

# **Neue Funktionen des p53-Tumorsuppressors an den Mitochondrien und im Zellkern**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III  
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften  
der Universität des Saarlandes

von

Kristina Heyne

Saarbrücken

2007

Tag des Kolloquiums: .....

Dekan: .....

Berichtersteller: .....

Meiner Familie gewidmet

Die Experimente zu der vorliegenden Arbeit wurden in den ersten eineinhalb Jahren am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung Virologie sowie in den restlichen eineinhalb Jahren am Lehrstuhl/Institut Innere Medizin I im José-Carreras-Zentrum der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar durchgeführt.

Teile dieser Arbeit werden bzw. wurden veröffentlicht in:

**Heyne Kristina, Schmitt Katrin, Mueller Daniel, Armbruester Vivienne, Mestres Pedro, and Roemer Klaus (2007):** Resistance of mitochondrial p53 to dominant inhibition. *Zur Veröffentlichung eingereicht.*

**Hublitz Philip, Kunowska Natalia, Mayer Ulrich P., Müller Judith M., Heyne Kristina, Yin Na, Fitzsche Claudia, Poli Cecilia, Miguet Laurent, Schupp Ingo W., van Grunsven Leo A., Potiers Noëlle, van Dorselaer Alain, Metzger Eric, Roemer Klaus, and Schüle Roland (2005):** NIR is a novel INHAT repressor that modulates the transcriptional activity of p53. *Genes & Development, 19: 2912-2924*

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

13. September 2004	8. Saar-Lor-Lux Meeting on Virus Research, Homburg
22. Mai 2006	International p53 Conference, New York

Erstgutachter: Prof. Dr. Klaus Römer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Nikolaus Müller-Lantzsch

## *Danksagung*

Herrn Prof. Dr. K. Römer danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die ausgezeichnete Betreuung, seine stete Bereitschaft zur Diskussion und Hilfe, für die kritische Durchsicht dieser Arbeit und für das sehr gute Arbeitsklima.

Herrn Prof. Dr. N. Müller-Lantzsch danke ich für die Aufnahme in den Arbeitskreis seines Instituts für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, für die Förderung dieser Arbeit und sein Vertrauen, sowie die Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M. Pfreundschuh danke ich für die Möglichkeit, die restliche Zeit meines Promotionsvorhabens in dem Arbeitskreis seines Instituts für Innere Medizin I zu absolvieren und für die netten gesellschaftlichen Veranstaltungen, an denen er mich hat teilhaben lassen.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Römer, die mich während meiner Promotion begleitet haben, bedanke ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit und das ausgezeichnete Arbeitsklima. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Nicole Dubois, Frau Dr. Sawsan Abou-Omar und Frau Monika Müller, ohne die unser erster Todtnau-Aufenthalt nur halb so lustig gewesen wäre. Bei Frau Dipl. Biol. Nina Raulf bedanke ich mich für ihre stete Diskussionsbereitschaft, meine Arbeit und fußballerische Fragen betreffend. Herrn Dr. Jörg Bittenbring und Herrn Dipl. Biol. Daniel Müller bin ich wegen ihres immerwährenden Interesses am Fortgang dieser Arbeit, ihrer Diskussions- und Hilfsbereitschaft und der vielen lustigen Stunden, die wir gemeinsam im Labor verbrachten, zu Dank verpflichtet. Bei Frau Katrin Schmitt und Frau cand. Biol. Sarah-Lena Puhl möchte ich mich ebenfalls für die heitere Zeit in unseren beiden „verschiedenen“ Sektoren bedanken.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Virologie und auch des Instituts für Innere Medizin I danke ich für das freundliche und angenehme Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft bei den Problemen des Laboralltags.

Ein ganz besonderer und herzlicher Dank gilt meiner Familie, die mich während dieser Arbeit immer unterstützt, fortwährend motiviert und mir in allen Phasen dieser Arbeit Verständnis entgegengebracht hat.

Bei meinem Freund Andreas Luckas möchte ich mich für die stete Geduld bedanken, die er mir während des Studiums entgegengebracht hat, dass er mich stets motiviert und bei allen Problemen, die während meiner Arbeit auftraten, mit aller Kraft unterstützt hat.

<b>I. Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>II. Verzeichnis der Abbildungen.....</b>	<b>X</b>
<b>III. Verzeichnis der Abkürzungen.....</b>	<b>XV</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Tumorentstehung und Tumorprogression.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Das Tumorsuppressorprotein p53.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Der Aufbau von p53 .....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 p53 im Zellkern .....</b>	<b>5</b>
1.4.1 p53 als Aktivator der Genexpression .....	5
1.4.2 p53 als Transkriptionsrepressor .....	8
1.4.3 Regulation der Transaktivierungsfunktion von p53 .....	9
1.4.3.1 p53-Regulation durch posttranslationale Modifikationen.....	9
1.4.3.1.1 Phosphorylierung.....	9
1.4.3.1.2 Acetylierung.....	10
1.4.3.1.3 Sumoylierung.....	10
1.4.3.1.4 Methylierung .....	10
1.4.3.1.5 Ubiquitinylierung .....	11
1.4.3.2 p53-Aktivierung durch Co-Aktivatoren und Co-Repressoren .....	11
1.4.3.2.1 p53-Aktivierung durch die Co-Aktivatoren Histon-Acetyltransferasen.....	12
1.4.3.2.2 p53-Aktivierung durch die Co-Aktivatoren Histon-Methyltransferasen.....	13
1.4.3.2.3 Co-Repressoren: Histon-Deacetylasen.....	13
1.4.3.2.4 Co-Repressoren: Inhibitoren der Histon-Acetyltransferasen.....	13

---

1.4.3.2.4.1	NIR, ein neuer INHAT repressor .....	14
1.4.3.2.4.2	p53 und NIR .....	16
1.4.3.3	Der p53-Hauptantagonist Mdm2 .....	16
<b>1.5</b>	<b>Extranukleäre Funktionen von p53.....</b>	<b>18</b>
1.5.1	Direkte Bindung und Antagonisierung von antiapoptotischem BclXL/2 durch p53 .....	19
1.5.2	Direkte Aktivierung von proapoptotischem Bax durch p53.....	20
1.5.3	Direkte Aktivierung von cytosolischem Bax durch p53.....	21
<b>1.6</b>	<b>Mutierte Formen des p53-Tumorsuppressors .....</b>	<b>23</b>
1.6.1	Funktionsverlustmutation (Loss-of-function).....	26
1.6.2	Funktionszugewinnmutation (Gain-of-function) .....	26
1.6.3	Dominant-negativer Effekt.....	27
<b>1.7</b>	<b>Die p53-Genfamilie .....</b>	<b>29</b>
1.7.1	Der Transkriptionsfaktor p73.....	31
1.7.1.1	$\Delta$ N-p73-Isoformen.....	32
1.7.1.2	Der dominant-negative Effekt der $\Delta$ N-p73-Isoformen .....	33
<b>1.8</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>34</b>
<b>2</b>	<b>Material.....</b>	<b>36</b>
<b>2.1</b>	<b>Chemikalien, Filter, Membranen .....</b>	<b>36</b>
<b>2.2</b>	<b>Puffer.....</b>	<b>39</b>
<b>2.3</b>	<b>Enzyme.....</b>	<b>40</b>
<b>2.4</b>	<b>Größen- und Molekulargewichtsmarker .....</b>	<b>41</b>
2.4.1	DNA- Größenmarker .....	41
2.4.2	Proteingewichtsmarker.....	42
2.4.3	Primärantikörper.....	43

---

2.4.4	Sekundärantikörper .....	44
<b>2.5</b>	<b>Bakterienstämme .....</b>	<b>44</b>
<b>2.6</b>	<b>Nährmedien zur Kultivierung von <i>E.coli</i> .....</b>	<b>44</b>
<b>2.7</b>	<b>Lösungen zur präparativen Plasmid-DNA-Isolierung .....</b>	<b>45</b>
<b>2.8</b>	<b>Zelllinien.....</b>	<b>46</b>
2.8.1	WS-1 .....	46
2.8.2	HCT116.....	46
2.8.3	HCT116 p53-/- .....	46
2.8.4	HCT116 p53-/- pBabePuro.....	46
2.8.5	HCT116 p53-/- R175HPuro.....	46
2.8.6	HCT116 p53-/- R273HPuro.....	46
2.8.7	MCF7 .....	47
2.8.8	H1299 .....	47
2.8.9	HEK 293GP.....	47
<b>2.9</b>	<b>Medien und Lösungen für die Zellkultur .....</b>	<b>47</b>
<b>2.10</b>	<b>Small interfering RNAs (siRNAs) .....</b>	<b>48</b>
2.10.1	NIR-siRNA.....	48
2.10.2	p53-siRNA.....	48
2.10.3	Mdm2-siRNA.....	48
2.10.4	Kontroll-siRNA.....	49
<b>2.11</b>	<b>Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....</b>	<b>49</b>
<b>2.12</b>	<b>Lösungen für den Western-Blot.....</b>	<b>49</b>
<b>2.13</b>	<b>Synthetische Oligonukleotide („Primer“).....</b>	<b>50</b>
2.13.1	Primer für die ChIP-Analysen.....	50
2.13.2	Primer für RNA-Analysen .....	50

2.13.3	Primer für die Klonierung des <i>p53</i> -Gens in pDsRed-N1 .....	51
2.13.4	Primer für die Amplifikation der mitochondrialen Sonden.....	51
<b>2.14</b>	<b>Vektoren.....</b>	<b>52</b>
2.14.1	PCR-Klonierungsvektor.....	52
2.14.1.1	pGEM-T (Promega) .....	52
2.14.1.2	pCR®2.1-TOPO .....	52
2.14.2	Das Reporterplasmid pGL2-Basic.....	53
2.14.3	Effektorplasmide .....	54
2.14.3.1	pCMV-p53.....	54
2.14.3.2	pCMX-Flag-Nir .....	54
2.14.4	Kontrollvektoren .....	55
2.14.4.1	pCMV-pA .....	55
2.14.4.2	pWAF-Luc .....	56
2.14.4.3	pWAF-Luc $\Delta$ p53-Bindungstelle .....	56
2.14.5	Fluoreszenzvektoren.....	57
2.14.5.1	pDsRed-Express-N1 .....	57
2.14.5.2	pDsRed-Express-N1-p53.....	58
2.14.6	Vektoren zur Herstellung stabiler Zelllinien mittels retroviraler Infektion . .....	59
2.14.6.1	Der retrovirale Vektor pLRNL.....	59
2.14.6.2	Die retroviralen Vektoren pLRNL p53 R175H bzw. R273H.....	60
2.14.6.3	Die retroviralen Vektoren pLRNL-p53 R175H $\Delta$ C bzw. R273H $\Delta$ C	60
2.14.6.4	Die retroviralen Vektoren pLRNL-p53 R175H $\Delta$ O bzw. R273H $\Delta$ O	61
2.14.6.5	Der retrovirale Vektor pLRNL $\Delta$ N-p73.....	62
2.14.6.6	Der retrovirale Vektor pBabePuro .....	62
2.14.6.7	Der retrovirale Vektor pBabePuro p53-337C .....	63
2.14.6.8	Der retrovirale Vektor pLXSN-p53 DD .....	64
2.14.6.9	Der Vektor pCMV-G.....	64
<b>2.15</b>	<b>Computersoftware.....</b>	<b>65</b>

---

<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>66</b>
<b>3.1</b>	<b>Kultivierung eukaryotischer Zellen.....</b>	<b>66</b>
3.1.1	Kultivierung von WS-1-Zellen.....	66
3.1.2	Kultivierung von HCT116-Zellen .....	67
3.1.3	Kultivierung von MCF7-Zellen .....	67
3.1.4	Kultivierung von H1299-Zellen .....	67
3.1.5	Kultivierung von HEK 293GP-Zellen .....	67
3.1.6	Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen.....	68
3.1.7	Zellzahlbestimmung mit dem Zellanalysegerät CASY.....	68
3.1.8	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen.....	69
3.1.9	Transiente Transfektion mit Nanofectin.....	69
3.1.10	Cotransfektion von Reportergenen und Reporterassays .....	70
3.1.11	Transiente Transfektionen mit RNAiFect® (Qiagen).....	70
3.1.12	Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen.....	71
3.1.12.1	Pseudotypisierte Retroviren .....	71
3.1.12.2	Herstellung infektiöser Retroviren .....	72
3.1.12.3	Virusinfektion eukaryotischer Zellen und Herstellung "bulk"- infizierter Zelllinien .....	72
3.1.13	Bestimmung der Transfektionseffizienz .....	73
3.1.13.1	Fixierung von mit FITC-gekoppelter Kontroll-siRNA transfizierter Zellen mittels FACS-Fix .....	73
3.1.14	Kolonieformierungsassay .....	74
3.1.15	Erstellung von Wachstumskurven .....	74
3.1.16	Apoptose-Assays .....	75
3.1.16.1	DNA-Färbung mit Propidiumiodid .....	75
3.1.16.2	Annexin V-Färbung .....	76
3.1.16.3	Durchflusszytometrie.....	77
<b>3.2</b>	<b>Kultivierung von Bakterien.....</b>	<b>77</b>
3.2.1	Kultivierung von <i>E.coli</i> .....	77
3.2.2	Herstellung kompetenter Bakterien (RbCl <sub>2</sub> -Methode) .....	78
3.2.3	Transformation von Bakterien .....	79
3.2.4	Herstellung von Bakterienstocks .....	79

<b>3.3</b>	<b>Proteintechniken .....</b>	<b>79</b>
3.3.1	Herstellung von Proteinextrakten und Konzentrationsbestimmung .....	79
3.3.1.1	Zellaufschluß unter reduzierten Bedingungen.....	79
3.3.1.2	Proteinkonzentrationsbestimmung .....	80
3.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	80
3.3.3	Western-Blot (Immunoblot) .....	82
3.3.3.1	Proteintransfer .....	82
3.3.3.2	Immunologische Detektion von Proteinen.....	83
3.3.3.3	Die „Enhanced Chemoluminescence“- Methode.....	83
3.3.3.4	Entfernen gebundener Antikörper nach ECL- Färbung („Stripping“) .....	83
3.3.4	Fällen von Proteinen mit Trichloressigsäure .....	84
3.3.5	Radioaktive Markierung von Proteinen .....	84
3.3.6	Nachweis radioaktiv-markierter Proteine durch Autoradiographie.....	85
3.3.7	Crosslink-Technik zur Untersuchung der p53-Oligomerisierung .....	85
3.3.7.1	BMH.....	85
3.3.7.1.1	Crosslink im Gesamtproteinextrakt .....	86
3.3.7.1.2	Crosslink an Mitochondrien.....	86
3.3.7.2	Glutaraldehyd.....	86
3.3.7.2.1	Crosslink im Gesamtproteinextrakt (modifiziert nach Atz <i>et al.</i> , 2000)	86
3.3.7.2.2	Crosslink an Mitochondrien.....	87
3.3.8	Co-Immunopräzipitation von Proteinen .....	87
3.3.9	Chromatin-Immunpräzipitation .....	88
3.3.9.1	Fixierung und Ernten der Zellen.....	88
3.3.9.2	Lyse und Beschallung der Zellen .....	89
3.3.9.3	Preclearing und Verdünnung der Proben.....	90
3.3.9.4	Immunpräzipitation und Bindung der Protein-AK-Komplexe .....	91
3.3.9.5	Waschen des Protein-Antikörper-Sepharose-Komplexes .....	92
3.3.9.6	Elution und reverses Cross-linking.....	93
3.3.9.7	Aufreinigung der DNA .....	94
3.3.10	Indirekte Immunfluoreszenz .....	94
3.3.11	Präparation von Zellen zur Fluoreszenzmikroskopie.....	95
3.3.12	Mitochondrien-Anfärbung zur Fluoreszenz-Mikroskopie .....	95

---

3.3.13	Isolierung von Mitochondrien aus Gesamtzellen.....	96
3.3.13.1	Mitochondrien-Isolation über Dichtegradientenzentrifugation .....	96
3.3.13.2	Mitochondrien-Isolation über differentielle Zentrifugation.....	97
3.3.14	Cytochrom C-Release-Assay .....	98
3.3.15	Immunogold-Elektronenmikroskopie an Mitochondrien.....	99
3.3.16	Mitochondrienmassen-Bestimmung .....	101
<b>3.4</b>	<b>DNA-Techniken.....</b>	<b>102</b>
3.4.1	Analytische Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien: Minipräparation .....	102
3.4.2	Präparative Plasmid-DNA-Isolierung.....	103
3.4.3	Spektrometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren .....	103
3.4.4	Agarosegelelektrophorese doppelsträngiger DNA .....	104
3.4.5	Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen .....	105
3.4.6	Modifikationen von DNA.....	106
3.4.6.1	Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen .....	106
3.4.6.2	Dephosphorylierung von DNA-Enden .....	106
3.4.6.3	Ligation von DNA- Fragmenten.....	106
3.4.7	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	107
3.4.8	DNA-Isolierung aus Agarosegelen .....	114
3.4.9	Dot Blot .....	115
3.4.9.1	Immobilisierung der DNA .....	115
3.4.9.2	Herstellen einer markierten Gensonde.....	115
3.4.9.3	Dot Blot-Hybridisierung .....	116
3.4.9.4	Detektion des Dot-Blot-Signals .....	116
<b>3.5</b>	<b>RNA-Techniken.....</b>	<b>117</b>
3.5.1	RNA-Isolierung mit der Phenol-Chloroform-Methode .....	117
3.5.2	DNase-Verdau isolierter RNA .....	118
3.5.3	Herstellung von cDNA: Reverse Transkription .....	118
3.5.4	Agarosegelelektrophorese von RNA .....	119
3.5.4.1	Herstellung von Formaldehyd-Agarosegelen; Gelelektrophorese von RNA .....	119

---

3.5.5	Northern Blot.....	120
3.5.5.1	Herstellen einer markierten Gensonde.....	121
3.5.5.2	Northern Blot-Hybridisierung.....	122
3.5.5.3	Detektion des Northern Blot Signals .....	123
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>124</b>
<b>4.1</b>	<b>Mitochondriales p53 ist resistent gegen dominant-negative Effekte .124</b>	
4.1.1	p53-abhängiger transaktivierungsunabhängiger Zelltod in HCT116-Zellen nach $\alpha$ -Amanitin bzw. $\alpha$ -Amanitin und 5FU .....	124
4.1.2	Anwesenheit von Wildtyp- und mutiertem p53 in der mitochondrialen Fraktion von HCT116-Zellen nach entsprechender Behandlung.....	129
4.1.3	Expression, mitochondriale Lokalisation und Oligomerisierung von p53-Mutanten .....	133
4.1.4	Dominante Inhibition von Wildtyp-p53 durch die Mutanten 175 $\Delta$ C und 273 $\Delta$ C .....	138
4.1.5	Mitochondriale Lokalisation von p53 und Apoptose in mit mutiertem p53 infizierten HCT116-Zellen.....	143
4.1.6	Dominant-inhibitorische Effekte von p53 DD auf die Transkription, aber nicht auf mitochondriale Apoptose .....	148
4.1.7	p53-Monomere und –Oligomere in der Zelle und an den Mitochondrien .....	150
4.1.8	Dominant-inhibitorischer Effekt von p73 $\Delta$ N auf die Transkription, aber nicht auf mitochondriale Apoptose .....	153
<b>4.2</b>	<b>Untersuchungen zur Herkunft von mitochondrialem p53 .....</b>	<b>157</b>
<b>4.3</b>	<b>Untersuchungen zum Effekt von p53 auf die mitochondriale Transkription.....</b>	<b>173</b>
4.3.1	Charakterisierung der Zelllinien.....	174
4.3.1.1	Erstellen von Wachstumskurven von HCT116- und HCT116 p53-/- Zellen .....	174
4.3.1.2	Zellzyklus-Verteilung in HCT116- und HCT116 p53-/- Zellen .....	176

