocorticoidrezeptors gerichtet ist. Das Immunpräzipitat des M20 Antikörpers enthielt ebenso eine signifikante, wenn auch deutlich geringere Menge an p53.

Die Ergebnisse aus den Immunpräzipitationsexperimenten legen die Vermutung nahe, dass p53 und der Glucocorticoidrezeptor miteinander über ihre zentralen Domänen interagieren.

4.1.5. Die Aktivierbarkeit des Glucocorticoidrezeptors wird durch den p53-Status determiniert

Um ihre Funktion als Transaktivator ausüben zu können, müssen sowohl p53 als auch der Glucocorticoidrezeptor aus dem Zytoplasma in den Kern wandern. Da p53 und der Glucocorticoidrezeptor im Cytoplasma als gemeinsamer Komplex vorliegen und mit Vimentin assoziiert sind, stellte sich die Frage, ob dieser Komplex bei der Aktivierung eines der beiden Proteine erhalten bleibt und beide Proteine gemeinsam in den Zellkern wandern, oder ob die Kernwanderung eine Spaltung des Komplexes voraussetzt.

Die Kernwanderung von tsp53$^{Val-135}$ kann durch Temperatur-Veränderungen ausgelöst werden. Bei der nicht-permissivenTemperatur von 39 °C ist tsp53$^{Val-135}$ in den Vimentin-positiven C6D8-1 Zellen überwiegend im Cytoplasma lokalisiert. Werden diese Zellen auf die permissive Temperatur von 32 °C gebracht, so transloziert p53 nach ca. sechs Stunden fast vollständig in den Zellkern (Klotsche, 2000).

Die Kernwanderung des Glucocorticoidrezeptors kann seinerseits durch Hormonstimulation initiiert werden. Dexamethason (Abb. 12), ein synthetisches, fluoriertes Glucocorticoid (Römpp, 1995), gilt als potenter Agonist des Glucocorticoidrezeptors (Pratt, 1994).

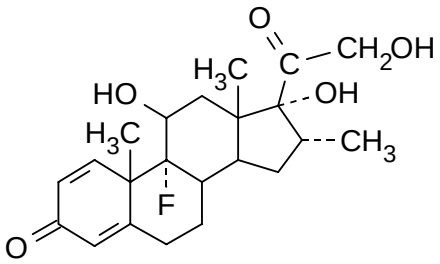


Abbildung 12:

Strukturformel von Dexamethason (Römpp, 1995)

Wurden vimentin-positive, mit tsp53$^{Val-135}$ stabil transfizierte (C6D8-1) Zellen bei nicht permissiver Temperatur von 39 °C über 60 Minuten mit 100 nM

Dexamethason inkubiert, so blieben sowohl p53 (Abb. 13A) als auch der Glucocorticoidrezeptor (Abb. 13B) weiterhin im Cytoplasma lokalisiert. In Kontrollzellen, den nicht mit tsp53$^{Val-135}$ transfizierten Parentalzellen C6D8, war dagegen eine komplette Verlagerung des Glucocorticoidrezeptors in den Kern zu beobachten (Abb. 13 E). Das Ergebnis ließ den Schluss zu, dass der im Komplex mit p53 vorliegende cytoplasmatische Glucocorticoidrezeptor nicht aktivierbar ist.

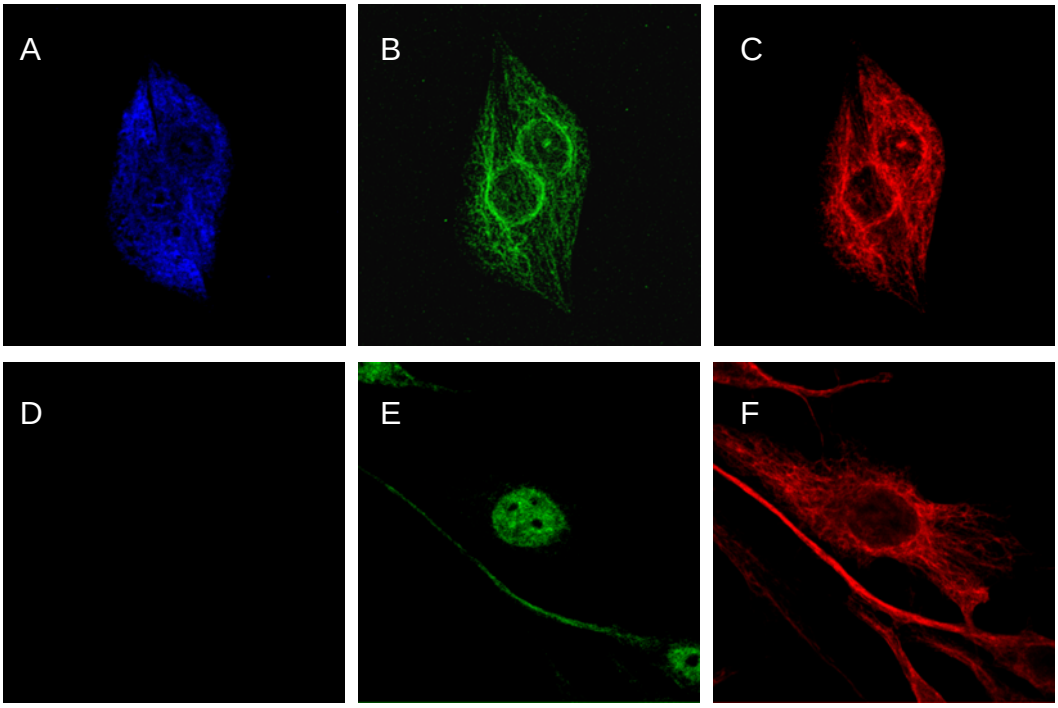


Abbildung 13:
Dexamethasonbehandlung von C6D8-1 und C6D8 Zellen bei nicht permissiver Temperatur von 39 °C

Dreifachfärbung mit Antikörpern gegen p53 (**A**, **D**), GR (**B**, **E**) und Vimentin (**C**, **F**). Mit tsp53$^{Val-135}$ transfizierte Zellen (**A**-**C**) zeigen bei nicht-permissiver Temperatur unter Dexamethasonzugabe keine Verlagerung des GR (**B**) in den Kern. In p53-negativen Zellen (**D**-**F**) lokalisiert der GR nach der Dexamethasonbehandlung im Kern (**E**).

In einem zweiten Experiment wurden die Zellen vor der Inkubation mit Dexamethason für 6 Stunden auf die permissive Temperatur von 32 °C gebracht (Abb. 14). Der Wechsel auf die permissive Temperatur führte zu einer Verlagerung von p53 in den Zellkern (Abb. 14A). Der Glucocorticoidrezeptor hingegen lokalisierte weiterhin im Cytoplasma (Abb. 14B). Wurden die Zellen anschließend mit Dexamethason inkubiert, so erfolgte nun auch eine Verlagerung des Rezeptors in den Zellkern (Abb.14 E). In allen Fällen blieb das Vimentinfilamentgerüst

erhalten. Die Ergebnisse zeigen, dass die Veränderung der p53 Konformation von der Mutantenform zur Wildtypform ausreicht, um p53 aus dem Komplex mit dem Rezeptor herauszulösen und eine Kernwanderung zu induzieren. Der Glucocorticoidrezeptor bleibt dabei weiterhin am Zytoskelett gebunden. Durch den Verlust von p53 aus dem Komplex ist der Rezeptor nun durch den Agonisten aktivierbar und kann in den Zellkern wandern.

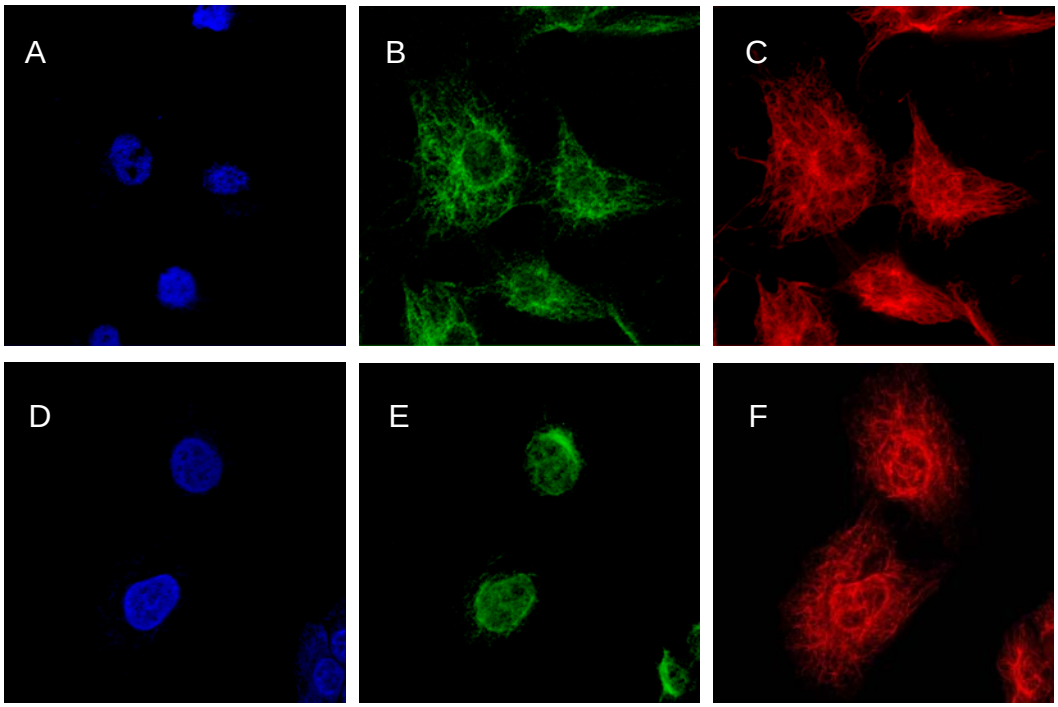


Abbildung 14:
Dexamethasonbehandlung von C6D8-1 Zellen bei permissiver Temperatur (32 °C)

Dreifachfärbung mit Antikörpern gegen p53 (**A**, **D**), GR (**B**, **C**) und Vimentin (**C**, **F**). Nach 6 Stunden Inkubation bei 32 °C, in Abwesenheit von Dexamethason, lokalisiert tsp35$^{Val-135}$ vollständig im Zellkern (**A**, **D**) (vergl. mit Abb.13A); der Glucocorticoidrezeptor verbleibt im Zytoplasma (**B**). Nach anschließender Zugabe von Dexamethason wandert auch der Glucocorticoidrezeptor in den Zellkern (**E**). Die Lage von Vimentin bleibt unverändert (**C**, **F**).

4.2. Die cytoplasmatische Verankerung des Glucocorticoidrezeptors an Vimentinfilamenten ist ein p53-unabhängiges Phänomen

Die Ergebnisse der Experimente aus 1.1.4 und 1.1.5. zeigen, dass p53 vermutlich über seine zentrale Domäne an den Glucocorticoidrezeptor bindet, welcher seinerseits am Cytoskelett verankert ist. Löst man das tsp53$^{Val-135}$ von diesem Komplex durch Wechsel auf die permissive Temperatur ab, so bleibt der Glucocorticoidrezeptor weiterhin am Cytoskelett gebunden. Somit war zu vermuten, dass der Glucocorticoidrezeptor im Zusammenspiel mit zusätzlichen Proteinen als Mittler der Verankerung zwischen p53 und Vimentin fungiert. p53$^{Val-135}$ induziert also nicht die cytoskeletale Verankerung des Rezeptors, es nutzt diesen bereits bestehenden Komplex für die cytoplasmatische Lokalisation.

Zur genaueren Charakterisierung des Glucocorticoidrezeptor-Komplexes am Cytoskelett wurden die nicht mit tsp53$^{Val-135}$ transfizierten Parentalzellen C6D8, C6D10 und VimWT3B4 herangezogen (Röser *et al.*, 1991; Etzrod, 1996).

4.2.1. Die cytoplasmatische Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors in C6 Zellen ist von der Anwesenheit von Vimentin abhängig

Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors an aceton-fixierten Zellen zeigten eine cytoplasmatische Lokalisation des Rezeptors in den vimentin-haltigen C6D8 Zellen (Abb. 15A), eine überwiegende Kernlokalisation in den vimentin-negativen C6D10-Zellen (Abb. 15B) und wiederum eine cytoplasmatische Lokalisation in den mit Vimentin retransfizierten VimWT3B4 Zellen (Abb. 15C).

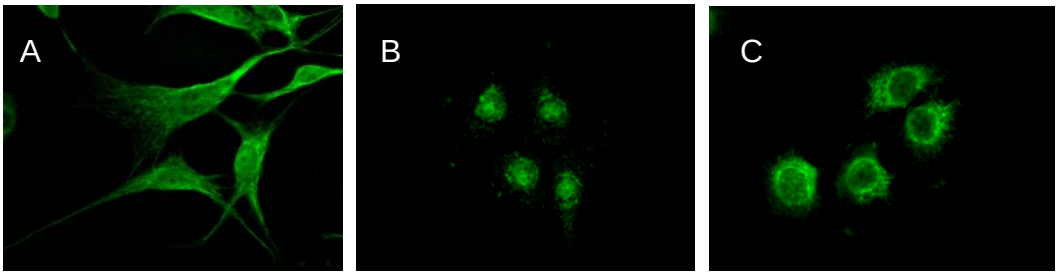


Abbildung 15:
Weitfeld-Fluoreszenzaufnahmen GR-markierter C6 Zellen

(**A**): Vimentin-positive C6D8 Zellen; (**B**): Vimentin-negative C6D10 Zellen; (**C**): VimWT3B4, mit murinem Vimentin stabil transfizierte C6D10 Zellen.

Auch die Parentalzellen der tsp53$^{Val-135}$-transfizierten Linien zeigen somit eine vimentin-abhängige subzelluläre Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors. Demzufolge ist die vimentin-abhängige cytoplasmatische Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors ein Ereignis, welches von p53 unabhängig ist.

4.2.2. Der Glucocorticoidrezeptor bindet an Vimentinfilamente

Bei der Untersuchung der p53-Glucocorticoidrezeptor-Interaktionen konnte gezeigt werden, dass nach Lysis der vimentin-positiven Zellen mit Triton X-100 in der verbleibenden Cytoskelettfraktion neben p53 ein großer Anteil des Glucocorticoidrezeptors gebunden bleibt (vgl. 4.1.1). Um zu überprüfen, ob dieses Phänomen auch in p53-negativen Zellen auftritt, wurden C6D8 Zellen mit Triton X-100 extrahiert, mit Paraformaldehyd fixiert und anschließend mit Ziegenserum gegen Vimentin und dem Kaninchenantiserum M-20 gegen den Glucocorticoid-rezeptor doppelmarkiert. Die immunfluoreszenzmikroskopische Analyse zeigte eine deutliche Kolokalisation beider Proteine (Abb. 16).

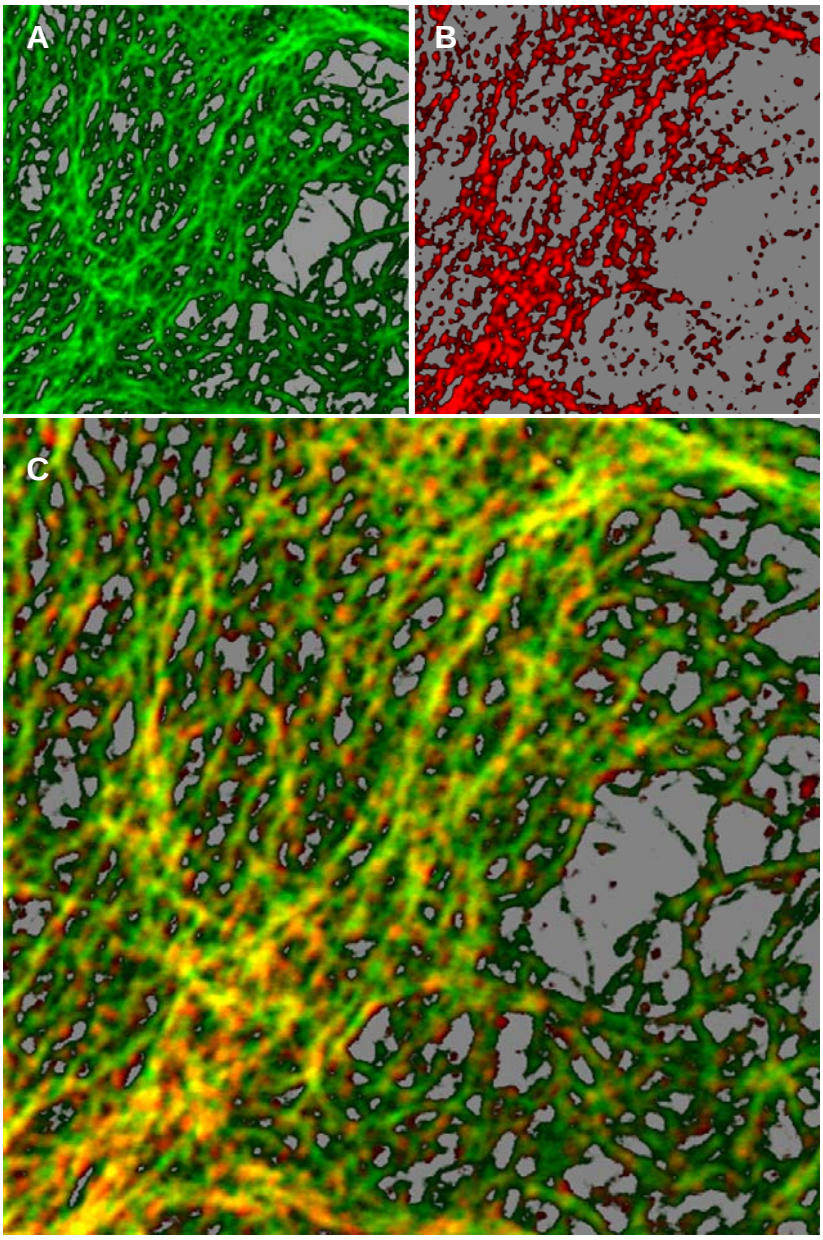


Abbildung 16:
Der Glucocorticoidrezeptor kolokalisiert mit Vimentin an Cytoskeletten von C6D8 Zellen. Konfokale Aufnahme von (**A**): Vimentin; (**B**): Glucocorticoidrezeptor; (**C**): Überlagerung. Zur besseren Visualisierung wurde der Wert aller Signale unter dem Schwellenwert auf 50 % grau gesetzt.

Um die visuell eindeutig erkennbare Kolokalisation von Vimentin und Glucocorticoidrezeptor zu verifizieren, wurde eine statistische Analyse der Rohdaten mit Hilfe des Kolokalisationsmoduls der Zeiss-LSM Software durchgeführt (Abb. 17; Tab. 3)

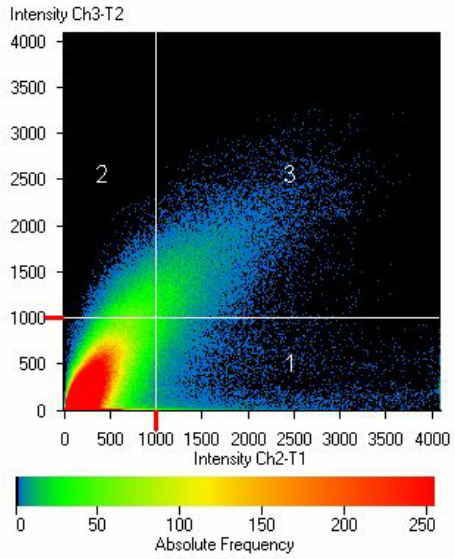


Abbildung 17:
Streuungsdiagramm der Signalintensitäten von Vimentin (Ch2-T1) und Glucocorticoidrezeptor (Ch3-T2) zu Abb. 16

Tabelle 3: statistische Auswertung der Signale zur Abb. 16

Kolokalisationskoeffizient des Vim-Kanals (Ch2-T1)	0,656
Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch3-T2)	0,543
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des Vim-Kanals (Ch2-T1)	0,841
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch3-T2)	0,693
Pearson´s Korrelationskoeffizient	0,57

Die Kolokalisationskoeffizienten und der Korrelationskoeffizient zeigen, dass beide Proteine zu 50 bis 80 % kolokalisieren.
Westernblots von SDS-Lysaten dieser Zellen (Abb.18) machten deutlich, dass Vimentin-positive Zellen (C6D8 und C6D8-1) im Gesamtzelllysat deutlich höhere Mengen an GR enthalten als Vimentin-negative Zellen (C6D10 und C6D10-5). Dieser Unterschied blieb auch nach Lyse der Zellen mit Triton X-100 erhalten und zeigte damit, dass er auf die unterschiedliche Menge cytoskelettgebundenen Rezeptors zurückzuführen ist. Die Glucocorticoidrezeptor-Menge der vimentin-negativen Zellen stellt, wie Immunfluoreszenzmarkierungen zeigen (1.1.2 und

1.2.1), die kerngebundene Fraktion dar. Daraus kann geschlossen werden, dass die Verankerung an Vimentin nicht nur die subzelluläre Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors bestimmt, sondern auch Einfluss auf die GR-Proteinmenge in der Zelle hat.

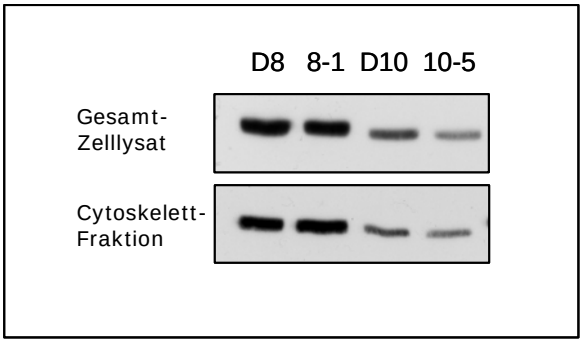


Abbildung 18:
Nachweis des Glucocorticoidrezeptors im Western Blot von Gesamt-Zelllysaten bzw. der cytoskeletalen Fraktion (extrahiert).

4.2.3. Aktin ist an der Verankerung des Glucocorticoidrezeptors nicht beteiligt

Die Hauptkomponenten des Cytoskeletts: Mikrofilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli sind sehr eng miteinander verknüpft (Bohn *et al.* 1996; Herrmann und Aebi, 2000). Um eine Interaktion zwischen dem Glucocorticoidrezeptor und Mikrofilamenten auszuschließen, wurden Immunfluoreszenzmarkierungen von Vimentin und dem Glucocorticoidrezeptor in Kombination mit einer Markierung des Aktins durchgeführt. Hierzu wurden C6D8 Zellen *in situ* lysiert und mit 1 % Paraformaldehyd fixiert. Anschließend wurden die Präparate mit polyklonalem Ziegenserum gegen Vimentin, polyklonalem Kaninchenantiserum gegen den Glucocorticoidrezeptor und mit Phalloidin-TRITC, zum Nachweis des Aktins markiert. (Abb. 19).

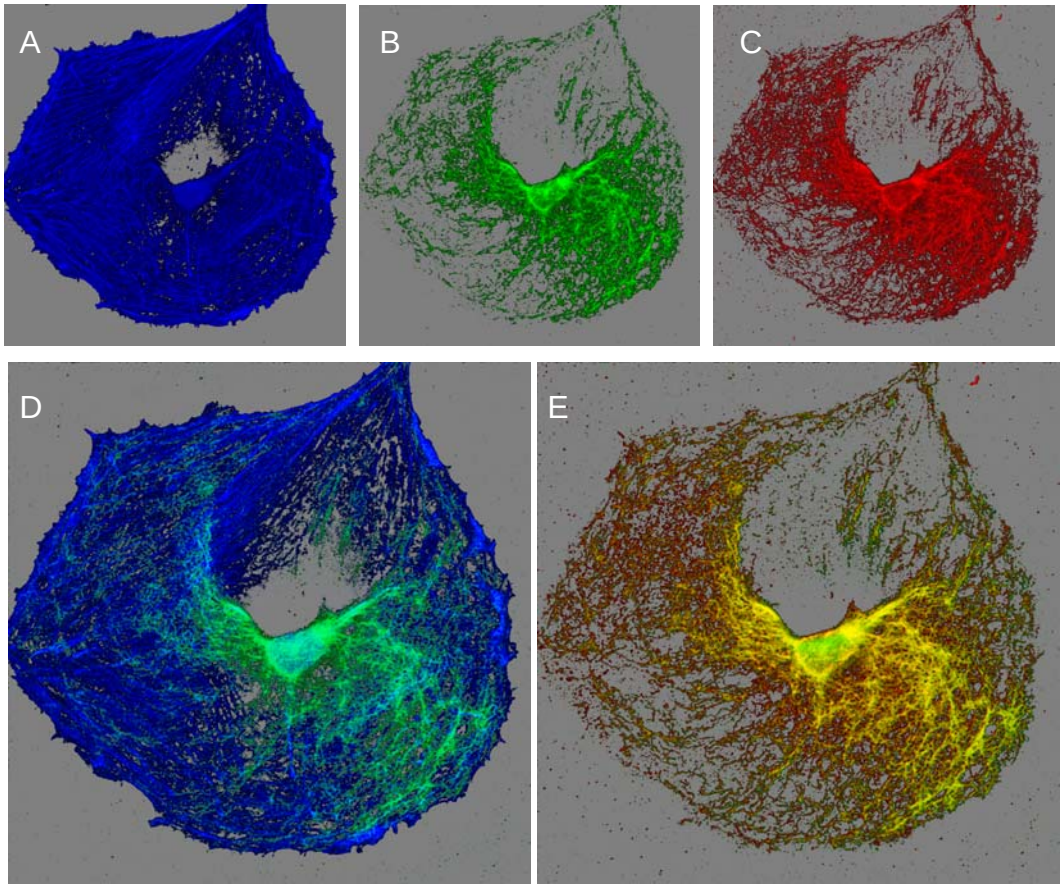


Abbildung 19:
Die subzelluläre Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors zeigt keine Übereinstimmung mit der der Aktinfilamente
Konfokaler Schnitt extrahierter C6D8 Zellen nach Dreifachfärbung mit Antikörpern gegen Aktin (**A**), Glucocorticoidrezeptor (**B**) und Vimentin (**C**). (**D**): Überlagerung von Aktin und GR; (**E**): Überlagerung von Vimentin und GR. Der Intensitätswert 0 für das absolute Schwarz wurde auf 50 % grau gesetzt.

Die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen des Laser-Raster-Mikroskops zeigen deutlich die unterschiedliche Organisation der Netzwerke von Aktin (Abb. 19A) und Vimentin (Abb. 19C). In der Überlagerung der Netzwerke mit der Glucocorticoidrezeptor-Färbung wird eine Übereinstimmung in der Lokalisation zwischen GR und Vimentin deutlich (Abb. 19E) während praktisch keine Kolokalisation von Aktin und GR (Abb. 19D) erkennbar ist. Dieses Ergebnis wurde wiederum statistisch verifiziert. Das breit gestreute Scatter-Diagramm der Aktin-GR-Überlagerung und die sehr niedrigen Kolokalisationskoeffizienten bzw. der Pearson-Korrelationskoeffizient (Abb. 20, Tab. 4) stehen in deutlichem Kontrast zu den hohen Korrelationswerten aus der Vimentin-GR Überlagerung (Abb. 21, Tab 5).

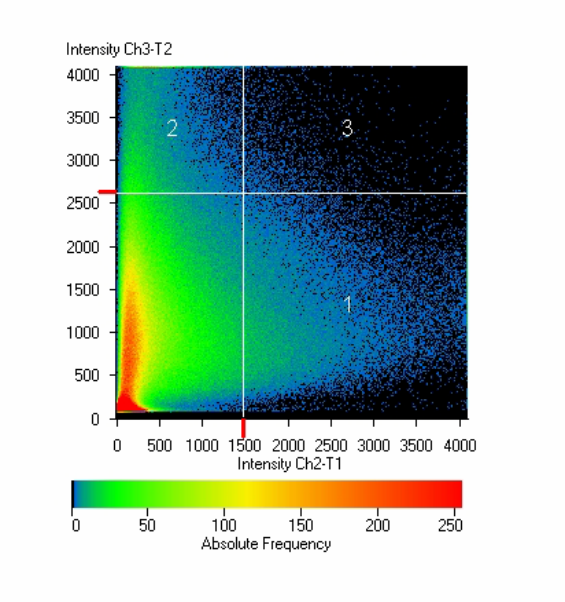


Abbildung 20:
Streuungsdiagramm der Signalintensitäten von GR (Ch2-T1) und Aktin (Ch3-T2) zu Abb. 19D

Tabelle 4: statistische Auswertung der Signale zur Abb. 19D

Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch2-T1)	0,041
Kolokalisationskoeffizient des Aktin-Kanals (Ch3-T2)	0,048
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch2-T1)	0,100
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des Aktin-Kanals (Ch3-T2)	0,188
Pearson´s Korrelationskoeffizient	-0,08

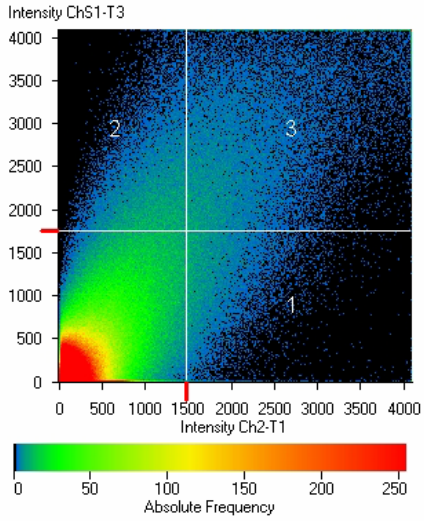


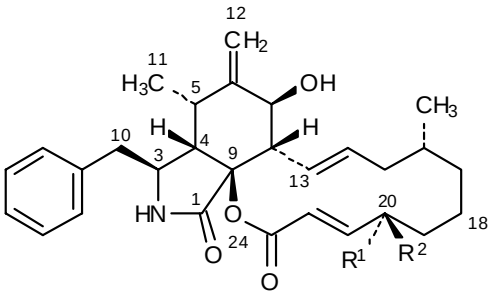
Abbildung 21:
Streuungsdiagramm der Signalintensitäten von GR (Ch2-T1) und Vimentin (ChS1-T3) zu Abb. 19E

Tabelle 5: statistische Auswertung der Signale zur Abb. 19E

Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch2-T1)	0,642
Kolokalisationskoeffizient des Vim-Kanals (ChS1-T3)	0,582
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch2-T1)	0,812
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des Vim-Kanals (ChS1-T3)	0,748
Pearson´s Korrelationskoeffizient	0,36

4.2.3.1. Depolymerisation des Aktingerüstes mit Cytochalasin B

Um zu untermauern, dass Aktin an der cytoplasmatischen Verankerung des GR nicht beteiligt ist, wurden die C6D8 Zellen mit Cytochalasin B behandelt. Cytochalasin B (Abb. 22) ist ein giftiges Stoffwechselprodukt einiger Schimmelpilze, wie z.B. *Helminthosporium dematioideum*, welches die Polymerisation des Aktins unterbindet (Römpp, 1995). Dies kann auf zwei Wegen geschehen. Einerseits bindet Cytochalasin mit hoher Affinität an das Plus-Ende von Aktinfilamenten und unterbindet somit die Assoziation bzw. die Dissoziation von Aktin-Untereinheiten. Andererseits führt die Bindung mit geringer Affinität an Aktin-Monomere zu deren Dimerisierung bei gleichzeitigen Hydrolyse eines ATP´s. Auf diesem Weg katalysiert Cytochalasin die Umwandlung von ATP-Aktin zu ADP-Aktin (Pollard, 2002).



R^1 = OH, R^2 = H: Cytochalasin B

R^1, R^2 = O: Cytochalasin A

Abbildung 22:
Strukturformel von Cytochalasin (Römpp, 1995)

Nach einer zehnminütigen Inkubation mit Cytochalasin B wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und mit Antikörpern gegen Vimentin, GR und Aktin einer Dreifachmarkierung unterzogen. Die markierten Zellen wurden im konfokalen Mikroskop untersucht. Die visuelle Beurteilung wurde mit Hilfe der statistischen Auswertung der Rohdaten mittels Zeiss-Kolokalisationssoftware verifiziert.

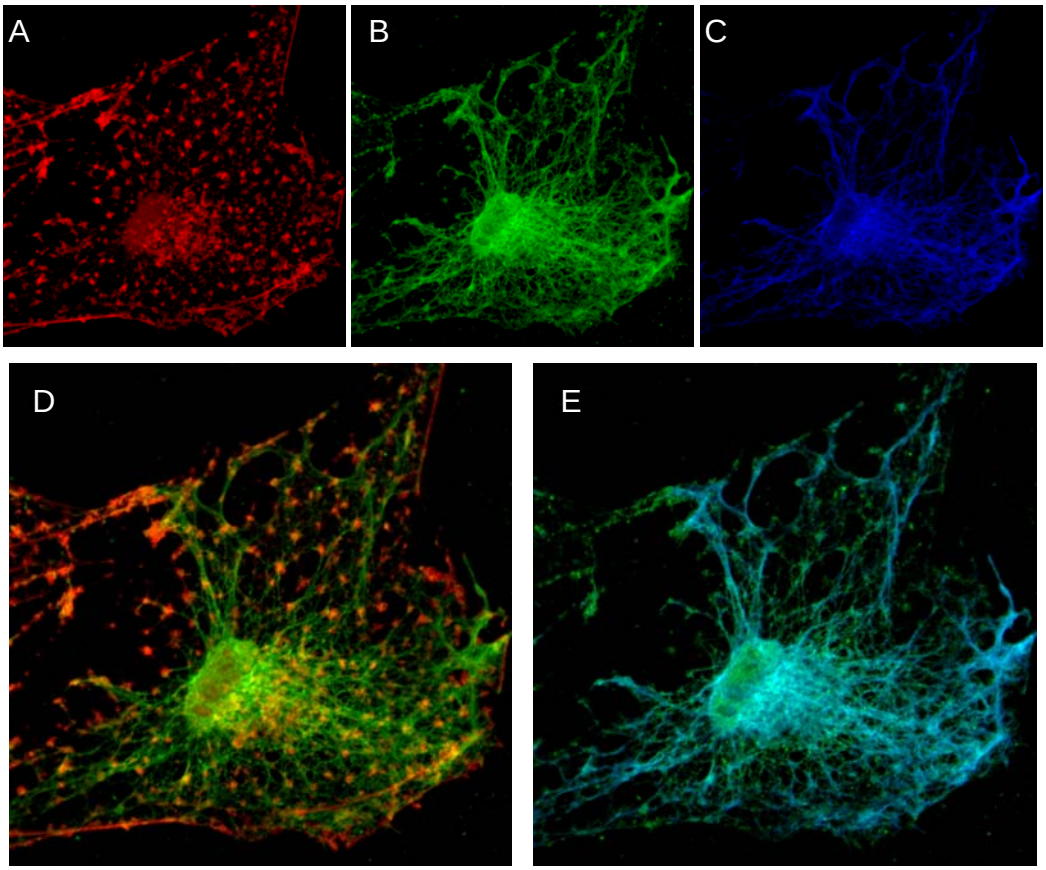


Abbildung 23:
Der Glucocorticoidrezeptor bleibt nach einer Cytochalasinbehandlung mit dem Vimentin-Gerüst assoziiert. (**A**): Aktinaggregate nach Inkubation mit Cytochalasin; die Kolokalisation des Glucocorticoidrezeptors (**B**) mit Vimentin (**C**) bleibt erhalten; (**D**): Überlagerung von Aktin und GR; (**E**): Überlagerung von GR und Vimentin

Wie die Abb. 23 zeigt, führte die Behandlung der Zellen mit Cytochalasin B zu einer Depolymerisation des Aktin-Gerüsts. Das fluoreszenzmarkierte Protein war in Aggregaten gleichmäßig innerhalb des Cytoplasmas verteilt. Dabei konnte weder visuell noch statistisch eine signifikante Überlagerung von Aktin und dem Glucocorticoidrezeptor nachgewiesen werden (Abb. 24 u. Tab. 6). Der hohe Kolokalisationsgrad der GR-Vimentin Überlagerung wurde durch die Cytochalasinbehandlung nicht gestört (Abb. 35 u. Tab. 7).

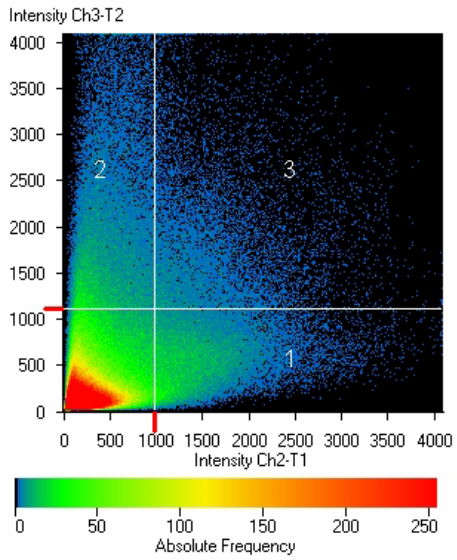


Abbildung 24:
Streuungsdiagramm der Signalintensitäten von Aktin (Ch3-T2) und Glucocorticoidrezeptor (Ch2-T1) in Cytochalasin behandelten C6D8 Zellen (zu Abb. 23D).

Tabelle 6: statistische Auswertung der Signale zur Abb. 23D

Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch2-T1)	0,264
Kolokalisationskoeffizient des Aktin-Kanals (Ch3-T2)	0,292
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch2-T1)	0,540
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des Aktin-Kanals (Ch3-T2)	0,580
Pearson´s Korrelationskoeffizient	0,02

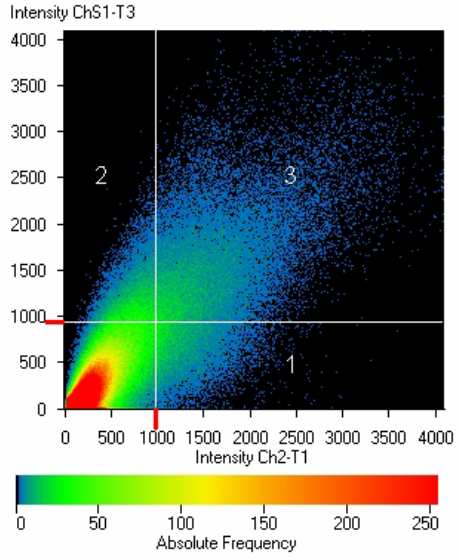


Abbildung 25:
Streuungsdiagramm der Signalintensitäten von Vimentin (ChS1-T3) und Glucocorticoidrezeptor (Ch2-T1) in Abb. 23E

Tabelle 7: statistische Auswertung der Signale zur Abb. 28E

Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch2-T1)	0,692
Kolokalisationskoeffizient des Aktin-Kanals (Ch3-T2)	0,657
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch2-T1)	0,848
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des Aktin-Kanals (Ch3-T2)	0,806
Pearson´s Korrelationskoeffizient	0,53

4.2.4. Tubulin ist an der Verankerung des Glucocorticoidrezeptors nicht beteiligt

Das Cytoskelett enthält neben den Intermediär- und Mikrofilamenten die Mikrotubuli als dritte Hauptkomponente. Von einigen Autoren wird eine Assoziation des Glucocorticoidrezeptors mit den Mikrotubuli diskutiert (Akner *et al.*, 1995; Pratt, 1989). Die Bindung des Rezeptors soll hierbei über Dynein an die Mikrotubuli erfolgen (Giannakakou *et al.*, 2000; Galigniana *et al.*, 2004).

Um zu überprüfen, welche Rolle Tubulin bei der Verankerung des Glucocorticoidrezeptors am Cytoskelett spielt, wurden mit Triton X-100 extrahierte C6D8 Zellen mit dem monoklonalen Antikörper Ab1 gegen Tubulin, dem polyklonalen Kaninchenserum M-20 gegen den GR und einem polyklonalen Ziegenserum gegen Vimentin für die immunfluorezenzmikroskopische Analyse dreifach markiert und im konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abb. 26).

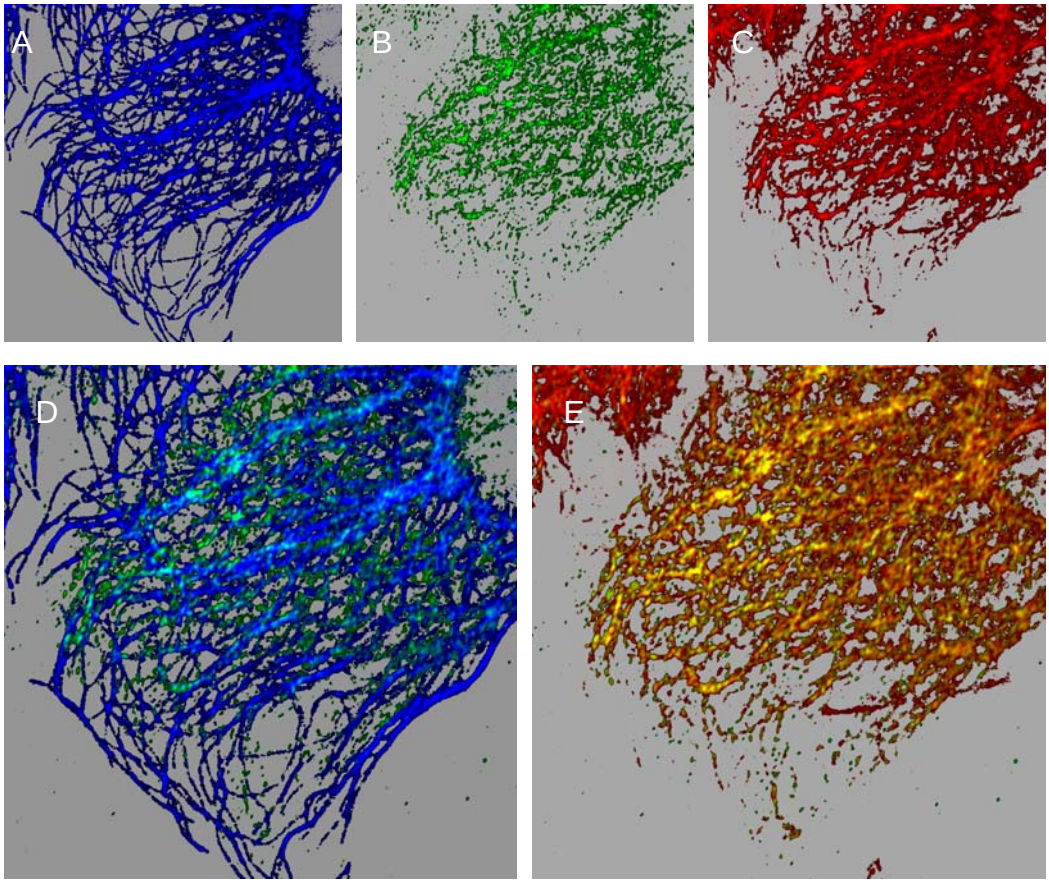


Abbildung 26:
Die Kolokalisation des Glucocorticoidrezeptors mit Vimentin ist eindeutiger, als die Kolokalisation mit Tubulin. Dreifachmarkierung extrahierter C6D8 Zellen mit Antikörpern gegen Tubulin (**A**), GR (**B**) und Vimentin (**C**). Die Überlagerung von Tubulin und GR ist in (**D**), die von GR und Vimentin in (**E**) dargestellt. Der Hintergrund wurde bei allen Bildern auf 50 % grau gesetzt

Die Einzeldarstellung der Filamentsysteme verdeutlicht den unterschiedlichen Verlauf der Mikrotubuli (Abb. 26A) und der Vimentinfilamente (Abb. 26C). Zum Teil wird ein gleichartiger Verlauf erkennbar, der die enge Assoziation dieser Filamentsysteme widerspiegelt (Bohn *et al.* 1996; Herrmann und Aebi, 2000). Die Verteilung des markierten Glucocorticoidrezeptors (Abb. 26B) im Cytoplasma

ähnelt eher dem Färbungsmuster des Vimentins. Die Überlagerung der Bilder macht diesen Unterschied deutlicher. Hier zeigt sich, dass die Verteilung des Glucocorticoidrezeptors der des Vimentins folgt und weniger dem Mikrotubuli-Muster ähnelt (Abb. 26D und E). Diese visuelle Beurteilung wird durch die statistische Auswertung der Rohdaten bestätigt.

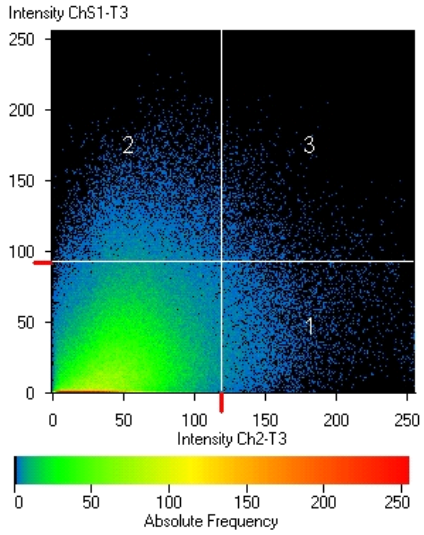


Abbildung 27:
Streuungsdiagramm der Signalintensitäten von Tubulin (ChS1-T3) und Glucocorticoidrezeptor (Ch2-T3) zu Abb. 26D

In dem Streuungsdiagramm für die Tubulin-Glucocorticoidrezeptor Signalkorrelation (Abb. 27) ist eine breite Verteilung der Signale über eine große Fläche zu erkennen. Nur ein geringer Teil der Gesamtpixel befindet sich im Bereich der kolokalisierenden Signale 3.

Tabelle 8: statistische Auswertung der Signale zur Abb. 26D

Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch2-T3)	0,153
Kolokalisationskoeffizient des Tub-Kanals (ChS1-T3)	0,126
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch2-T3)	0,336
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des Tub-Kanals (ChS1-T3)	0,246
Pearson´s Korrelationskoeffizient	-0,10

Die niedrigen Werte der gewichteten und nicht gewichteten Kolokalisationskoeffizienten unterstützen den visuellen Eindruck einer geringen Kolokalisation zwischen Tubulin und Glucocorticoidrezeptor. Der sehr geringe Korrelationskoeffizient entspricht der breit gefächerten Verteilung der Werte im Scatterdiagramm (Abb. 27).

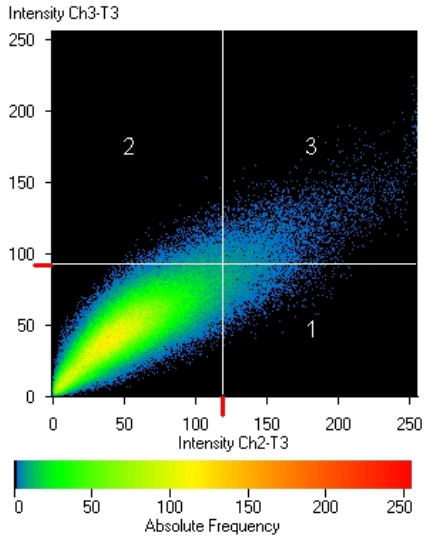


Abbildung 28:
Streuungsdiagramm der Signalintensitäten von Vimentin (Ch3-T3) und Glucocorticoidrezeptor (Ch2-T3) zu Abb. 26E

Tabelle 9: statistische Auswertung der Signale zur Abb. 26E

Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch2-T3)	0,506
Kolokalisationskoeffizient des Vim-Kanals (Ch3-T3)	0,640
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch2-T3)	0,597
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des Vim-Kanals (Ch3-T3)	0,737
Pearson´s Korrelationskoeffizient	0,65

Im Unterschied dazu zeigt das Streuungsdiagramm der Signalintensitäten von GR und Vimentin (Abb. 28) eine Verteilung der Signalwolke entlang einer Linie. Entsprechend hoch ist der Pearson´s Korrelationskoeffizient. Die hohen, um 50 bis

70 % liegenden Kolokalisationskoeffizienten sprechen für einen hohen Grad der Kolokalisation zwischen GR und Vimentin.

4.2.4.1. Depolymerisation des Mikrotubuli-Netzwerkes mit Nocodazol

Durch die Behandlung der Zellen mit Nocodazol sollten die Befunde des Abschnittes 1.2.4.0 unterstützt werden. Nocodazol (Abb. 29) ist ein als Cytostatikum einsetzbares synthetisches Zellgift, dessen Wirkung auf der Depolymerisation von Mikrotubuli beruht (Römpp, 1995). Dabei bindet Nocodazol an Tubulindimere und verhindert somit den Zusammentritt der Untereinheiten am Mikrotubuli-Ende (Pollard, 2002).

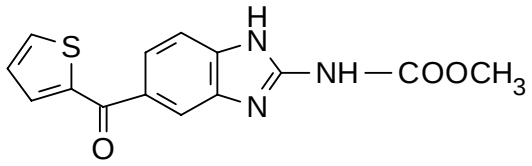


Abbildung 29:
Strukturformel von Nocodazol (Römpp, 1995)

Für den Versuch wurden proliferierende C6D8 Zellen für 30 Minuten mit 10 µg/ml Nocodazol behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton permeabilisiert und mit Antikörpern gegen den Glucocorticoidrezeptor, Vimentin und Tubulin analog zu 1.2.4.0 dreifach markiert. Die markierten Proben wurden im konfokalen Mikroskop analysiert. Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 30 dargestellt.

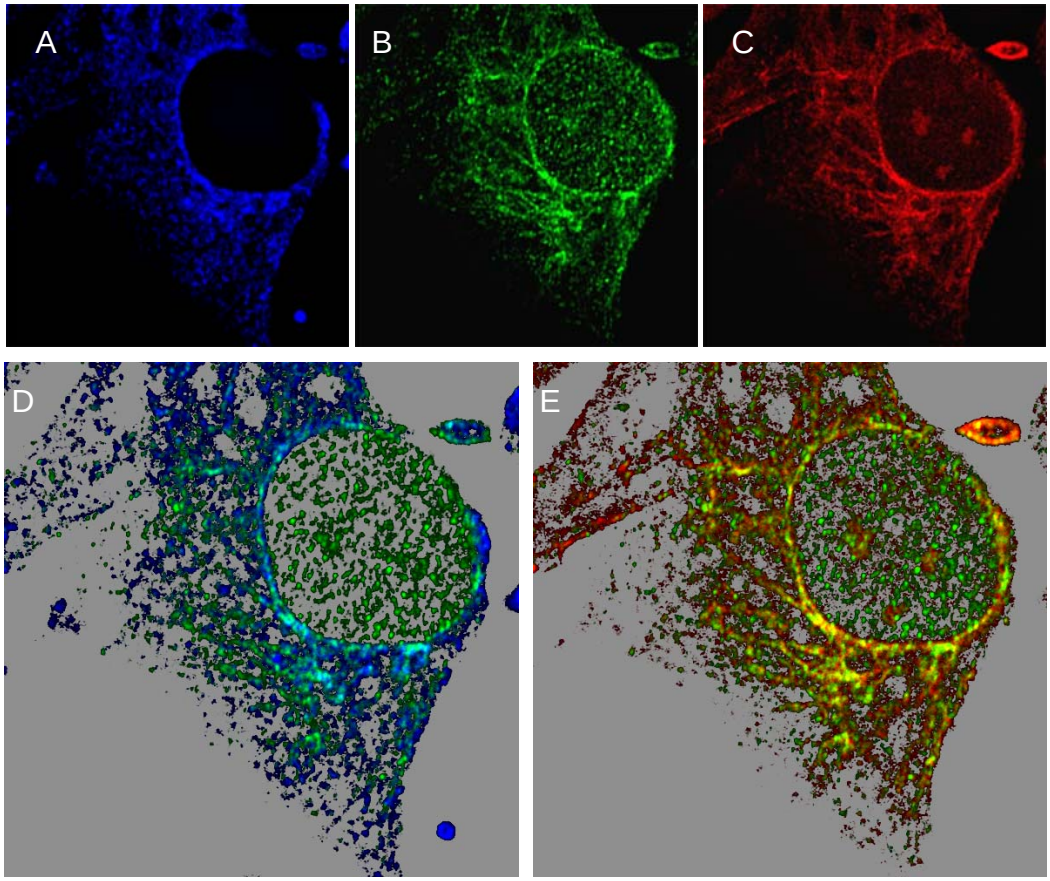


Abbildung 30:
In Nocodazol-behandelten C6D8 Zellen ist eine deutlichere Kolokalisation zwischen dem Glucocorticoidrezeptor und Vimentin als zwischen GR und Tubulin feststellbar. (**A**) depolymerisiertes Tubulin; (**B**): Glucocorticoid-rezeptor; (**C**): Vimentin; (**D**): Überlagerung von A und B; (**E**): Überlagerung von B und C. Bei D und E wurden Signale unterhalb des Schwellenwertes auf 50 % grau gesetzt.

Die Nocodazolbehandlung führte zur vollständigen Depolymerisation des Mikrotubuli-Netzwerkes (Abb. 30A, vgl. mit Abb. 26A). Sie bedingte außerdem eine partielle Umstrukturierung des Vimentingerüstes (Abb. 30C). Das Tubulin lag nach der Behandlung mit Nocodazol in cytoplasmatischen Aggregaten vor, deren Konzentration zum Zellkern hin zunahm. Im Gegensatz dazu war in der Organisation des Vimentins trotz Umverteilung immer noch eine filamentöse Struktur erkennbar. Das Vimentingerüst bildete wenige, stark verdickte Filamente und lag zum Teil eng der Kernmembran bzw. der Kernlamina an. Die Verteilung des markierten Glucocorticoidrezeptors folgte weitestgehend der residualen filamentösen Organisation des Vimentins. Teilweise konnte man auch eine, verglichen mit unbehandelten Zellen, deutlichere Lokalisation des Glucocorticoid-rezeptors im Zellkern feststellen.

Für die statistische Auswertung der Daten wurde eine Region ausgewählt, welche das komplette Cytoplasma, nicht jedoch den Kern umfasste. Die Streuungsdiagramme und Zahlenwerte der Analyse sind in Abb. 31, 32 und Tabellen 10 und 11 dargestellt.