---

4.3.1.3	Vergleich der Mitochondrienanzahl und der mitochondrialen Genome in HCT116 und HCT116 p53 <sup>-/-</sup> Zellen.....	178
	Northern Blot-Untersuchungen an HCT116- und HCT116 p53 <sup>-/-</sup> Zellen .....	182
<b>4.4</b>	<b>Untersuchungen zur transkriptionellen Regulierung von p53 durch NIR .....</b>	<b>186</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>193</b>
5.1	Mitochondriales p53 ist resistent gegen dominant-negative Effekte .	193
5.2	Die Herkunft von mitochondrialem p53.....	197
5.3	Hat p53 Effekte auf die mitochondriale Transkription? .....	199
5.4	Transkriptionelle Regulierung von p53 durch NIR .....	202
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>205</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>206</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>207</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>232</b>

## Verzeichnis der Abbildungen

<b>Abbildung 1:</b> Funktionen von p53	<b>3</b>
<b>Abbildung 2:</b> Das Tumorsuppressorgen p53	<b>5</b>
<b>Abbildung 3:</b> Struktur des NIR-Proteins.	<b>15</b>
<b>Abbildung 4:</b> p53 bindet direkt an antiapoptotisches BclXL/2, um die proapoptotischen Proteine Bax und Bak freizusetzen.	<b>20</b>
<b>Abbildung 5:</b> p53 aktiviert den apoptotischen Effektor Bak in der äußeren mitochondrialen Membran direkt.	<b>21</b>
<b>Abbildung 6:</b> p53 kann cytosolisches Bax direkt aktivieren.	<b>22</b>
<b>Abbildung 7:</b> Die Rolle von p53-Mutationen bei der Tumorgenese	<b>25</b>
<b>Abbildung 8:</b> Das Miniprotein p53-DD und seine Wirkung auf Wildtyp-p53	<b>29</b>
<b>Abbildung 9:</b> Der genetische Aufbau der p53-Genfamilie	<b>31</b>
<b>Abbildung 10:</b> Genomische Organisation der verschiedenen $\Delta$ TA-Isoformen von p73	<b>33</b>
<b>Abbildung 11:</b> Dualer Mechanismus der dominant-negativen Wirkung von $\Delta$ N-p73 auf Wildtyp-p53 bzw. TA-p73	<b>34</b>
<b>Abbildung 12:</b> 1 kb+ DNA-Leiter der Firma Invitrogen (Karlsruhe).	<b>41</b>
<b>Abbildung 13:</b> PageRuler™, vorgefärbte Proteinleiter der Firma Fermentas (St. Leon-Rot).	<b>42</b>
<b>Abbildung 14:</b> Der Vektor pGEM®-T	<b>52</b>
<b>Abbildung 15:</b> Der Vektor pCR®2.1-TOPO	<b>53</b>
<b>Abbildung 16:</b> Der Vektor pGL2-Basic	<b>53</b>
<b>Abbildung 17:</b> Der Vektor pCMV-p53	<b>54</b>
<b>Abbildung 18:</b> Der Vektor pCMX-Flag-NIR	<b>55</b>
<b>Abbildung 19:</b> Der Vektor pCMV-pA	<b>56</b>
<b>Abbildung 20:</b> Der Vektor pWAF-Luc	<b>56</b>
<b>Abbildung 21:</b> Der Vektor pWAF-Luc $\Delta$ p53-Bindungsstelle	<b>57</b>
<b>Abbildung 22:</b> Der pDsRed-Express-N1-Vektor	<b>58</b>
<b>Abbildung 23:</b> Der pDsRed-Express-N1-p53-Vektor	<b>58</b>
<b>Abbildung 24:</b> Der retrovirale Vektor pLRNL	<b>59</b>
<b>Abbildung 25:</b> Der Vektor pLRNL-R175H bzw. R273H	<b>60</b>
<b>Abbildung 26:</b> Der Vektor pLRNL-R175H $\Delta$ C bzw. R273H $\Delta$ C	<b>61</b>
<b>Abbildung 27:</b> Der Vektor pLRNL-R175H $\Delta$ O bzw. R273H $\Delta$ O	<b>61</b>

<b>Abbildung 28:</b> Der Vektor pLRNL $\Delta$ N-p73	<b>62</b>
<b>Abbildung 29:</b> Der retrovirale Vektor pBabePuro	<b>63</b>
<b>Abbildung 30:</b> Der Vektor pBabePuro-337C	<b>63</b>
<b>Abbildung 31:</b> Der Vektor pLXSN-p53 DD	<b>64</b>
<b>Abbildung 32:</b> Der Vektor pCMV-G	<b>65</b>
<b>Abbildung 33:</b> Transaktivierungsunabhängige p53-abhängige Apoptose in HCT116-Zellen.	<b>126</b>
<b>Abbildung 34:</b> Blockade der Transaktivierung p53-responsiver Gene nach simultaner Behandlung mit 5FU und $\alpha$ -Amanitin.	<b>127</b>
<b>Abbildung 35:</b> Der durch 5FU und $\alpha$ -Amanitin induzierte Zelltod ist apoptotisch.	<b>128</b>
<b>Abbildung 36:</b> p53 transloziert in HCT116-Zellen nach Behandlung mit 5FU, $\alpha$ -Amanitin oder 5FU plus $\alpha$ -Amanitin zu den Mitochondrien.	<b>129</b>
<b>Abbildung 37:</b> Mutiertes p53 ist auch ohne Anwesenheit von Stress in der mitochondrialen Fraktion in HCT116-Zellen.	<b>130</b>
<b>Abbildung 38:</b> Immunelektronen-Mikroskopie detektiert mutiertes p53 an den Mitochondrien.	<b>131</b>
<b>Abbildung 39:</b> Mutiertes p53 ist durch 5FU nicht aktivierbar.	<b>132</b>
<b>Abbildung 40:</b> Zellen mit mutiertem p53 durchlaufen nach Behandlung mit 5FU keinen programmierten Zelltod.	<b>133</b>
<b>Abbildung 41:</b> Expression der p53-Mutanten in der parentalen Wildtyp-p53 exprimierenden HCT116-Zelllinie.	<b>134</b>
<b>Abbildung 42:</b> Die p53-Mutanten 175 $\Delta$ C und 273 $\Delta$ C sind in der mitochondrialen Fraktion ungestresster Zellen detektierbar.	<b>135</b>
<b>Abbildung 43:</b> Oligomerisierung der p53-Mutanten.	<b>136</b>
<b>Abbildung 44:</b> Heterooligomerisierung zwischen mutiertem p53 und einer Vollängen-p53-Variante mit mutiertem DO-1-Epitop.	<b>137</b>
<b>Abbildung 45:</b> Dominante Inhibition von Wildtyp-p53 durch 273 $\Delta$ C auf RNA-Ebene in HCT116-Zellen.	<b>138</b>
<b>Abbildung 46:</b> Dominante Inhibition von Wildtyp-p53 durch 273 $\Delta$ C auf Proteinebene in HCT116-Zellen	<b>139</b>
<b>Abbildung 47:</b> Dominante Inhibition von Wildtyp-p53 durch 273 $\Delta$ C auf Proteinebene nach transienter Transfektion.	<b>140</b>

- Abbildung 48:** Fehlende p53-Promotor-Okkupation des *p21Waf/Cip1*-Gens in Zellen mit der 273 $\Delta$ C-Mutante nach Einfluss von Zellstress. **141**
- Abbildung 49:** p53-Mutanten zeigen auch phänotypisch dominant-inhibitorischen Effekt auf Wildtyp-p53 nach Behandlung der Zellen mit Etoposid. **142**
- Abbildung 50:** Akkumulation von endogenem Wildtyp-p53 in der mitochondrialen Fraktion nach Behandlung mit 5FU,  $\alpha$ -Amanitin und einer Kombination beider Substanzen in HCT116 LRNL, 175 $\Delta$ C und 273 $\Delta$ C. **144**
- Abbildung 51:** Apoptose in HCT116 LRNL, 175 $\Delta$ C und 273 $\Delta$ C 12, 24 und 48 h nach Behandlung mit  $\alpha$ -Amanitin, 5FU und einer Kombination beider Reagenzien. **146**
- Abbildung 52:** Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien nach Behandlung mit  $\alpha$ -Amanitin, 5FU und einer Kombination von beiden. **147**
- Abbildung 53:** Expression von p53 DD im Hintergrund von Wildtyp-p53 **148**
- Abbildung 54:** Dominant-negativer Effekt von p53 DD auf Wildtyp-p53 in HCT116-Zellen 24 h nach Behandlung mit 5FU. **149**
- Abbildung 55:** Apoptose in HCT116 LRNL und HCT116 p53 DD 48 h nach Behandlung mit  $\alpha$ -Amanitin, 5FU und einer Kombination von beiden. **150**
- Abbildung 56:** Untersuchungen zur Oligomerisierung von Wildtyp-p53, 273H und 175H in HCT116-Zellen. **151**
- Abbildung 57:** p53-Translokation zu den Mitochondrien nach 24 h Behandlung mit  $\alpha$ -Amanitin, 5FU und einer Kombination von beiden in MCF7-Zellen. **152**
- Abbildung 58:** Die p53-Variante p53 DD transloziert nach Einwirkung von Zellstress in HCT116-Zellen nicht zu den Mitochondrien. **153**
- Abbildung 59:** Expression von p73 $\Delta$ N **154**
- Abbildung 60:** Dominant-negativer Effekt von p73 $\Delta$ N auf Wildtyp-p53 in HCT116-Zellen 24 h nach Behandlung mit 5FU. **155**
- Abbildung 61:** Apoptose in HCT116 LRNL und HCT116 p73 $\Delta$ N 48 h nach Behandlung mit  $\alpha$ -Amanitin, 5FU und einer Kombination von beiden. **156**
- Abbildung 62:** In normal proliferierenden primären Zellen wird p53 durch Resveratrol nicht aktiviert. **159**
- Abbildung 63:** Resveratrol verursacht eine p53-Stabilisierung in HCT116- und MCF7-Zellen. **160**
- Abbildung 64:** Adriamycin induziert in HCT116 und MCF7-Zellen eine p53-Akkumulation im Zellkern, während Resveratrol eine diffuse p53-Verteilung im Cytoplasma hervorruft. **161**

---

<b>Abbildung 65:</b> Biochemischer Nachweis der p53-Akkumulation im Cytoplasma nach Resveratrol-Behandlung in HCT116- und MCF7-Zellen.	<b>162</b>
<b>Abbildung 66:</b> Expressionskontrolle von pDsRed-N1-p53.	<b>163</b>
<b>Abbildung 67:</b> Das Fusionsprotein DsRed-p53 vermag weiterhin, den p21-Promotor zu transaktivieren.	<b>164</b>
<b>Abbildung 68:</b> Resveratrol induziert in HCT116 p53 <sup>-/-</sup> und H1299-Zellen nach Transfektion von pDsRed-N1-p53 eine p53-Akkumulation im Cytoplasma.	<b>166</b>
<b>Abbildung 69:</b> Mdm2-Level in MCF7-Zellen nach Mdm2-Repression mittels RNA-Interferenz.	<b>168</b>
<b>Abbildung 70:</b> Mdm2-Repression reduziert die cytoplasmatischen p53-Level in MCF7-Zellen erheblich.	<b>169</b>
<b>Abbildung 71:</b> Blockade der Proteinneusynthese durch Cycloheximid in MCF7-Zellen.	<b>170</b>
<b>Abbildung 72:</b> In MCF7-Zellen wird p53, das nach Resveratrol-Behandlung im Cytoplasma zu finden ist, aus dem Zellkern exportiert.	<b>171</b>
<b>Abbildung 73:</b> Wachstumskurven von HCT116 und HCT116 p53 <sup>-/-</sup> Zellen.	<b>175</b>
<b>Abbildung 74:</b> Beispiel FACS-Profil	<b>176</b>
<b>Abbildung 75:</b> Zellzyklus-Verteilung in HCT116 und HCT116 p53 <sup>-/-</sup> Zellen.	<b>177</b>
<b>Abbildung 76:</b> Mitochondrienmassenbestimmung in HCT116- und HCT116 p53 <sup>-/-</sup> Zellen	<b>179</b>
<b>Abbildung 77:</b> Das mitochondriale Genom und die durch die Wahl der Primer entstandenen Fragmente nach der PCR, die als Sonden eingesetzt wurden.	<b>180</b>
<b>Abbildung 78:</b> Mitochondriale DNA- Fragmente nach PCR- Amplifikation	<b>180</b>
<b>Abbildung 79:</b> Dot Blot mit genomischer und mitochondrialer Sonde auf genomische DNA aus unbehandelten HCT116- und HCT116 p53 <sup>-/-</sup> Zellen	<b>181</b>
<b>Abbildung 80:</b> Northern Blot mit mitochondrialer Sonde 2 auf RNA aus HCT116- und HCT116 p53 <sup>-/-</sup> Zellen behandelt mit 5FU oder Adriamycin.	<b>183</b>
<b>Abbildung 81:</b> Northern Blot mit mitochondrialer Sonde 6 auf RNA aus HCT116- und HCT116 p53 <sup>-/-</sup> Zellen behandelt mit 5FU oder Adriamycin.	<b>184</b>
<b>Abbildung 82:</b> NIR-Knockdown führt zu erhöhter p21-Protein- und mRNA-Expression in ungestressten HCT116-Zellen.	<b>187</b>
<b>Abbildung 83:</b> NIR-Knockdown führt zu erhöhter p21-Protein- und mRNA-Expression in ungestressten HCT116-Zellen.	<b>188</b>

- Abbildung 84:** NIR-Knockdown beeinflusst die Expression von proapoptotischen p53-Zielgenen in ungestressten HCT116-Zellen nicht. **189**
- Abbildung 85:** NIR-Knockdown führt in HCT116-Zellen zu einer starken Apoptose-Antwort. **190**
- Abbildung 86:** NIR-Knockdown hat in HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen keinen Einfluß auf die Apoptose-Antwort. **191**
- Abbildung 87:** Simultaner Knockdown von p53 und NIR resultiert in einer signifikanten Reduktion der Apoptose-Rate. **192**

## Abkürzungen und Symbole

A	$\alpha$ -Amanitin
$\alpha$ A	$\alpha$ -Amanitin
$\alpha$ A+5FU	$\alpha$ -Amanitin plus 5-Fluorouracil
7-AAD	7-Amino-Actinomycin
Abb.	Abbildung
AD	Transaktivierungs-Domäne
ADR	Adriamycin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Basische Domäne
BLAST	basic local alignment search tool
BMH	Bis-maleimidohexan
bp, kb	Basen., Kilobasenpaare
BSA	„Bovine serum albumine“, Rinderserumalbumin
$\Delta$ C	ohne Carboxy-Terminus
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
C-	Carboxy-
<i>C.elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
cDNA	„complementary DNA“, komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CHR	Chloramphenicolresistenz
CHX	Cycloheximid
CIP	calf intestinal phosphatase
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cyto	cytoplasmatische Fraktion
Cyt-ox	Cytochrom-Oxidase Untereinheit IV
$\Delta$	Delta, „ohne“

Da, kDa	Dalton, Kilodalton
D-Loop	Displacement-Loop
<i>D.melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DBD	DNA-Bindedomäne
DNA	„Desoxyribonucleic acid“, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dox	Adriamycin
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	“enhanced chemoluminescence”
ER	Östrogen-Rezeptoren
<i>et al.</i>	und Mitarbeiter
F	5-Fluorouracil
FA	5-Fluorouracil plus $\alpha$ -Amanitin
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoreszin
For	Forward
5FU	5-Fluorouracil
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
g	Normalerdschwerebeschleunigung
$\gamma$	Gamma-
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GLD	Glutaraldehyd
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Bidestilliertes Wasser
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HSP	„heavy strand promotor“
Ig	Immunglobulin
INHAT	Inhibitor der Histon-Acetyltransferase
J	Joule
Kan	Kanamycin

$\lambda$	Lambda, Wellenlänge
LB	„Luria broth“
$\mu$	Mikro
l	Liter
LSP	“light strand promotor”
LTR	long terminal repeat
Luc	Luziferase
m	Milli
M	Molar
mA	Milliampere
MCS	multiple cloning site
min	Minute
mito	mitochondriale Fraktion
mm	Millimeter
mono	Monomere
mRNA	“messenger“-Ribonukleinsäure
mtDNA	mitochondriale DNA
mtTFA	mitochondrialer Transkriptionsfaktor A
N-	Amino-
$\Delta$ N	ohne Aminoterminus
Neo	Neomycin
ng	Nanogramm
NLS	Kernlokalisierungssignal
nm	Nanometer
$\Delta$ O	ohne Oligomerisierungsdomäne
OD	Optische Dichte
oligo	Oligomere
P	statistische Signifikanz
pA	Polyadenylierungssignal
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„Phosphate buffered saline“, Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin

pH	potentia Hydrogenii
PI	Propidiumiodid
PRD	Prolin-reiche Domäne
r	Purin
Resv.	Resveratrol
Rev	Reverse
RNA	„Ribonucleic acid“, Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
rpm	„rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription Polymerasekettenreaktion
<sup>35</sup> S	Radioaktives Isotop von Schwefel
SAM	„sterile alpha motif“
Sec	Sekunde
siRNA	Small interfering RNAs
SV40	„Simian virus 40“
TA	Transaktivierungs-
ΔTA	ohne Transaktivierungsdomäne
TD	Tetramerisierungsdomäne
TE	Transfektionseinheit
T3	Trijodthyronin
total	Gesamtzell-Fraktion
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
Ø	unbehandelt
U	„Unit“, Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WAF1	„Wildtype p53 activated fragment 1“
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
y	Pyrimidin

# 1 Einleitung

## 1.1 Tumorentstehung und Tumorprogression

Damit sich ein eukaryotischer Organismus korrekt entwickelt und auch die Reproduktion sicher gestellt ist, ist es unabdingbar, dass die Zellen dieses Organismus korrekt zusammenarbeiten. Für eine solche Zusammenarbeit bedarf es einer strikten Kontrolle von Zellvermehrung und Zelltod.