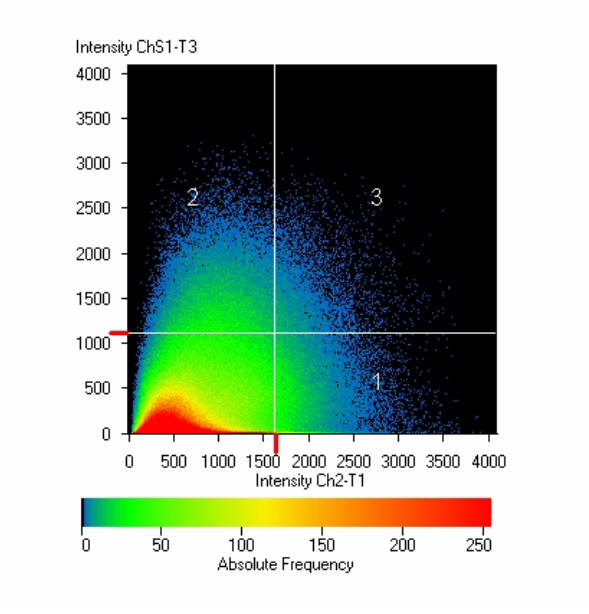


Abbildung 31:
Streuungsdiagramm der Signalintensitäten von Tubulin (ChS1-T3) und Glucocorticoidrezeptor (Ch2-T1) zu Abb. 30D

Tabelle 10: statistische Auswertung der Signale zur Abb. 30D

Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch2-T1)	0,166
Kolokalisationskoeffizient des Tub-Kanals (ChS1-T3)	0,141
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch2-T1)	0,401
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des Tub-Kanals (ChS1-T3)	0,240
Pearson´s Korrelationskoeffizient	0,06

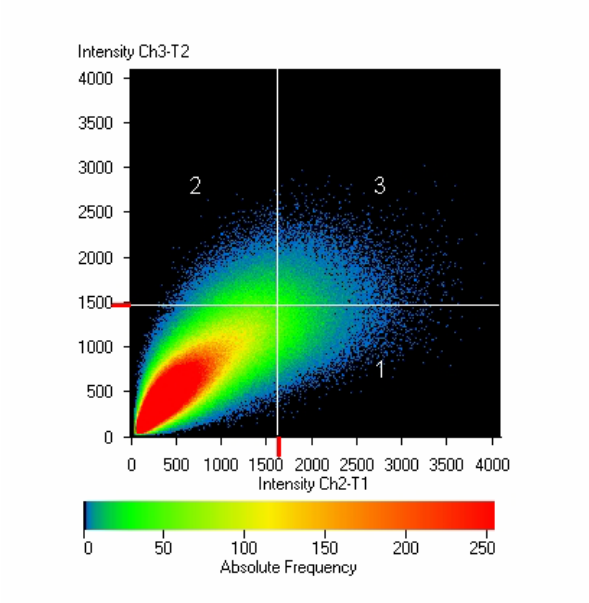


Abbildung 32:
Streuungsdiagramm der Signalintensitäten von Vimentin (Ch3-T2) und Glucocorticoidrezeptor (Ch2-T1) zu Abb. 30E

Tabelle 11: statistische Auswertung der Signale zur Abb. 30E

Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch2-T3)	0,349
Kolokalisationskoeffizient des Vim-Kanals (Ch3-T2)	0,407
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch2-T3)	0,441
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des Vim-Kanals (Ch3-T2)	0,518
Pearson´s Korrelationskoeffizient	0,15

Die statistische Auswertung der Signalintensitäten zeigte, analog zu den Werten der nicht mit Nocodazol behandelten Zellen, keine signifikante Korrelation der Signale von Tubulin und Glucocorticoidrezeptor, aber eine deutliche Übereinstimmung der Signale von Glucocorticoidrezeptor und Vimentin.

4.2.5. Das Hitzeschockprotein HSP70 kolokalisiert mit dem Glucocorticoidrezeptor

Wie eingangs dargestellt, liegt der Glucocorticoidrezeptor im Cytoplasma nicht in seiner monomolekularen Form vor, sondern ist mit verschiedenen regulatorisch wirkenden Proteinen komplexiert. Die wichtigsten Interaktionspartner des Glucocorticoidrezeptors innerhalb eines solchen Komplexes stellen die Hitzeschockproteine HSP70 und HSP90 dar. Sie erfüllen dabei ihre klassische "Chaperon"-Rolle, indem sie zusammen mit dem Adapterprotein p60 ein "Foldosom" bilden, den Glucocorticoidrezeptor unter ATP-Verbrauch "entfalten" und somit für den Steroid-Liganden zugänglich machen (Pratt *et al.*, 1997).

Es stellte sich die Frage, ob der Glucocorticoidrezeptor, welcher nach der Lyse der Zellen mit Detergentien am Cytoskelett assoziiert bleibt, ebenso diese Hitzeschockproteine enthält. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden Cytoskelette von C6D8 Zellen mit Antikörpern gegen den Glucocorticoidrezeptor und gegen die Hitzeschockproteine HSP 70 bzw. HSP90 in Parallelansätzen markiert. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit dem konfokalen Mikroskop sind in Abb. 33 dargestellt.

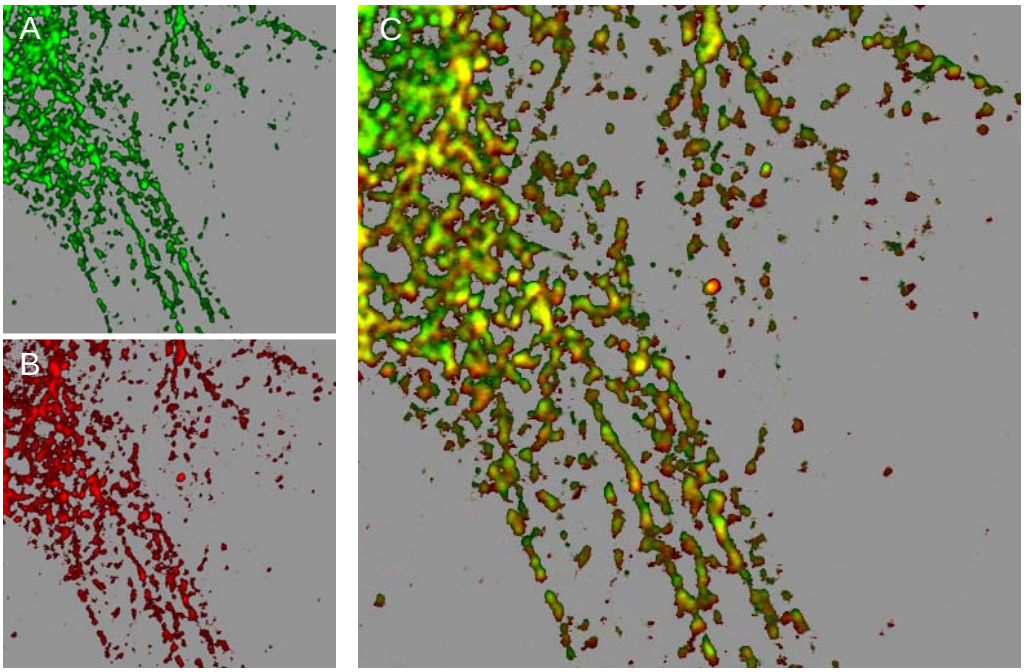


Abbildung 33:
HSP70 verbleibt nach Lyse der Zellen in der cytoskelettalen Fraktion und kolokalisiert mit dem Glucocorticoidrezeptor. (**A**): Gluco-corticoidrezeptor; (**B**): HSP70; (**C**): Überlagerung von A und B. Der Hintergrund wurde auf 50 % grau gesetzt.

Die Markierung der extrahierten Zellen mit HSP70-Antikörpern ergab eine deutliche cytoplasmatische Färbung. Dabei zeigten die Signale von HSP70 und dem Glucocorticoidrezeptor eine visuell deutlich erkennbare Kolokalisation, die sich in der statistischen Auswertung bestätigen ließ (Abb. 34; Tab. 12).

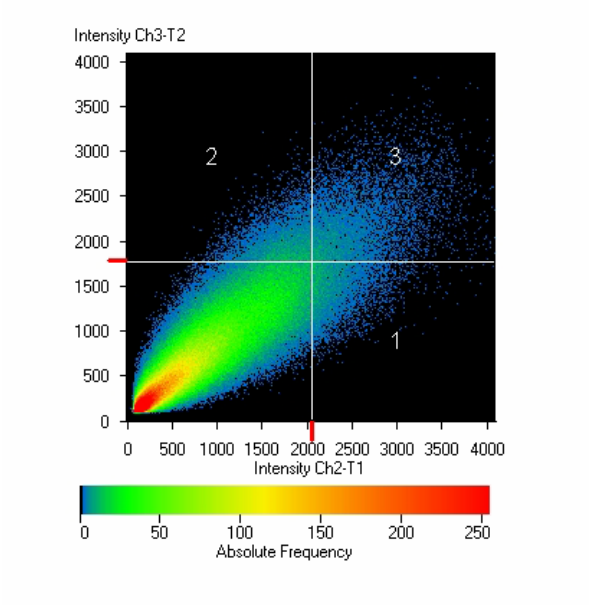


Abbildung 34:
Streuungsdiagramm der Signalintensitäten vom Glucocorticoidrezeptor (Ch2-T1) und HSP70 (Ch3-T2) zu Abb. 33C

Tabelle 12: statistische Auswertung der Signale zur Abb. 33C

Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch2-T1)	0,549
Kolokalisationskoeffizient des Vim-Kanals (Ch3-T2)	0,527
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch2-T1)	0,648
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des Vim-Kanals (Ch3-T2)	0,624
Pearson´s Korrelationskoeffizient	0,39

Die Wolke der Signalintensitäten beider Kanäle liegt relativ dicht um eine Linie verteilt. Das spricht für eine signifikante Korrelation der Signale von HSP70 und denen des Glucocorticoidrezeptors, welches auch durch den Pearson´s Korrelationskoeffizienten von 0,39 zum Ausdruck kommt (Tab.12). Die

Kolokalisationskoeffizienten sprechen für eine Kolokalisation der beiden Proteine von 50-70 %.

Die Markierung von HSP90 mit dem monoklonalen Antikörper F-8 führte in diesem Experiment zu keinem befriedigenden Ergebnis. Die Kontrolle des Antikörpers mit Markierungen an nicht extrahierten, paraformaldehyd- oder aceton-fixierten Zellen zeigte dagegen eine deutliche cytoplasmatische Färbung.

4.2.6. Das Immunophilin HSP56 kolokalisiert mit dem Glucocorticoidrezeptor

Der cytoplasmatische Proteinkomplex aus Glucocorticoidrezeptor und Hitzeschockproteinen durchläuft verschiedene "Reifungsstadien" bevor es zur Aktivierung des Rezeptors durch Steroidhormone kommen kann (Pratt, 1997). Im Laufe dieser "Reifung" assoziieren oder dissoziieren diverse Proteine (vgl. Abb. 51). Das finale Reifungsstadium des Komplexes ist u.a. durch die Anwesenheit von Immunophilinen gekennzeichnet.

Immunophiline gehören mit den Zyklophilinen und Parvulinen zu der Familie der Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Rotamasen, welche die cis-trans-Konformation von Peptidyl-Prolyl-Bindungen katalysieren. Immunophiline lassen sich in zahlreichen Organen, in besonders hoher Konzentration aber in Gehirnzellen, nachweisen. Zurzeit sind 7 unterschiedliche Immunophiline bekannt, welche bei der Komplexierung von Steroidrezeptoren, Gentranskription, Freisetzung von Neurotransmittern, intraneuronalen Kalzium-Freisetzung, Kalzineurin-Aktivität oder TGFß-Signaltransduktion eine Rolle spielen (Brecht und Herrdegen, 1999). Immunophiline der FKBP-Klasse (FK506-bindende Proteine, FKBPs) tragen ihre Bezeichnung wegen der hohen Affinität zu dem immunosuppressiven Agenz Tacrolimus oder FK-506. Das auch unter dem Namen HSP56 bekannte Protein FKBP52 ist eine in der Literatur oft erwähnte Komponente des reifen Glucocorticoidrezeptor-Komplexes (Pratt *et al.*, 1997).

Der Nachweis eines solchen Immunophilins zusammen mit Hitzeschockproteinen in einem Komplex mit dem am Cytoskelett verankerten Glucocorticoidrezeptor würde die Vermutung bestätigen, dass der Glucocorticoidrezeptor sich dort in seiner funktional aktiven Form befindet. Zur Bestätigung dieser These wurde eine Doppelfärbung von HSP56 (oder FKBP52) und dem Glucocorticoidrezeptor an extrahierten C6D8 Zellen durchgeführt (Abb. 35).

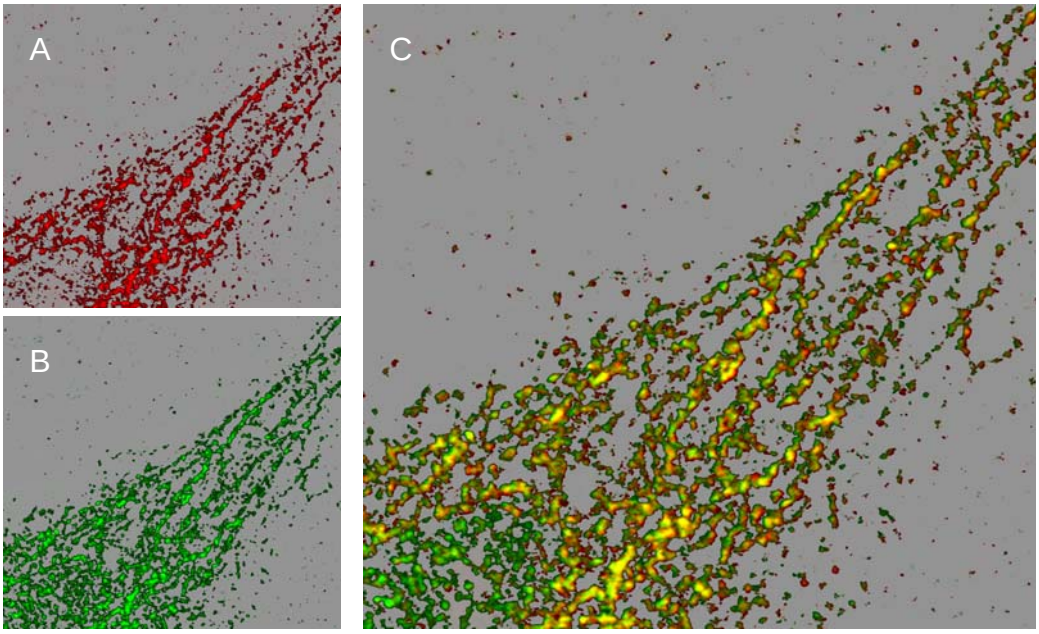


Abbildung 35:
Der Glucocorticoidrezeptor und das Immunophilin FKBP52 kolokalisieren am Cytoskelett extrahierter C6D8 Zellen. (**A**): FKBP52; (**B**): Glucocorticoid-rezeptor; (**C**): Überlagerung von A und B. Der Hintergrund der Bilder wurde zur besseren Visualisierung auf 50 % grau gesetzt.

Die sehr hohe Übereinstimmung der FKBP52- und der Glucocorticoidrezeptor-Markierungen im Bereich des Cytoplasmas (Abb. 35C) wurde mit der Kolokalisationsanalyse-Software verifiziert. Für die statistische Auswertung wurde eine Region ausgewählt, welche das Cytoplasma ohne Zellkern umfasste. Die Ergebnisse der Kolokalisationsanalyse sind in Abb. 36 und Tabelle 13 dargestellt.

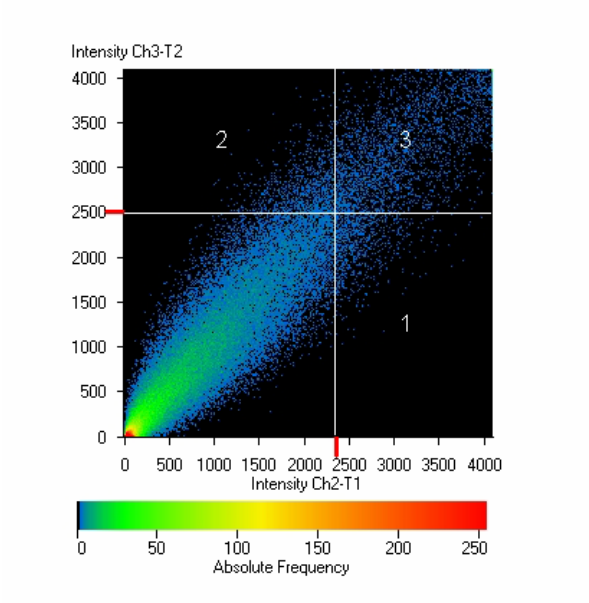


Abbildung 36:
Streuungsdiagramm der Signalintensitäten von FKBP52 (Ch3-T2) und Glucocorticoidrezeptor (Ch2-T1) zu Abb. 35C

Das Streuungsdiagramm (Abb. 36) zeigt eine recht eng verteilte, entlang einer Linie ausgerichtete Signalwolke. Daraus resultiert ein relativ hoher Korrelationskoeffizient von 0,57. Auch die sehr hohen Kolokalisationskoeffizienten sprechen für eine 70-80 prozentige Überlagerung der Signale von FKBP52 und des Glucocorticoidrezeptors im Cytoplasma von extrahierten C6D8 Zellen (Tab. 13).

Tabelle 13: statistische Auswertung der Signale zur Abb. 35C

Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch2-T1)	0,749
Kolokalisationskoeffizient des Vim-Kanals (Ch3-T2)	0,704
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des GR-Kanals (Ch2-T1)	0,817
gewichteter Kolokalisationskoeffizient des Vim-Kanals (Ch3-T2)	0,785
Pearson´s Korrelationskoeffizient	0,57

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass der Glucocorticoidrezeptor im Komplex mit Hitzeschockproteinen und dem Immunophilin FKBP52 am Cytoskelett verankert ist und somit in seiner aktivierbaren Form vorliegt.

4.2.7. Der am Cytoskelett verankerte Glucocorticoidrezeptor ist aktivierbar

Um zu überprüfen, ob der an Vimentin verankerte Glucocorticoidrezeptor in C6D8 Zellen aktivierbar ist, wurden die Zellen für 30 Minuten mit 100 nM Dexamethason (siehe 1.1.5) behandelt. Die acetonfixierten Proben wurden anschließend mit Antikörpern gegen den Glucocorticoidrezeptor und gegen Vimentin doppelmarkiert. Die Zellkerne wurden mit dem Interkalatorfarbstoff DRAQ5 angefärbt.

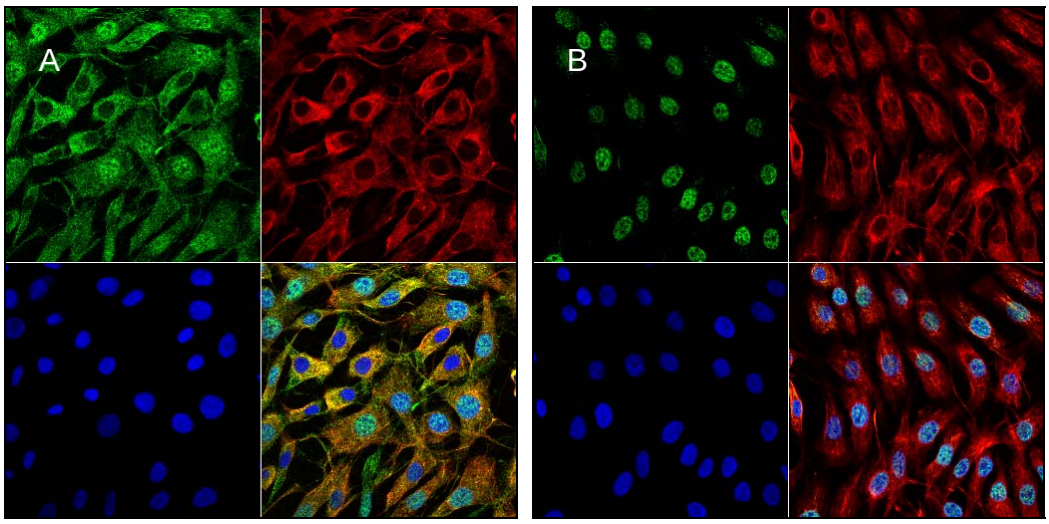


Abbildung 37:
Der im Cytoplasma vorliegende und an Vimentin verankerte Glucocorticoidrezeptor kann mit Dexamethason aktiviert werden und wandert in den Zellkernern. C6D8 Zellen vor (**A**) und nach Inkubation mit Dexamethason (**B**). Grün: GR; rot: Vimentin, blau: Zellkerne

Aus Abb. 37 wird ersichtlich, dass die Ligandbindung den Glucocorticoidrezeptor aus dem Cytoplasma (Abb. 37A) in den Zellkern (Abb. 37B) verlagert.
Die Ergebnisse zeigen, dass die Verankerung an Vimentin kein Mechanismus ist, mit dem die Aktivierung des Rezeptors durch Ligandbindung verhindert wird.

4.2.8. Über die Verankerung werden Kontrollfunktionen des Glucocorticoidrezeptors moduliert

Glucocorticoide induzieren einen Zellzyklus-Arrest in Zelllinien, allerdings sind die von der Zugabe des Hormons bis zum Arrest führenden Ereignisse weitgehend unbekannt. In humanen GR-negativen Osteosarkomzelllinien (SAOS2) führt die ektope Expression des Glucocorticoidrezeptors zu einem Zellzyklus-Arrest in G1. Die Aktivierung des Glucocorticoidrezeptors in U2OS Zellen reprimiert die Expression der Zyklin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 ebenso wie die von Zyklin D3 und führt zur Unterphosphorylierung des Retinoblastomproteins (pRB). Steroide reduzieren auch die Menge der am G1-S Übergang beteiligten Transkriptionsfaktoren E2F-1 und c-Myc (Rogatzky *et al.*, 1997).
Es stellte sich die Frage, ob die hier beobachtete Verankerung des Glucocorticoid-rezeptors am Vimentin die proliferationssuppressiven Eigenschaften des Rezeptors beeinflusst.
Zur Klärung dieser Frage wurde das Medium proliferierender vimentin-positiver C6D8, vimentin-negativer C6D10 und der VimWT3B2 Zellen (mit murinem Vimentin stabil transfizierte C6D10 Zellen) über einen Zeitraum von 48 Stunden mit 100 nM Dexamethason versetzt. 4, 6, 12, 24 und 48 Stunden nach der Dexamethasonzugabe wurden die Zellen für jeweils 30 Minuten mit BrdU inkubiert und in -20 °C kaltem Aceton fixiert. Nach einer sauren DNS-Denaturierung wurde das eingebaute BrdU mit einem monoklonalen Antikörper für die Immunfluoreszenzmikroskopie markiert und die DNS mit dem Interkalatorfarbstoff TO-PRO3 gegengefärbt. An digitalen Aufnahmen der Präparate wurde der prozentuale Anteil der BrdU-positiven Zellen mit Hilfe der ImageJ Software bestimmt. Für jeden Zeitpunkt wurden pro Zelllinie ca. 1000 Zellen ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Auszählungen sind in Abb. 38 dargestellt.

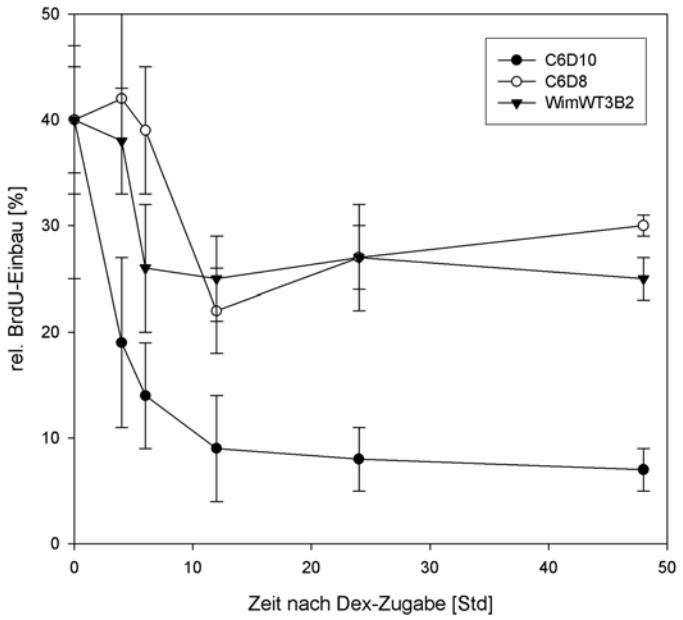


Abbildung 38:
Dexamethason unterdrückt die S-Phase Aktivität in vimentin-negativen Zellen (C6D10). In vimentin-positiven Zellen (C6D8, VimWT3B2) bleibt die S-Phase-Aktivität auf einem hohen Niveau.

Abb. 38 veranschaulicht, dass die Zahl der BrdU inkorporierenden Zellen in den vimentin-negativen C6D10 Kulturen in Anwesenheit von Dexamethason innerhalb von 12 h auf einen Wert von unter 10% fiel (Abnahme von ca. 30%). Sowohl in den vimentin-positiven C6D8 als auch in den mit murinem Vimentin retransfizierten VimWT3B2 Kulturen fiel die Zahl der BrdU inkorporierenden Zellen nur auf etwa 25% (Abnahme um 15%). In C6D8 Kulturen war im Anschluss an die Proliferations-Stagnation sogar ein leichter Anstieg in der Zahl BrdU positiver Zellen zu beobachten.

Die Ergebnisse zeigen, dass vimentin-negative Zellen sehr viel deutlicher mit einer Suppression der Proliferation reagieren als die vimentinhaltigen Zellen.

Die mikroskopische Analyse wurde mit durchflusscytometrischen Untersuchungen (FACS) ergänzt, um zu überprüfen, ob die Reduktion der S-Phase Aktivität mit einer Arretierung der Zellen in einer bestimmten Zellzyklusphase einhergeht. Hierfür wurden normal proliferierende Zellen mit 100 nM Dexamethason behandelt und die Proben nach jeweils 6, 12, 24 und 48 Stunden in 10% DMSO bei -80 °C gesammelt. Die DNS der aufgetauten Zellen wurde mit Tween20-haltigem hypotonischem Propidiumiodid-Färbepuffer angefärbt (Vendelov, 1983)

und die Proben in einem Durchflusscytometer analysiert.

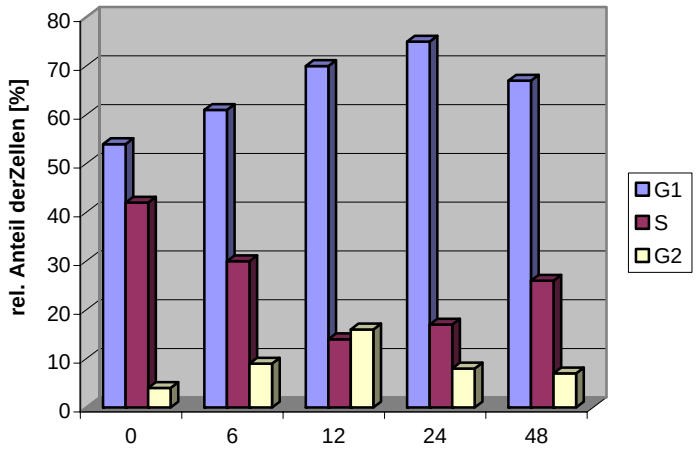


Abbildung 39:
Vimentin-positive Zellen (C6D8) proliferieren weiter nach einer kurzen Stagnation des Zellzyklus bei 12 Stunden nach der Dexamethasonbehandlung

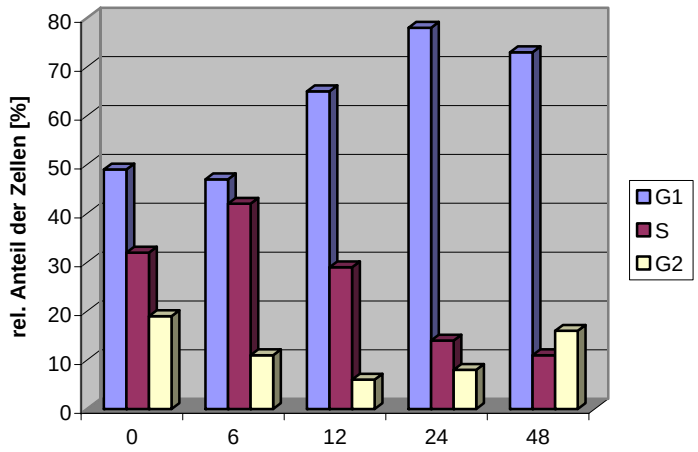


Abbildung 40:
Vimentin-negative Zellen (C6D10) gehen nach Dexamethason-Behandlung in einen G1 Zellzyklus-Arrest.