Tumoren entstehen aus einer einzigen ursprünglich, gesunden Zelle, bei der diese Kontrollinstanzen nicht mehr intakt sind. Der Grund für eine fehlgesteuerte Zellproliferation sind meist somatische Mutationen, die allerdings nur dann ein Risiko für den Gesamtorganismus darstellen, wenn sie zur Entstehung eines Tumors führen. Dafür bedarf es größtenteils weiterer Veränderungen in den Tochterzellen, bevor diese zu Krebszellen entarten.

Die aufgetretenen Mutationen können den Zellen einen Wachstumsvorteil verleihen, wodurch ein lokaler solider Tumor entstehen kann. Sind die Tumorzellen jedoch maligne, so haben sie die Fähigkeit zum invasiven und destruktiven Wachstum sowie zur Metastasenbildung. Maligne Tumoren können zum Tod führen, wenn sie lebenswichtige Organe und Gewebe angreifen.

Es konnten 3 Klassen von Genen identifiziert werden, die vielfach in Tumoren Mutationen aufweisen und somit für einen Großteil der unkontrollierten Zellproliferation verantwortlich zu sein scheinen:

- Proto-Onkogene: Genprodukte kontrollieren und steuern Wachstum, Teilung und Differenzierung einer Zelle und fördern die Zellvermehrung
- Mutatorgene: Genprodukte sorgen für die Erhaltung und die Integrität des Genoms und die Sicherheit des Informationstransfers
- Tumorsuppressorgene: Genprodukte inhibieren die Zellproliferation, indem sie bei der Zellzykluskontrolle mitwirken und geschädigte Zellen in den programmierten Zelltod (Apoptose) leiten.

## 1.2 Das Tumorsuppressorprotein p53

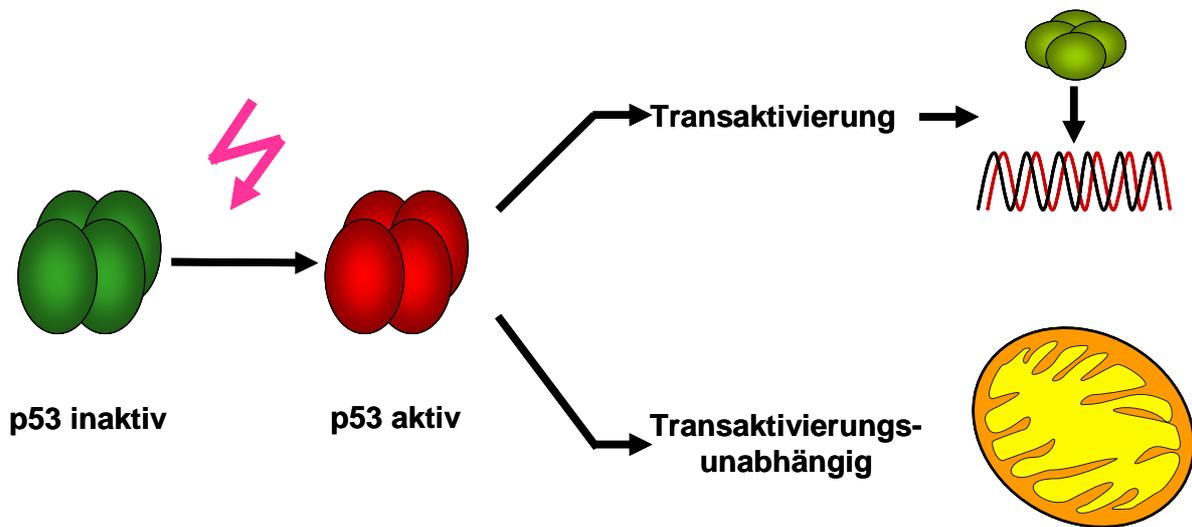
p53 ist der wichtigste Tumorsuppressor. Er wurde 1979 von David Lane und Arnold Levine entdeckt (Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979), und es wurde zunächst angenommen, dass p53 ein Onkogen ist, das für verschiedene Arten von Krebs verantwortlich ist (De Leo *et al.*, 1979; Kress *et al.*, 1979; Lane and Crawford, 1979). Die folgenden Jahre gaben jedoch Aufschluss darüber, dass man sich bei den bisherigen Arbeiten mutiertes p53 angesehen hatte und die eigentliche Wildtyp-Form als Tumorsuppressor fungiert (Soussi *et al.*, 1994; Vogelstein *et al.*, 2000).

p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch zellulären Stress, wie DNA-Schäden, die Anwesenheit von Onkogenen, Sauerstoffmangel, ribosomalen Stress, Nahrungsmittel-Entzug oder Telomeren-Erosion aktiviert und stabilisiert wird. Als Tetramer bindet p53 an die Konsensus-Sequenz zahlreicher Gene und ist somit in der Lage, nach Zellstress die Transaktivierung bzw. Transreprimierung verschiedenster Zielgene, die an der Regulation des Zellzyklus, der Einleitung des programmierten Zelltodes und der DNA-Reparatur beteiligt sind, zu induzieren. Somit wird verhindert, dass eine genetisch veränderte Zelle unkontrolliert proliferiert und Tumoren entstehen.

Mittlerweile ist bekannt, dass p53 auch unter normalen Wachstumsbedingungen, d.h. ohne die Anwesenheit von Zellstress, enorm wichtig ist, um das Zellüberleben oder auch den Zelltod zu fördern. Der alltägliche Stress, dem Säugerzellen ausgesetzt sind, induziert die p53-Aktivität, selbst wenn das Protein in nur sehr geringen Mengen vorhanden ist. Es wurde gezeigt, dass p53 eine erhebliche Rolle bei der Regulation der Glykolyse spielt und p53-Verlust zum Warburg-Effekt beiträgt (Matoba *et al.*, 2006; Bensaad *et al.*, 2006). Auch bei dem Vorgang der Autophagie (Crighton *et al.*, 2006), der Reparatur von genotoxischen Schäden (Gatz und Wiesmüller, 2006), dem Überleben der Zelle und der Regulation von oxidativem Stress (Bensaad und Vousden, 2005) scheint p53 wirksam zu sein. Andere Genprodukte der p53-Transaktivierung sind verantwortlich für die zelluläre Seneszenz (Kortlever *et al.*, 2006) oder mitbeteiligt an der Angiogenese (Teodoro *et al.*, 2006) und der Zelldifferenzierung (Murray-Zmijewski *et al.*, 2006).

Neben den Aufgaben im Zellkern wurden jedoch auch transaktivierungs-unabhängige p53-Funktionen außerhalb des Zellkerns entdeckt. Hier verstärkt p53

die apoptotische Antwort über Interaktion mit Proteinen, die im Cytosol bzw. den Mitochondrien lokalisiert sind (Moll *et al.*, 2005) (siehe 1.5).



**Abbildung 1: Funktionen von p53**

p53 wird nach verschiedenen Formen von Zellstress aktiviert und kann dann im Zellkern an Elemente in der DNA binden und Gene anschalten, die z.B. Apoptose oder Zellzyklusarrest auslösen (oberer Arm der Abb.). Um diese Aufgabe zu erfüllen, muß p53 als Tetramer vorliegen. Dies ist der transaktivierungsabhängige Weg von p53. Auf dem transaktivierungsunabhängigen Pathway transloziert p53 an die Mitochondrien, um hier unabhängig von Transkription Zelltod auszulösen. Ob p53 hier auch als Tetramer fungiert, war unklar.

### 1.3 Der Aufbau von p53

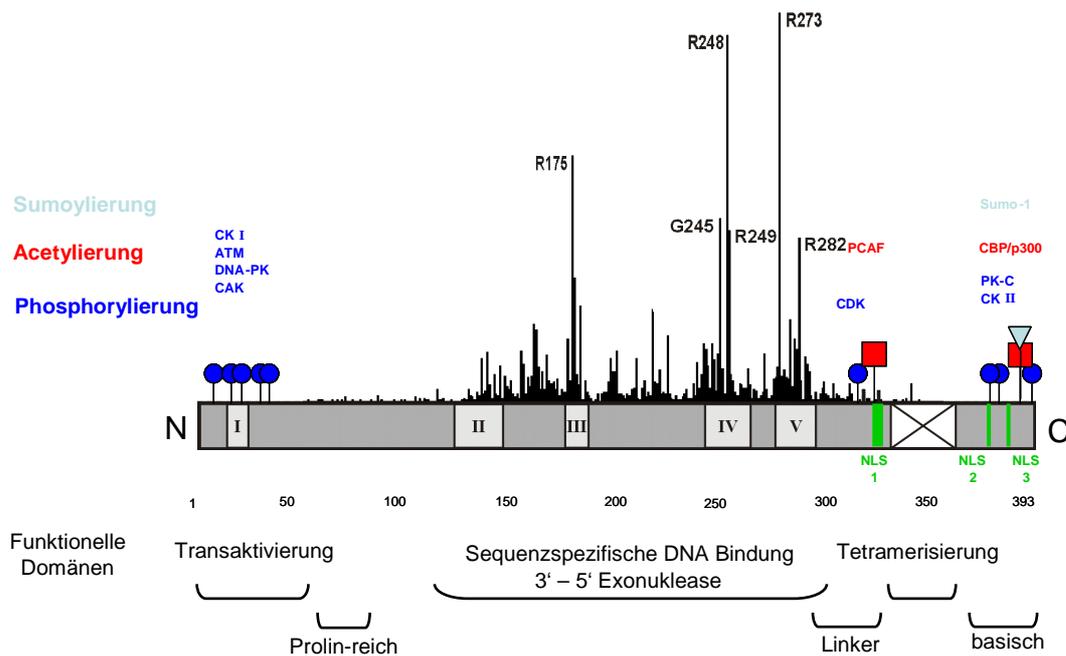
Das menschliche p53-Protein besteht aus 393 Aminosäuren und ist in unterschiedliche funktionelle Domänen untergliedert.

Im Aminoterminus befinden sich die Transaktivierungsdomäne (AS 1-42) von p53, die für die Aktivierung der Expression von p53-Zielgenen verantwortlich ist (Fields und Jang, 1990; Lu und Levine, 1995; Thut *et al.*, 1995), und eine Prolin-reiche Zielregion (AS 60-97) mit 5 PXXP-Motiven. Diesem Bereich wird eine essentielle Rolle bei der Apoptose-Induktion zugesprochen (Sakamuro *et al.*, 1997; Venot *et al.*, 1997).

Den größten Teil des Proteins macht die sequenzspezifische DNA-Bindedomäne (DBD) im Zentrum des Proteins aus (AS 102-292). Sie ist von entscheidender Bedeutung für die DNA-Bindung des gesamten Proteins. p53 bindet über diese Domäne an eine palindrome doppelsträngige DNA-Promotor-Konsensus-Sequenz, die durch bis zu 13 Basenpaaren von einer zweiten Kopie getrennt sein kann. Stabil

ist der p53-DNA-Komplex nur, wenn p53 als Tetramer an ein komplettes Erkennungselement bindet. Die Gruppe um Ute Moll hat jedoch eine weitere wichtige Aufgabe der DNA-Bindedomäne von p53 aufgeklärt: Durch Interaktion über die DBD von p53 mit den mitochondrialen Proteinen BclXI und Bcl-2 werden diese in ihrer antiapoptotischen Funktion gehemmt und Apoptose induziert (Tomita *et al.*, 2006).

An die DNA-Bindedomäne schließt sich die C-terminal gelegene Multifunktionsdomäne an, in der eine Tetramerisierungsdomäne (AS 323-365) und eine regulatorische basische Domäne (AS 360-393) lokalisiert sind. Die Tetramerisierungsdomäne vermittelt die Quartärstruktur von p53 (Hupp *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1994), ohne die p53 nicht an DNA binden könnte. Über eine so genannte Linker-Region, die das Kernlokalisierungssignal enthält (Shaulsky *et al.*, 1990), ist die Tetramerisierungsdomäne mit der DNA-Bindedomäne verbunden. Durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Acetylierung, die zu Konformationsänderungen von p53 führen und dadurch die Bindung an Konsensus-Sequenzen beeinflussen (May und May, 1999; Friedler *et al.*, 2005), wird hier über die Stabilität und Aktivität von p53 entschieden (Hupp und Lane, 1994; Hupp *et al.*, 1995) (siehe 1.4.3.1).



**Abbildung 2: Das Tumorsuppressorgen p53**

Die mit römischen Ziffern gekennzeichneten Boxen repräsentieren die fünf evolutionär hochkonservierten Domänen. Die mit einem Kreuz markierte Box stellt die Oligomerisierungsdomäne dar. Die Kernlokalisationsignale („nuclear localization signal“, NLS) sind als grüne Balken eingezeichnet (NLS1: AS 316-325; NLS2: AS 369-375; NLS3: AS 379-384). Die vertikalen Linien repräsentieren die Häufigkeit des Auftretens von Mutationen und sogenannter „hot spot mutations“ (AS R175, G245, R249, R273, R282), die in humanen Tumoren identifiziert wurden (Hollstein *et al.*, 1991). Die viereckigen, runden und dreieckigen Symbole zeigen die Phosphorylierungs- (CK I (Casein kinase I) Ser-4, Ser-6, Ser-9, ATM Ser-15; DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) Ser- 15, Ser-37; CAK (CDK activating kinase) Ser- 33; CDK (Cyclin-dependent kinase) Ser-315; PK-C (Protein kinase C) Ser-371, Ser-376, Ser- 378; CK II Ser- 392), Acetylierungs- (p/CAF Lys-320; CBP/p300 Lys-382) und Sumoylierungstellen (Sumo-1 Lys-386). Unter dem Schema sind die funktionellen Domänen von p53 dargestellt.

## 1.4 p53 im Zellkern

Eine der Hauptaufgaben von p53 ist die Funktion als Transkriptionsfaktor, welcher die Expression zahlreicher Zielgene sowohl positiv als auch negativ reguliert.

### 1.4.1 p53 als Aktivator der Genexpression

Durch die Aktivierung von p53 werden vor allem zwei zelluläre Antworten bewirkt: Zellzyklus-Arrest und der zelluläre Selbstmord (Apoptose). p53 induziert die

Expression von Genen, deren Produkte dafür sorgen, dass eine Zelle bei maligner Progression am Wachstum gehindert wird.

Prominente Beispiele solcher p53-Zielgene sind *p21* (G1- und G2-Arrest) (el-Deiry *et al.*, 1993; Xiong *et al.*, 1993; Bunz *et al.*, 1998), *14-3-3 $\sigma$*  (G2-Arrest) (Hermeking *et al.*, 1997) und *gadd45* (G2-Arrest) (Wang *et al.*, 1999; Zhan *et al.*, 1999), welche einen Wachstums-Arrest induzieren. Weitere Zielgene von p53 sind die Apoptose-auslösenden Gene, zu der die Gene der Bcl2-Familie gehören, wie *puma* (Nakano und Vousden, 2001; Yu *et al.*, 2001), *noxa* (Oda *et al.*, 2000), *bid* (Sax *et al.*, 2002), *bax* (Miyashita *et al.*, 1995) und *bad* (Jiang *et al.*, 2006). Letztere Gruppe löst den intrinsischen Apoptose-Signalweg aus. Aber auch die Todesrezeptoren Fas (Owen-Schaub *et al.*, 1995) und Killer/DR5 (Wu *et al.*, 1997), die in den extrinsischen Apoptose-Pathway involviert sind, werden von p53 aktiviert.

Interessanterweise bindet p53 mit höherer Affinität an die Konsensus-Sequenzen von Genen, die an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind, als an Gene, die zur Einleitung des programmierten Zelltods essentiell sind (Weinberg *et al.*, 2005).

Es sind weiterhin Gene bekannt, die an der Seneszenz, der Differenzierung, der DNA-Reparatur, der Inhibition der Angiogenese, der Metastasierung (Harms *et al.*, 2004), der Glykolyse (Matoba *et al.*, 2006) und anderen p53-abhängigen Aufgaben (Wei *et al.*, 2006; zusammengefasst in Vousden und Lane, 2007) (siehe Tabelle 1) mitwirken.

Zusätzlich kontrolliert p53 seine eigene Aktivität über die Induktion seines Negativ-Regulators Mdm2 (Haupt *et al.*, 1997) (siehe 1.4.3.3) und zusätzlicher Proteine, die seine Degradation über das Proteasom steuern (Leng *et al.*, 2003; Dornan *et al.*, 2004).