Die durchflusscytometrische Analyse bestätigt, dass unter Dexamethason-Behandlung die Zahl der S-Phase Zellen reduziert wird. Parallel zur Reduktion der Zahl der S-Phase Zellen stieg der Anteil an G1 Zellen und erreichte in beiden Zellarten bei 24h ein Maximum. Sowohl die Reduktion der S-Phase Zellen als auch die anschließende Annäherung an das ursprüngliche Zellzyklusprofil findet in den

C6D8 Zellen sehr viel schneller statt als in den C6D10 Zellen. Im Gegensatz zu den vimentin-negativen Zellen blieb der Anteil der S-Phase Zellen in den vimentin-positiven Kulturen nach weiteren 24h auf einem niedrigen Niveau. Die FACS-Analyse zeigt, dass Dexamethason die Zellen in einen G1/S Wachstumsarrest treibt, der aber transient ist. Sie verdeutlicht die Beobachtung, dass vimentin-positive Zellen diesen Wachstumsarrest sehr viel schneller überkommen können als der vimentin-negative C6 Subklon. Daraus kann vermutet werden, dass die Verankerung des Glucocorticoidrezeptors am Cytoskelett ein Mechanismus sein könnte, mit dem wachstumssuppressive Eigenschaften des Rezeptors eingeschränkt werden.

4.3. Die Anwesenheit von Vimentin ist für die cytoplasmatische Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors allein nicht ausreichend

Beobachtungen aus den vorangegangenen Experimenten legten nahe, dass die cytoplasmatische Verankerung des Glucocorticoidrezeptors in C6 Zellen über die Interaktion mit Vimentin zustande kommt. Eine Überprüfung weiterer Zelllinien zeigte aber, dass die Anwesenheit von Vimentin in permanenten Zelllinien nicht zwangsläufig eine cytoplasmatische Verankerung und Akkumulation des Glucocorticoidrezeptors nach sich zieht. In vielen Zellen lokalisierte der Glucocorticoidrezeptor trotz Vimentinexpression im Zellkern.

Somit ist das Vorhandensein von Vimentin für die Verankerung allein nicht ausreichend. Es mussten zusätzliche Ereignisse, wie z. B. posttranslationale Modifikationen des Vimentins stattfinden, welche die Verankerung des Glucocorticoidrezeptors beeinflussen. Andererseits wäre es möglich, dass die Verankerung über Brückenproteine vermittelt wird, die mit Vimentin und dem Glucocorticoidrezeptor interagieren.

4.3.1. Die Verankerung des Glucocorticoidrezeptor-Komplexes erfolgt nicht über den Carboxyterminus von Vimentin

In vivo und *in vitro* Experimente haben gezeigt, dass Intermediärfilamente "bürstenartige" Polymere darstellen, in denen die Carboxytermini weit aus dem Filamentstrang herausragen und somit Interaktionsflächen für andere Moleküle bilden (Steinert, 1993; Cary, 1994; Aebi und Herrmann, 2000).

Zur Klärung der Frage, ob der C-Terminus von Vimentin an der Glucocorticoidrezeptor-Verankerung beteiligt ist, wurden B2mut (Etzrodt *et al.*, 1996) Zellen mit C-terminal trunkiertem Vimentin herangezogen. Diese Zellen bilden kein Vimentin-Netzwerk im Cytoplasma aus, sondern zeigen in der Immunfluoreszenzfärbung cytoplasmatisch verteilte, kurze, verdickte Vimentin-filament-Bruchstücke, deren Konzentration zum Zellkern hin zunimmt (Abb. 42A).

Die Doppelmarkierung von Vimentin und Glucocorticoidrezeptor in Zellen mit diesem C-terminal trunkiertem Vimentin zeigte überraschenderweise eine Kolokalisation der beiden Signale analog zu den C6 Zellen mit Wildtyp-Vimentin. Die Konsequenz aus diesem Ergebnis ist, dass die Verankerung des Glucocorticoidrezeptor-Komplexes nicht über den Carboxyterminus von Vimentin erfolgt, und die Interaktion zwischen GR und Vimentin möglicherweise über ein zusätzliches Ankerprotein zustande kommt.

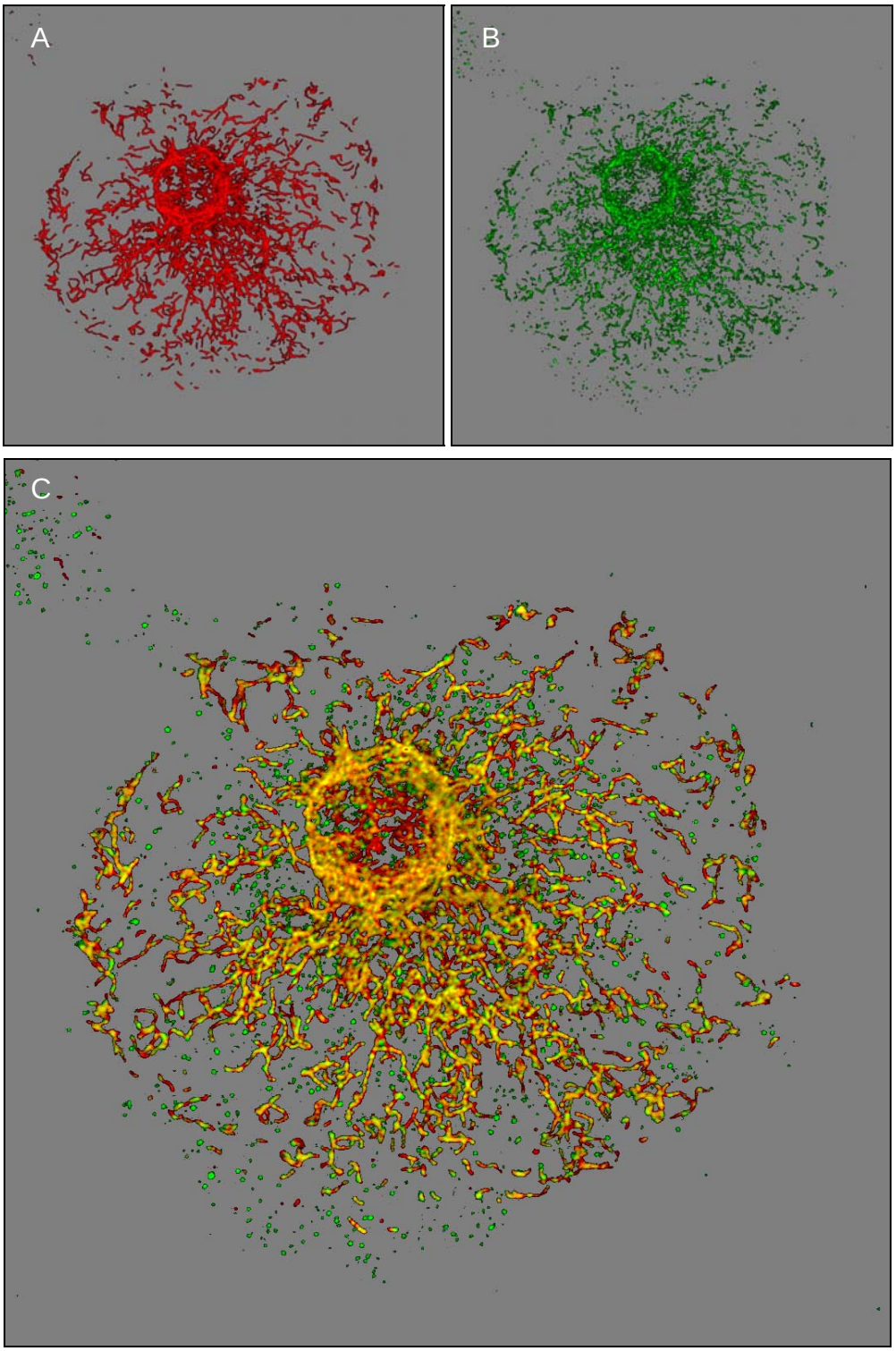


Abbildung 41:
Der Glucocorticoidrezeptor kolokalisiert mit carboxyterminal-trunkiertem Vimentin in B2mut Zellen
(**A**): carboxyterminal trunkiertes Vimentin; (**B**): Glucocorticoidrezeptor;
(**C**): Überlagerung von A und B. Der Hintergrund wurde auf 50 % grau gesetzt

4.3.2. Die Verankerung des Glucocorticoidrezeptors am Cytoskelett erfordert die Anwesenheit des Intermediärfilamentproteins Nestin

Die Ergebnisse der Färbungen an B2mut Zellen mit C-Terminal trunkiertem Vimentin und die Beobachtungen der Glucocorticoidrezeptor/Vimentin-Korrelation in anderen Zelllinien sprechen dafür, dass Vimentin allein nicht für die Verankerung verantwortlich sein kann. So zeigen z.B. Glucocorticoidrezeptor-Markierungen in transformierten Embryonalfibroblasten der Ratte (Clone 6) oder Maus (10-1) überwiegend eine Kernlokalisation des Proteins (Abb. 42A), obwohl alle Zellen beider Linien ein ausgeprägtes Vimentinfilament-Netzwerk aufweisen (Abb.42B). In einigen wenigen Zellen ist jedoch eine deutliche Kolokalisation des Glucocorticoidrezeptors mit Vimentin sichtbar (Abb. 43A).

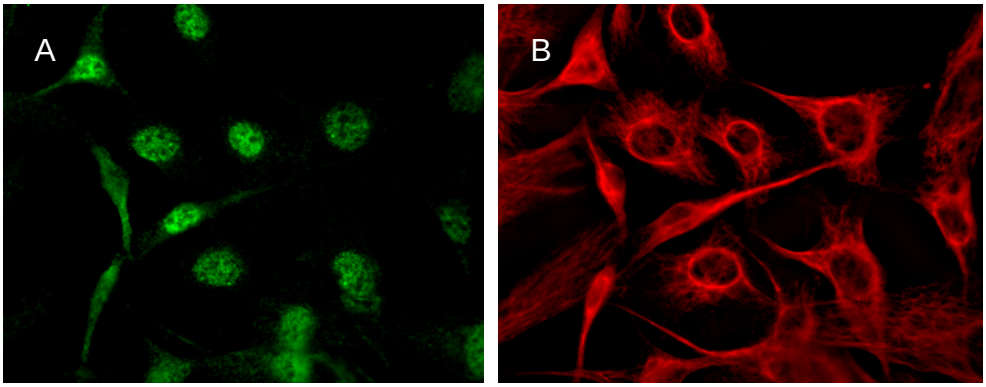


Abbildung 42:
*Clone 6 Zellen zeigen bei der Markierung des Glucocorticoidrezeptors (**A**) eine Kernlokalisation des Proteins obwohl alle Zellen vimentin-positiv (**B**) sind*

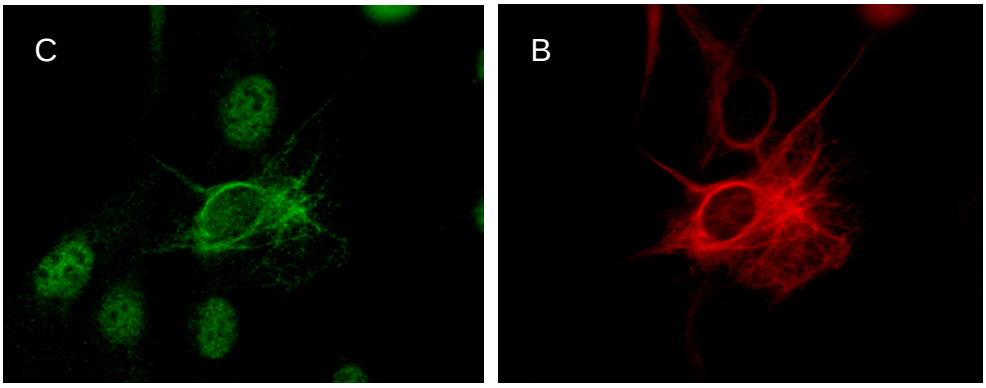


Abbildung 43:
*Die Nestin-exprimierende Subpopulation der Clone 6 Zellen zeigt eine deutliche Verlagerung des Glucocorticoidrezeptors in das Cytoplasma. Weitfeldimmunfluoreszenz-Aufnahmen von GR (**A**) und Nestin (**B**)*

Aufgrund dieser Befunde stellte sich die Frage nach einer weiteren Komponente,

welche eng mit Vimentin assoziiert sein muss. Da aus embryonalen Zellen herausgegangene Linien wie Clone 6 oder 10-1 eine ungleichmäßige Glucocorticoidrezeptor-Verteilung aufwiesen, wurde nach Proteinen gesucht, die bei der Differenzierung eine Rolle spielen könnten und mit Intermediärfilamenten assoziiert sind. Ein solcher Differenzierungsmarker ist das Intermediärfilament-Protein Nestin. Nestin ist nicht imstande, ein eigenes Intermediärfilament-Netzwerk auszubilden, kopolymerisiert aber bevorzugt mit Vimentin (Aebi und Herrmann, 2000). Die Immunfluoreszenzmarkierung von Nestin und Glucocorticoidrezeptor in Clone 6 Zellen bestätigte die Vermutung, dass die cytoplasmatische Lokalisation des GR durch Nestin determiniert wird (Abb. 43). Alle Zellen, welche Nestin exprimierten, wiesen auch eine cytoplasmatisch lokalisierte, filamentös aussehende Glucocorticoidrezeptor-Markierung auf.

4.3.3. Die cytoplasmatische Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors erfordert die Kopolymerisation von Nestin mit Vimentin

Die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Teil veranlassten, alle C6 Subklone auf Nestinexpression zu untersuchen. Sowohl die vimentin-positiven C6D8 Zellen als auch die ursprünglich vimentin-negativen, aber stabil mit murinem Vimentin retransfizierten VimWT3B4 Zellen zeigten eine Kolokalisation zwischen Nestin und Glucocorticoidrezeptor. Die Färbungen von Nestin und Vimentin waren in diesen Zellen nicht zu unterscheiden (nicht gezeigt). Eine Ausnahme stellten die Vimentin-negativen C6D10 Zellen dar: das exprimierte Nestin ist in diesen Zellen mangels Vimentin-Gerüst diffus im Cytoplasma verteilt (Abb. 44A). Der Glucocorticoidrezeptor ist aber, wie bereits in 1.2.1 beschrieben, im Zellkern lokalisiert (Abb. 44B).

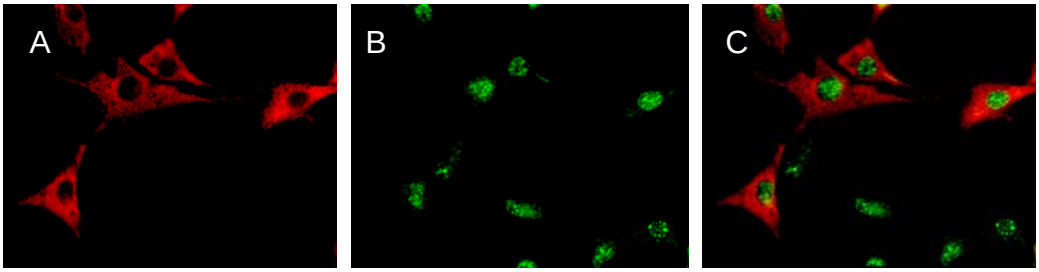


Abbildung 44:
In Vimentin-negativen C6D10 Zellen hat die Nestin-Expression keinen Einfluss auf die Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors. Weitfeldimmunfluoreszenz-Aufnahmen von (**A**): Nestin; (**B**): Glucocorticoidrezeptor; (**C**): Überlagerung von A und B.

Die Ergebnisse dieser Immunfluoreszenzmarkierungen zeigen einen klaren Zusammenhang zwischen der Koexpression von Vimentin und Nestin und der cytoplasmatischen Verankerung des Glucocorticoidrezeptors. Das ausschließliche Vorhandensein von Vimentin oder Nestin führt in den Zellen nicht zur einer Verankerung des Glucocorticoidrezeptors am Cytoskelett.

4.3.4. In nestin-negativen RAT1 Zellen lokalisiert der Glucocorticoidrezeptor im Zellkern

Die Abhängigkeit der cytoplasmatischen Verankerung des Glucocorticoidrezeptors konnte anhand von Untersuchungen an den 3T3 ähnlichen, von Fischer-Ratten abstammenden Fibroblasten Rat1und Rat2 manifestiert werden. Beide Zelllinien Haben denselben Klon Rat1 als Ursprung. Rat2 Zellen zeichnen sich, außer dass ihnen die nukleäre Thymidin-Kinase fehlt (Topp, 1981), durch die Expression von Nestin aus. Da beide Zelllinien Glucocorticoidrezeptor- und Vimentin-positiv sind, schien es von Interesse, die intrazelluläre Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors zu überprüfen. Hierfür wurden acetonfixierte Rat1 und Rat2 Zellen mit Antikörpern gegen Glucocorticoidrezeptor, Nestin und Vimentin dreifachmarkiert und im konfokalen Mikroskop analysiert (Abb. 45).

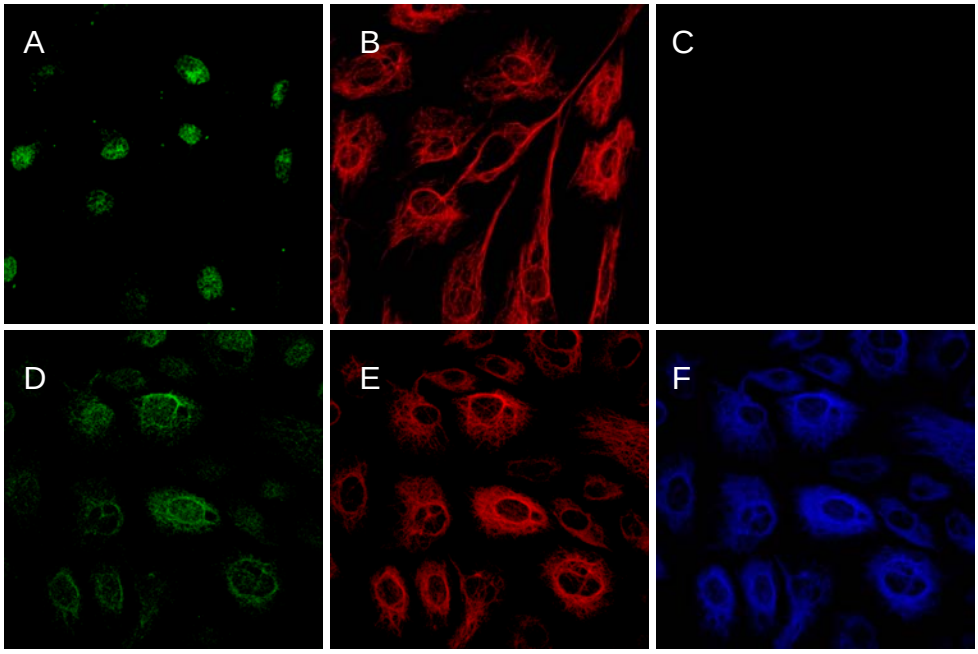


Abbildung 45:
Die cytoplasmatische Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors wird in Rat1 bzw. Rat2 Zellen durch die Expression des mit Vimentin kopolymerisierenden Nestins determiniert. (**A** bis **C**): Nestin-negative Rat1 Zellen; (**D** bis **F**) Nestin-exprimierende Rat2 Zellen. Grün: GR; Rot: Vimentin; Blau: Nestin

Die Nestin-negativen Rat1 Zellen wiesen, wie erwartet, eine Kernlokalisation des Glucocorticoidrezeptors auf (Abb 45A). Nestin-positive Rat2 Zellen dagegen zeigten eine deutlich filamentöse cytoplasmatische GR-Färbung (Abb. 45D). Die Markierung von Vimentin, Nestin und Glucocorticoidrezeptor in diesen Zelllinien verdeutlichte die Abhängigkeit der cytoplasmatischen Verankerung des Glucocorticoidrezeptors von der Expression und Kopolymerisation beider Intermediärfilamentproteine.

4.3.5. Die ektope Expression von Nestin in Rat1 Zellen führt zur Verankerung des Glucocorticoidrezeptors am Cytoskelett

Da Rat1 und Rat2 Zellen monoklonalen Ursprungs und demzufolge sehr ähnlich sind, bot sich an, die Nestin-Expression in den Nestin-negativen Rat1 Zellen zu rekonstituieren, um die Beobachtungen aus den vorhergegangenen Abschnitten zu manifestieren. Ein geeigneter Nestin-Expressionsvektor wurde freundlicherweise von Jing Yang (Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai) zur Verfügung gestellt. Für das Experiment wurden Nestin-negative Rat1 Zellen

mittels Amaxa Nucleofector mit dem Vector pNH64 transfiziert, nach 16 Stunden Inkubation mit aceton fixiert und mit Antikörpern gegen Nestin und Glucocorticoidrezeptor markiert (Abb.46).

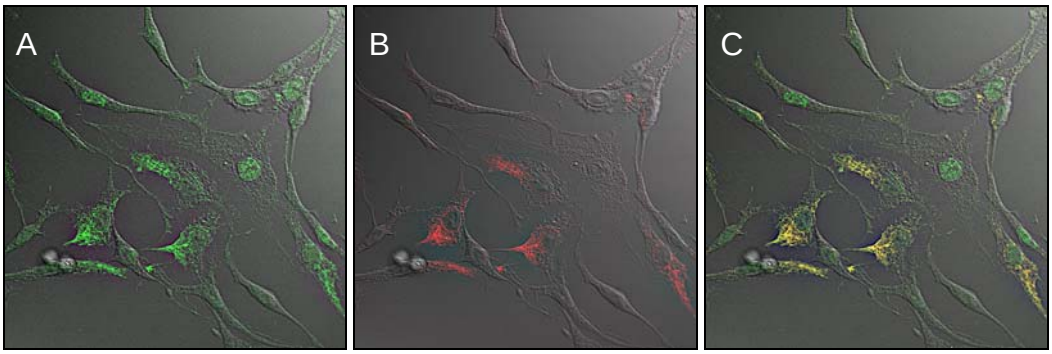


Abbildung 46:
Der Glucocorticoidrezeptor zeigt in Rat1 Zellen eine deutliche Kolokalisation mit ektopem Nestin. (A): Glucocorticoidrezeptor; (B): Nestin; (C) Überlagerung von A und B. Konfokalmikroskopische Aufnahmen mit DIC-Überlagerung.

Die konfokalmikroskopische Untersuchung der markierten Zellen führte zu dem Ergebnis, dass das ektope Nestin zu 100% mit der Lokalisation des endogenen Vimentins übereinstimmte (nicht gezeigt). Darüber hinaus zeigten alle Nestin-exprimierenden Zellen eine eindeutige Verlagerung des Glucocorticoidrezeptors aus dem Zellkern in das Cytoplasma und ebenso eine Kolokalisation des Rezeptors mit Nestin (Abb. 46). Es ist somit gelungen, einen eindeutigen Zusammenhang der Verankerung des Glucocorticoidrezeptors am Cytoskelett mit der Koexpression und Kopolymerisation von Vimentin und Nestin zu manifestieren.

4.4. Die nestin-abhängige Verankerung des Glucocorticoidrezeptors an Vimentin findet sich auch in Primärzellen

Zellen mit einem an Nestin/Vimentin Filamenten verankertem Glucocorticoidrezeptor reagieren anders auf hormonellen Stress als Zellen, denen dieses Filamentsystem fehlt (Abschnitt 1.2.8). Durch die Nestin-Beteiligung zeigt dieses Regulationssystem einen engen Bezug zur Differenzierung. Allerdings wurde dieser, hier erstmals dargestellte, Zusammenhang an transformierten Zelllinien beobachtet. Daraus stellte sich die Frage, ob dies nur ein für permanente Zelllinien charakteristisches Phänomen ist. Es bestand somit die Notwendigkeit zu

untersuchen, inwieweit dieser Verankerungsmechanismus des Glucocorticoidrezeptors in primären, differenzierungsfähigen Zellen zu finden ist. Hierfür wurden primäre embryonale Mausfibroblasten herangezogen.

4.4.1. Fibroblasten aus Mausembryonen zeigen eine Glucocorticoidrezeptor-Verankerung am Cytoskelett

Primäre Fibroblasten aus Mausembryonen ließen sich bis zu siebenmal passagieren. Jede Passage wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenztechniken (s. o.) auf die Expression von Vimentin, Nestin und Glucocorticoidrezeptor untersucht (Abb. 47). Parallel dazu erfolgten Doppelfärbungen der Seneszenz-assoziierten β-Galaktosidase in Kombination mit einer Immunfluoreszenzmarkierung des Glucocorticoid-rezeptors (Abb.48).

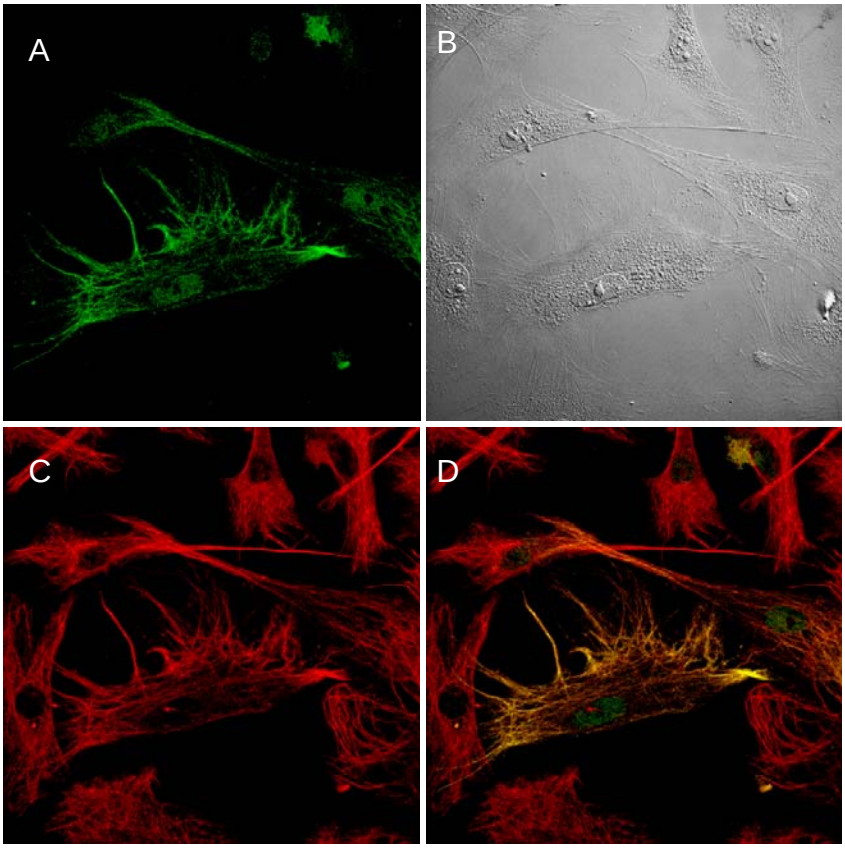


Abbildung 47:
Embryonale Fibroblasten der Maus zeigen eine, mit der Passage-Zahl stagnierende Anzahl an Zellen mit cytoplasmatischem Glucocorticoidrezeptor. (**A**): GR; (**B**) DIC; (**C**): Vimentin; (**D**): Überlagerung von A und C.