**Tabelle 1:** Die wichtigsten transkriptionellen Zielgene von p53

Gen	Funktion	Referenz
<i>p21</i> ( <i>WAF1</i> )	Zellzyklus-Stopp über G1- und G2/M-Arrest	El-Deiry <i>et al.</i> , 1993; Smits <i>et al.</i> , 2000; Xiong <i>et al.</i> , 1993; Bunz <i>et al.</i> , 1998
<i>14-3-3<math>\sigma</math></i>	Zellzyklus-Stopp über G2/M-Arrest	Hermeking <i>et al.</i> , 1997
<i>gadd45</i> (growth arrest and DNA-damage inducible gene 45)	Zellzyklus-Stopp über G2/M-Arrest; Nukleotid-Exzisionsreparatur; Erhaltung der genomischen Stabilität	Wang <i>et al.</i> , 1999; Zhan <i>et al.</i> , 1999; Maeda <i>et al.</i> , 2002

<i>igfbp3</i> (insulin growth factor-binding protein 3)	Apoptose-Induktion durch selektives Blocken Mitogen-aktivierter Überlebens-Pathways	Buckbinder <i>et al.</i> , 1995; Levine, 1997
<i>p53Dinp1</i> (p53-dependent damage-inducible nuclear protein 1)	Verstärkung der p53-Phosphorylierung → Apoptose-Induktion	Okamura <i>et al.</i> , 2001
<i>pig3</i> (p53-inducible gene 3)	Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies → Induktion von ROS-abhängigem Zelltod	Polyak <i>et al.</i> , 1997
<i>puma</i> (p53-upregulated modulator of apoptosis)	Cytochrom C-Freisetzung aus Mitochondrien durch indirekte Aktivierung von Bax, sowie Apaf-1-Aktivierung, intrinsischer Apoptose-Pathway	Nakano und Vousden, 2001; Yu <i>et al.</i> , 2001;
<i>noxa</i>	Cytochrom C-Freisetzung aus Mitochondrien durch direkte Aktivierung von Bax, sowie Apaf-1-Aktivierung, intrinsischer Apoptose-Pathway	Oda <i>et al.</i> , 2000; Schuler <i>et al.</i> , 2003
<i>bid</i> (BH3 interacting domain death antagonist)	Verknüpfung von intrinsischem und extrinsischem Apoptose-Pathway, Anteil am intrinsischen Apoptose-Pathway	Sax <i>et al.</i> , 2002; Li <i>et al.</i> , 1999
<i>bax</i> (Bcl2 associated factor X)	Cytochrom C-Freisetzung aus Mitochondrien, intrinsischer Apoptose-Pathway	Miyashita <i>et al.</i> , 1995; Miyashita <i>et al.</i> , 1994
<i>bak</i> (Bcl2 antagonist/killer 1)	Cytochrom C-Freisetzung aus Mitochondrien, intrinsischer Apoptose-Pathway	Wei <i>et al.</i> , 2001; Griffiths <i>et al.</i> , 1999; Griffiths <i>et al.</i> , 2001
<i>bad</i> (Bcl2 antagonist of cell death)	Cytochrom C-Freisetzung aus Mitochondrien durch direkte Aktivierung von Bax und Bak, intrinsischer Apoptose-Pathway	Chattopadhyay <i>et al.</i> , 2001; Jiang <i>et al.</i> , 2006
<i>p53AIP1</i> (p53-regulated apoptosis inducing protein 1)	Cytochrom C-Freisetzung aus Mitochondrien durch Inhibition von Bcl2, intrinsischer Apoptose-Pathway	Oda <i>et al.</i> , 2000
<i>fas/APO1</i>	Todesrezeptor, extrinsischer Apoptose-Pathway	Owen-Schaub <i>et al.</i> , 1995; Fukazawa <i>et al.</i> , 1999
<i>killer/DR5</i>	Todesrezeptor, extrinsischer Apoptose-Pathway	Wu <i>et al.</i> , 1997; Takimoto und El-Deiry, 2000

<i>apaf-1</i> (apoptosis protease-activating factor 1)	Intrazellulärer Regulator des intrinsischen Apoptose-Pathways; Komponente des Apoptosoms; Regulation der Apoptose in der Entwicklung	Fortin <i>et al.</i> , 2001
<i>mdm2</i> (mouse double minute 2)	Negativer Regulator von p53	Barak <i>et al.</i> , 1993; Boyd <i>et al.</i> , 2000 ; Rodriguez <i>et al.</i> , 2000 ; Xirodimas <i>et al.</i> , 2001
<i>pcna</i> (proliferating cell nuclear antigen)	Fehlpaarungs-Reparatur	Xu und Morris, 1999; Flores-Rozas <i>et al.</i> , 2000
<i>pai-1</i> (plasminogen activator inhibitor-1)	Replikative Seneszenz; Hemmung der Metastasierung	Kortleverme <i>et al.</i> , 2006; Kunz <i>et al.</i> , 1995
<i>tsp1</i> (thrombospondin 1)	Inhibition der Angiogenese	Dameron <i>et al.</i> , 1994
<i>sco-2</i> (synthesis of cytochrom oxidase 2)	Aerobe Atmung	Matoba <i>et al.</i> , 2006
<i>tigar</i> (TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator)	Glykolyse-Inhibition, Reduktion der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) → Schutz vor ROS-assoziiierter Apoptose	Bensaad <i>et al.</i> , 2006
<i>pomc</i> (pro-opiomelanocortin)	UV-induzierte Hautpigmentierung	Cui <i>et al.</i> , 2007

### 1.4.2 p53 als Transkriptionsrepressor

Zusätzlich zur Aktivierung der Genexpression konnte gezeigt werden, dass p53 auch als sequenzspezifischer Transkriptionsrepressor fungiert. Es liegen Arbeiten vor, in denen gezeigt wurde, dass p53 die Expression des bcl-2-Gens (Miyashita *et al.*, 1994), des Mikrotubuli-assoziierten Proteins MAP4 (Murphy *et al.*, 1996), von Survivin (Hoffman *et al.*, 2002) und dem Hitzschockprotein Hsp90 $\beta$  (Zhang *et al.*, 2004) unterdrückt, um eine Apoptose-Induktion einzuleiten. Desweiteren verhindert p53 die Expression von c-myc (G1-Arrest) (Ho *et al.*, 2005) und Cyclin B1 (G2-Arrest) (Innocente *et al.*, 1999; Imbriano *et al.*, 2005), um die Zelle am Wachstum zu hindern. Zur Regulation der DNA-Replikation und Rekombination wird die Expression von REQ4 herabgesetzt (Sengupta *et al.*, 2005). p53 ist außerdem dazu in der Lage, das Retinoblastom-Tumorsuppressorgen (Rb) zu transreprimieren, das an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt ist (Donehower und Bradley, 1993). Die Gruppe um Yang Xu konnte zeigen, dass p53 nach DNA-Schaden die Expression von Nanog in embryonalen Stammzellen von Mäusen supprimiert, um deren Differenzierung in

Zelltypen zu induzieren, die einen effizienten Zellzyklus-Arrest und Apoptose durchzuführen vermögen (Lin *et al.*, 2005).

### **1.4.3 Regulation der Transaktivierungsfunktion von p53**

Wegen seiner Toxizität für nicht-tumorigene Zellen muss die Aktivität von p53 unter normalen physiologischen Bedingungen streng kontrolliert werden. Erst auf zelluläre Stresssignale hin wird p53 aktiviert und akkumuliert im Zellkern, was eine Grundvoraussetzung für seine Aktivität darstellt. p53 muss dann über seine DNA-Bindedomäne an die p53-responsiven Elemente, die im Bereich der Promotoren von p53-Zielgenen lokalisiert sind, binden. Die Transaktivierungsdomäne von p53 ist schließlich dafür verantwortlich, die basale Transkriptionsmaschinerie, Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren zu rekrutieren, um die Genexpression zu regulieren.

#### **1.4.3.1 p53-Regulation durch posttranslationale Modifikationen**

##### **1.4.3.1.1 Phosphorylierung**

Im p53-Protein sind 17 Serin- und Threoninreste vorhanden, die putative Phosphorylierungsstellen darstellen. Die Phosphorylierung wird durch Mitglieder der DNA-PK-Familie (DNA-dependent protein kinase) vermittelt, insbesondere der ATM (Ataxia teleangiectasia-mutierte Genprodukt)- und der ATR (ATM- und Rad3-verwandte Proteinkinase)-Kinase. ATM wird aktiviert durch DNA-Schäden und ionisierende Strahlen (Helt *et al.*, 2005), wobei ATR durch UV-induzierte Schäden eine p53-Phosphorylierung induziert (Shieh *et al.*, 1997). Die Phosphorylierung hat eine Erhöhung der Stabilität und eine geringere Abbaurate von p53 zur Folge (Bode und Dong, 2004; Steegenga *et al.*, 1996), da die Interaktion zwischen p53 und seinem Haupt-Negativ-Regulator Mdm2 unterbrochen wird (Sakaguchi *et al.*, 1997; Shieh *et al.*, 1997; Craig *et al.*, 1999). Dadurch kommt es zu einer verstärkten Transaktivierung von p53-regulierten Genen (Banin *et al.*, 1998; Nakagawa *et al.*, 1999). Es ist weiterhin bekannt, dass durch Phosphorylierung am Carboxy-Terminus eine erhöhte Oligomerisierung erreicht wird (Hupp und Lane, 1994).

#### **1.4.3.1.2 Acetylierung**

Von der Acetylierung sind verschiedene Lysinreste in der carboxyterminalen Domäne von p53 betroffen (Bode und Dong, 2004; Gu und Roeder, 1997). DNA-Schäden und Phosphorylierungen können eine Kaskade von Acetylierungsereignissen auslösen. Durch die Aktivität der Histon-Acetyl-Transferasen wird die Transkriptionsaktivität von p53 reguliert (Barlev *et al.*, 2001; Prives und Manley, 2001). p300/CBP stellt eine solche Histon-Acetyltransferase dar (Chan und La Thangue, 2001). Acetylierungen von p53 erhöhen die Bindungsaffinität von p53 für p53-responsive Elemente (Gu und Roeder, 1997; Sakaguchi *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 2004) (siehe 1.4.3.2.1).

Die Histon-Deacetyltransferasen heben diesen Effekt wieder auf (Luo *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2001; Vaziri *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 2004) und setzen somit die transkriptionelle Aktivität von p53 herab (siehe 1.4.3.2.3).

Die Co-Existenz von p53-Acetylierung und -Deacetylierung zeigt, dass p53 zumindest teilweise durch Acetylierung stabilisiert und aktiviert wird und dass acetyliertes p53 durch Deacetylierung inaktiviert wird, wenn der DNA-Schaden behoben wurde.

#### **1.4.3.1.3 Sumoylierung**

Das kleine Ubiquitin-ähnliche Protein SUMO-1 („small ubiquitin-related modifier 1“) kann an eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren angehängt werden, einschließlich p53 (Gostissa *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 1999; Melchior und Hengst, 2002). Die Sumoylierung von p53 findet an Lysin 386 statt und stimuliert die Transaktivierungsfähigkeit von p53.

#### **1.4.3.1.4 Methylierung**

Die Methyltransferase SET 9/7 sorgt für eine Methylierung eines Lysinrestes im Carboxy-Terminus von p53, die in der Konstanthaltung der Halbwertszeit von p53 resultiert und dafür zu sorgen scheint, dass p53 nicht aus dem Zellkern ausgeschleust wird (Chuikov *et al.*, 2004).

#### **1.4.3.1.5 Ubiquitynylierung**

Durch das Anhängen von Ubiquitin-Resten an Lysine im C-Terminus von p53 wird dessen Halbwertszeit und der nachfolgende Abbau über den Proteasomenweg reguliert (Jesenberger und Jentsch, 2002). Diese Funktion übernimmt der Haupt-Gegenspieler von p53, nämlich Mdm2, welches E3-Ligase-Aktivität besitzt (Fang *et al.*, 2000) (siehe 1.4.3.3).

#### **1.4.3.2 p53-Aktivierung durch Co-Aktivatoren und Co-Repressoren**

Findet in einer eukaryotischen Zelle keine Replikation oder Transkription statt, so liegt die genomische DNA dicht gepackt vor in Form von hoch organisiertem Chromatin, das mit Nukleosomen verbunden ist (Emerson, 2002). Jede Einheit eines Nukleosoms ist zusammengesetzt aus einem Histon-Oktamer und einem DNA-Doppelstrang von 160-240 Basenpaaren, der sich annähernd 1,7-mal um das Histon-Oktamer windet. Ein Histon-Oktamer besteht aus zwei H2A, zwei H2B, zwei H3 und zwei H4-Histonen. Durch diese dichte Verpackung stellt das Chromatin eine Struktur dar, in der die Promotoren eingebettet sind, die aber unzugänglich sind für die basale Transkriptionsmaschinerie (Featherstone, 2002). Für eine transkriptionelle Aktivierung muss die Chromatin-Struktur aufgelockert werden.

Der Zugang der Promotoren wird hauptsächlich durch Histone kontrolliert, die in ihren Aminotermi kovalent modifiziert werden können. Histon-Modifikationen wie zum Beispiel Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung und Ubiquitynylierung verändern die Konformation des Chromatins dahingehend, dass Promotoren mehr oder weniger zugänglich werden für die entsprechenden Transkriptionsfaktoren (Cheung *et al.*, 2000; Strahl und Allis, 2000). Die meisten der Histon-Modifikationen sind reversibel, wodurch Transkription auch auf einer anderen Ebene reguliert werden kann.

Die Veränderungen an der Nukleosomenoberfläche infolge von spezifischen Histon-Modifikationen stellen eine Art Code (den so genannten „Histon-Code“ der Transkription (Cheung *et al.*, 2000)) dar. Durch diesen Code können die Nukleosomen mit der Umgebung kommunizieren, indem die Bindung von Faktoren gefördert oder verhindert wird. Dies hat entsprechende Konsequenzen für die Chromatinstruktur und die Genexpression.

Enzyme, die daran beteiligt sind, die Histone kovalent zu modifizieren, werden Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren genannt.

#### **1.4.3.2.1 p53-Aktivierung durch die Co-Aktivatoren Histon-Acetyltransferasen**

Histon-Acetyltransferasen (HAT) katalysieren die Übertragung einer Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysinen in den flexiblen Domänen von Histonen. Außerdem können auch Nicht-Histon-Proteine wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren acetyliert werden. Durch das Anhängen der Acetylgruppe wird die Chromatinstruktur aufgelockert, so dass der RNA-Polymerase II-Holoenzym-Komplex binden und die Transkription starten kann (Glass und Rosenfeld, 2000). Eine Acetylierung von Transkriptionsfaktoren in der Nähe ihrer spezifischen DNA-Bindedomäne resultiert in einem Anstieg ihrer relativen DNA-Bindungsaffinität (Gu und Roeder, 1997; Sartorelli *et al.*, 1999; Martinez-Balbas *et al.*, 2000).

Um spezifische Genexpression zu starten, rekrutiert p53 Enzyme, die Histon-Modifikationen vornehmen, an die Promotoren, wodurch die Histone verändert werden und somit die Promotoren in eine offene zugängliche Konfiguration überführen. p300/CBP und p/CAF sind Proteine mit Histon-Acetyltransferasen-Aktivität (Chan und La Thangue, 2001), die durch p53 gebunden werden und die p53-Transaktivierungsfähigkeit zu unterstützen vermögen (Avantaggiati *et al.*, 1997; Gu und Roeder, 1997; Lill *et al.*, 1997; Scolnick *et al.*, 1997). Als Co-Aktivator von p53 ist die Hauptaufgabe von p300/CBP bzw. p/CAF, Histone in der Umgebung der Promotoren von p53-Zielgenen zu acetylieren (Barlev *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2003).

Interessanterweise scheint eine Acetylierung am Serin 120 von p53 für die Entscheidung verantwortlich zu sein, ob eine Zelle am Wachstum gehemmt wird oder in die Apoptose getrieben wird (Sykes *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2006). Es wurde gezeigt, dass die Histon-Acetyltransferasen Tip60 oder hMOF nach großem DNA-Schaden p53 acetylieren. Dies führt zu einer geringeren Affinität von p53 zum *p21*-Promotor, während die Bindungsaffinität zu Promotoren von proapoptotischen Genen wie *bax* und *puma* erhöht wird, was das Gleichgewicht vom Zellzyklusarrest zur Apoptose hin verschiebt.

#### **1.4.3.2.2 p53-Aktivierung durch die Co-Aktivatoren Histon-Methyltransferasen**

Auch durch den Transfer von Methylgruppen kann die p53-abhängige Transkription reguliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die beiden Methyltransferasen PRMT1 und CARM1 direkt mit p53 interagieren und dass sie und p300 Histone unabhängig voneinander, aber auch kooperativ modifizieren können (An *et al.*, 2004). Durch die Aktivität dieser Methyltransferasen wird, ebenso wie durch die Histonacetyltransferasen, die transkriptionelle Aktivität von p53 erhöht.

#### **1.4.3.2.3 Co-Repressoren: Histon-Deacetylasen**

Die Acetylierung von Histonen kann durch Histon-Deacetylasen (HDACs) rückgängig gemacht werden (de Ruijter *et al.*, 2003). HDACs werden in drei Gruppen unterteilt. Die Einteilung beruht auf ihrer Sequenz-Homologie zu bekannten Hefe-HDACs, strukturellen Merkmalen und ihrer subzellulären Lokalisation (de Ruijter *et al.*, 2003; Thiagalingam *et al.*, 2003). Bei Klasse I HDACs handelt es sich um Kernproteine, wohingegen Klasse II HDACs zwischen Zellkern und Zytoplasma hin- und herpendeln. Beide Klassen werden durch Trichostatin und Natrium-Butyrat blockiert. Klasse III HDACs weisen sowohl strukturell als auch bezüglich ihrer katalytischen Eigenschaften große Unterschiede auf. Sie sind NAD<sup>+</sup>-abhängig und werden durch Nicotinamid in ihrer Enzymaktivität gehemmt.

HDACs fungieren als Co-Repressoren von p53. p53 rekrutiert HDACs an Promotoren über Interaktion mit mSin3a, das direkt an die HDACs bindet (Murphy *et al.*, 1999). Die Rekrutierung von HDACs an Promotoren über mSin3a ist der wichtigste Mechanismus, durch den p53 Zielgene transkriptionell reprimiert, denn für die Unterdrückung der Expression von c-myc, Nanog und HSP90  $\beta$  durch p53 ist in allen Fällen die Rekrutierung von HDAC1 über Interaktion mit mSin3a erforderlich (Ho *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2004).

#### **1.4.3.2.4 Co-Repressoren: Inhibitoren der Histon-Acetyltransferasen**

Als eine weitere wichtige Komponente der negativen transkriptionellen Regulation sind schließlich die Inhibitoren der Histon-Acetyltransferasen (**INH**ibitors of **HISTON** **ACETYL**Transferases = **INHAT**) zu nennen. Während HDACs lediglich die HAT-

vermittelte Acetylierung rückgängig machen, wirken INHATs durch Bindung an Histonschwänze und direkte Inhibition der Acetylierung (Seo *et al.*, 2001). Die Gruppe entdeckte einen neuen Zellkomplex, der die Fähigkeit besitzt, die HAT-Aktivität von p300/CBP und p/CAF durch direkte Bindung an Histone zu hemmen. Der aktive Teil des Komplexes, das Set/TAF1 $\beta$ -Onkoprotein bindet an die Histonschwänze und verhindert so, dass HATs an ihren Substraten angreifen können. Nachfolgend wurden weitere Proteine mit INHAT-Aktivität gefunden wie pp32 (Seo *et al.*, 2002), Ataxin-3 (Li *et al.*, 2002) und der Corepressor PELP1 (Choi *et al.*, 2004). Set/TAF1 $\beta$  und pp32 binden präferentiell an nicht- und unter-acetylierte Histone. Außerdem können INHAT-Proteinkomplexe zumindest teilweise auch HDACs enthalten, die bereits vorhandene Acetylgruppen entfernen können (Kutney *et al.*, 2004). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass mit Hilfe der HDAC-Aktivität zunächst eine Deacetylierung von hyperacetylierten Histonen stattfindet, um einen inaktiven Zustand des Chromatins zu schaffen. Dieser reprimierte Zustand wird weiterhin durch die Aktivität der INHAT-Untereinheiten Set/TAF1 $\beta$  und pp32 fortgesetzt. Diese konzentrierte Deacetylierung und HAT-Inhibition scheint eine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung einer basalen oder reprimierten Chromatinstruktur zu spielen.

p53 wurde von unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit der Freiburger Arbeitsgruppe um Roland Schüle als Ziel und Interaktionspartner eines bislang unbekanntes INHATs identifiziert (Hublitz *et al.*, 2005).

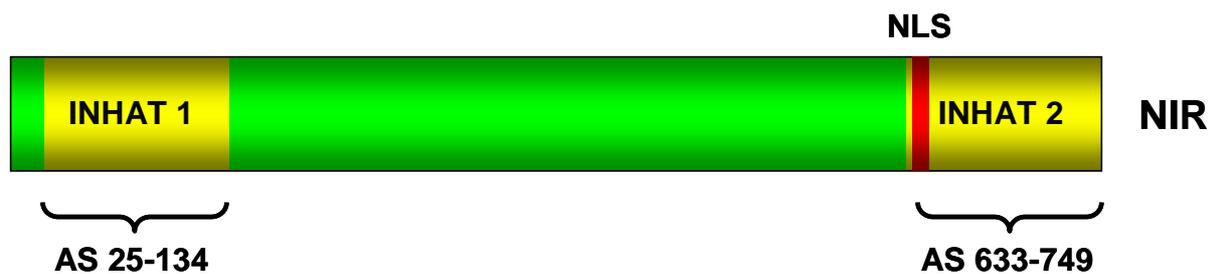
#### **1.4.3.2.4.1 NIR, ein neuer INHAT repressor**

Mit Hilfe einer Datenbank-Suche für Proteine mit putativen INHAT-Domänen gelang der Arbeitsgruppe aus Freiburg die Identifizierung und Charakterisierung des p53-interagierenden INHAT-Repressors NIR (**N**ovel **I**NHAT **R**epressor).

Die menschliche cDNA codiert für 749 AS, und NIR-Orthologe hat man in allen untersuchten Organismen von Würmern bis hin zu Säugetieren gefunden. Mittels RT-PCR- und Dot-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass das Protein in allen Stadien der Mausembryogenese exprimiert wird. Auch in allen untersuchten humanen Geweben und Tumorzelllinien wird NIR, wenn auch in unterschiedlicher Menge, hergestellt. Demnach lässt sich folgern, dass NIR ubiquitär exprimiert wird.

Am C-, sowie am N-Term des NIR-Proteins befindet sich je eine INHAT-Domäne (

Abbildung 3), die beide dazu in der Lage sind, mit Kernhistonen aus Kalbsthymus sowie mit Nukleosomen aus HeLa-Zellen eine Interaktion einzugehen. Weiterhin können beide INHAT-Domänen an die unmodifizierten N-terminalen AS 1-30 von Histon H3 binden. In Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen an anderen INHATs hemmt die Acetylierung der H3-Lysine 9, 14, 18 und 23 die Bindung der INHAT-Domänen (Kutney *et al.*, 2004; Schneider *et al.*, 2004). Mit Hilfe von *in vitro*-Acetylierungsassays zeigte sich, dass beide INHAT-Domänen die Acetylierung von Kernhistonen durch die enzymatisch aktive Domäne von p300 sowie p/CAF blockieren können. In gleicher Weise interagierte aufgereinigtes „getaggetes“ Vollängen-NIR, nicht aber die zentrale Domäne ohne wenigstens eine der beiden INHAT-Domänen mit Nukleosomen und konnte Acetylierung verhindern. NIR kann demnach als neuer funktioneller Repressor mit zwei unabhängigen INHAT-Domänen angesehen werden.



### Abbildung 3: Struktur des NIR-Proteins.

Das NIR-Protein weist am Amino- und am Carboxyterminus je eine INHAT-Domäne auf. Außerdem besitzt das Protein ein Kernlokalisierungssignal (NLS).

In transienten Transfektionen zeigte sich, dass NIR, abhängig von der Dosis, dazu befähigt ist, minimale und komplexe Promotoren zu reprimieren. Auch Aktivator-getriebene Transkription vermochte NIR zu supprimieren. Der Repressor konnte die basale sowie die aktivierte Transkription Promotor- und Zelltyp-unabhängig inhibieren. Die NIR-vermittelte Repression wurde nicht beeinflusst durch die chemischen Inhibitoren der 3 HDAC-Klassen (siehe 1.4.3.2.3), so dass NIR im Gegensatz zu den bisher bekannten INHATs HDAC-unabhängig wirkt.

#### 1.4.3.2.4.2 p53 und NIR

Um die biologischen Funktionen von NIR zu erfassen, hat man über Tandem-Affinitätsreinigung NIR-interagierende Proteine aus humanen HEK293-Zellen isoliert und diese über eine spektrometrische Analyse mittels MALDI-TOF/TOF identifiziert. Unter den 20 assoziierten Proteinen befand sich der Tumorsuppressor p53.

Mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie hat man bestätigt, dass sich NIR ebenso wie p53 im Zellkern befindet.

Durch GST-Pulldown-Assays konnte ermittelt werden, dass p53 an die zentrale Domäne von NIR, aber nicht an den C- bzw. den N-Terminus bindet. NIR hingegen assoziiert mit der zentralen DNA-Binde- und der Tetramerisierungsdomäne von p53. Die Wechselwirkung der beiden Proteine konnte *in vivo* mit Hilfe von Co-Immunpräzipitationen in verschiedenen Zelltypen bestätigt werden.

Bei Untersuchungen zur Relevanz der Interaktion von p53 und NIR wurde gezeigt, dass nach transienter Transfektion in diverse p53-defiziente Tumorzelllinien NIR, entsprechend seiner Funktion als potenter Repressor, die Aktivierung von plasmidständigen und endogenen p53-regulierten Genen unterdrücken kann bei gleichzeitiger Transfektion von p53. Dabei waren sowohl Zellzyklus- als auch Apoptose-regulierende Gene in gleicher Weise betroffen. Die Repression war abhängig von der NIR-Menge und der Anwesenheit von p53. Eine Überexpression von NIR resultierte in einer Inhibition der Aktivierung von Promotoren durch DNA-Schaden aktiviertes p53. Genotoxischer Stress hatte zwar eine p53-Stabilisierung und -Akkumulation zur Folge, aber die NIR-Level blieben unverändert.

Durch Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) konnte aufgeklärt werden, dass p53 befähigt ist, NIR an verschiedene p53-responsive Promotoren zu rekrutieren. Interessanterweise verblieb NIR durch genotoxische Einwirkung mit den p53-assoziierten Promotoren verbunden.

#### 1.4.3.3 Der p53-Hauptantagonist Mdm2

Das zelluläre Onkoprotein Mdm2 (mouse double minute 2) wirkt als Hauptregulator von p53 (Vogelstein, Lane und Levine, 2000; Vousden und Lu, 2002). Man findet Mdm2 in menschlichen Tumoren häufig hochreguliert (Momand *et al.*, 2000).

Mdm2 blockiert p53 unter anderem durch physische Wechselwirkung, indem es an die Transaktivierungsdomäne von p53 bindet (Freedman *et al.*, 1997; Picksley *et al.*,

1994; Chen *et al.*, 1993). Die Bindung von Mdm2 inhibiert die Transkriptionsaktivität von p53, da die Mdm2-Bindestelle von p53 auch für die Wechselwirkung mit Faktoren der Transkriptionsmaschinerie verantwortlich ist (Uesugi und Verdine, 1999). Posttranslationale Modifikationen an dieser Stelle können die p53-Mdm2-Interaktion stören und zur p53-Aktivierung führen (McCoy *et al.*, 2003).

Auf der anderen Seite inhibiert Mdm2 p53 durch seine Funktion als E3-Ligase, die p53 in Assoziation mit der E4-ähnlichen HAT p300 polyubiquitinylieren kann (Grossman *et al.*, 2003). Dadurch wird p53 für den Abbau durch das 26S-Proteasom markiert. Als Konsequenz hat p53 eine kurze Halbwertszeit und die p53-Konzentration wird auf niedrigem Niveau gehalten.

Mdm2 kann darüber hinaus aber auch eine Mono-Ubiquitinylierung bewirken, wodurch p53 aus dem Kern exportiert wird und dort nicht mehr als Transkriptionsfaktor zur Verfügung steht, aber nicht durch das Proteasom abgebaut wird.

Ob p53 nun mono- oder polyubiquitinyliert wird, hängt von der Mdm2-Menge ab: Niedrige Mdm2-Konzentrationen induzieren eine Monoubiquitinylierung und somit den Kernexport von p53, wohingegen hohe Mdm2-Level die Polyubiquitinylierung von p53 und somit dessen Abbau im Kern fördern (Li *et al.*, 2003)

Die Gruppe um Ute Moll konnte ferner kürzlich zeigen, dass Mdm2 auch cytoplasmatisches p53 zu monoubiquitinylieren vermag und diese Monoubiquitinylierung den Transport von p53 zu den Mitochondrien unterstützt (Marchenko *et al.*, 2007) (siehe Abschnitt 1.5).

Darüber hinaus wird die Mdm2-Transkription nach p53-Aktivierung induziert, weil das Mdm2-Gen selbst zwei p53-responsive Elemente in seiner Promotorregion enthält. Diese Verbindung zwischen den beiden Proteinen stellt die Basis für eine negativ regulatorische Rückkopplungsschleife dar, die die Menge der beiden Proteine streng reguliert (Juven-Gershon und Oren, 1999; Freedman *et al.*, 1997; Kubbutat und Vousden, 1998; Harris und Levine, 2005).

## 1.5 Extranukleäre Funktionen von p53

Der mitochondriale Apoptose-Pathway spielt eine ausschlaggebende Rolle bei der p53-abhängigen Apoptose (Schuler und Green, 2001).

Die Gruppe um Ute Moll entdeckte, dass zu Beginn einer p53-abhängigen Apoptose eine Fraktion von stress-stabilisiertem p53-Protein zu den Mitochondrien transloziert (Marchenko *et al.*, 2000). Das Phänomen wird induziert nach vielen verschiedenen Formen von Stress wie z.B. DNA-schädigenden Substanzen (Chemotherapeutika), UV- und  $\gamma$ -Strahlung, Hypoxie, viralen und zellulären Onkogenen, Transkriptionsblockaden und ROS-generierenden Reagenzien (Marchenko *et al.*, 2000; Sansome *et al.*, 2001; Mihara *et al.*, 2003; Arima *et al.*, 2005; Nemajerova *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005). Dieser Pathway wurde bisher in vielen verschiedenen Zellsystemen beobachtet wie den radiosensitiven Geweben Thymus, Testis und Milz (Erster *et al.*, 2004). Auch in Primärzellen wie Maus-Thymozyten, dem Brust-Epithel, dem Venen-Endothel des Nabels, dermalen Fibroblasten sowie Haut-Keratinocyten (Mihara *et al.*, 2003; Bonafe *et al.*, 2004; Nemajerova *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2005) und gleichzeitig immortalen und transformierten Zelllinien aller drei Keimblätter (Marchenko *et al.*, 2000; Sansome *et al.*, 2001; Dumont *et al.*, 2003; Leu *et al.*, 2004; Arima *et al.*, 2005) tritt eine stress-induzierte p53-Akkumulation an den Mitochondrien auf. Außerdem wurde dokumentiert, dass in einer humanen Kolonkarzinom-Zelllinie auch ohne Einwirkung von Stress der Tumorsuppressor an den Mitochondrien zu finden ist (Mahyar-Roemer *et al.*, 2004). Weiterhin wurden in der mitochondrialen DNA-Sequenz putative p53-Bindungsstellen gefunden, die in *in vitro*-Assays durch p53 im Kontext des Zellkerns auch transaktivierbar waren. Deshalb kann vermutet werden, dass p53 in seiner Rolle als Transkriptionsfaktor voraussichtlich auch Gene, die durch das mitochondriale Genom codiert werden, kontrollieren und regulieren könnte (Heyne *et al.*, 2004).

Mitochondriale p53-Translokation ereignet sich sehr schnell. In Zellen des hämatopoetischen und lymphatischen Systems akkumulieren etwa 2 % des Gesamtzell-p53 (Marchenko *et al.*, 2000) binnen 30 bis 60 min an die Mitochondrien nach initialer Stress-Induktion und vor detektierbarer Kern-Anhäufung (Marchenko *et al.*, 2000, Sansome *et al.*, 2001; Mihara *et al.*, 2003; Erster *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2005). Die p53-Translokation zu den Mitochondrien geht einer Cytochrom-C-Freisetzung aus dem mitochondrialen Intermembranraum, dem Zusammenbruch des

inneren Mitochondrien-Membranpotentials und der Procaspase-3-Aktivierung voraus (Marchenko *et al.*, 2000). Dadurch wird Apoptose induziert. Diese Beobachtung lässt sich in radiosensitiven Organen wie Thymus, Milz und Testis, aber nicht in radioresistenten Organen wie Leber und Niere machen.

Dass p53 überhaupt an die Mitochondrien transloziert, ist zunächst ein überraschendes Phänomen, da bisher keine mitochondriale Target-Sequenz im p53-Gen gefunden wurde. Kürzlich wurde gezeigt, dass p53 mit dem pro-apoptotischen Bad-Protein assoziiert und dadurch an die Mitochondrien transportiert wird (Jiang *et al.*, 2006).

Es wurden mehrere Wege beschrieben, wie p53 an den Mitochondrien Apoptose induzieren kann.

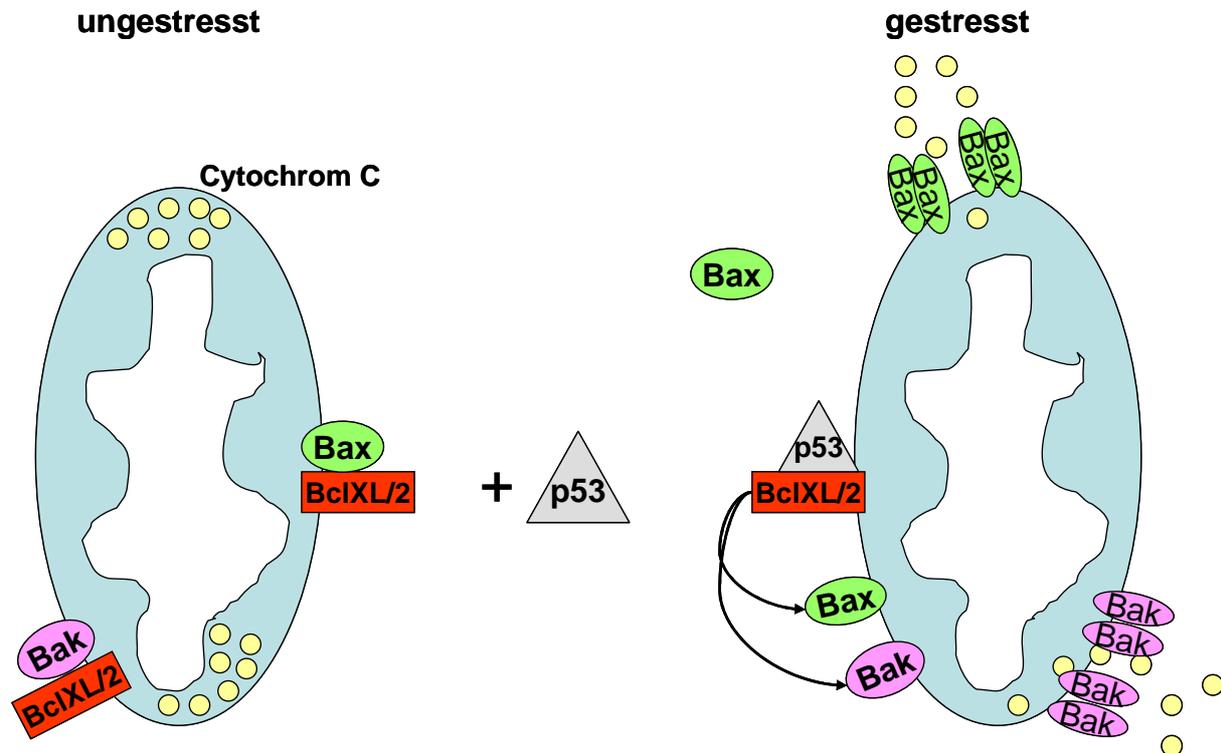
### **1.5.1 Direkte Bindung und Antagonisierung von antiapoptotischem BclXL/2 durch p53**

Die protektiven antiapoptotischen BclXL/2-Proteine sind konstitutiv in der äußeren Mitochondrien-Membran verankert. Sie üben hier über eine Stabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und die Inhibition der proapoptotischen Proteine Bax und Bak entscheidende Überlebensfunktionen aus. Über die Interaktion mit Bax bzw. Bak wird die Freisetzung von Cytochrom C und anderen proapoptotischen Faktoren blockiert.

p53 transloziert nun nach einem Zelltod-Stimulus an die Mitochondrien, wo es mit Bcl2/XL einen Komplex eingeht, da die Affinität von BclXL/2 zu p53 höher ist als die Affinität zu proapoptotischem Bax und Bak. Dadurch werden Bax und Bak freigesetzt und es kommt zu einer Bak- und Bax-Oligomerisierung in der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch diese permeabilisiert wird und die apoptotischen Aktivatoren aus dem Intermembran-Raum freigesetzt werden. Die Permeabilisierung ist abhängig von p53/BclXL-Komplexbildung. Die p53-BclXL/2-Interaktion wird über die DNA-Bindedomäne von p53 vermittelt (Mihara *et al.*, 2003; Tomita *et al.*, 2006) (Abbildung 4).

Mutiertes p53 vermag nicht an BclXL/2 zu binden, ist aber dennoch konstitutiv an den Mitochondrien auffindbar (Mihara *et al.*, 2003). Warum die p53-Mutanten an die Mitochondrien translozieren und welche Mechanismen dem zugrunde liegen, bleibt bisher offen. Möglich ist jedoch, dass die p53-Mutation selbst einen Stresstimulus

für die Zelle darstellt oder dass in den Zellen mit p53-Mutation die p53-Translokationsmechanismen dereguliert sind.



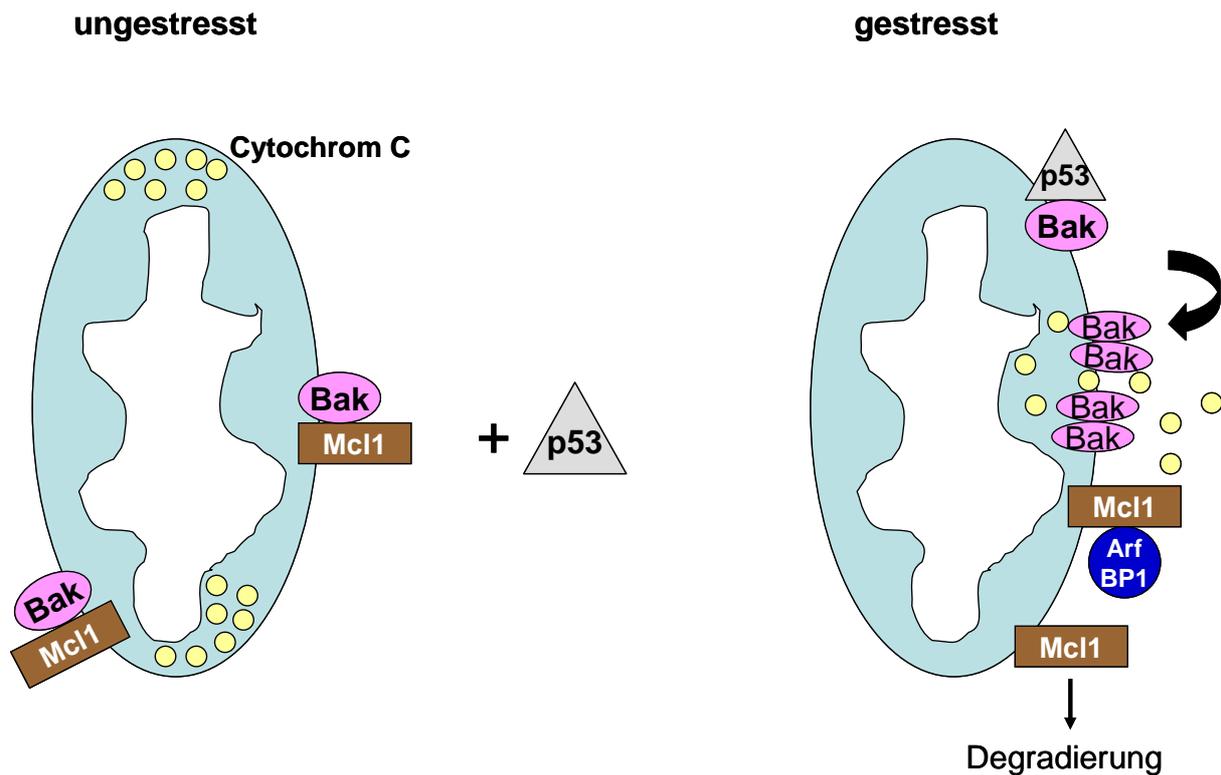
**Abbildung 4: p53 bindet direkt an antiapoptotisches BclXL/2, um die proapoptotischen Proteine Bax und Bak freizusetzen.**

Erläuterungen siehe Text.