Nach sieben Passagen stellten die Zellen die Proliferation ein, dann gingen sie in die Krise und entwickelten Merkmale der Seneszenz. Entsprechend ihrer Herkunft aus mesenchymalem Gewebe exprimierten diese Fibroblasten Vimentin. In frühen Passagen zeigten diese Zellen außerdem die Expression von Nestin. Sobald die Zellen das Seneszenzstadium erreichten, wurde die Nestin-Expression schwächer und in den Zellen mit dem typisch seneszenten Phänotyp war schließlich kein Nestin mehr nachzuweisen, jedoch immer noch Vimentin. Untersuchungen zur Verteilung des Glucocorticoidrezeptors zeigten in frühen Passagen dieser Zellen eine cytoplasmatische Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors, die an das Cytoskelett gebunden war und mit der Lokalisation von Nestin und Vimentin übereinstimmte. In seneszenten Zellen, die Vimentin aber kein Nestin mehr ausprägten, lokalisierte der Glucocorticoidrezeptor im Zellkern.

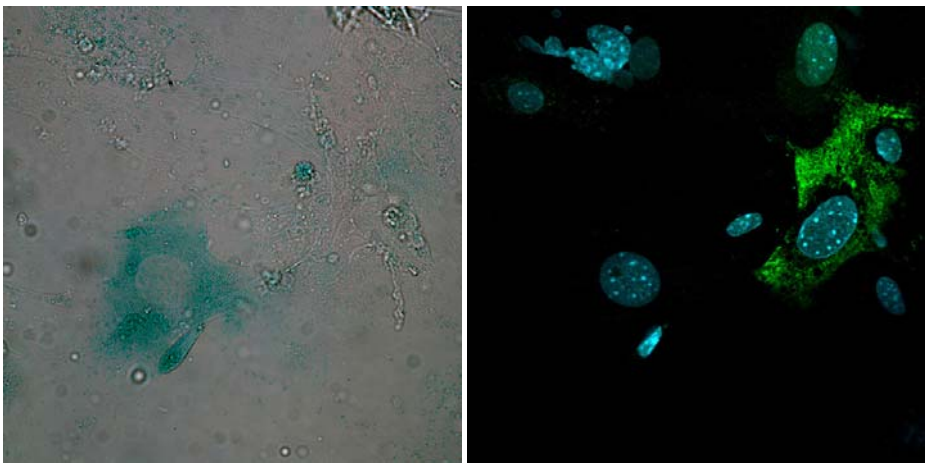


Abbildung 48:
*Fibroblasten aus Mausembryonen weisen nach ca. sechs Passagen Seneszenzmerkmale auf (**A**). Eine Subpopulation der Zellen mit cytoplasmatischem Glucocorticoidrezeptor zeigt diese Merkmale nicht (**B**).* Die Blaufärbung in Bild (**A**) zeigt die Umsetzung des Farbstoffs X-Gal durch die Seneszenz-assoziierte β-Galaktosidase. In (**B**) sind der GR grün und die Zellkerne hellblau dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen einen engen Zusammenhang zwischen der cytoplasmatischen Lokalisation des Glucocorticoidrezeptors und der Anwesenheit von Nestin. Sie machen deutlich, dass die Nestin/Vimentin abhängige subzelluläre Lokalisation des Rezeptors kein Phänomen ist, das auf permanente Zelllinien beschränkt ist, sondern offensichtlich auf primäre Zellen übertragen werden kann.

5. DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, den Mechanismus der cytoplasmatischen Sequestrierung einer temperatursensitiven Mutante von p53 ($tsp53^{Val-135}$) in Rattengliomzellen zu definieren. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die cytoplasmatische Sequestrierung von $tsp53^{Val-135}$ von funktioneller Relevanz ist, weil dadurch die wachstumssuppressiven Eigenschaften von p53 bei permissiver Temperatur ausschaltet werden. In dieser Hinsicht weist das System eine deutliche Analogie zur Situation in Neuroblastomzellen auf, die wtp53 im Cytoplasma sequestrieren. Der Befund, dass cytoplasmatisch sequestriertes tsp53 in den Rattengliomzellen dem wtp53 in den Neuroblastomzellen entsprechend mit dem Glucocorticoidrezeptor interagiert, erhärtet die Vermutung, analoger Sequestrierungsmechanismen. Demzufolge sind die an $tsp53^{Val-135}$-transfizierten C6 Zellen gemachten Beobachtungen nicht isoliert zu sehen, sondern mit hoher Wahrscheinlichkeit auf natürlich vorkommende Systeme übertragbar. $Tsp53^{Val-135}$-transfizierte Rattengliomzellen könnten somit ein Modellsystem für die Analyse der cytoplasmatischen Sequestrierung von p53 darstellen.

Neuroblastomzellen sind Tumorzellen. Retrospektiv lässt sich schwer abschätzen, inwieweit die p53 Sequestrierung in der Zelle der entscheidende Auslöser für ihre Transformation war; zumindest kann angenommen werden, dass die Inaktivierung von p53 durch Sequestrierung die Tumorbildung begünstigt hat. Der Kernausschluss von p53 ist jedoch kein auf Tumoren beschränktes Phänomen. So akkumuliert z.B. wtp53 in primären Oligodendrocyten aus Ratten bis zum Differenzierungsende dieser Zellen im Cytoplasma. Fehldifferenzierte Zellen werden nach einer Translokaton von p53 aus dem Cytoplasma in den Zellkern durch Apoptose eliminiert (Eizenberg *et al.*, 1995; 1996). Normales Mammagewebe, das während der Laktationsphase starken Differenzierungsprozessen unterliegt, enthält Zellen mit cytoplasmatisch lokalisiertem wtp53 (Moll *et al.*, 1992). D.h., die cytoplasmatische Sequestrierung von p53 ist ein Merkmal, das in undifferenzierten Zellen auftritt und möglicherweise dazu benutzt wird, die Transaktivierungsfunktion von p53 zu steuern (Shaulsky *et al.*, 1991; Moll *et al.*, 1996).

Durch die Akkumulation im Cytoplasma wird in den Zellen eine hohe Menge an p53 bereitgehalten, mit welcher in Stresssituationen, die im Zusammenhang mit Differenzierungsprozessen auftreten können, umgehend Zielgene aktiviert werden

können. Als Folge kann entweder ein Zellzyklusarrest oder die Apoptose eingeleitet werden (Aladjem *et al.*, 1998). Dies erweitert die Bedeutung der cytoplasmatischen Sequestrierung von p53 von einem die Tumorgenese unterstützenden Mechanismus hin zu einem generellen Steuerungsmechanismus der p53-Aktivität in der Proliferation und Differenzierung von Zellen.

In vorangegangenen Arbeiten war beobachtet worden, dass tsp53 in den Rattengliomzellen an Vimentinfilamenten verankert wird (Klotzsche *et al.*, 1999; Klotzsche 2000). Eine entscheidende Frage ist deshalb, inwieweit die an Neuroblastomzellen beobachtete Interaktion zwischen wtp53 und dem Glucocorticoidrezeptor mit der cytoskeletalen Verankerung von tsp53$^{Val-135}$ in den Rattengliomzellen korreliert werden kann. Möglicherweise stellen beide Systeme voneinander unabhängige Mechanismen der cytoplasmatischen Verankerung von p53 dar. Mit den hier erarbeiteten Ergebnissen, die zeigen, dass die p53/Glucocorticoidrezeptor-Komplexe in den Rattengliomzellen an Vimentin verankert werden, wird Bezug zwischen diesen beiden Systemen hergestellt.

Vimentin ist ein Intermediärfilamentprotein der Klasse III und repräsentiert das charakteristische IF-Protein in Zellen mesenchymalen Ursprungs. Außerdem tritt es in undifferenzierten Zellen als IF-Vorläuferprotein auf und wird im Laufe der Differenzierung durch gewebespezifische Pendants wie Desmin, GFAP oder Neurofilamente ersetzt (Franke *et al.*, 1982). In Tumoren dient der Nachweis von Vimentin als Kontrollmarker zur Abklärung der Histiogenese des Tumorgewebes (Osborn und Weber, 1983). Nestin ist ebenso ein differenzierungsspezifisches Intermediärfilamentprotein, das in Vorläuferzellen des zentralen Nervensystems exprimiert wird (Matsuda *et al.*, 1996; Frojdman *et al.*, 1997). Die hier beschriebene Beteiligung von Vimentin und Nestin an der Verankerung des tsp53^{Val135}/Glucocorticoidrezeptor-Komplexes stellt somit eine Verbindung zu Differenzierungsprozessen her.

5.1. Bindung zwischen Glucocorticoidrezeptor und p53

Der Glucocorticoidrezeptor ist selbst ein Transkriptionsfaktor, dem eine wichtige Rolle bei der Regulation der Homeostase als Reaktion auf internen und externen Stress und in Entwicklung und Wachstum zukommt (Yudt und Cidlowski, 2002).

Er gehört zur Familie der Steroidrezeptoren, welche in die Superfamilie der Kernrezeptoren eingeordnet wird. Zu dieser Familie gehören außer den Steroidrezeptoren, die Retinsäure-, Thyroxin- und Vitamin D_3-Rezeptoren. Sie alle vereint ein analoger Aufbau des Proteins aus einer variablen aminoterminalen Domäne, einer hoch konservierten DNS-bindenden Domäne und einer C-terminal gelegenen Ligand-Bindungsdomäne (Abb. 49). Der konservierte Aufbau der Proteine könnte erklären, warum p53 nicht nur mit dem Glucocorticoidrezeptor (Sengupta *et al.*, 2000), sondern auch mit dem Thyroidrezeptor β-1 (Yap *et al.*, 1996), dem Orphanrezeptor TR-2 (Lin *et al.*, 1996) und dem Östrogenrezeptor (Yu *et al.*, 1997) interagiert.

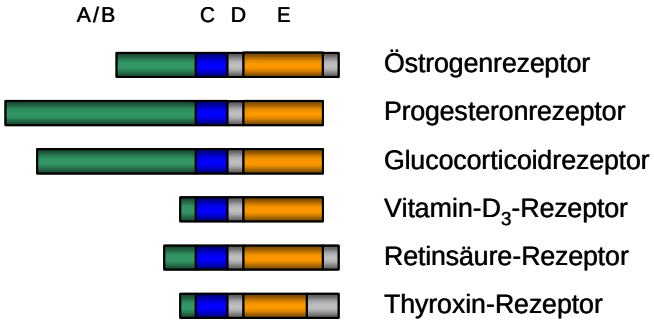


Abbildung 49:
Strukturelle Gemeinsamkeiten der Kernrezeptorsuperfamilie (Stryer, 1995). Die aminoterminal gelegene, sehr variable Aktivierungsdomäne ist grün dargestellt, die hochkonservierte DNS-bindende Domäne blau und die C-Terminale hormonbindende Domäne ist orange dargestellt.

Die Struktur des Glucocorticoidrezeptors und seiner funktionellen Domänen ist in Abb. 50 dargestellt. Der aminoterminale Bereich des Proteins besitzt eine Ligand-unabhängige Transaktivierungsfunktion (Hollenberg *et al.*, 1988; Bocquel *et al.*, 1989). Im Aminoterminus liegen Serin/Threonin-Phosphorylierungsstellen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Zellzyklus aktiviert werden können und so die Stabilität des Glucocorticoidezeptors, seine Transaktivierungsfunktion und die

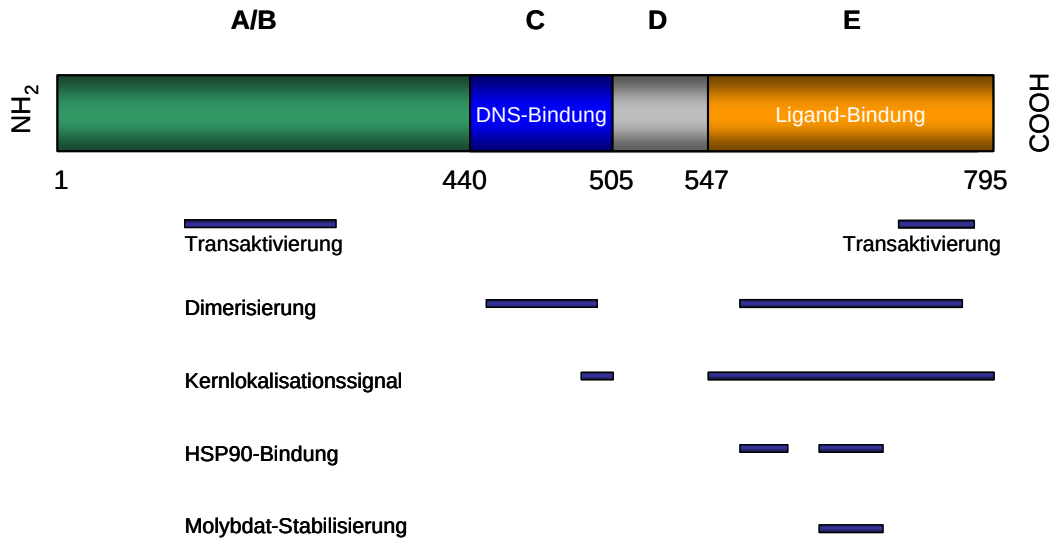


Abbildung 50:
Struktureller Aufbau des Glucocorticoidrezeptors der Ratte, Rattus norvegicus (nach Hache, 1999). Die Farbgebung ist analog zur Abb. 49 gewählt, ebenso wie die für Kernrezeptoren typische Domänenorganisation von A bis E. Die Lokalisation funktioneller Motive und HSP90-Bindungsstellen ist unterhalb des Proteins zusammengefasst.

subzelluläre Lokalisation beeinflussen (Munck *et al.*, 1984; Hsu *et al.*, 1992; Hsu *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1997; Webster *et al.*, 1997; Bodwell *et al.*, 1998). Innerhalb der C-terminalen, ligand-bindenden Domäne des Proteins befindet sich eine zweite steroid-abhängige Transaktivierungsdomäne (Hollenberg *et al.*, 1988; Bocquel *et al.*, 1989; Danielian *et al.*, 1992). Die C-terminale Domäne (E) enthält auch die Bindungsstellen für das regulatorisch wirkende Hitzeschockprotein HSP90 (Howard *et al.*, 1990; Dahlman-Wright *et al.*, 1991; Giannoukos *et al.*, 1999).

In den hier durchgeführten Immunpräzipitationsversuchen konnten aus Zelllysaten vimentin-positiver C6D8-1 Zellen, die bei restriktiver Temperatur gehalten worden waren, p53/Glucocorticoidrezeptor-Komplexe isoliert werden. Mit Antikörpern gegen terminale Domänen von p53 und Glucocorticoidrezeptor ließen sich beide Proteine kopräzipitieren. Weniger erfolgreich war dies mit Antikörpern, die gegen die zentrale Domäne des jeweiligen Proteins gerichtet sind. Dies lässt vermuten, dass die Interaktion beider Proteine über ihre zentralen Domänen erfolgt und diese Domänen deshalb für Antikörper weniger gut zugänglich sind.

Diese Beobachtung korreliert mit den Ergebnissen anderer Autoren aus *in vitro*-Bindungsstudien zwischen p53 und dem Glucocorticoidrezeptor (Sengupta *et al.*

2002). In diesen Studien konnten im Glucocorticoidrezeptor die DNS-bindende Domäne und in p53 der Bereich des Kernlokalisationssignals (NLS), der direkt an die DNS-bindende Domäne anschließt, als interagierende Domänen identifiziert werden. Die Maskierung des NLS könnte entscheidend dazu beitragen, dass die Kernwanderung von p53, bzw. die des p53/Glucocorticoidrezeptor-Komplexes unterbleibt.

Unberücksichtigt in den *in vitro*-Bindungsstudien von Sengupta *et al.* (2001) blieben die Hitzeschockproteine, welche *in vivo* an den Rezeptor binden und seine Struktur und Funktion kontrollieren. Die gleichen Hitzeschockproteine interagieren auch mit p53 (Milner *et al.*, 1991; Muller *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die isolierten p53/Glucocorticoidrezeptor-Komplexe die Hitzeschockproteine HSP70 und HSP90 enthalten. Eine Interaktion von p53 und Glucocorticoidrezeptor über diese Proteine ist somit nicht auszuschließen.

5.2. "Reifungszustand" des Glucocorticoidrezeptors und Bindung von p53

Steroidrezeptoren unterscheiden sich von den anderen Mitgliedern der Kernrezeptor-Familie durch ihre Wechselwirkung mit Chaperonen, Immunophilinen und anderen Hitzeschockproteinen, die den Rezeptor in einen für die Bindung des Liganden bereiten Zustand bringen. Aufbau und "Reifung" des Rezeptorkomplexes unterliegen einem streng geordneten Schema (Kanelakis *et al.*, 2003). Ein aktuelles Modell dieser Vorgänge ist in Abb. 51 dargestellt. Inwieweit Hsp70 im reifen, finalen Heterokomplex noch vorhanden ist, ist umstritten. Ein sicheres Indiz für den reifen, aktivierbaren Zustand des Komplexes ist die Anwesenheit der Immunophiline.

In den aus C6D8-1 Zellen isolierten p53/Glucocorticoidrezeptor-Komplexen konnten die Hitzeschockproteine HSP70 und HSP90 nachgewiesen werden. Zudem konnten der Glucocorticoidrezeptor, p53 und das Immunophilin FKBP52 am Cytoskelett kolokalisiert werden. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die mit p53 komplexierte Glucocorticoidrezeptor-Fraktion im physiologisch "reifen", d.h. durch den Liganden aktivierbaren Zustand vorliegt.

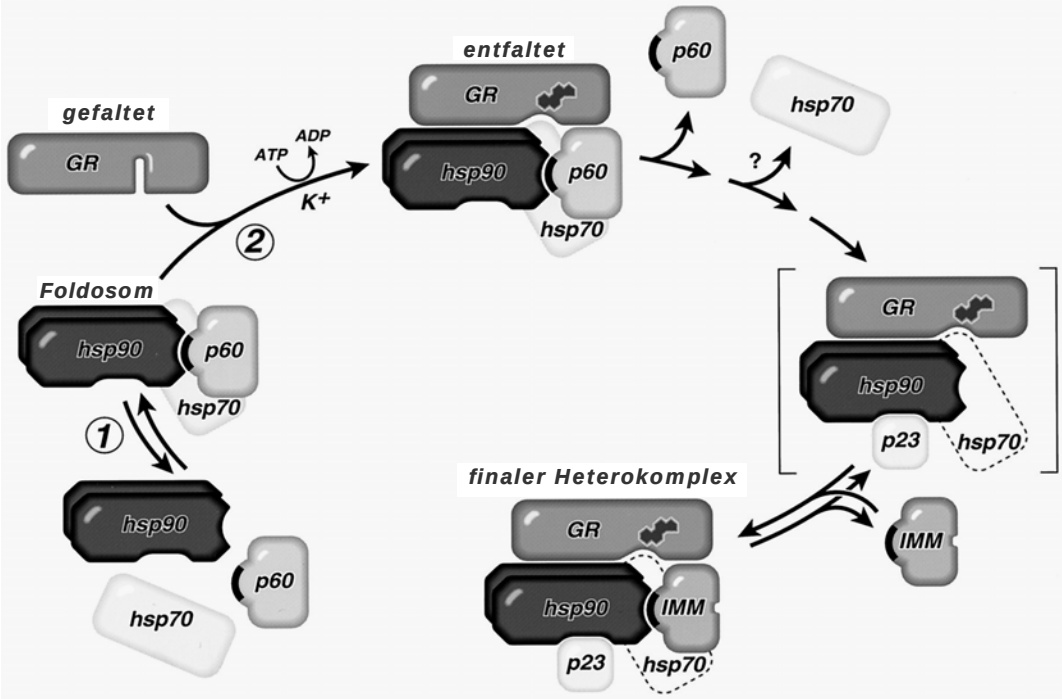


Abbildung 51:
Schema der Glucocorticoidrezeptor-Heterokomplex "Reifung" (Kanelakis et al., 2003). Zwei HSP90 Moleküle formen zusammen mit HSP70 und dem Adapterprotein p60 das "Foldosom". Dieser Komplex bindet unter ATP-Verbrauch an ein GR-Molekül und entfaltet es so, dass die Ligand-Bindungsstelle frei wird. Nach Dissoziation von p60 und evtl. auch HSP70 wird der finale Heterokomplex durch Bindung eines Immunophilins und des Co-Chaperons p23 fertiggestellt.

5.3. Bindung von p53 und Aktivierbarkeit des "reifen" Rezeptors

Die Aktivierung des "reifen" Glucocorticoidrezeptors durch Steroidhormone folgt einem bestimmten, größtenteils aufgeklärten Schema. Nach diesem Schema befindet sich der naive Glucocorticoidrezeptor im Cytoplasma als Heterokomplex mit Hitzeschockproteinen und Immunophilinen (Picard *et al.*, 1987; Sackey *et al.*, 1996). Die Konformation des Rezeptors wird durch die gebundenen Hitzeschockproteine so stabilisiert, dass die Ligandbindungsstelle geöffnet ist. Nach Bindung des Liganden dissoziiert der Rezeptor vom Heterokomplex ab und wandert als Homodimer in den Zellkern (Wikstrom *et al.*, 1987; Picard *et al.*, 1987; Cidlowski *et al.*, 1990; Sackey *et al.*, 1996). Dort bindet er an spezifische Erkennungssequenzen auf der DNS (Glucocorticoid Response Elements, GRE) und agiert als Transaktivator in Verbindung mit Kofaktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie (Beato *et al.*, 1996; Wolffe *et al.*, 1997). Nach dem

Steroidverlust dissoziiert der Glucocorticoidrezeptor in Monomere, wandert in das Cytoplasma und bildet erneut einen Heterokomplex mit Hitzeschockproteinen und Immunophilinen (Sackey *et al.*, 1996; Hache *et al.*, 1999).

In C6D8 Zellen, in denen kein tsp53$^{Val-135}$ exprimiert wurde, beinhaltet der cytoplasmatische Glucocorticoidrezeptor-Heterokomplex die Hitzeschockproteine HSP70 und HSP90 als auch das Immunophilin FKBP52. Gleiches trifft auch auf C6D8-1 Zellen zu, in welchen der Rezeptor im Komplex mit p53 vorliegt. In beiden Fällen sind die Proteinkomplexe an das Cytoskelett gebunden. Wurde zu den p53-negativen C6D8 Zellen der Ligand Dexamethason zugegeben, so wurde der Glucocorticoidrezeptor innerhalb kurzer Zeit (ca. 30 min) fast vollständig aus dem Cytoplasma in den Zellkern verlagert. D.h., der im Cytoplasma dieser Zellen akkumulierte und an das Cytoskelett gebundene Rezeptor war aktivierbar. Dieser Effekt blieb in den tsp53$^{Val-135}$-positiven, bei nichtpermissiver Temperatur von 39 °C gehaltenen C6D8-1 Zellen aus. Offensichtlich war der Glucocorticoidrezeptor im Komplex mit p53 nicht aktivierbar, bzw. die Bindung von p53 blockierte vermutlich die des Liganden. Sollte dies zutreffen, so müsste die Dissoziation von p53 aus dem Komplex die Aktivierbarkeit wiederherstellen. Die Temperaturerniedrigung auf 32 °C und damit zusammenhängende Konformationsänderung von tsp53$^{Val-135}$ führte zu einer Kernwanderung von p53. Danach konnte der Glucocorticoidrezeptor auch in diesen Zellen durch Dexamethason aktiviert werden - ein Befund, der die oben aufgestellte Hypothese verifiziert.

Der Zusammenhang zwischen der Konformationsänderung von tsp53$^{Val-135}$ und der Bindung an den Glucocorticoidrezeptor ist noch unklar. Es könnte zum einen bedeuten, dass p53$^{Val-135}$ spezifisch in seiner Mutantenkonformation an den Rezeptor bindet. Dem widerspricht aber die Tatsache, dass in Neuroblastomzellen nur Wildtyp p53 vorliegt. Außerdem finden sich p53/Glucocorticoidrezeptor-Komplexe auch in C6D8-1 Zellen, die bei permissiver Temperatur progressieren und in denen p53$^{Val-135}$ im Cytoplasma in seiner Wildtypkonformation akkumuliert.

Die Beobachtungen implizieren, dass p53 über den Glucocorticoidrezeptor am Cytoskelett verankert sein muss, und dass die Verankerung des Rezeptors am Cytoskelett (Vimentin) in den C6D8-1 Zellen nicht erst durch p53 induziert wird, sondern im Gegenteil, die Grundlage für die cytoplasmatische Sequestrierung von p53 liefert. Beobachtungen, dass der Rezeptor-Antagonist RU486 p53$^{Val-135}$ aus dem cytoplasmatischen Komplex verdrängen kann (Daten hier nicht gezeigt), erhärten

diese Schlussfolgerung.

Die hier gemachte Beobachtung zur Aktivierbarkeit des Glucocorticoidrezeptors entsprecht derjeniger in Neuroblastomzellen: auch dort inhibiert die Bindung von p53 an den Glucocorticoidrezeptor die Aktivierbarkeit des Rezeptors durch Dexamethason. Die Zugabe des Antagonisten RU486 führt dagegen zu einer Translokation von p53 in den Zellkern, ohne dass die cytoplasmatische Lokalisation des Rezeptors beeinflusst wird (Sengupta *et al.,* 2000).

5.4. Die Rolle von Cytoskelettkomponenten für die cytoplasmatische Verankerung des Glucocorticoidrezeptors

Eine Assoziation des Glucocorticoidrezeptors mit dem Cytoskelett wird bereits seit längerem in Erwägung gezogen. So wurde z.B. beobachtet, dass eine Überexpression des Glucocorticoidrezeptors die Menge seiner naiven, chaperonassoziierten Form im Zellkern erhöht. Diese Tatsache impliziert die Existenz eines unbekannten Sequestrierungsmechanismus, dessen Kapazität durch GR-Überexpression gesättigt werden kann (Sanchez, 1990; Martins *et al.*, 1991). Aus dem Cytosol intestinaler L-Zellen isolierte Gluco-corticoidrezeptor-Heterokomplexe beinhalten große Mengen der Cytoskelett-proteine Aktin, Tubulin und Vimentin (Scherrer und Pratt, 1992). *In vitro* Bindungsstudien mit aufgereinigten Proteinen zeigten Interaktionen zwischen dem Glucocorticoidrezeptor und Aktin bzw. Tubulin (Akner *et al.*, 1990, 1991; Miyata, 1991). All diese Daten sprechen für eine Affinität des Glucocorticoidrezep-tors für Komponenten des Cytoskeletts.