### 1.5.2 Direkte Aktivierung von proapoptotischem Bak durch p53

In gesunden Zellen wird Bak durch eine Komplex-Bildung mit antiapoptotischem Mcl1 oder BclXL in der äußeren Mitochondrienmembran in Schach gehalten. Bak kann Apoptose nur induzieren, wenn es von beiden antiapoptotischen Proteinen freigesetzt wird (Willis *et al.*, 2005).

Nach Zellstress transloziert p53 an die Mitochondrien und setzt proapoptotisches Bak aus dem Komplex mit Mcl1 frei, indem ein p53/Bak-Komplex gebildet wird. Hierdurch kommt es zur Bak-Oligomerisierung (Leu *et al.*, 2004). Mcl1 wird nach Apoptose-Signal schnell durch die E3-Ubiquitin-Ligase Arf-BP1 degradiert (Zhong *et al.*, 2005). Die Position, mit der p53 an Bak bindet, liegt ebenfalls in der DNA-Bindedomäne, unterscheidet sich aber von der Interaktionsstelle mit BclXL/2 (Leu *et al.*, 2004) (Abbildung 5).



**Abbildung 5: p53 aktiviert den apoptotischen Effektor Bak in der äußeren mitochondrialen Membran direkt.**

Erläuterungen siehe Text.

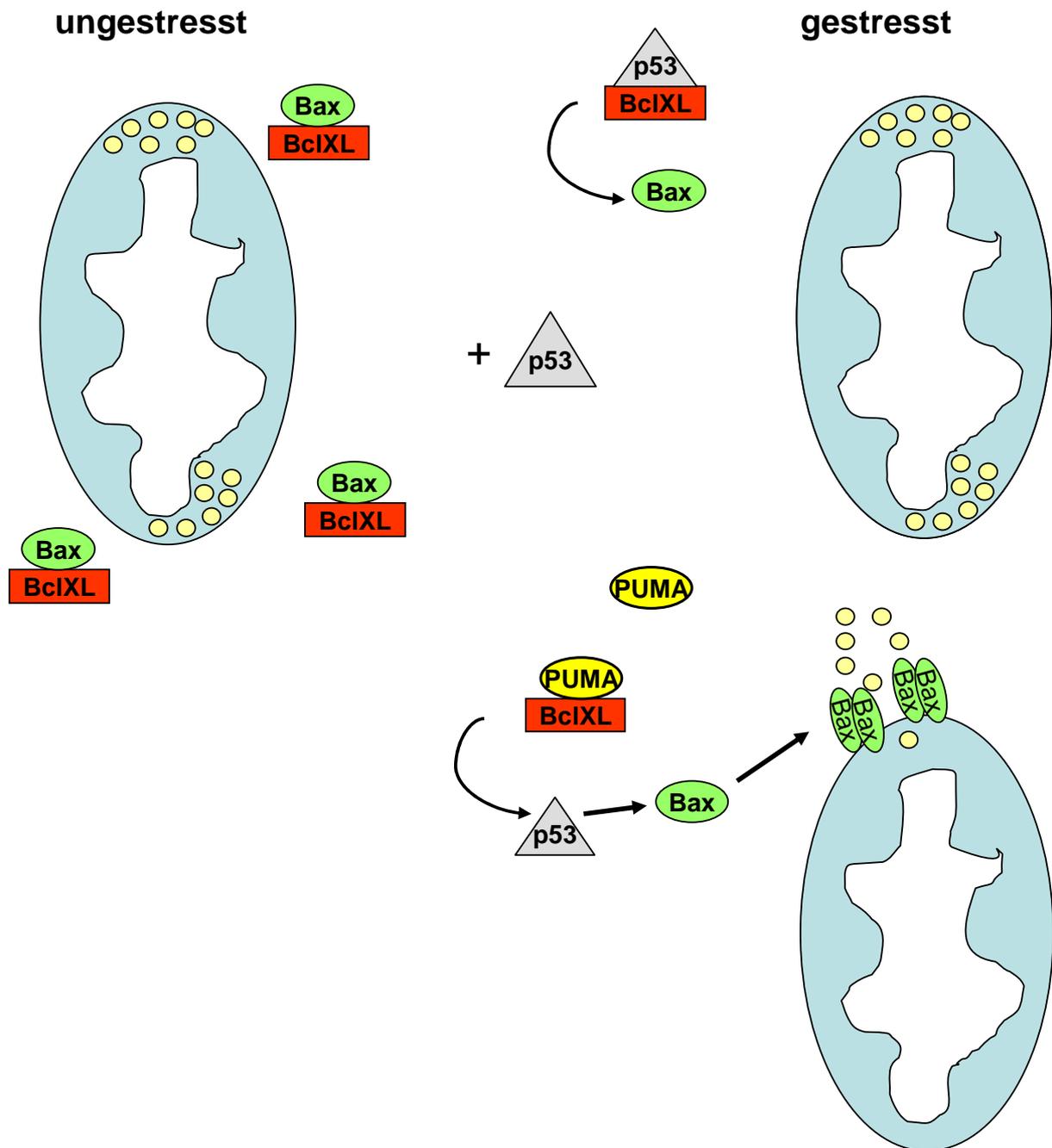
### 1.5.3 Direkte Aktivierung von cytosolischem Bax durch p53

Ein dritter Weg zur mitochondrialen p53-abhängigen Apoptose wurde beschrieben in UV-behandelten Embryonal-Fibroblasten von Mäusen mit einer Subfraktion an löslichem BclXL im Cytosol (Chipuk *et al.*, 2004). p53 aktiviert zunächst cytosolisches Bax durch dessen Freisetzung aus dem Komplex mit cytosolischem BclXL. p53 verdrängt Bax aus dem Komplex und geht selbst eine Interaktion mit BclXL ein, wodurch nun p53 inaktiv in diesem Komplex vorliegt. Bcl2 liegt ausschließlich membran-gebunden vor und ist nicht beteiligt an diesem Weg (Hsu *et al.*, 1996). Der N-Terminus von p53 ist verantwortlich für die Fähigkeit von p53, gebundenes Bax aus dem Komplex mit BclXL freizusetzen (Chipuk *et al.*, 2004).

Chipuk und Mitarbeiter haben dieses Modell 2005 ausgeweitet und gefunden, dass p53 PUMA transaktiviert, p53 danach aus dem Komplex mit cytosolischem BclXL freigesetzt wird, indem PUMA an die Stelle von p53 tritt. Freigesetztes p53 kann dann direkt Bax aktivieren. Bax durchläuft nun eine Konformationsänderung,

transloziert an die Mitochondrien, homo-oligomerisiert in der äußeren Mitochondrien-Membran, und es kommt zur Permeabilisierung.

Dieser Weg stellt eine Verbindung zwischen den mitochondrialen und den transkriptionellen Funktionen von p53 dar (Abbildung 6).



**Abbildung 6: p53 kann cytosolisches Bax direkt aktivieren.**

Erläuterungen siehe Text.

## 1.6 Mutierte Formen des p53-Tumorsuppressors

Der p53-Tumorsuppressor dient als Haupt-Inhibitor der Krebs-Entstehung. So ist es nicht verwunderlich, dass in fast allen menschlichen Tumoren der p53-Signalweg beeinträchtigt ist (Vogelstein *et al.*, 2000). Über die Hälfte der Malignome beinhaltet Mutationen im *p53*-Gen selbst, wohingegen der anderen Hälfte Wildtyp-p53 erhalten blieb, jedoch andere genetische oder epigenetische Veränderungen erworben wurden, die die p53-Antwort mindern. Die meisten p53-Mutationen (ca. 80 %) sind Missense-Mutationen, die in der Expression von mutierten Vollängen-p53-Proteinen resultieren (Hussain und Harris, 1998; Weisz *et al.*, 2007). Das ist insofern von Bedeutung, als die meisten anderen Tumorsuppressorgene nach Frame-Shift- oder Nonsense-Mutationen inaktiviert werden, was entweder zur Expression eines verkürzten Proteins oder kompletter Eliminierung des dazugehörigen Genproduktes führt.

Das mutierte p53-Protein wird in menschlichen Tumoren sehr viel höher exprimiert als Wildtyp-p53 in gesunden Zellen.

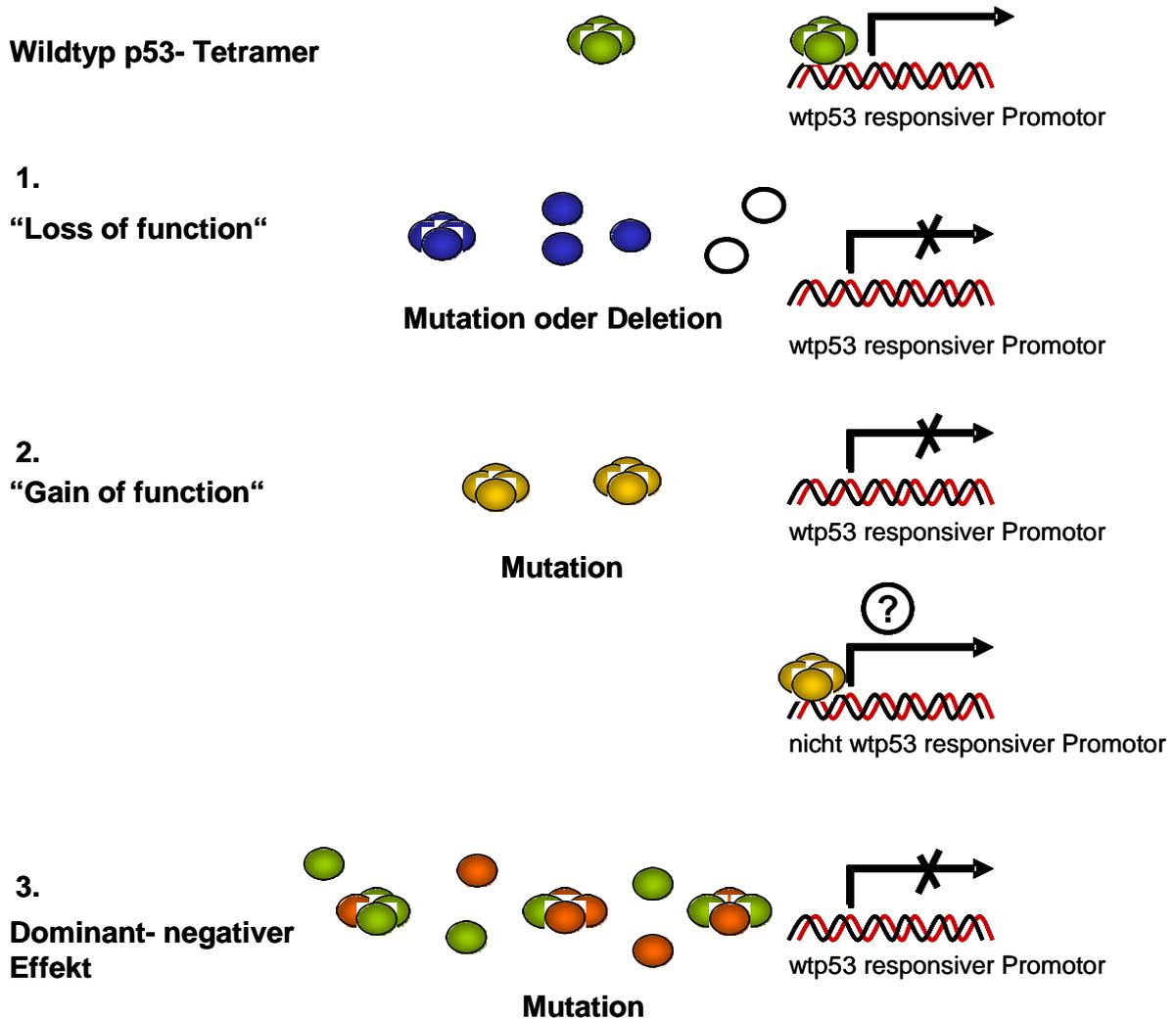
Die p53-Mutationen sind in 97 % der Fälle in der sequenz-spezifischen DNA-Bindedomäne des p53-Proteins zu finden. Es kann theoretisch jede der Aminosäuren in dieser Domäne als Mutations-Stelle dienen, jedoch ist die Verteilung der Mutationen nicht willkürlich: Es wurden 6 Hot-Spot-Mutationen identifiziert, die allein 40 % aller p53-Missense-Mutationen darstellen (Abbildung 2). Im Wesentlichen beeinträchtigen alle tumor-assoziierten DNA-Binde-Domäne-Mutationen die Fähigkeit von p53, mit hoher Affinität an spezifische DNA-Sequenzen zu binden.

Strukturell kann man diese Mutationen in 2 Klassen einteilen:

- **Klasse I: DNA-Kontakt-Mutanten:** Zeigen Aminosäuren-Veränderung an Positionen, die die Bindung an DNA, d.h. an p53-responsive DNA-Elemente, beeinträchtigt, ohne jedoch die Konformation von p53 zu verändern (Roemer *et al.*, 1999) (Beispiel: R273H-Mutante).
- **Klasse II: Konformations-Mutanten:** Zeigen Aminosäuren-Veränderungen an Positionen, die entscheidend für die Erhaltung der globalen Konformation von p53 sind (Cho *et al.*, 1994; Prives, 1994; Roemer, 1999) (Beispiel: R175H-Mutante).

---

Funktionell können p53-Mutationen in einem Verlust der Tumorsuppressor-Aktivitäten von Wildtyp-p53 (loss-of-function), in einem Zugewinn von Wildtyp-p53 unabhängigen onkogenen Funktionen (gain-of-function) oder in der Fähigkeit, die Funktionen des verbleibenden Wildtyp-p53-Allels über dominant-inhibitorische Mechanismen zu unterdrücken (dominant-inhibitorischer bzw. dominant-negativer Effekt), resultieren (Weisz *et al.*, 2007).



**Abbildung 7: Die Rolle von p53-Mutationen bei der Tumorgnese**

Das Wildtyp-p53-Tetramer (grün) ist transkriptionell aktiv nach Zellstress und induziert die Expression von Downstream-Zielgenen.

1. Loss-of-function: Eine inaktivierende Mutation (blau) oder Deletion von p53 (offene Kreise) resultieren in einem kompletten Funktionsverlust mit Eliminierung der p53-vermittelten Antwort nach Zellstress.
2. Gain-of-function: Andere p53-Mutanten (gelb) besitzen neue Funktionen, die man bei Wildtyp-p53 nicht findet. Sie transaktivieren nicht die normalen p53-Zielgene, sondern eine andere Gruppe von Genen.
3. Dominant-negativ: Einige p53-Mutanten (orange) oligomerisieren mit Wildtyp-p53 (grün) und inhibieren die transkriptionelle Aktivität von Wildtyp-p53 in einer dominant-inhibitorischen Weise.

### 1.6.1 Funktionsverlustmutation (Loss-of-function)

Eine Funktionsverlustmutation ist eine Mutation, bei der das betroffene Gen funktionslos wird. Der Verlust der Funktionen des p53-Tumorsuppressors beeinträchtigt die Fähigkeit einer Zelle, auf genotoxischen Stress zu reagieren, schwerwiegend. Nur Tumoren, die p53-negativ sind (oder p53-Knockout-Mäuse) repräsentieren einen echten „loss-of-function“. Diese Veränderung ist offensichtlich ausreichend, Tumorgenese zu fördern.

### 1.6.2 Funktionszugewinnmutation (Gain-of-function)

In einigen Fällen führen Mutationen von p53 zu Funktionen, die die Ausbildung von Tumoren fördern, wie z.B. transkriptionelle Aktivierung von Genen, die in Zellproliferation, Zellüberleben und Angiogenese involviert sind. Dies hat zur Konsequenz, dass Zellen, die eine solche p53-Mutante exprimieren, verstärktes tumorigenes Potential aufweisen mit erhöhter Resistenz gegenüber Chemotherapie und Bestrahlung, aber auch erhöhtem metastatischem Potential und einer gesteigerten Gewebsinvasivität. Mutiertes p53 bindet bei diesem Mechanismus an DNA-Sequenzen, die kein p53-responsives Element in ihrem Promotor haben und daher von Wildtyp-p53 normalerweise nicht transaktiviert werden (Dittmer *et al.*, 1993).

So zeigten Lang und Mitarbeiter (2004), sowie Olive und Kollegen (2004), dass heterozygot mutierte Mäuse mit den p53-Mutationen an Codon 172 oder 270 (äquivalent zu den humanen Codons 175 bzw. 273) aggressiver sind und ein höheres metastatisches Potential aufweisen als p53<sup>+/-</sup> Mäuse (Iwakuma und Lozano, 2007).

Es wurden zwei Modelle vorgeschlagen für den Funktionszugewinn von mutiertem p53. Auf der einen Seite gewinnt p53 neue Funktionen hinzu über inhibitorische Interaktionen mit den p53-Familien-Mitgliedern p63 und p73. Es wurde gezeigt, dass diese Assoziationen verschiedene tumorsuppressive Aktivitäten von p63 bzw. p73 hemmen, wodurch Karzinogenese gefördert wird (Moll *et al.*, 2001; Irwin *et al.*, 2003; Lang *et al.*, 2004; Olive *et al.*, 2004). Das andere Modell geht von einer direkteren onkogenen Rolle von mutiertem p53 aus über Regulation der Expression einer bestimmten Gruppe von Genen, wie z.B. die verstärkte Expression des multidrug

resistance 1 (MDR-1)-Gens (Chin *et al.*, 1992) oder die negative Regulation des CD95/Fas/Apo1-Gens (Zalcenstein *et al.*, 2003).