Das Immunophilin FKBP52, welches Teil des "reifen" Glucocorticoidrezeptor-Heterokomplexes ist, ist imstande an das mit Mikrotubuli assoziierte Motorprotein Dynein zu binden (Czar *et al.*, 1995). Aufgrund dieser Tatsache wurde für den aktivierten Glucocorticoidrezeptor ein von Dynein getriebener Transport in den Zellkern entlang der Mikrotubuli vorgeschlagen (Galigniana *et al.*,1998). Allerdings konnte weder eine Depolymerisation der Mikrotubuli, noch die Zerstörung der Mikrofilamente eine Verlagerung des Glucocorticoidrezeptors aus dem Cytoplasma in den Zellkern induzieren (Szapary *et al.*, 1994; Vorgias, 1988).

Die Schwierigkeit, eindeutige Relationen zwischen dem Glucocorticoidrezeptor und Proteinen des Cytoskeletts herzustellen, beruht im wesentlich darauf, dass die einzelnen Cytoskelettkomponenten stark miteinander vernetzt sind. (Abb. 52).

Intermediärfilamente, Mikrotubuli und das Aktin-Netzwerk sind sowohl indirekt über Proteine, wie Plektin und Kinesin, als auch direkt eng miteinander verknüpft (Bohn *et al.*, 1993; Hermann *et* Aebi, 2000).

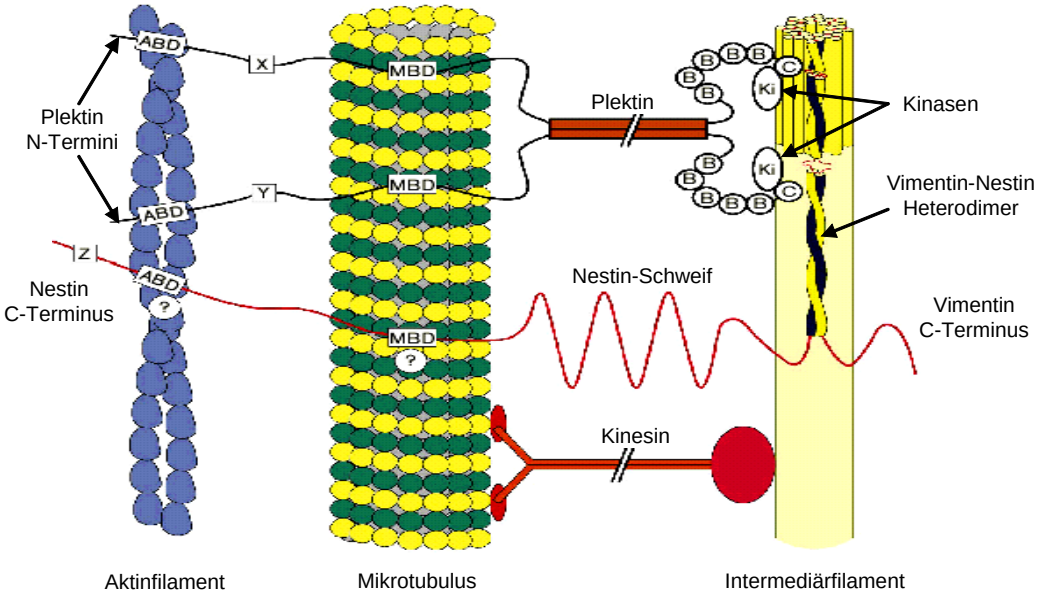


Abbildung 52:
Modell für direkte bzw. indirekte Interaktionen zwischen verschiedenen Cytoskelettproteinen. Danach können Intermediärfilamente über Kinesin und Plektin mit den Mikrotubuli verknüpft sein. Plektin besitzt in den ausgedehnten N-Termini außer der an Mikrotubuli bindenden Domäne (MBD) eine an Aktin bindende Domäne (ABD) und kann damit an Mikrofilamente binden. Analog dazu werden MBD und ABD in dem langen C-terminalen Nestin-Schweif vermutet. Nestin bildet selbst keine Filamente, kopolymerisiert aber mit Vimentin (Herrmann und Aebi, 2000)

In den hier dargestellten Untersuchungen konnte keine Beziehung zwischen dem Glucocorticoidrezeptor und den Mikrofilamenten nachgewiesen werden. Sowohl die normal proliferierenden Zellen als auch die mit Cytochalasin behandelten Zellen, in denen das Aktin-Netzwerk zerstört war, wiesen in der Immunfluoreszenz keinerlei Kolokalisation von Glucocorticoidrezeptor und Aktin auf. Eine Interaktion mit den Mikrotubuli kann dagegen nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Obwohl die Immunfluoreszenz-Untersuchungen auch hier praktisch keine Kolokalisation zwischen Tubulin und Glucocorticoidrezeptor aufwiesen, findet man in der Literatur immer wieder Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen GR und Tubulin. Möglicherweise ist dies durch die sehr enge Verbindung zwischen Intermediärfilamenten und Mikrotubuli erklärbar.

Darüber hinausgehend konnte hier erstmals gezeigt werden, dass die Verankerung

des Glucocorticoidrezeptors am Cytoskelett unter Beteiligung des Intermediärfilamentproteins Nestin stattfindet. Dies konnte nicht nur an den C6 Zellen, sondern auch an anderen Zelllinien und an Primärzellen gezeigt werden, und ließ sich durch ektope Expression des Proteins in nestin-negativen Zellen verifizieren. Nestin wird als cytoplasmatischer Anker für den Glucocorticoidrezeptor allerdings erst funktionell, wenn Vimentinfilamente vorhanden sind. Vimentin-negative C6D10 Zellen zeigten trotz der Tatsache, dass im Cytoplasma Nestin vorhanden war, ausschließlich eine Kernlokalisation des Glucocorticoidrezeptors. Nestin kann selbst keine Filamente bilden und nur mit Vimentin bzw. Internexin kopolymerisieren (Herrmann und Aebi, 2000). Daher ist für die Rezeptor-Verankerung wahrscheinlich ein intaktes Intermediärfilament-Netzwerk nötig.

5.5. Relevanz der cytoplasmatischen Verankerung des Glucocorticoidrezeptors für die Zellproliferation

Eine zentrale Frage ist, inwieweit die cytoplasmatische Verankerung des Glucocorticoidrezeptors über Vimentin-Nestin-Filamente eine physiologische Bedeutung besitzt. Erste Antworten darauf geben die Beobachtungen an C6 Zellen und an Primärkulturen von Mausfibroblasten.

In C6-Rattengliomzellen löste die Inkubation mit dem Glucocorticoidrezeptor-Liganden Dexamethason einen G1-Zellzyklusarrest aus. Sowohl die vimentin-positiven C6D8 Zellen, als auch die ursprünglich negativen, mit murinem Vimentin retransfizierten Zellen VimWT3B4 zeigten nach einem transienten G1-Arrest, der ungefähr einen Zyklus anhielt, erneute Proliferationsaktivität. Vimentin-negative Zellen (C6D10), in denen der Rezeptor im Zellkern lokalisierte, arretierten über einen längeren Zeitraum. Eine Erklärung für dieses Verhalten wäre, dass durch die Verankerung des Glucocorticoidrezeptors am Cytoskelett ein Proteinpool entsteht, der nach Bindung des Liganden Dexamethason "geleert" und nach Dissoziation des Liganden wieder gefüllt werden kann. Dies würde den vimentin-positiven Zellen einen zeitlichen Vorsprung gegenüber den vimentin-negativen Zellen in der Inaktivierung des Rezeptors verschaffen.

In den primären Mausfibroblasten war nur in frühen Passagen, die sich durch schnelle Proliferation der Zellen auszeichneten, eine cytoplasmatische, cytoskelettgebundene Lokalisation des Rezeptors zu beobachten. In späteren

Passagen, wenn die Zellen begannen einen seneszenten Phänotyp anzunehmen, lokalisierte der Rezeptor im Zellkern. Entsprechend zeigten diese Zellen keine Expression von Nestin mehr, aber immer noch die von Vimentin. Dies kann als Hinweis gewertet werden, dass die cytoplasmatische Verankerung des Glucocorticoidrezeptors ein differenzierungsspezifisches Regulativ sein könnte, welches die Proliferation der Zellen in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungszustand kontrolliert.

Wie p53, ist auch der Glucocorticoidrezeptor ein Transkriptionsfaktor, der unter bestimmten Umständen die Expression von p21(Cip1) bzw. p27(Kip1) und die Repression von bcl2 auslösen kann, und somit die Zellen in einen G1-Zellzyklusarrest und in die Apoptose treiben kann (Rogatsky *et al.*, 1999). Dieser Effekt scheint aber zelltypspezifisch zu sein (Naumann *et al.*, 1998), was vielleicht durch die große Vielfalt an GR-kontrollierten Genen erklärbar ist. Die aktuelle Zahl der bekannten, durch den Glucocorticoidrezeptor regulierten Gene beläuft sich auf ca. 70 (Merkulova *et al.*, 2003). Darunter fallen auch Gene der am Zellzyklus beteiligten Serin- bzw. Threonin-Kinasen oder das Protoonkogens *c-myc*.

5.6. Modell des Verankerungsmechanismus

Aufbauend auf den aktuellen Modellen für die "Reifung" (Kanelakis, 2003) des Glucocorticoidrezeptors und seinen nukleo-cytoplasmatischen Transport (Hache *et al.*, 1999), wurde anhand der Ergebnisse dieser Arbeit ein Modell für die cytoplasmatische Sequestrierung von p53 entwickelt (Abb. 53).

Voraussetzung für die Verankerung von p53 am Cytoskelett ist ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren. Zunächst müssen die Zellen sich in einem Stadium der Differenzierung befinden, in dem die Intermediärfilamentproteine Vimentin und Nestin exprimiert werden. Diese Situation tritt nicht nur in naiven Zellen mesenchymalen Ursprungs auf, sondern ist auch in vielen dedifferenzierten Tumoren zu beobachten. Durch die Kopolymerisation von Nestin mit Vimentin bieten die so entstehenden Filamente über die weit herausschweifende Nestin C-Termini Interaktionsflächen für andere Proteine (vgl. Abb. 52). Vermutlich können darüber nicht nur Interaktionen zu anderen Cytoskelettkomponenten, wie Mikrotubuli bzw. Aktinfilamenten, entstehen, sondern auch Bindungen mit anderen cytoplasmatischen Proteinen zustande kommen. Wie hier gezeigt, bindet

auch der Glucocorticoidrezeptor an kopolymerisierte Intermediärfilamente aus Nestin und Vimentin. Ob der Rezeptor selbst oder andere Komponenten des Heterokomplexes wie Hitzeschockproteine direkt mit Nestin/Vimentin Polymeren interagieren, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Tatsache ist, dass der Glucocorticoidrezeptor durch die Cytoskelettverankerung allein nicht inaktiviert wird. In tsp53^{Val135}-negativen C6D8 Zellen ist nach einer Dexamethason-Behandlung sowohl eine Translokation des Glucocorticoidrezeptors aus dem Cytoplasma in den Zellkern, als auch eine physiologische Antwort zu beobachten. Durch das Auftreten von p53 im Cytoplasma, wie z.B. in C6D8-1 Zellen, wird der Glucocorticoidrezeptor blockiert. Dies wird durch die nach Hormongabe ausbleibende Translokation des Rezeptors in den Zellkern sichtbar. Diese Ergebnisse implizieren eine direkte Bindung von p53 an den Glucocorticoid-rezeptor, bei welcher die Ligandbindung an den Rezeptor entweder erschwert oder gänzlich verhindert wird. Somit wird durch die Entstehung eines am Cytoskelett verankerten p53/Glucocorticoidrezeptor-Heterokomplexes die Funktionalität beider Proteine beeinträchtigt.

Durch die differenzierungsabhängige Regulation der Expression von Nestin, welches durch seine ausschweifende C-Termini Interaktionsflächen für andere Proteine bietet, könnte eine Art dynamischer Pool für Stressregulatoren, wie den Glucocorticoidrezeptor oder auch p53, geschaffen werden. Durch die räumliche Trennung der Transkriptionsfaktoren von den Zielgenen werden sie epigenetisch inaktiviert, sind aber im Notfall in ausreichender Menge vorhanden und können schnell mobilisiert werden.

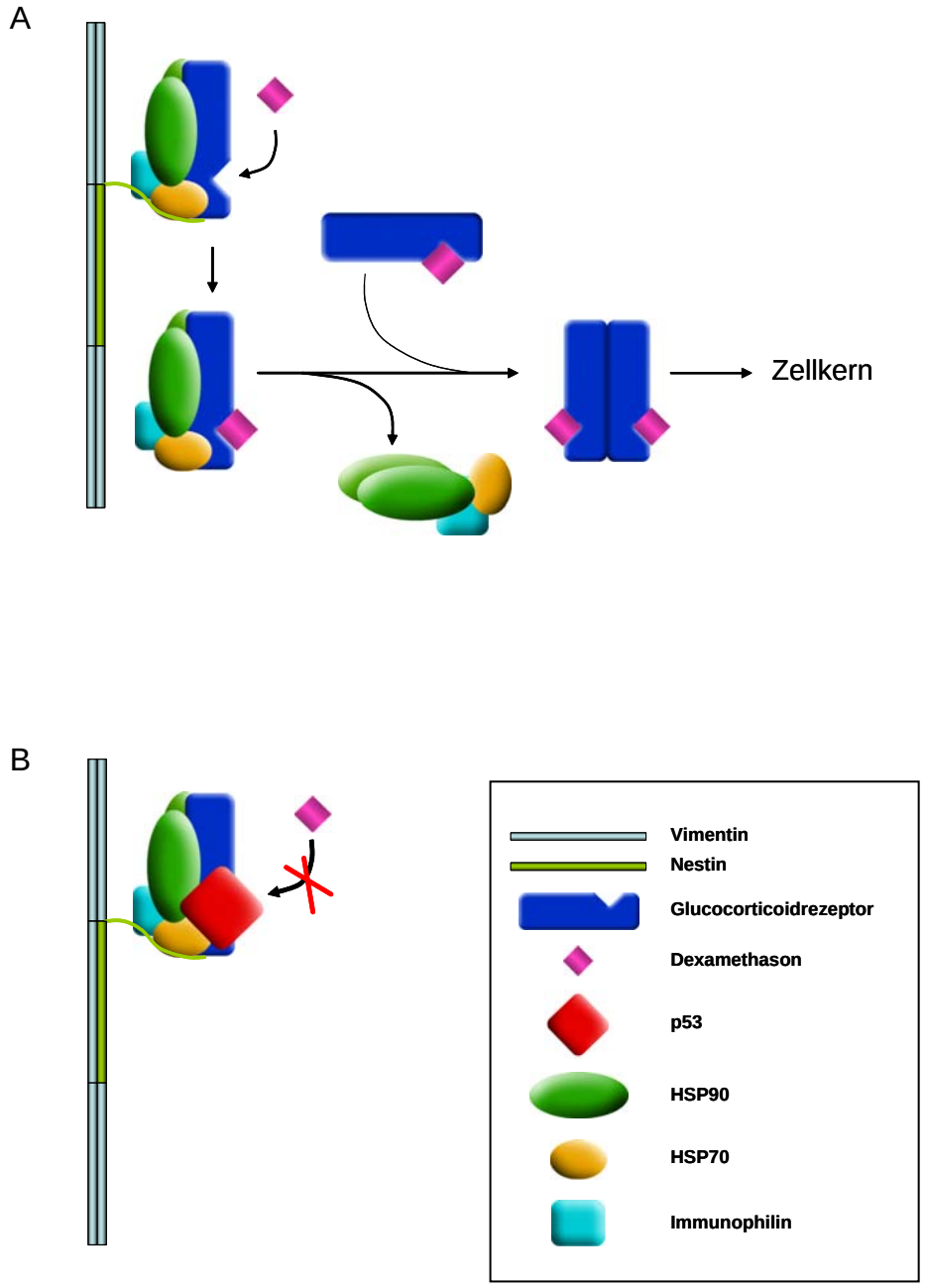


Abbildung 53:
Modell für die Verankerung des Glucocorticoiderzeptors und p53 am Cytoskelett. (**A**): In tsp53^{Val135}-negativen C6D8 Zellen ist der Heterokomplex aus Hitzeschockproteinen, Glucocorticoidrezeptor und Immunophilin am C-terminalen Schweif des Nestins gebunden. Die Funktionalität des Rezeptors wird dadurch nicht beeinträchtigt: nach der Bindung des Liganden transloziert der Glucocorticoidrezeptor in den Zellkern. (**B**): In tsp53^{Val135}-positiven C6D8-1 Zellen ist die Ligandbindungsstelle sterisch durch p53 blockiert. Eine Aktivierung des Glucocorticoidrezeptors durch Dexamethason kann nicht erfolgen.

5.7. Ausblick

Noch ist offen, ob der an das Cytoskelett gebundene p53/Glucocorticoidrezeptor Heterokomplex noch zusätzliche Komponenten, außer den hier erwähnten, beinhaltet. In diesem Zusammenhang muss überprüft werden, inwieweit der sehr große (~1MDa) Proteinkomplex Parc (Nikolajev *et al.*, 2002) oder das mit Mikrotubuli assoziierte Dynein (Galigniana *et al.*, 2004) an dieser Verankerung teilnehmen. Um die Funktion von Nestin in der Verankerung genauer zu erfassen, sollte die Beteiligung des Nestin C-Terminus an der cytoskelettalen Verankerung des Glucocorticoidrezeptors überprüft werden.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist das funktionelle Zusammenspiel zwischen p53 und Glucocorticoidrezeptor. Beide Transkriptionsfaktoren könnten synergistisch wirken oder aber sich gegenseitig in ihrer Wirkung aufheben.

Die hier vorliegenden Zellsysteme und aufgezeigten Zusammenhänge bieten eine Grundlage für funktionelle Studien über die Wechselwirkung zwischen p53, Glucocorticoidrezeptor und dem Cytoskelett in Verbindung mit Differenzierungsprozessen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Akner G, Mossberg K, Wikstrom AC, Sundqvist KG, Gustafsson JA. (1991). Evidence for colocalization of glucocorticoid receptor with cytoplasmic microtubules in human gingival fibroblasts, using two different monoclonal anti-GR antibodies, confocal laser scanning microscopy and image analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol,* **39**, 419-32.

Akner G, Sundqvist KG, Denis M, Wikstrom AC, Gustafsson JA. (1990). Immunocytochemical localization of glucocorticoid receptor in human gingival fibroblasts and evidence for a colocalization of glucocorticoid receptor with cytoplasmic microtubules. *Eur J Cell Biol,* **53**, 390-401.

Aladjem, M. I., Spike, B. T., Rodewald, L. W., Hope, T. J., Klemm, M., Jaenisch, R., and Wahl, G. M. (1998). ES cells do not activate p53-dependent stress responses and undergo p53- independent apoptosis in response to DNA damage. *Curr Biol,* **8**, 145-55.

Alani, E., Lee, S., Kane, M. F., Griffith, J., and Kolodner, R. D. (1997). Saccharomyces cerevisiae MSH2, a mispaired base recognition protein, also recognizes Holliday junctions in DNA. *J Mol Biol,* **265**, 289-301

Alberts, B. (1995). Molekularbiologie der Zelle. Weinheim (VCH), 3. Auflage.

Alexandropoulos, K., Cheng, G., and Baltimore, D. (1995). Proline-rich sequences that bind to Src homology 3 domains with individual specificities. *Proc Natl Acad Sci USA,* **92**, 3110-4.

Ali, I. U., Schweitzer, J. B., Ikejiri, B., Saxena, A., Robertson, J. T., and Oldfield, E. H. (1994). Heterogeneity of subcellular localization of p53 protein in human glioblastomas. *Cancer Res,* **54**, 1-5.

Anklesaria, P. (2000). Gene therapy: a molecular approach to cancer treatment. *Curr Opin Mol Ther* **2**, 426-32.

Askjaer, P., Jensen, T. H., Nilsson, J., Englmeier, L., and Kjems, J. (1998). The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *J Biol Chem,* **273**, 33414-22.

Bakalkin, G., Selivanova, G., Yakovleva, T., Kiseleva, E., Kashuba, E., Magnusson, K. P., Szekely, L., Klein, G., Terenius, L., and Wiman, K. G. (1995). p53 binds single-stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the middle domain. *Nucleic Acids Res,* **23**, 362-369.

Bakalkin, G., Yakovleva, T., Selivanova, G., Magnusson, K. P., Szekely, L., Kiseleva, E., Klein, G., Terenius, L., and Wiman, K. G. (1994). p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer. *Proc Natl Acad Sci USA,* **91**, 413-417.

Baker, S.J., Markowitz, S., Fearon, E.R., Willson-JKV and Vogelstein, B. (1990). Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science,* **249**, 912-915.

Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., and Oren, M. (1993). Mdm2 expression is induced by wild-type p53 activity. *Embo J,* **12**, 461-468.

Bauer, C. (1999). Spezifische Interaktion von Wildtyp p53 mit dem 5'-UTR der p53 mRNA als Basis der translationalen Autoregulation der p53 Biosynthese. Dissertation.

Bauer, C., and Traub, P. (1995). Interaction of intermediate filaments with ribosomes in vitro. *Europ J Cell Biol,* **68**, 288-296.

Baumann, P., Benson, F. E., and West, S. C. (1996). Human Rad51 protein promotes ATP-dependent homologous pairing and strand transfer reactions in vitro. *Cell,* **87**, 757-766.

Bayle, J. H., Elenbaas, B., and Levine, A. J. (1995). The carboxyl-terminal domain of the p53 protein regulates sequence-specific DNA binding through its nonspecific nucleic acid-binding activity. *Proc Natl Acad Sci USA,* **92**, 5729-5733.

Beato M, Sanchez-Pacheco A. (1996). Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev.* **17**, 587-609.

Benda, P., Someda, K., Messer, J., and Sweet, W. H. (1971). Morphological and immunochemical studies of rat glial tumors and clonal strains propagated in culture. *J Neurosurg,* **34**, 310-23.

Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S. W., Luzio, J. P., Simari, R., and Weissberg, P. (1998). Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science,* **282**, 290-3.

Berg, P. E., Sheffery, M., King, R. S., Gong, Y., and Anderson, W. F. (1987). The expression of integrated plasmid DNA depends on copy number. *Exp Cell Res,* **168**, 376-88.

Bertrand, P., Rouillard, D., Boulet, A., Levalois, C., Soussi, T., and Lopez, B. S. (1997). Increase of spontaneous intrachromosomal homologous recombination in mammalian cells expressing a mutant p53 protein. *Oncogene,* **14**, 1117-22.

Beuttenmuller, M., Chen, M., Janetzko, A., Kuhn, S., and Traub, P. (1994). Structural elements of the amino-terminal head domain of vimentin essential for intermediate filament formation in vivo and in vitro. *Exp Cell Res,* **213**, 128-142.

Bishop JM. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell*, **64**, 235-48.

Bishop, M., and de la Monte, S. M. (1989). Dual lineage of astrocytomas. *Am J Pathol,* **135**, 517-27.

Blaydes, J. P., and Wynford-Thomas, D. (1998). The proliferation of normal human fibroblasts is dependent upon negative regulation of p53 function by Mdm2. *Oncogene,* **16**, 3317-22.

Bocquel MT, Kumar V, Stricker C, Chambon P, Gronemeyer H. (1989). The contribution of the N- and C-terminal regions of steroid receptors to activation of transcription is both receptor and cell-specific. *Nucleic Acids Res*, **17**, 2581-95.

Bodwell JE, Webster JC, Jewell CM, Cidlowski JA, Hu JM, Munck A. (1999). Glucocorticoid receptor phosphorylation: overview, function and cell cycle-dependence. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **65**, 91-9.

Bohn W, Etzrodt D, Foisner R, Wiche G, Traub P. (1996). Cytoskeleton architecture of C6 rat glioma cell subclones whole mount electron microscopy and immunogold labeling. *Scanning Microsc Suppl*, **10**, 285-93.

Bohn, W., Roser, K., Hohenberg, H., Mannweiler, K., and Traub, P. (1993). Cytoskeleton architecture of C6 rat glioma cell subclones differing in intermediate filament protein expression. *J Struct Biol,* **111**, 48-58.

Bond, J. A., Blaydes, J. P., Rowson, J., Haughton, M. F., Smith, J. R., Wynford-Thomas, D., and Wyllie, F. S. (1995). Mutant p53 rescues human diploid cells from senescence without inhibiting the induction of SDI1/WAF1. *Cancer Res,* **55**, 2404-9.

Bond, J., Haughton, M., Blaydes, J., Gire, V., Wynford-Thomas, D., and Wyllie, F. (1996). Evidence that transcriptional activation by p53 plays a direct role in the induction of cellular senescence. *Oncogene,* **13**, 2097-2104.

Bosari S, Moneghini L, Graziani D, Lee AK, Murray JJ, Coggi G, Viale G. (1995). bcl-2 oncoprotein in colorectal hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas. *Hum Pathol*, **26**, 534-40.

Bratthauer, G. L. (1999). The peroxidase-antiperoxidase (PAP) method and other all-immunologic detection methods. *Methods Mol Biol,* **115**, 191-201.

Brooks CL, Gu W. (2003). Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. *Curr Opin Cell Biol,* **15**, 164-71.

Brown, C. R., Doxsey, S. J., White, E., and Welch, W. J. (1994). Both viral (adenovirus E1B) and cellular (hsp 70, p53) components interact with centrosomes. *J Cell Physiol,* **160**, 47-60.

Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J. I., Beach, D., Jacks, T., and Hannon, G. J. (1995). Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21. *Nature,* **377**, 552-557.

Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem,* **112**, 195-203.

Buschmann T, Adler V, Matusevich E, Fuchs SY, Ronai Z. (2000). p53 phosphorylation and association with murine double minute 2, c-Jun NH2-terminal kinase, p14ARF, and p300/CBP during the cell cycle and after exposure to ultraviolet irradiation. *Cancer Res,* **60**, 896-900.

Caelles, C., Helmberg, A., and Karin, M. (1994). p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature,* **370**, 220-223.

Caron de Fromentel, C., and Soussi, T. (1992). The TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes, chromosomes and cancer,* **4**, 1-15.

Carson, D. A., and Lois, A. (1995). Cancer progression and p53. *Lancet,* **346**, 1009-1011.

Casey, G., Lo-Hsueh, M., Lopez, M.E., Vogelstein, B. and Stanbridge, E.J. (1991). Growth suppression of human breast cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene. *Oncogene*, **6**, 1791-1797.

Cathcart R, Schwiers E, Saul RL, Ames BN. (1984). Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine: a possible assay for oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA,* **81**, 5633-7.

Chan, T. A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1999). 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature,* **401**, 616-620.

Chehab NH, Malikzay A, Appel M, Halazonetis TD. (2000). Chk2/hCds1 functions as a DNA damage checkpoint in G(1) by stabilizing p53. *Genes Dev,* **14**, 278-88.

Chen, J., Lin, J. and Levine, A.J. (1995). Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the mdm-2 oncogene. *Mol Med*, **1**, 142-52.

Chen, P.L., Chen, Y., Bookstein, R. and Lee, W.H. (1990). Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science*, **250**, 1576-1580.

Chen, Y., Chen, P.L., Arnaiz, N., Goodrich, D. and Lee, W.H. (1991). Expression of wildtype p53 in human A673 cells suppresses tumorigenicity but not growth rate. *Oncogene*, **6**, 1799-1805.

Cheng, T. J., and Lai, Y. K. (1994). Transient increase in vimentin phosphorylation and vimentin-HSC70 association in 9L rat brain tumor cells experiencing heat-shock. *J Cell Biochem,* **54**, 100-9.

Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D., and Pavletich, N. P. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science,* **265**, 346-55.

Cidlowski JA, Bellingham DL, Powell-Oliver FE, Lubahn DB, Sar M. (1990). Novel antipeptide antibodies to the human glucocorticoid receptor: recognition of multiple receptor forms in vitro and distinct localization of cytoplasmic and nuclear receptors. *Mol Endocrinol,* **4**, 1427-37.

Clarke, A.R., Purdie-C, A., Harrison, D.J., Morris, R.G., Bird, C.C., Hooper, M.L. and Wyllie, A.H. (1993) Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*, **362**, 849-852.

Clarke, C. F., Cheng, K., Frey, A. B., Stein, R., Hinds, P. W., and Levine, A. J. (1988). Purification of complexes of nuclear oncogene p53 with rat and Escherichia coli heat shock proteins: in vitro dissociation of hsc70 and dnaK from murine p53 by ATP. *Mol Cell Biol,* **8**, 1206-15.

Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J,* **326**, 1-16.

Connell-Crowley, L., Harper, J. W., and Goodrich, D. W. (1997). Cyclin D1/Cdk4 regulates retinoblastoma protein-mediated cell cycle arrest by site-specific phosphorylation. *Mol Biol Cell*, **8**, 287-301.

Counter, C. M. (1996). The roles of telomeres and telomerase in cell life span. *Mutat Res,* **366**, 45-63.

Crawford, L.V., Pim, D.C., Gurney, E.G., Goodfellow, P. and Taylor-Papadimitriou, J. (1981). Detection of a common feature in several human tumor cell lines - a 53,000-dalton protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, **78**, 41-45.

Cross, S.M., Sanchez, C.A., Morgan, C.A., Schimke, M.K., Ramel, S., Idzerda, R.L., Raskind, W.J. and Reid, B.J. (1995). A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science*, **267**, 1353-1356.

Cuddihy AR, Wong AH, Tam NW, Li S, Koromilas AE. (1999). The double-stranded RNA activated protein kinase PKR physically associates with the tumor suppressor p53 protein and phosphorylates human p53 on serine 392 in vitro. *Oncogene,* **18**, 2690-702.

Czar MJ, Lyons RH, Welsh MJ, Renoir JM, Pratt WB. (1995). Evidence that the FK506-binding immunophilin heat shock protein 56 is required for trafficking of the glucocorticoid receptor from the cytoplasm to the nucleus. *Mol Endocrinol*, **9**, 1549-60.

Czar, M. J., Welsh, M. J., and Pratt, W. B. (1996). Immunofluorescence localization of the 90-kDa heat-shock protein to cytoskeleton. *Eur J Cell Biol,* **70**, 322-330.

Dahlman-Wright K, Wright A, Gustafsson JA, Carlstedt-Duke J. (1991). Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids. *J Biol Chem,* **266**, 3107-12.

Danielian PS, White R, Lees JA, Parker MG. (1992). Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J,* **11**, 1025-33.

Datto, M. B., Li, Y., Panus, J. F., Howe, D. J., Xiong, Y., and Wang, X. F. (1995). Transforming growth factor Beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA,* **92**, 5545-5549.

De Wind, N., Dekker, M., Berns, A., Radman, M., and Riele, H. t. (1995). Inactivation of the mouse msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. *Cell,* **82**, 321-330.

Deb, S. P. (2002). Function and dysfunction of the human oncoprotein MDM2. *Front Biosci,* **7**, 235-43.

Del Sal, G., Ruaro, E. M., Utrera, R., Cole, C. N., Levine, A. J., and Schneider, C. (1995). Gas1-induced growth suppression requires a transactivation-independent p53 function. *Mol Cell Biol*, **15**, 7152-60.

Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J., and Leder, P. (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell,* **82**, 675-84.

Deppert, W. (1993). p53: Oncogene, tumor suppressor, or both? Molecular and Cell Biological Methods in the Diagnosis of Malignant Diseases, Eds.: C. Wagener, S. Neumann. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 27-39.

Deppert, W. (1994). The yin and yang of p53 in cellular proliferation. Semin. *Cancer Biol,* **5**, 187-202.

Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., and et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA,* **92**, 9363-7.

Dittmer, D., Pati, S., Zambetti, G., Chu, S., Teresky, A. K., Moore, M., Finlay, C., and Levine, A. J. (1993). Gain of function mutations in p53. *Nat Genet,* **4**, 42-6.

Domagala, W., Weber, K., and Osborn, M. (1988). Diagnostics significance of coexpression of intermediate filaments in fine needle aspirates of human tumors. *Acta Cytol,* **32**, 49-59.

Domingo, A., Sarria, J. A., Evans, R. M., and Klymkowsky, M. W. (1992). Studying intermediate filaments. In The cytoskeleton: a practical approach. New York: Oxford University Press, 223-255.

Dudenhoeffer, C., Rohaly, G., Will, K., Deppert, W., and Wiesmueller, L. (1998). Specific mismatch recognition in heteroduplex intermediates by p53 suggests a role in fidelity control of homologous recombination. *Mol Cell Biol,* **18**, 5332-5342.

Dumaz, N., and D.W. Meek. (1999). Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactiva-tion but does not directly influence interaction with HDM2. *Embo J*, **18**, 7002-10.

Dutta, A., Ruppert, J. M., Aster, J. C., and Winchester, E. (1993). Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. *Nature,* **365**, 79-82.

Earl, R. T., Mangiapane, E. H., Billett, E. E., and Mayer, R. J. (1987). A putative protein-sequestration site involving intermediate filaments for protein degradation by autophagy. Studies with transplanted Sendai-viral envelope proteins in HTC cells. *Biochem J,* **241**, 809-15.

Eckelt, A., Herrmann, H., and Franke, W. W. (1992). Assembly of a tail-less mutant of the intermediate filament protein, vimentin, in vitro and in vivo. *Eur J Cell Biol,* **58**, 319-30.

Eizenberg, O., Faber-Elman, A., Gottlieb, E., Oren, M., Rotter, V., and Schwartz, M. (1995). Direct involvement of p53 in programmed cell death of oligodendrocytes. *EMBO J*, **14**, 1136-1144.

Eizenberg, O., Faber-Elman, A., Gottlieb, E., Oren, M., Rotter, V., and Schwartz, M. (1996). p53 plays a regulatory role in differentiation and apoptosis of central nervous system-associated cells. *Mol Cell Biol,* **16**, 5178-85.

El-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet*, **1**, 45-9.

El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell,* **75**, 817-25.

Eliyahu, D., Michalovitz, D., and Oren, M. (1985). Overproduction of p53 antigen makes established cells highly tumorigenic. *Nature*, **316**, 158-60.

Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D., and Oren, M. (1984). Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature,* **312**, 646-649.

Elmore E, Kakunaga T, Barrett JC. (1983). Comparison of spontaneous mutation rates of normal and chemically transformed human skin fibroblasts. *Cancer Res,* **43**, 1650-5.

Engelhard, H. H., Duncan, H. A., and Dal Canto, M. (1997). Molecular characterization of glioblastoma cell differentiation. *Neurosurgery,* **41**, 886-96; discussion 896-7.

Eskes, R., Antonsson, B., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Richter, C., Sadoul, R., Mazzei, G., Nichols, A., and Martinou, J. C. (1998). Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg2+ ions. *J Cell Biol,* **143**, 217-24.

Etzrodt, D. (1996). Untersuchungen zur Komplettierung des Zytoskelettsystems durch Vimentininduktion und -transfektion in intermediärfilamentfreien Zellen der Ratte-Gliazellinie C6. Dissertation.

Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry,* **136**, 6-13.

Finlay, C. A., Hinds, P. W., and Levine, A. J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell,* **57**, 1083-1093.

Finlay, C. A., Hinds, P. W., Tan, T. H., Eliyahu, D., Oren, M., and Levine, A. J. (1988). Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol,* **8**, 531-9.

Florenes, V. A., Mælandsmo, G. M., Forus, A., Andreassen, Å., and Myklebost, O. (1994). MDM2 gene amplification and transcript levels in human sarcomas: Relationship to TP53 gene status. *Jnci,* **86**, 1297-1302.

Ford, J. M., and Hanawalt, P. C. (1995). Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance. *Proc Natl Acad Sci USA,* **92**, 8876-8880.

Forrester, K., Ambs, S., Lupold, S.E., Kapust, R.B., Spillare, E.A., Weinberg, W.C., Felley-Bosco, E., Wang, X.W., Geller, D.A., Tzeng, E., Billiar, T.R. and Harris, C.C. (1996). Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci USA,* **93**, 2442-2447.

Fostinis, Y., Theodoropoulos, P. A., Gravanis, A., and Stournaras, C. (1992). Heat shock protein HSP90 and its association with the cytoskeleton: a morphological study. *Biochem Cell Biol,* **70**, 779-786.

Franke, W. W., Grund, C., Kuhn, C., Jackson, B. W., and Illmensee, K. (1982). Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. *Differentiation,* **23**, 43-59.

Freedman, D. A., and Levine, A. J. (1998). Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol Cell Biol,* **18**, 7288-93.

Fried, J., Perez, A. G., and Clarkson, B. D. (1976). Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide. Properties of the method and mathematical analysis of the data. *J Cell Biol,* **71**, 172-81.

Frojdman K, Pelliniemi LJ, Lendahl U, Virtanen I, Eriksson JE. (1997). The intermediate filament protein nestin occurs transiently in differentiating testis of rat and mouse. *Differentiation,* **61**, 243-9.

Fuchs, S. Y., Adler, V., Buschmann, T., Wu, X. W., and Ronai, Z. (1998). Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene,* **17**, 2543-2547.

Fukasawa, K., Choi, T., Kuriyama, R., Rulong, S., and Vande Woude, G. F. (1996). Abnormal centrosome amplification in the absence of p53. *Science,* **271**, 1744-7.

Funk, W. D., Pak, D. T., Karas, R. H., Wright, W. E., and Shay, J. W. (1992). A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol Cell Biol,* **12**, 2866-2871.

Gannon, J. V., and Lane, D. P. (1991). Protein synthesis required to anchor a mutant p53 protein which is temperature-sensitive for nuclear transport. *Nature,* **349**, 802-6.

Gannon, J. V., Greaves, R., Iggo, R., and Lane, D. P. (1990). Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *Embo J,* **9**, 1595-602.

Giannoukos G, Silverstein AM, Pratt WB, Simons SS Jr. (1999). The seven amino acids (547-553) of rat glucocorticoid receptor required for steroid and hsp90 binding contain a functionally independent LXXLL motif that is critical for steroid binding. *J Biol Chem,* **274**, 36527-36.

Gire, V., and Wynford-Thomas, D. (1998). Reinitiation of DNA synthesis and cell division in senescent human fibroblasts by microinjection of anti-p53 antibodies. *Mol Cell Biol,* **18**, 1611-21.

Glore, G. M., Omichinski, J. G., Sakaguchi, K., Zambrano, N., Sakamoto, H., Appella, E., and Gronenborn, A. M. (1994). High-resolution structure of the oligomerization domain of p53 by multidimensional NMR. *Science,* **265**, 386-391.

Goldman, S. C., Chen, C. Y., Lansing, T. J., Gilmer, T. M., and Kastan, M. B. (1996). The p53 signal transduction pathway is intact in human neuroblastoma despite cytoplasmic localization. *Am J Pathol,* **148**, 1381-1385.

Goping, I. S., Gross, A., Lavoie, J. N., Nguyen, M., Jemmerson, R., Roth, K., Korsmeyer, S. J., and Shore, G. C. (1998). Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol,* **143**, 207-15.

Gordon, A. J. E. (1996). p53 null mice, nothing to lose? *Trends Genet,* **12**, 444-444.

Gorospe, M., Cirielli, C., Wang, X., Seth, P., Capogrossi, M. C., and Holbrook, N. J. (1997). p21(Waf1/Cip1) protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene,* **14**, 929-35.

Gorospe, M., Wang, X., Guyton, K. Z., and Holbrook, N. J. (1996). Protective role of p21(Waf1/Cip1) against prostaglandin A2-mediated apoptosis of human colorectal carcinoma cells. *Mol Cell Biol,* **16**, 6654-60.

Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S. E., Scheffner, M., and Del Sal, G. (1999). Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo J,* **18**, 6462-71.

Graeber, T. G., Peterson, J. F., Tsai, M., Monica, K., Fornace, A. J., Jr., and Giaccia, A. J. (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**, 6264-6277.

Gratzner, H. G., Pollack, A., Ingram, D. J., and Leif, R. C. (1976). Deoxyribonucleic acid replication in single cells and chromosomes by immunologic techniques. *J Histochem Cytochem*, **24**, 34-9.

Grotzinger, T., Jensen, K., Guldner, H. H., Sternsdorf, T., Szostecki, C., Schwab, M., Savelyeva, L., Reich, B., and Will, H. (1996). A highly amplified mouse gene is homologous to the human interferon- responsive Sp100 gene encoding an autoantigen associated with nuclear dots. *Mol Cell Biol,* **16**, 1150-6.

Gu, W., and Roeder, R. G. (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell,* **90**, 595-606.

Gupta, R. C., Bazemore, L. R., Golub, E. I., and Radding, C. M. (1997). Activities of human recombination protein Rad51. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **94**, 463-468.

Hache RJ, Savory JG, Lefebvre YA. (1999). Nucleocytoplasmic trafficking and glucocorticoid receptor function. *Gene Ther Mol Biol*, **4**, 99-107.

Halazonetis, T. D., Kandil, A. N. (1993). Conformational shifts propagate from the oligomerization domain of p53 to its tetrameric DNA binding domain and restore DNA binding to select p53 mutants. *EMBO J,* **12**, 5057-5064.

Hargreaves, A. J., Yusta, B., Avila, J., Hesketh, J. E., Aranda, A., and Pascual, A. (1989). Sodium butyrate induces major morphological changes in C6 glioma cells that are correlated with increased synthesis of a spectrin-like protein. *Brain Res Dev Brain Res,* **45**, 291-5.

Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin- dependent kinases. *Cell,* **75**, 805-16.

Hartwig, J. H. (1992). An Ultrastructural approach to understanding the cytoskeleton. IRL Press at Oxford University Press

Harvey, M., Vogel, H., Morris, D., Bradley, A., Bernstein, A., and Donehower, L. A. (1995). A mutant p53 transgene accelerates tumour development in heterozygous but not nullizygous p53-deficient mice. *Nature Genet,* **9**, 305-311.

Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature,* **387**, 296-9.

Hayflick, L. (1979). The cell biology of aging. *J Invest Dermatol,* **73**, 8-14.

Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingan, S., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell,* **1**, 3-11.

Herrmann H, Aebi U. (2000). Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol,* **12**, 79-90.

Herrmann, H., Haner, M., Brettel, M., Muller, S. A., Goldie, K. N., Fedtke, B., Lustig, A., Franke, W. W., and Aebi, U. (1996). Structure and assembly properties of the intermediate filament protein vimentin: the role of its head, rod and tail domains. *J Mol Biol,* **264**, 933-953.

Herrmann, H., Hofmann, I., and Franke, W. W. (1992). Identification of a nonapeptide motif in the vimentin head domain involved in intermediate filament assembly. *J Mol Biol,* **223**, 637-50.

Hinds, P. W., Finlay, C. A., Frey, A. B., and Levine, A. J. (1987). Immunological evidence for the association of p53 with a heat shock protein, hsc70, in p53-plus-ras-transformed cell lines. *Mol Cell Biol,* **7**, 2863-9.

Hinds, P., Finlay, C., and Levine, A. J. (1989). Mutation is required to activate the p53 gene for cooperation with the ras oncogene and transformation. *J Virol,* **63**, 739-746.

Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, Liu D, Elledge SJ, Mak TW. (2000). DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science,* **287**, 1824-7.

Hiyama, H., Iavarone, A., LaBaer, J., and Reeves, S. A. (1997). Regulated ectopic expression of cyclin D1 induces transcriptional activation of the cdk inhibitor p21 gene without altering cell cycle progression. *Oncogene,* **14**, 2533-42.

Hofmann, I., and Herrmann, H. (1992). Interference in vimentin assembly in vitro by synthetic peptides derived from the vimentin head domain. *J Cell Sci,* **101**, 687-700.

Hollenberg SM, Evans RM. (1998). Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell*, **55**, 899-906.

Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science,* **253**, 49-53.

Honda, R., Tanaka, H., and Yasuda, H. (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett,* **420**, 25-27.

Howard KJ, Holley SJ, Yamamoto KR, Distelhorst CW. (1990). Mapping the HSP90 binding region of the glucocorticoid receptor. *J Biol Chem,* **265**, 11928-35.

Hsu SC, DeFranco DB. (1995). Selectivity of cell cycle regulation of glucocorticoid receptor function. *J Biol Chem,* **270**, 3359-64.

Hsu SC, Qi M, DeFranco DB. (1992). Cell cycle regulation of glucocorticoid receptor function. *EMBO J,* **11**, 3457-68.

Huang, P. (1998). Excision of mismatched nucleotides from DNA: a potential mechanism for enhancing DNA replication fidelity by the wild-type p53 protein. *Oncogene,* **17**, 261-270.

Hupp, T. R., and Lane, D. P. (1995). Two distinct signaling pathways activate the latent DNA binding function of p53 in a case kinase II-independent manner. *J Biol Chem,* **270**, 18165-18174.

Hupp, T. R., Meek, D. W., Midgley, C. A., Lane, D. P. (1992). Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell,* **71**, 875-886.

Janus, F., Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Wiesmüller, L., Grosse, F., and Deppert, W. (1999). The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *CMLS,* **55**, 12-27.

Janus, F., Albrechtsen, N., Knippschild, U., Wiesmüller, L., Grosse, F., and Deppert, W. (1999). Different regulation of the p53 core domain activities 3'-to-5' exonuclease and sequence-specific DNA binding. *Mol Cell Biol,* **19**, 2155-2168.

Jeffrey, P. D., Gorina, S., Pavletich, N. P. (1995). Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science,* **267**, 1498-1502.

Jones, S. N., Roe, A. E., Donehower, L. A., and Bradley, A. (1995). Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature,* **378**, 206-208.

Juan LJ, Shia WJ, Chen MH, Yang WM, Seto E, Lin YS, Wu CW. (2000). Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation. *J Biol Chem*, **275**, 20436-43.

Kanelakis KC, Pratt WB. (2003). Regulation of glucocorticoid receptor ligand-binding activity by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Methods Enzymol,* **364**, 159-73.

Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Craig, R. W. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res,* **51**, 6304-6311.

Katsumoto, T., Higaki, K., Ohno, K., and Onodera, K. (1995). Cell-cycle dependent biosynthesis and localization of p53 protein in untransformed human cells. *Biol Cell,* **84**, 167-73.

Kern, S. E., Kinzler, K. W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C., and Vogelstein, B. (1991). Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science,* **252**, 1708-1711.

Kieser, A., Weich, H. A., Brandner, G., Marm, D., and Kolch, W. (1994). Mutant p53 potentiates protein kinase C induction of vascular endothelial growth factor expression. *Oncogene,* **9**, 963-969.

Kim, E., Albrechtsen, N., and Deppert, W. (1997). DNA-conformation is an important determinant of sequence-specific DNA binding by tumor suppressor p53. *Oncogene,* **15**, 857-69.

Klotzsche O, Etzrodt D, Hohenberg H, Bohn W, Deppert W (1998). Cytoplasmic retention of mutant tsp53 is dependent on an intermediate filament protein (Vimentin) scaffold. *Oncogene,* **16**, 3423-3434.

Klotzsche, O. (1996). Untersuchungen zur cytoplasmatischen Lokalisation des nucleären Proteins p53. Diplomarbeit am Fachbereich Biologie der Universität Hamburg.

Klotzsche, O. (2000). Cytoplasmatische Verankerung von temperatursensitivem p53 in Subklonen der Rattengliomzellinie C6 Ein experimentelles Modell zur Analyse der epigenetischen Inaktivierung von Wildtyp p53 durch Kernausschluß. Dissertation.

Klymkowsky, M. W. (1995). Intermediate filaments: new proteins, some answers, more questions. *Current Biology,* **7**, 46-54.

Klymkowsky, M. W., Bachant, J. B., and Domingo, A. (1989). Functions of intermediate filaments. *Cell Motil Cytoskeleton,* **14**, 309-31.

Knippers, R. (1995). Molekulare Genetik. Georg Thieme Verlag (Stuttgart) 6. Auflage.

Knippschild, U., Kolzau, T., and Deppert, W. (1995). Cell-specific transcriptional activation of the mdm2-gene by ectopically expressed wild-type form of a temperature-sensitive mutant p53. *Oncogene,* **11**, 683-690.

Knippschild, U., Milne, D. M., Campbell, L. E., DeMaggio, A. J., Christenson, E., Hoekstra, M. F., and Meek, D. W. (1997). p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by the delta and epsilon isoforms of casein kinase 1 and enhances the level of casein kinase 1 delta in response to topoisomerase-directed drugs. *Oncogene,* **15**, 1727-1736.

Knippschild, U., Oren, M., and Deppert, W. (1996). Abrogation of wild-type p53 mediated growth-inhibition by nuclear exclusion. *Oncogene,* **12**, 1755-1765.

Ko, L. J., and Prives, C. (1996). p53: Puzzle and paradigm. *Genes Dev,* **10**, 1054-1072.

Kokunai, T., Kawamura, A., and Tamaki, N. (1997). Induction of differentiation by wild-type p53 gene in a human glioma cell line. *J Neurooncol,* **32**, 125-133.

Kovesi G, Szende B. (2003). Changes in apoptosis and mitotic index, p53 and Ki67 expression in various types of oral leukoplakia. *Oncology,* **65**, 331-6.

Kraiss, S., Quaiser, A., Oren, M., Montenarh, M. (1988). Oligomerization of oncoprotein p53. *J Virol,* **62**, 4737-4744.

Kreis, T. E., and Vale, R. D. (1993). Guidebook to Cytoskeletal and Motor Proteins. Oxford University Press (Oxford, UK).

Kress, M., May, E., Cassingena, R. and May, P. (1979). Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol,* **31**, 472-483.

Kubbutat, M. H., Jones, S. N., and Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature,* **387**, 299-303.

Kubbutat, M. H., Ludwig, R. L., Ashcroft, M., and Vousden, K. H. (1998). Regulation of Mdm2-directed degradation by the C terminus of p53. *Mol Cell Biol,* **18**, 5690-8.

Kudo, N., Khochbin, S., Nishi, K., Kitano, K., Yanagida, M., Yoshida, M., and Horinouchi, S. (1997). Molecular cloning and cell cycle-dependent expression of mammalian CRM1, a protein involved in nuclear export of proteins. *J Biol Chem,* **272**, 29742-51.

Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E. P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S., and Yoshida, M. (1998). Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res,* **242**, 540-7.

Kuehn, C., Mueller, F., Melle, C., Nasheuer, H. P., Janus, F., Deppert, W., and Grosse, F. (1999). Surface plasmon resonance measurements reveal stable complex formation between p53 and DNA polymerase alpha. *Oncogene,* **18**, 769-774.

LaBaer, J., Garrett, M. D., Stevenson, L. F., Slingerland, J. M., Sandhu, C., Chou, H. S., Fattaey, A., and Harlow, E. (1997). New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev,* **11**, 847-62.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature,* **227**, 680-5.

Lane, D. P. (1992). Cancer: p53, guardian of the genome. *Nature,* **358**, 15-16.

Lane, D. P., and Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature,* **278**, 261-263.

Lazarides, E. (1981). Intermediate filaments - chemical heterogeneity in differentiation. *Cell,* **23**, 649-650.

Leach, F. S., Tokino, T., Meltzer, P., Burrell, M., D, O. J., Smith, S., Hill, D. E., Sidransky, D., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). p53 mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res,* **53**, 2231-2234.

Lee, S., Cavallo, L., and Griffith, J. (1997). Human p53 Binds Holliday Junctions Strongly and Facilitates Their Cleavage. *J Biol Chem,* **272**, 7532-7539.

Lee, S., Elenbaas, B., Levine, A., and Griffith, J. (1995). p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell,* **81**, 1013-1020.

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M., and Boedtker, H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry,* **16**, 4743-51.

Levine AJ. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell,* **88**, 323-31.

Levine, A. J., Chang, A., Dittmer, D., Notterman, D. A., Silver, A., Thorn, K., Welsh, D., Wu, M. (1994). The p53 tumor suppressor gene. *J Lab Clin Med,* **123**, 817-823.

Lewin, B. (2003). Genes VIII. Oxford University Press (New York) 8th Edition.

Li, G., and Ho, V. C. (1998). p53-dependent DNA repair and apoptosis respond differently to high- and low-dose ultraviolet radiation. *Br J Dermatol,* **139**, 3-10.

Li, Y., Jenkins, C. W., Nichols, M. A., and Xiong, Y. (1994). Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene,* **9**, 2261-8.

Lianes, P., Orlow, I., Zhang, Z. F., Oliva, M. R., Sarkis, A. S., Reuter, V. E., and Cordon-Cardo, C. (1994). Altered patterns of MDM2 and TP53 expression in human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst,* **86**, 1325-30.

Liang SH, Clarke MF. (1999) A bipartite nuclear localization signal is required for p53 nuclear import regulated by a carboxyl-terminal domain. *J Biol Chem,* **274**, 32699-703.

Lin DL, Chang C. (1996). p53 is a mediator for radiation-repressed human TR2 orphan receptor expression in MCF-7 cells, a new pathway from tumor suppressor to member of the steroid receptor superfamily. *J Biol Chem*, **271**, 14649-52.

Lin, A. W., Barradas, M., Stone, J. C., Van Aelst, L., Serrano, M., and Lowe, S. W. (1998). Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev,* **12**, 3008-3019.

Lindahl T, Nyberg B. (1972). Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry,* **12**, 3610-8.

Lindstrom, M. S., U. Klangby, et al. (2001). p14ARF homozygous deletion or MDM2 overexpression in Burkitt lymphoma lines carrying wild type p53. *Oncogene,* **20**, 2171-7.

Linke, S. P., Clarkin, K. C., Di Leonardo, A., Tsou, A., and Wahl, G. M. (1996). A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes Dev,* **10**, 934-947.

Linzer, D.I.H. and Levine, A.J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumorantigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell,* **17**, 43-52.

Liu, L., Scolnick, D. M., Trievel, R. C., Zhang, H. B., Marmorstein, R., Halazonetis, T. D., Berger, S. L. (1999). p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol,* **19**, 1202-1209.

Ljungman M. (2000). Dial 9-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia,* **2**, 208-25.

Loeb LA. (1991). Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res,* **15**, 3075-9.

Loignon, M., Fetni, R., Gordon, A. J. E., and Drobetsky, E. A. (1997). A p53-independent pathway for induction of p21waf1cip1 and concomitant G1 arrest in UV-irradiated human skin fibroblasts. *Cancer Res,* **57**, 3390-3394.

Lowe, S. W., Schmitt, E. M., Smith, S. W., Osborne, B. A., and Jacks, T. (1993). p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature,* **362**, 847-849.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem,* **193**, 265-275.

Lu, H., Levine, A. J. (1995). Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 5154-5158.

Lu, W., Pochampally, R., Chen, L., Traidej, M., Wang, Y., and Chen, J. (2000). Nuclear exclusion of p53 in a subset of tumors requires MDM2 function. *Oncogene,* **19**, 232-40.