Gallagher und Kollegen zeigten 1999, dass auch eine veränderte Protein-Protein-Interaktion für den gain-of-function-Mechanismus von mutiertem p53 verantwortlich gemacht werden kann. So bindet nur mutiertes p53 an MBP1, ein Onkogen, dessen Überexpression sowohl neoplastische Transformation als auch Tumorwachstum fördert. In gleicher Weise vermag p53 außerdem genetische Instabilität zu verursachen, indem es das DNA-Reparaturprotein ATM inaktiviert über Bindung eines ATM-aktivierenden Proteins namens Mre11 (Song *et al.*, 2007).

### 1.6.3 Dominant-negativer Effekt

Mutiertes p53-Protein kann außerdem dominant-negativ bzw. dominant-inhibitorisch wirken. Dieser Effekt kann sich auswirken entweder über Sequestrierung limitierter Faktoren oder aber durch Hetero-Oligomerisierung mit endogenem Wildtyp-p53 vom verbleibenden, nicht mutierten p53-Allel (Herskowitz, 1987; Roemer, 1999; Iwakuma und Lozano, 2007). Im Falle von p53 wurde gezeigt, dass hier die Inaktivierung über die Hetero-Oligomerisierung vorherrscht.

Damit p53 effizient als Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor wirksam werden kann, ist eine Tetramerisierung über die Oligomerisierungsdomäne unabdingbar (Friedman *et al.*, 1993; Halazonetis und Kandil, 1993; Pietenpol *et al.*, 1994; McLure und Lee, 1998). Onkogene, mutierte p53-Proteine mit einer intakten Oligomerisierungsdomäne sind voll funktionsfähig, Tetramere auszubilden, aber können nicht mehr effizient an spezifische DNA-Konsensus-Elemente binden, die nach Zellstress von Wildtyp-p53-Tetrameren angesteuert werden. Nach einer Hetero-Oligomerisierung von mutiertem p53 mit Wildtyp-p53 ist die transkriptionelle Aktivität dieses Tetramers nicht mehr gegeben, da aufgrund der Verunreinigung durch die Mutante keine effiziente DNA-Bindung mehr stattfinden kann. Im Falle von Konformationsmutanten wird der Wildtyp in die inaktive mutierte Konformation überführt, die dann nicht mehr an p53-responsive Promotoren binden kann (Medcalf und Milner, 1991). Bei DNA-Kontaktmutanten geht man davon aus, dass wegen der unzureichenden Teilnahme der Mutante an der Transaktivierung bestimmter p53-Zielgene ein dominant-negativer Effekt auftritt. Das Wildtyp/Mutant-Heterotetramer kann nicht mit so hoher Affinität an DNA binden, wie es ein Wildtyp-Homotetramer

tun würde (Friedlander *et al.*, 1996; Chene, 1998; Nicholls *et al.*, 2002). Die p53-Mutanten üben ihren dominant-negativen Effekt also über eine Reduktion der Fähigkeit des Wildtyp-Proteins, an p53-responsive Elemente zu binden, aus. Dies hat eine Herabsetzung seiner transkriptionellen Aktivität zur Konsequenz (Willis *et al.*, 2004).

So ist die Apoptoserate in Thymozyten von Mäusen, die heterozygot mutiertes p53 besitzen, ein Mittelmaß zwischen den Thymozyten von p53<sup>+/-</sup> und p53<sup>-/-</sup> Mäusen (Olive *et al.*, 2004).

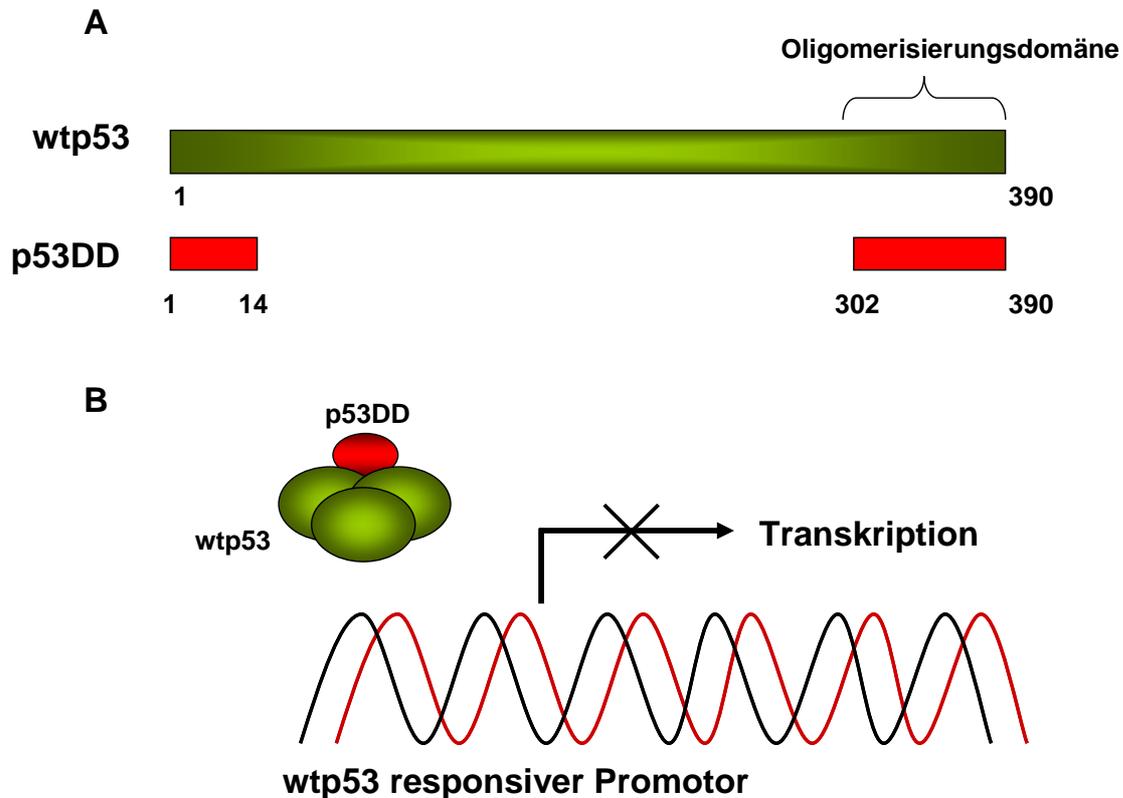
Der dominant-inhibitorische Effekt von mutierten p53 lässt sich auch belegen durch Untersuchungen an Li-Fraumeni-Familien, die eine Keimbahn-Mutation in einem der beiden p53-Allele haben. Familien mit einer Mutation in einem der beiden p53-Allele entwickeln schneller Tumoren als Familien, die eine Deletion in einem p53-Allel und somit gar kein mutiertes p53-Protein besitzen. Dies kommt daher, dass die p53-Mutante das noch aktive p53, welches von dem anderen Allel produziert wird, in diesem Falle über Hetero-Oligomerisierung wegfangen kann (Varley *et al.*, 1997; Birch *et al.*, 1998).

Die Konformationsmutante R175H, sowie die DNA-Kontakt-Mutante R273H üben beide einen dominant-negativen Effekt über Wildtyp-p53 aus, was die Gruppe um Xinbin Chen zeigen konnte. Beide Mutanten wirken sich negativ auf die Transaktivierung p53-responsiver Gene (*p21*, *pig3*, *mdm2*) aus, was sich auch dadurch erklären lässt, dass der Wildtyp weniger effizient an die Promotoren seiner Zielgene bindet. Infolgedessen ist die Inhibition des Zellwachstums und die Induktion des Zellzyklus-Arrest gestört (Willis *et al.*, 2004).

Hinds und Mitarbeiter (1990) bzw. Slingerland und Kollegen (1993) haben beschrieben, dass die Konformationsmutanten (z.B. R175H) oftmals stärkere dominant-negative Effekte ausüben als DNA-Kontaktmutanten (z.B. R273H).

Shaulian und Mitarbeiter haben 1992 ein Miniprotein namens p53-DD synthetisiert, um die Bedeutung des dominant-negativen Effektes über Heterooligomerisierung von Wildtyp-p53 und dem Miniprotein für die Transformation einer Zelle zu zeigen. p53-DD besteht aus den ersten 14 AS und der Oligomerisierungsdomäne (AS 302-390) des Wildtyp-p53 der Maus (Shaulian *et al.*, 1992) (Abbildung 8). Über die Oligomerisierungsdomäne bildet dieses Miniprotein stabile Hetero-Oligomere mit Wildtyp-p53 aus. Die funktionelle Konsequenz der Bildung solcher gemischten Oligomeren ist die Aufhebung sequenzspezifischer DNA-Bindung durch Wildtyp-p53

aufgrund des Fehlens der DNA-Bindedomäne in p53-DD. Somit ist die Transaktivierung p53-responsiver Gene dominant-negativ inhibiert (Gottlieb *et al.*, 1994; Sheard *et al.*, 2003; Cui *et al.*, 2007).



**Abbildung 8: Das Miniprotein p53-DD und seine Wirkung auf Wildtyp-p53**

A: Das künstlich synthetisierte Miniprotein p53-DD besteht aus den ersten 14 AS, sowie der Oligomerisierungsdomäne des murinen Wildtyp-p53.

B: p53-DD (rot) bildet mit Wildtyp-p53 (grün) Hetero-Oligomeren aus und inhibiert dadurch die Transaktivierungsfähigkeit des Wildtyps dominant-negativ, da keine Bindung an spezifische DNA-Sequenzen mehr stattfinden kann. Somit werden keine p53-responsiven Gene aktiviert.

Die Abbildung zeigt ein Hetero-Oligomer, bestehend aus 3 Wildtyp-Proteinen und einem Miniprotein, jedoch sind auch andere Kombinationen der Hetero-Oligomeren denkbar.

## 1.7 Die p53-Genfamilie

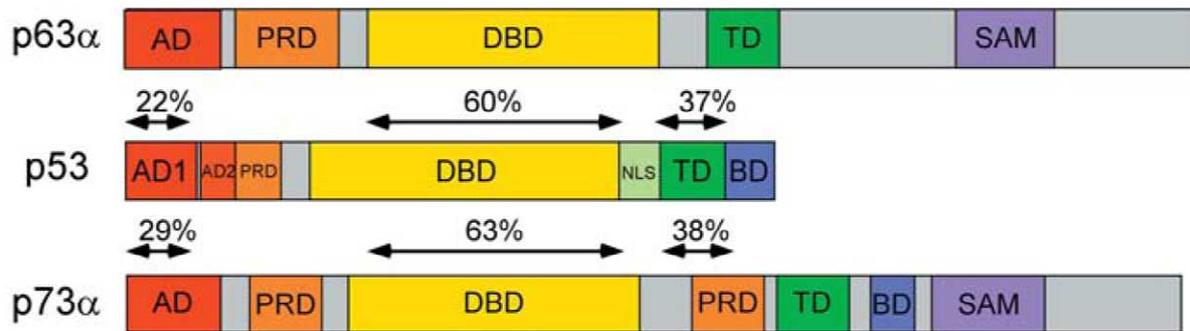
Erst 20 Jahre nach der Entdeckung des p53-Tumorsuppressors haben Kaghad und Kollegen von der Existenz eines weiteren Familienmitglieds im Menschen, genannt p73, berichtet (Kaghad *et al.*, 1997). Ein Jahr später wurde von derselben Gruppe mit p63 ein weiteres Homolog identifiziert (Yang *et al.*, 1998). Alle drei Familienmitglieder haben die gleiche modulare Architektur mit einer aminoterminalen Transaktivierungsdomäne, einer DNA-Bindedomäne, gefolgt von der

Tetramerisierungsdomäne und einer carboxyterminalen regulatorischen Domäne (Moll und Slade, 2004; Melino *et al.*, 2003). Der höchste Homologie-Grad liegt in der DNA-Bindedomäne, wo p63 und p73 circa 65 % Sequenzhomologie zu p53 aufweisen. p63 und p73 weisen zusätzlich im C-Terminus eine SAM-Domäne auf („sterile alpha motif“), die für Protein-Protein-Interaktionen zuständig zu sein scheint (Abbildung 9).

Alle drei Gene exprimieren viele verschiedene Spleiß-Varianten, eine Eigenschaft die jahrelang nur p63 und p73 zugesprochen wurde (Trink *et al.*, 1998); erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch das p53-Gen mehrere Isoformen exprimiert (Bourdon *et al.*, 2005). p63 und p73 beinhalten einen zweiten intronischen Promotor, der N-terminal verkürzte Proteine generiert. Weitere  $\Delta$ N-Isoformen werden durch alternative Spleiß-Ereignisse bzw. alternative Translationsinitiation gebildet. Da der N-Terminus essentiell für die Transaktivierung von Zielgenen ist, können transaktivierende Vollängen-Isoformen funktionell von den transaktivierungsdefekten  $\Delta$ N-Isoformen, die anti-apoptotische und dominant-negative Eigenschaften offenbaren, unterschieden werden.

Wegen der strukturellen Ähnlichkeit wurde erwartet, dass die Funktionen von p63 und p73 hinsichtlich der Unterdrückung von Tumoren, Apoptose-Induktion und Zellzyklus-Kontrolle vergleichbar mit den Aufgaben von p53 sind (Maisse *et al.*, 2003; Mondal und Parvin, 2005). Es zeigte sich jedoch bei p63<sup>+/-</sup> bzw. p73<sup>+/-</sup> Mäusen, dass es hier im Gegensatz zu p53<sup>+/-</sup> Mäusen nicht zur Entwicklung spontaner Tumoren kommt (Flores *et al.*, 2005). Diese Mäuse zeigen vielmehr schwerwiegende Defekte in der embryonalen Entwicklung und der Differenzierung (Yang *et al.*, 1999; Mills *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000). Dennoch benötigt p53 bei der Antwort auf verschiedene Stressoren p73 genauso wie p63, um eine effiziente Apoptose-Antwort einzuleiten (Flores *et al.*, 2002).

p53-Homologe wurden in allen bislang untersuchten vielzelligen Organismen, einschließlich *C.elegans* und *D.melanogaster*, gefunden (Brodsky *et al.*, 2000; Derry *et al.*, 2001; Ollmann *et al.*, 2000; Schumacher *et al.*, 2001). Wahrscheinlich handelt es sich bei dem Vorläufergen der p53-Familie um p63. Das p53-Gen wurde erst im weiteren Verlauf der Evolution durch Genduplikation und weitere Mutationen hinzugefügt, als die Gewebeerneuerung und damit auch ein erhöhtes Krebsrisiko bei höheren Tieren eingeführt wurde (Blandino und Dobbelstein, 2004).



**Abbildung 9: Der genetische Aufbau der p53-Genfamilie**

Die Gesamtprotein-Architektur besteht aus homologen Domänen, die in allen drei Mitgliedern der Familie vertreten sind (N-terminale Transaktivierungsdomäne (AD), Prolin-reiche Region (PRD), DNA-Bindedomäne (DBD), Oligomerisierungsdomäne (TD)), sowie die nur in p63 und p73 vorkommende „sterile alpha motif“-Domäne (SAM), die in Protein-Protein-Interaktionen involviert ist. Die Prozentzahlen geben jeweils die Sequenzhomologie der jeweiligen Domänen zur entsprechenden p53-Domäne an. BD-basische Domäne. Abbildung nach Harms *et al.*, 2004.

### 1.7.1 Der Transkriptionsfaktor p73

Das Protein p73 zeigt viele p53-ähnliche Eigenschaften. So ist es unter anderem als Transkriptionsfaktor wirksam, bindet an p53-responsive Elemente auf der DNA und transaktiviert viele p53-Zielgene, die Apoptose induzieren wie *bax* und *p53AIP1* (Harms *et al.*, 2004) und einen Zellzyklusarrest auslösen wie *p21*, *gadd45* und *14-3-3 $\sigma$*  (Harms *et al.*, 2004). p73 wird auch durch Zellstress wie DNA-Schädigung stabilisiert und aktiviert. Diese funktionellen Ähnlichkeiten führten zu der Idee, dass p73 wie p53 auch ein Tumorsuppressorgen ist. Ute Moll und Neda Slade beschreiben p73 jedoch nicht als klassischen Knudson-Tumorsuppressor, da in den meisten Tumoren die p73-Expression nicht verloren geht bzw. p73 keine Funktion während der Tumorgenese zeigt (in mehr als 1100 primären Tumoren wurden nur in 0,6 % der Fälle p73-Mutationen, die zu einem Funktionsverlust führen, gefunden) (Moll und Slade, 2004).

Eine weitere bemerkenswerte Abweichung zwischen p53 und p73 betrifft ihren Abbau, der durch Mdm2 induziert wird. Ungleich zu p53, das durch Mdm2-vermittelte Ubiquitylierung und Abbau durch das Proteasom reguliert wird (siehe 1.4.3.3), führt die Wechselwirkung zwischen p73 mit Mdm2 zur Inaktivierung von p73, aber nicht zum Abbau von p73 durch das Proteasom (Balint *et al.*, 1999). Als ein zusätzlicher Unterschied zu p53 wurde beschrieben, dass p73 nicht inaktiviert werden kann durch

die meisten viralen Onkoproteine, die p53 außer Kraft setzen (SV40 T-Antigen und Adenovirus E1B 55 kDa) (Reichelt *et al.*, 1999; Wienzek *et al.*, 2000).

Mäuse, die funktionell inaktiv für alle p73-Isoformen sind, zeigen eine hohe Mortalität innerhalb der ersten beiden Monate nach der Geburt. Weiterhin haben sie oftmals einen Hydrocephalus und Störungen in der Hippocampus-Entwicklung. Die Tiere leiden an chronischen Infektionen und Entzündungen. Ein weiteres Merkmal dieser Mäuse sind Defekte in der Pheromondetektion, wodurch sich das anormale Sozialverhalten der Tiere erklären lässt (fehlendes Interesse der männlichen Mäuse an Weibchen und Abwesenheit von Aggressionen gegenüber anderen Männchen) (Yang *et al.*, 2000).