Macleod, K. F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B., and Jacks, T. (1995). p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev*, **9**, 935-944.

MacMillan-Crow, L. A., and Lincoln, T. M. (1994). High-affinity binding and localization of the cyclic GMP-dependent protein kinase with the intermediate filament protein vimentin. *Biochemistry,* **33**, 8035-43.

Maki, C. G. (1999). Oligomerization is required for p53 to be efficiently ubiquitinated by MDM2. *J Biol Chem,* **274**, 16531-5.

Malkin, D. (1993). p53 and the Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Genet Cytogenet,* **66**, 83-92.

Marchenko ND, Zaika A, Moll UM.(2000). Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem*, **275**, 16202-12.

Martinez, J. D., Craven, M. T., Joseloff, E., Milczarek, G., and Bowden, G. T. (1997). Regulation of DNA binding and transactivation in p53 by nuclear localization and phosphorylation. *Oncogene,* **14**, 2511-20.

Martinez, J., Georgoff, I., Martinez, J., and Levine, A. J. (1991). Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature- sensitive p53 protein. *Genes Dev,* **5**, 151-9.

Martins VR, Pratt WB, Terracio L, Hirst MA, Ringold GM, Housley PR. Demonstration by confocal microscopy that unliganded overexpressed glucocorticoid receptors are distributed in a nonrandom manner throughout all planes of the nucleus. *Mol Endocrinol,* **5**, 217-25.

Matsuda M, Katoh-Semba R, Kitani H, Tomooka Y. (1996). A possible role of the nestin protein in the developing central nervous system in rat embryos. *Brain Res,* **723**, 177-89.

Matsumoto, H., Shimura, M., Omatsu, T., Okaichi, K., Majima, and Ohnishi, T. (1994). p53 proteins accumulated by heat stress associate with heat shock proteins HSP72/HSC73 in human gliomlastoma cell lines. *Cancer Lett,* **87**, 39-46.

Maxwell, S. A., Ames, S. K., Sawai, E. T., Decker, G. L., Cook, R. G., and Butel, J. S. (1991). Simian virus 40 large T antigen and p53 are microtubule-associated proteins in transformed cells. *Cell Growth Differ,* **2**, 115-27.

May, P., and May, E. (1999). Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene,* **18**, 7621-36.

Mayr, G. A., Reed, M., Wang, P., Wang, Y., Schwedes, J. F., and Tegtmeyer, P. (1995). Serine phosphorylation in the NH2 terminus of p53 facilitates transactivation. *Cancer Res,* **55**, 2410-2417.

McCormick, M. B., Kouklis, P., Syder, A., and Fuchs, E. (1993). The roles of the rod end and the tail in vimentin IF assembly and IF network formation. *J Cell Biol,* **122**, 395-407.

Meek, D. W. (1999). Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene,* **18**, 7666-75.

Meisenhelder, J., and Hunter, T. (1988). Radioactive protein-labelling techniques. *Nature,* **335**, 120.

Mekeel, K. L., Tang, W., Kachnic, L. A., Luo, C. M., DeFrank, J. S., and Powell, S. N. (1997). Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. *Oncogene,* **14**, 1847-1857.

Mekeel, K.L., Tang, W., Kachnic, L.A., Luo, C.M., DeFrank, J.S. and Powell, S.N. (1997). Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. *Oncogene,* **14**, 1847-1857.

Mercer, W. E., Avignolo, C., and Baserga, R. (1984). Role of p53 protein in cell proliferation as studied by microinjection of monoclonal antibodies. *Mol Cell Biol,* **4**, 276-281.

Merkulova, T.I., Merkulov, V.M., and Mitina, R.L. Glucocorticoid Regulation Mechanisms and Glucocorticoid-controlled Gene Regulatory Regions: Description in the TRRD Database. *http://wwwmgs.bionet.nsc.ru/mgs/papers/merkulova/gluc/*

Metcalfe, S., Weeds, A., Okorokov, A. L., Milner, J., Cockman, M., and Pope, B. (1999). Wild-type p53 protein shows calcium-dependent binding to F-actin. *Oncogene,* **18**, 2351-5.

Michalovitz, D., Halevy, O., and Oren, M. (1990). Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell,* **62**, 671-80.

Middeler, G., Zerf, K., Jenovai, S., Thulig, A., Tschodrich-Rotter, M., Kubitscheck, U., and Peters, R. (1997). The tumor suppressor p53 is subject to both nuclear import and export, and both are fast, energy-dependent and lectin-inhibited. *Oncogene,* **14**, 1407-17.

Midgley, C. A., and Lane, D. P. (1997). p53 protein stability in tumour cells is not determined by mutation but is dependent on Mdm2 binding. *Oncogene,* **15**, 1179-89.

Milner, J., and Medcalf, E. A. (1990). Temperature-dependent switching between "wild-type" and "mutant" forms of p53-Val135. *J Mol Biol,* **216**, 481-4.

Milner, J., and Medcalf, E. A. (1991). Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell,* **65**, 765-74.

Milner, J., Medcalf, E. A., and Cook, A. C. (1991). Tumor suppressor p53: analysis of wild-type and mutant p53 complexes. *Mol Cell Biol,* **11**, 12-9.

Mirzayans, R., Enns, L., Dietrich, K., Barley, R. D. C., and Paterson, M. C. (1996). Faulty DNA polymerase delta/epsilon-mediated excision repair in response to gamma radiation or ultraviolet light in p53-deficient fibroblast strains from affected members of a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Carcinogenesis,* **17**, 691-698.

Miyashita, T., and Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell,* **80**, 293-9.

Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B., and Reed, J. C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene,* **9**, 1799-1805.

Miyata Y, Yahara I. (1991). Cytoplasmic 8 S glucocorticoid receptor binds to actin filaments through the 90-kDa heat shock protein moiety. *J Biol Chem,* **266**, 8779-83.

Moll, U. M., LaQuaglia, M., Benard, J., and Riou, G. (1995). Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. *Proc Natl Acad Sci USA,* **92**, 4407-11.

Moll, U. M., Ostermeyer, A. G., Haladay, R., Winkfield, B., Frazier, M., and Zambetti, G. (1996). Cytoplasmic sequestration of wild-type p53 protein impairs the G1 checkpoint after DNA damage. *Mol Cell Biol,* **16**, 1126-1137.

Moll, U. M., Riou, G., and Levine, A. J. (1992). Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci USA,* **89**, 7262-6.

Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., and Levine, A. J. (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell,* **69**, 1237-45.

Mosner, J., Mummenbrauer, T., Bauer, C., Sczakiel, G., Grosse, F., and Deppert, W. (1995). Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *Embo J,* **14**, 4442-4449.

Muller L, Schaupp A, Walerych D, Wegele H, Buchner J. (2004). Hsp90 regulates the activity of wild type p53 under physiological and elevated temperatures. *J Biol Chem,* in press.

Muller S, Ledl A, Schmidt D. (2004). SUMO: a regulator of gene expression and genome integrity. *Oncogene,* **23**, 1998-2008.

Müller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S. L., Galle, P. R., Stremmel, W., Oren, M., and Krammer, P. H. (1998). p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med,* **188**, 2033-2045.

Mummenbrauer, T., Janus, F., Muller, B., Wiesmuller, L., Deppert, W., and Grosse, F. (1996). p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell,* **85**, 1089-1099.

Munck A, Holbrook NJ. (1984). Glucocorticoid-receptor complexes in rat thymus cells. Rapid kinetic behavior and a cyclic model. *J Biol Chem*, **259**, 820-31.

Mundt, M., Hupp, T., Fritsche, M., Merkle, C., Hansen, S., Lane, D., and Groner, B. (1997). Protein interactions at the carboxyl terminus of p53 result in the induction of its in vitro transactivation potential. *Oncogene,* **15**, 237-244.

Murphy, K. L. and J. M. Rosen (2000). Mutant p53 and genomic instability in a transgenic mouse model of breast cancer. *Oncogene,* **19**, 1045-51.

Nakano, K., Mizuno, T., Sowa, Y., Orita, T., Yoshino, T., Okuyama, Y., Fujita, T., Ohtani-Fujita, N., Matsukawa, Y., Tokino, T., Yamagishi, H., Oka, T., Nomura, H., and Sakai, T. (1997). Butyrate activates the WAF1/Cip1 gene promoter through Sp1 sites in a p53-negative human colon cancer cell line. *J Biol Chem,* **272**, 22199-206.

Nedbal, W., Frey, M., Willemann, B., Zentgraf, H., and Sczakiel, G. (1997). Mechanistic insights into p53-promoted RNA-RNA annealing. *J Mol Biol,* **266**, 677-687.

Ngai, J., Coleman, T. R., and Lazarides, E. (1990). Localization of newly synthesized vimentin subunits reveals a novel mechanism of intermediate filament assembly. *Cell,* **60**, 415-27.

Nicolai, S., Willems, J., Zwijsen, A., Van Mechelen, E., and Slegers, H. (1996). Cyclic AMP-induced differentiation increases the synthesis of extracellular superoxide dismutase in rat C6 glioma. *Free Radic Biol Med,* **21**, 481-6.

Oberosler, P., Hloch, P., Ramsperger, U., and Stahl, H. (1993). p53-catalyzed annealing of complementary single-stranded nucleic acids. *EMBO J,* **12**, 2389-2396.

Ogryzko VV, Wong P, Howard BH. (1997). WAF1 retards S-phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol,* **17**, 4877-82.

Ohnishi, T., Wang, X., Ohnishi, K., Matsumoto, H. and Takahashi, A. (1996). p53-dependent induction of WAF1 by heat treatment in human glioblastoma cells. *J Biol Chem*, **271**, 14510-3.

Oliner, J.D., Pietenpol, J.A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1993). Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature*, **362**, 857-60.

Oren, M. (1985). The p53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochim Biophys Acta*, **823**, 67-78.

Orend, G., Hunter, T., and Ruoslahti, E. (1998). Cytoplasmic displacement of cyclin E-cdk2 inhibitors p21Cip1 and p27Kip1 in anchorage-independent cells. *Oncogene,* **16**, 2575-83.

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol,* **4**, 552-65.

Osborn, M., and Weber, K. (1983). Tumor diagnosis by intermediate filament typing. *Lab Invest,* **48**, 372-394.

Ou, H. C., Jea-Chien, E., and Sun, S. H. (1997). Sodium butyrate decreases histamine-stimulated calcium mobilization in C6 glioma cells. *Neuroreport,* **8**, 1375-8.

Owen, P. J., Johnson, G. D., and Lord, J. M. (1996). Protein kinase C-delta associates with vimentin intermediate filaments in differentiated HL60 cells. *Exp Cell Res*, **225**, 366-73.

Owen-Schaub, L.B., Zhang, W., Cusack, J.C., Angelo, L.S., Santee, S.M., Fujiwara, T., Roth, J.A., Deisseroth, A.B., Zhang, W.W., Kruzel, E. and et al. (1995) Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol*, **15**, 3032-40.

Palecek, E., Brazdova, M., Brazda, V., Palecek, J., Billova, S., Subramaniam, V., Jovin, T. M. (2001). Binding of p53 and its core domain to supercoiled DNA. *Eur J Biochem,* **268**, 573-581.

Parada, L. F., Land, H., Weinberg, R. A., Wolf, D., and Rotter, V. (1984). Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. *Nature,* **312**, 649-651.

Parker, S. B., Eichele, G., Zhang, P., Rawls, A., Sands, A. T., Bradley, A., Olson, E. N., Harper, J. W., and Elledge, S. J. (1995). p53-independent expresion of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science,* **267**, 1024-1027.

Patschinsky, T., and Deppert, W. (1990). Phosphorylation of p53 in primary, immortalized, and transformed Balb/c mouse cells. *Oncogene,* **5**, 1071-1076.

Picard D, Yamamoto KR. (1987). Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J,* **6**, 3333-40.

Poppenborg, H., Munstermann, G., Knupfer, M. M., Hotfilder, M., and Wolff, J. E. (1997). C6 cells cross-resistant to cisplatin and radiation. *Anticancer Res,* **17**, 2073-7.

Reifenberger, G., Liu, L., Ichimura, K., Schmidt-E, E., and Collins, V. P. (1993). Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res,* **53**, 2736-2739.

Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Midgley, C. A., Lane, D. P., and Hay, R. T. (1999). SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *Embo J,* **18**, 6455-61.

Rogatsky I, Hittelman AB, Pearce D, Garabedian MJ. (1999). Distinct glucocorticoid receptor transcriptional regulatory surfaces mediate the cytotoxic and cytostatic effects of glucocorticoids. *Mol Cell Biol*, **19**, 5036-49.

Rogers, K. R., Eckelt, A., Nimmrich, V., Janssen, K. P., Schliwa, M., Herrmann, H., and Franke, W. W. (1995). Truncation mutagenesis of the non-alpha-helical carboxyterminal tail domain of vimentin reveals contributions to cellular localization but not to filament assembly. *Eur J Cell Biol,* **66**, 136-150.

Röser, K., Bohn, W., Giese, G., and Mannweiler, K. (1991). Subclones of C6 rat glioma cells differing in intermediate filament protein expression. *Exp Cell Res,* **197**, 200-6.

Rotter V, Abutbul H, Ben-Ze'ev A. (1983). P53 transformation-related protein accumulates in the nucleus of transformed fibroblasts in association with the chromatin and is found in the cytoplasm of non-transformed fibroblasts. *EMBO J,* **2**, 1041-7

Ruaro, E. M., Collavin, L., Del Sal, G., Haffner, R., Oren, M., Levine, A. J., and Schneider, C. (1997). A proline-rich motif in p53 is required for transactivation-independent growth arrest as induced by Gas1. *Proc Natl Acad Sci USA,* **94**, 4675-80.

Sackey FN, Hache RJ, Reich T, Kwast-Welfeld J, Lefebvre YA. (1996). Determinants of subcellular distribution of the glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol,* **10**, 1191-205.

Sakaguchi, K., Herrera, J. E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C. W., and Appella, E. (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev,* **12**, 2831-2841.

Sakamuro, D., Sabbatini, P., White, E. and Prendergast, G.C. (1997). The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene*, **15**, 887-898.

Sanchez ER, Hirst M, Scherrer LC, Tang HY, Welsh MJ, Harmon JM, Simons SS Jr, Ringold GM, Pratt WB. (1990). Hormone-free mouse glucocorticoid receptors overexpressed in Chinese hamster ovary cells are localized to the nucleus and are associated with both hsp70 and hsp90. *J Biol Chem,* **265,** 20123-30.

Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H., and Elledge, S. J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science,* **277**, 1497-1501.

Sayama, K., Shirakata, Y., Midorikawa, K., Hanakawa, Y., and Hashimoto, K. (1999). Possible involvement of p21 but not of p16 or p53 in keratinocyte senescence. *J Cell Physiol,* **179**, 40-44.

Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., and Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell,* **63**, 1129-1136.

Scherrer LC, Pratt WB. Energy-dependent conversion of transformed cytosolic glucocorticoid receptors from soluble to particulate-bound form. *Biochemistry,* **31**, 10879-86.

Schlamp, C. L., Poulsen, G. L., Nork, T. M., and Nickells, R. W. (1997). Nuclear exclusion of wild-type p53 in immortalized human retinoblastoma cells. *J Natl Cancer Inst,* **89**, 1530-6.

Schneider, E., Montenarh, M., and Wagner, P. (1998). Regulation of CAK kinase activity by p53. *Oncogene,* **17**, 2733-41.

Schuler, M., Bossy-Wetzel, E., Goldstein, J. C., Fitzgerald, P., and Green, D. R. (2000). p53 Induces Apoptosis by Caspase Activation through Mitochondrial Cytochrome c Release. *J Biol Chem,* **275**, 7337-7342.

Schwaller, J., Koeffler, H. P., Niklaus, G., Loetscher, P., Nagel, S., Fey, M. F., and Tobler, A. (1995). Posttranscriptional stabilization underlies p53-independent induction of p21WAF1/CIP1/SDI1 in differentiating human leukemic cells. *J Clin Invest,* **95**, 973-979.

Seeler, J. S., and Dejean, A. (1999). The PML nuclear bodies: actors or extras? *Curr Opin Genet Dev,* **9**, 362-367.

Sembritzki O, Hagel C, Lamszus K, Deppert W, Bohn W. (2002). Cytoplasmic localization of wild-type p53 in glioblastomas correlates with expression of vimentin and glial fibrillary acidic protein. *Neurooncol,* **4**, 171-178.

Sengupta S, Vonesch JL, Waltzinger C, Zheng H, Wasylyk B. (2000). Negative cross-talk between p53 and the glucocorticoid receptor and its role in neuroblastoma cells. *EMBO J,* **19**, 6051-64

Sengupta S, Wasylyk B. (2001). Ligand-dependent interaction of the glucocorticoid receptor with p53 enhances their degradation by Hdm2. *Genes Dev,* **15**, 2367-80.

Shaulsky, G., Ben-Ze'ev, A., and Rotter, V. (1990). Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle of Balb/c 3T3 cells. *Oncogene,* **5**, 1707-11.

Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben-Ze'ev, A., and Rotter, V. (1990). Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol Cell Biol,* **10**, 6565-77.

Shaulsky, G., Goldfinger, N., Peled, A., and Rotter, V. (1991). Involvement of wild-type p53 protein in the cell cycle requires nuclear localization. *Cell Growth Differ,* **2**, 661-7.

Shaulsky, G., Goldfinger, N., Tosky, M. S., Levine, A. J., and Rotter, V. (1991). Nuclear localization is essential for the activity of p53 protein. *Oncogene,* **6**, 2055-65.

Shaw, P., Bovey, R., Tardy, S., Sahli, R., Sordat, B. and Costa, J. (1992) Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**, 4495-4499.

Shieh SY, Ahn J, Tamai K, Taya Y, Prives C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev,* **14**, 289-300.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem,* **150**, 76-85.

Soussi, T., de Fromentel, C. C., and May, P. (1990). Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene,* **5**, 945-952.

Stein, G. H., Namba, M., and Corsaro, C. M. (1985). Relationship of finite proliferative lifespan, senescence, and quiescence in human cells. *J Cell Physiol,* **122**, 343-9.

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

Stommel, J. M., Marchenko, N. D., Jimenez, G. S., Moll, U. M., Hope, T. J., and Wahl, G. M. (1999). A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *Embo J,* **18**, 1660-72.

Stryer, L. (1995). Biochemie. Spektrum, 4 Auflage.

Stürzbecher, H. W., Brain, R., Addison, C., Rudge, K., Remm, M., Grimaldi, M., Keenan, E., and Jenkins, J. R. (1992). A C-terminal a-helix plus basic region motif is the major structural determinant of p53 tetramerization. *Oncogene*, **7**, 1513-1523.

Stürzbecher, H. W., Donzelmann, B., Henning, W., Knippschild, U., and Buchhop, S. (1996). p53 is linked directly to homologous recombination processes via Rad51/Reca protein interaction. *Embo J,* **15**, 1992-2002.

Sugrue, M. M., Shin, D. Y., Lee, S. W., and Aaronson, S. A. (1997). Wild-type p53 triggers a rapid senescence program in human tumor cells lacking functional p53. *Proc Natl Acad Sci USA,* **94**, 9648-53.

Szapary D, Barber T, Dwyer NK, Blanchette-Mackie EJ, Simons SS Jr. (1994). Microtubules are not required for glucocorticoid receptor mediated gene induction. *J Steroid Biochem Mol Biol,* **51**, 43-8.

Tahara, H., Sato, E., Noda, A., and Ide, T. (1995). Increase in expression level of p21sdi1/cip1/waf1 with increasing division age in both normal and SV40-transformed human fibroblasts. *Oncogene,* **10**, 835-840.

Takahashi, K., and Suzuki, K. (1994). DNA synthesis-associated nuclear exclusion of p53 in normal human breast epithelial cells in culture. *Oncogene,* **9**, 183-8.

Takenaka, I., Morin, F., Seizinger, B. R., and Kley, N. (1995). Regulation of the sequence-specific DNA binding function of p53 by protein kinase C and protein phosphatases. *J Biol Chem,* **270**, 5405-5411.

Tao, W., and Levine, A. J. (1999). P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci USA,* **96**, 6937-41.

Thut, C.J., Chen, J.-L., Klemm, R. and Tjian, R. (1995). p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science*, **267**, 100-104.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA,* **76**, 4350-4.

Traub, P., and Vorgias, C. E. (1983). Involvement of the N-terminal polypeptide of vimentin in the formation of intermediate filaments. *J Cell Sci,* **63**, 43-67.

Vaziri, H., West, M. D., Allsopp, R. C., Davison, T. S., Wu, Y. S., Arrowsmith, C. H., Poirier, G. G., and Benchimol, S. (1997). ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly(ADP-ribose) polymerase. *Embo J,* **16**, 6018-6033.

Venot, C., Maratrat, M., Dureuil, C., Conseiller, E., Bracco, L. and Debussche, L. (1998). The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *Embo J*, **17**, 4668-4679.

Vielkind U, Walencewicz A, Levine JM, Bohn MC. (1990). Type II glucocorticoid receptors are expressed in oligodendrocytes and astrocytes. *J Neurosci Res*, **27**, 360-73.

Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M. and Bos, J.L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, **319**, 525-32.

Vorgias CE, Perides GA, Traub P, Sekeris CE. (1988). Colchicine, colcemide and cytochalasin B do not affect translocation of the glucocorticoid hormone-receptor in rat thymocytes or Ehrlich ascites cells. *Biosci Rep,* **8**, 193-7.

Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature,* **369**, 574-8.

Walker, K. K., and Levine, A. J. (1996). Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci USA,* **93**, 15335-15340.

Wang, X. W., Yeh, H., Schaeffer, L., Roy, R., Moncollin, V., Egly, J.-M., Wang, Z., Friedberg, E. C., Evans, M. K., Taffe, B. G., Bohr, V. A., Weeda, G., Hoeijmakers, J. H. J., Forrester, K., and Harris, C. C. (1995). p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nature Genet,* **10**, 188-195.

Webster JC, Jewell CM, Bodwell JE, Munck A, Sar M, Cidlowski JA. (1997). Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein. *J Biol Chem,* **272**, 9287-93.

Weigele, M., De Bernardo, S., and Leimgruber, W. (1973). Fluorescent labeling of proteins. A new methodology. *Biochem Biophys Res Commun,* **54**, 899-906.

White, E. (1996). Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev,* **10**, 1-15.

Wiesmüller, L., Cammenga, J., and Deppert, W. (1996). In vivo assay of p53 function in homologous recombination between simian virus 40 chromosomes. *J Virol,* **70**, 737-744.

Wikstrom AC, Bakke O, Okret S, Bronnegard M, Gustafsson JA. (1987). Intracellular localization of the glucocorticoid receptor: evidence for cytoplasmic and nuclear localization. *Endocrinology,* **120**, 1232-42.

Wilkins, J. A., and Lin, S. (1981). Association of actin with chromaffin granule membranes and the effect of cytochalasin B on the polarity of actin filament elongation. *Biochim Biophys Acta,* **642**, 55-66.

Wolf, D., Admon, S., Oren, M. and Rotter, V. (1984). Abelson murine leukemia virustransformed cells that lack p53 protein synthesis express aberrant p53 mRNA species. *Mol Cell Biol*, **4**, 552-558.

Wolffe AP. (1997). Chromatin remodeling regulated by steroid and nuclear receptors. *Cell Res,* **7**, 127-42.

Wynford-Thomas, D. (1996). p53: guardian of cellular senescence. *J Pathol*,**180**, 118-21.

Wynford-Thomas, D. (1999). Cellular senescence and cancer. *J Pathol,* **187**, 100-111.

Xiao, H., Pearson, A., Coulombe, B., Truant, R., Zhang, S., Regier, J. L., Trizenberg, S. J., Reinberg, D., Flores, O., and Ingles, C. J. (1994). Binding of basal transcription factor TFIIH to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Mol Cell Biol,* **14**, 7013-7024.

Yakovleva, T., Pramanik, A., Terenius, L., Ekstrom, T., Bakalkin, G. (2002). p53 latency - out of the blind alley. *Trends Biochem Sci,* **27**, 612-618.

Yamato, K., Yamamoto, M., Hirano, Y., and Tsuchida, N. (1995). A human temperature-sensitive p53 mutant p53Val-138: modulation of the cell cycle, viability and expression of p53-responsive genes. *Oncogene,* **11**, 1-6.

Yang, J., Winkler, K., Yoshida, M., and Kornbluth, S. (1999). Maintenance of G2 arrest in the Xenopus oocyte: a role for 14-3-3-mediated inhibition of Cdc25 nuclear import. *Embo J,* **18**, 2174-83.

Yang J, Cheng L, Yan Y, Bian W, Tomooka Y, Shiurba R, Jing N. (2001). Mouse nestin cDNA cloning and protein expression in the cytoskeleton of transfected cells. *Biochim Biophys Acta*, **1520**, 251-254.

Yap N, Yu CL, Cheng SY. Modulation of the transcriptional activity of thyroid hormone receptors by the tumor suppressor p53. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93,** 4273-7.

Yew, P.R. and Berk, A.J. (1992). Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature*, **357**, 82-85.

Yewdell, J. W., Gannon, J. V., and Lane, D. P. (1986). Monoclonal antibody analysis of p53 expression in normal and transformed cells. *J, Virol,* **59**, 444-452.

Yu CL, Driggers P, Barrera-Hernandez G, Nunez SB, Segars JH, Cheng S. (1997). The tumor suppressor p53 is a negative regulator of estrogen receptor signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun,* **239**, 617-20

Yudt MR, Cidlowski JA. (2002). The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol,* **16**, 1719-26.

Zaika, A., Marchenko, N., and Moll, U. M. (1999). Cytoplasmically "Sequestered" wild type p53 protein is resistant to Mdm2-mediated degradation. *J Biol Chem,* **274**, 27474-80.

Zhang, W., Yamada, H., Sakai, N., and Nozawa, Y. (1993). Sensitization of C6 glioma cells to radiation by staurosporine, a potent protein kinase C inhibitor. *J Neurooncol,* **15**, 1-7.

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Abteilung Tumorvirologie am Heinrich-Pette Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie (HPI) angefertigt und aus den Mitteln der Deutschen Krebshilfe e.V. gefördert.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert und Herrn PD Dr. Wolfgang Bohn für die Möglichkeit, an diesem interessanten Thema zu forschen. Herrn W. Bohn danke ich für seine kompetente Betreuung, jederzeitige Unterstützung bei Problemen und für die Gewährleistung großzügiger Freiräume bei meiner Arbeit.

Herrn PD Dr. Quader danke herzlichst für die freundliche und unkomplizierte Übernahme des Dissertationsgutachtens.

Darüber hinaus danke ich ganz besonders (alphabetisch) Dr. S. Heinrichs, Dr. J. Heukeshoven, Dr. E. Kim, Dr. G. Rohaly, Dr. D. Speidel, Dr. G. Tolstonog für das jederzeitige Bereitstellen ihres exzellenten fachlichen Wissens.

Frau Christina Heinlein danke ich herzlich für die Bereitstellung der MEF´s; Frau Jing Yang (Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai) für die Bereitstellung des Nestin-Expressionsvektors.

Frau Martina Hintz-Malchow bin ich für die Unterstützung bei jeglichen Problemen formaler Art dankbar. Für die Förderung meines Basteldranges danke ich Frau Doris Weidemann.

Selbstverständlich bin ich der ganzen Abteilung 3 einen Dank für die freundliche und nette Atmosphäre während meiner gesamten Promotionszeit schuldig.