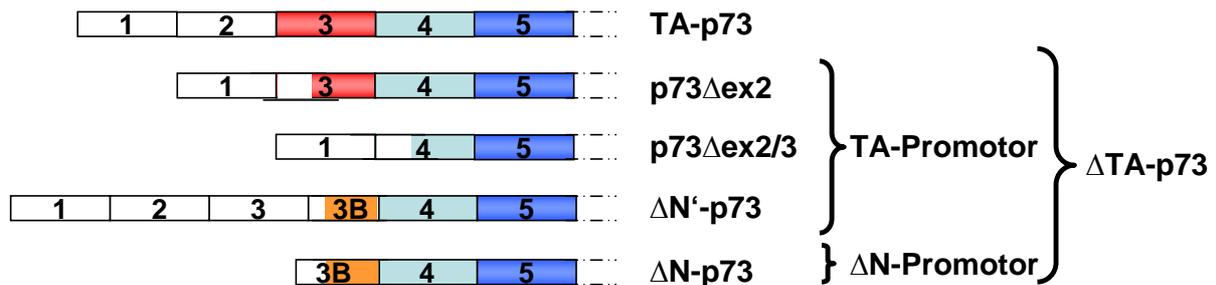
### 1.7.1.1 $\Delta$ N-p73-Isoformen

p73-Funktionsverlust bzw. p73-Mutationen sind in nur ganz seltenen Fällen mit Tumoren assoziiert (Moll und Slade, 2004). Durch alternative Spleiß-Prozesse und einen zusätzlichen Promotor im Intron 3 entstehen allerdings bei der Transkription neben dem Volllängen-p73 auch einige N-terminal verkürzte Proteine (Abbildung 10), die aufgrund des Mangels der Transaktivierungsdomäne nicht mehr transaktivierungskompetent sind und deshalb anti-apoptotisch wirken. Die Überexpression dieser N-terminal verkürzten p73-Isoformen, im Gegensatz zu Volllängen-p73, trägt jedoch zur Tumorentstehung bei. In Brusttumoren, gynäkologischen Malignomen, hepatozellulären Karzinomen und Neuroblastomen ist eine tumorspezifische Hochregulierung der N-terminal verkürzten p73-Varianten gefunden worden (Zaika *et al.*, 2002; Concin *et al.*, 2004; Stiewe *et al.*, 2002; Putzer *et al.*, 2003; Sayan *et al.*, 2001; Casciano *et al.*, 2002; Douc-Rasy *et al.*, 2002). Sie wirken als Onkogene, indem intrazelluläre Signalkaskaden angeschaltet werden, die zur Zelltransformation und Tumorentstehung beitragen.

Die Überexpression von  $\Delta$ N-p73 stellt zudem einen Marker für eine schlechte Prognose für das Überleben bei Patienten mit Neuroblastom dar (Casciano *et al.*, 2002).

Interessanterweise scheint die Hemmung der Transaktivierung von p53-Zielgenen durch  $\Delta$ N-p73 aber auch eine wichtige Rolle beim Schutz sich entwickelnder sympathischer Neuronen vor p53- bzw. p63-induzierter Apoptose zu spielen (Miller und Kaplan, 2007).

Von Grob und Mitarbeitern wurde 2001 gezeigt, dass eine wechselseitige Regulation zwischen der Expression von p53, TA-p73 bzw.  $\Delta N$ -p73 existiert. Dabei vermögen p53 und TA-p73 an den  $\Delta N$ -Promotor zu binden, um dadurch dessen Transkription zu induzieren.  $\Delta N$ -p73 hemmt daraufhin p53 und TA-p73 durch Besetzung ihrer Promotorbindungsstellen oder direkte Bindung an die beiden Proteine, wodurch ein negativer Feedback-Loop entsteht (Grob *et al.*, 2001).

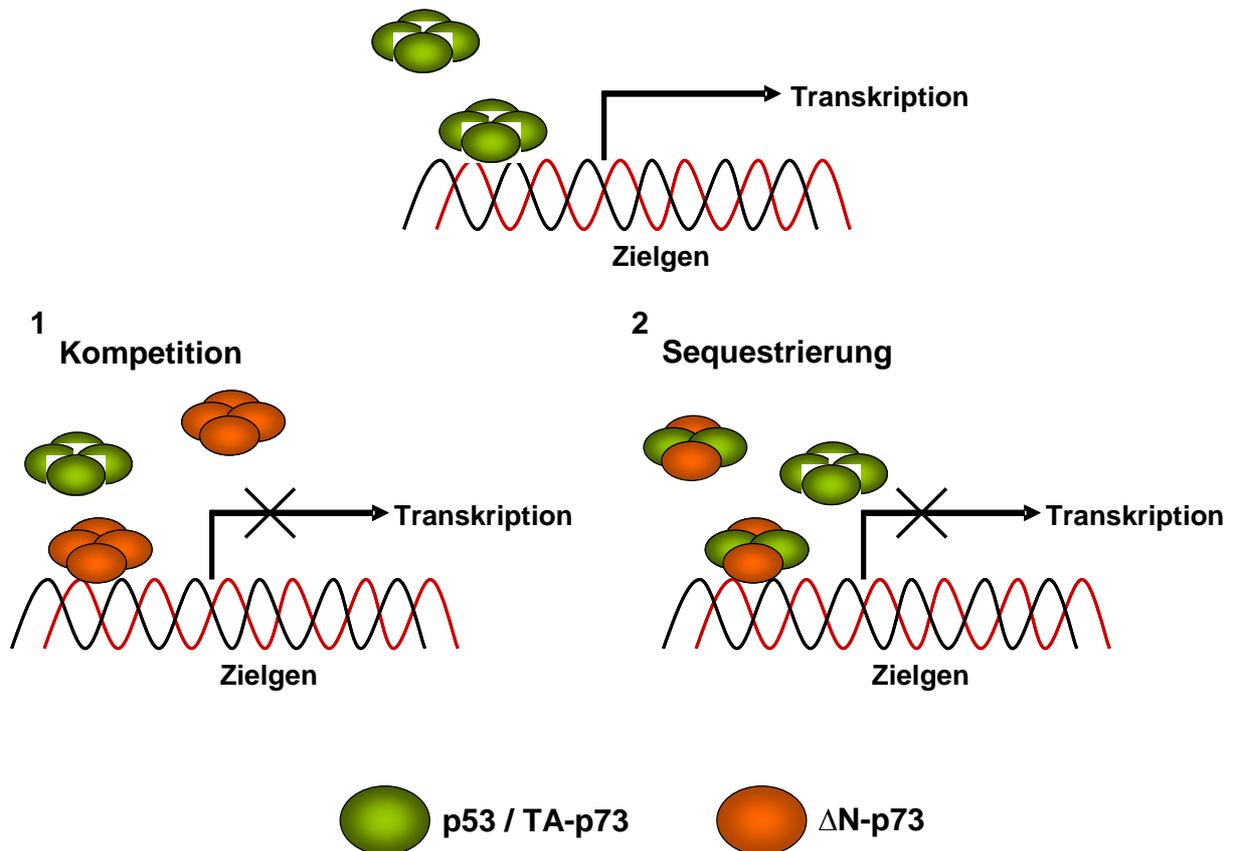


**Abbildung 10: Genomische Organisation der verschiedenen  $\Delta TA$ -Isoformen von p73**

Die drei p73-Isoformen p73 $\Delta$ ex2, p73 $\Delta$ ex2/3 und  $\Delta N'$ -p73 entstehen durch alternatives Spleißen. Die  $\Delta N$ -p73-Isoform wird von einem kryptischen Promotor innerhalb Intron 3 generiert. Allen hier angezeigten Isoformen fehlt die Transaktivierungsdomäne. Rot = Transaktivierungsdomäne; orange = codierende Sequenz aus Exon 3B; blau = DNA-Bindedomäne; weiß = nicht-codierende Sequenz. Abbildung nach Stiewe *et al.*, 2002.

### 1.7.1.2 Der dominant-negative Effekt der $\Delta N$ -p73-Isoformen

N-Terminal verkürzte p73-Isoformen wirken als dominant-negative Inhibitoren von Vollängen-p73 und Wildtyp-p53 und tragen somit zur Tumorentstehung bei (Grob *et al.*, 2001; Pozniak *et al.*, 2000; Stiewe *et al.*, 2002; Fillippovich *et al.*, 2001; Stiewe *et al.*, 2002). Dieser Effekt kann durch zwei verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden. Da die  $\Delta N$ -p73-Proteine immer noch über die DNA-Bindungsdomäne verfügen, konkurrieren sie zum einen um DNA-Bindungsstellen, die normalerweise von p53 oder TA-p73 besetzt würden, um entsprechende Zielgene, deren Transaktivierung für die Tumorsuppression notwendig sind, anzuschalten. Auf der anderen Seite vermögen die  $\Delta N$ -p73-Varianten p53 bzw. TA-p73 über Heterooligomerisierung abzufangen, so dass keine effiziente DNA-Bindung an p53- bzw. p73-responsive Promotoren und somit keine Transaktivierung der Zielgene mehr stattfinden kann.



**Abbildung 11: Dualer Mechanismus der dominant-negativen Wirkung von  $\Delta N$ -p73 auf Wildtyp-p53 bzw. TA-p73**

Für eine effiziente Tumorsuppression bindet p53 bzw. TA-p73 (grün) an sequenzspezifische DNA-Elemente, um entsprechende Zielgene zu transaktivieren.  $\Delta N$ -p73 (orange), das dieselbe DNA-Bindungs- und Oligomerisierungsdomäne wie das TA-Protein beinhaltet, inhibiert die Aktivitäten von p53 bzw. TA-p73 durch zwei verschiedene Mechanismen.

1. **Kompetition:** Sehr stabile  $\Delta N$ -p73-Moleküle konkurrieren um DNA-Bindungsstellen, so dass aktive p53- oder TA-p73-Tetramere nicht mehr an diese Stellen binden und die Zielgene transaktivieren können.
2. **Sequestrierung:**  $\Delta N$ -p73-Moleküle interagieren mit p53 oder TA-p73 und sondern diese somit ab; die entstandenen Heterooligomeren sind transaktivierungsincompetent.

## 1.8 Zielsetzung der Arbeit

p53 wird nach Einwirkung von Zellstress aktiviert und kann dann an Elemente in der DNA binden und Gene anschalten, die Apoptose und Zellzyklusarrest auslösen. p53 kann außerdem an die Mitochondrien translozieren, um hier unabhängig von Transkription Zelltod auszulösen.

Nach der Knudson-Hypothese (1971) braucht man normalerweise zwei unabhängige Ereignisse, um beide Allele eines Tumorsuppressors zu inaktivieren: Wenn nur in

einem der beiden Allele eines Tumorsuppressorgens eine Mutation auftritt, so kann das Genprodukt vom zweiten Allel die Tumorsuppression aufrechterhalten. Erst wenn in diesem Allel ebenfalls wegen einer Mutation oder einer Deletion das Genprodukt ausbleibt, entstehen sporadische Tumoren. Das heißt, wenn lediglich eines der beiden Allele ausfällt, dient das verbleibende Allel als „Sicherungskopie“. p53 bildet hier jedoch oftmals eine Ausnahme. Während bei anderen Tumorsuppressoren Mutationen zu komplettem Funktionsverlust mit fehlendem oder trunkiertem Protein führen, entstehen bei p53 gewöhnlich mutierte Volllängen-Proteine. Diese sind nicht funktionell neutral, sondern tragen zur Tumorentstehung bei, weil p53, um als Transkriptionsfaktor tätig sein zu können, als Homotetramer vorliegen muß, das mutierte p53-Protein aber dazu in der Lage ist, durch Hetero-Oligomerisierung das Wildtyp-Protein zu neutralisieren (dominant-negativer Effekt). Es reicht also oftmals die Mutation eines der beiden p53-Allele aus, um die Funktionen von p53 insgesamt zu beeinträchtigen. Weiterhin können p73-Varianten, denen der N-Terminus und somit die Transaktivierungsdomäne fehlt, die Transaktivierung von p53-Zielgenen ebenfalls blockieren, indem sie die Promotoren der p53-responsiven Gene besetzen.

Im Zuge dieser Arbeit sollte primär untersucht werden, wie sich mutiertes p53 und die  $\Delta N$ -p73-Variante auf den extranukleären mitochondrialen Apoptoseweg, der nicht von der Transkription von Zielgenen abhängt, auswirkt. Unsere Arbeitshypothese lautete:

Der extra-nukleäre, transkriptions-unabhängige Weg zur Apoptose hat sich im Verlauf der Evolution als „fail-safe“-Mechanismus entwickelt, um der dominant-negativen Wirkung von mutiertem p53 und  $\Delta TA$ -Isoformen der p53-Familie entgegenzuwirken.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien, Filter, Membranen

Aceton	Hedinger
Acrylamid	Roth
Adriamycin	Sigma
Agarose	Biozym
$\alpha$ -Amanitin	Sigma
Ammoniumpersulfat	Merck
Ampicillin (Binotal <sup>TM</sup> )	Ratiopharm
Annexin V	BD Biosciences
Aprotinin	Sigma
Bisacrylamid	Roth
Bis-maleimidohexan (BMH)	Pierce
Bromphenolblau	Merck
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs
Calciumchlorid	Merck
Chaps	Roth
Chloroform	Merck
Cycloheximid	Sigma
DAPI	Sigma
Diethyl-Pyrocbonat (DEPC)	Sigma
Desoxycholinsäure (DOC)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Doxorubicin (Adriamycin)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Roth
EDTA (Titriplex III)	Merck
Enhanced Chemoluminescence Western Blotting Detection System (ECL <sup>TM</sup> )	Pierce
Essigsäure (Eisessig)	Merck
Ethanol	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck

Ethidiumbromid	Merck
Etoposid	Sigma
Ficoll 400	Sigma
0,45 µM-Filter	Renner
5-Fluorouracil (5-FU)	Sigma
Fötale Kälberserum	PAA Laboratories GmbH
Formaldehyd 37 %	Merck
Formamid	Applichem
G418	PAA Laboratories GmbH
Glutaraldehyd	Sigma
Glycerin	Merck
Glycin	Applichem
Guanidiumthiocyanat	Sigma
Harnstoff	Merck
Hefeextrakt	BD
Heringssperma-DNA	Roche
Amersham Hyperfilm ECL™	GE Healthcare
Immobilon-Membran	Millipore
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Hedinger
JC-1	Molecular Probes
Kaliumacetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaltwasserfisch-Gelatine	Sigma
Kristallviolett	Sigma
Kupfer (II)-Sulfat	Merck
Leupeptin	Sigma
Lithiumchlorid	Sigma
Lowikryl K4M	Polysciences
Magermilchpulver	Töpfer
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Manganchlorid	Merck

β-Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Roth
Methylcellulose	Sigma
Microcon® Centrifugal Filter Devices YM-10	Millipore
MitoTracker® Green FM	Molecular Probes
MOPS	Sigma
Nanofectin I	PAA
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumcitrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumphosphat	Merck
Natriumsalicylat	Merck
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell
N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	Sigma
NP-40 (Igepal)	Sigma
Nukleotide (dNTPs)	Roche
Nylon-Membran	Scheicher & Schuell
Paraformaldehyd	Merck
Penicillin-Streptomycin	Gibco
Phenol (wasser-gesättigt)	Roth
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol	Sigma
PMSF	Sigma
Polybrene	Sigma
Polyvinylalkohol (Elvanol)	Roth
Polyvinylpyrolidon	Sigma
Propidiumiodid	Sigma
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma
Protein G-Sepharose (4 Fast Flow™)	GE Healthcare
Puromycin	Calbiochem

Resveratrol	Alexis Biochemicals
Rubidiumchlorid	Sigma
<sup>35</sup> S	MP Biomedicals
N-Lauroyl-sarcosin (Sarcosyl-L)	Sigma
Trichloressigsäure	Merck
Tri-Natrium-Citrat-2'-Hydrat	Merck
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Applichem
Triton X-100	Sigma
Trypton	BD
Tween-20	Serva
Uranyl-Acetat	IMS
Zellulosefilter Whatman™#1	Schleicher & Schuell

## 2.2 Puffer

50x TAE-Puffer	Tris/HCl (pH 8,0)	2 M
	Eisessig	1 M
	EDTA	0,05 M
		ad pH 8,0
5x MSE-Puffer	MOPS (pH 7,0)	0,2 M
	Na-Acetat	50 mM
	EDTA (pH 8,0)	5 mM
TE-Puffer	Tris/HCl (pH 7,5)	10 mM
	EDTA (pH 7,5)	1 mM
PBS-Puffer	NaCl	140 mM
	KCl	25 mM
	MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM
	CaCl <sub>2</sub>	1 mM
	Na-K-Phosphat	10 mM

5x Ladepuffer für DNA- Agarosegelelektrophorese	EDTA	50 mM
	Glycerin	50 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Ladepuffer für RNA- Agarosegelelektrophorese	Formamid (deionisiert)	0,75 ml
	5x MSE-Puffer	0,15 ml
	Formaldehyd (37 %)	0,24 ml
	50 % Glycerin (v/v)	0,2 ml
	Bromphenolblau	0,025 % (w/v)
RIPA-Puffer	NaCl	150 mM
	NP-40	1 %
	DOC	0,5 %
	SDS	0,1 %
Lysispuffer	Tris-HCl (pH 7,6)	10 mM
	NaCl	140 mM
	NP-40	0,5 %
	Protease Inhibitor Cocktail	1:100
FACS-Fix	NaCl	0,145 M
	Paraformaldehyd	1 %
		pH auf 7,4 einstellen
Konjugatpuffer	PBS (pH 7,2)	1x
	EDTA	5-10 mM

### 2.3 Enzyme

AmpliGold Taq	Applied Biosystems
DNase I, Rnase-frei	Roche
High Prime	Roche
HotStar-Taq-DNA-Polymerase	Qiagen

RNaseA (aus Rinderpankreas)	Roche
RNaseH	Roche
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Fermentas
SuperScript™ III reverse Transkriptase	Invitrogen
Taq-DNA- Polymerase	Sigma
T4-DNA-Ligase	Fermentas
Viralex Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH
Trypsin/EDTA 100x	Gibco

## 2.4 Größen- und Molekulargewichtsmarker

### 2.4.1 DNA- Größenmarker

Zur Bestimmung der Größe doppelsträngiger linearer DNA-Moleküle in einem Bereich von 0,1 bis 12 Kbp wurde die „1 kb+ DNA Ladder“ der Firma Invitrogen verwendet (siehe Abbildung 12). Sie enthält Fragmente folgender Größe (in bp):

100 / 200 / 300 / 400 / 500 / 650 / 850 / 1000 / 1650 / 2000 / 3000 / 4000 / 5000 / 6000 / 7000 / 8000 / 9000 / 10.000 / 11.000 / 12.000

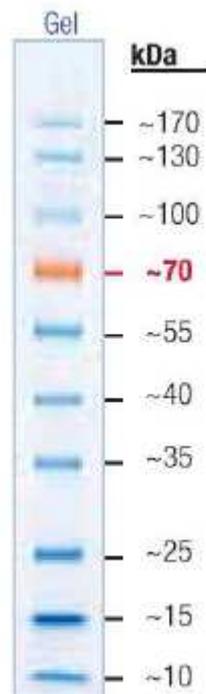


Abbildung 12: 1 kb+ DNA-Leiter der Firma Invitrogen (Karlsruhe).

## 2.4.2 Proteingewichtsmarker

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen wurde ein vorgefärbter Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) der Firma Fermentas verwendet. Dieser Marker setzt sich aus zehn in *E. coli* rekombinant hergestellten und aufgereinigten Proteinen zusammen. An neun dieser Proteine, die zwischen 10 und 170 kDa groß sind, wurde kovalent ein blauer Farbstoff gekoppelt. Nur ein 70 kDa-Protein, welches als Größenreferenz dient, wurde mit einem orangenen Farbstoff gekoppelt (siehe Abbildung 13). Die einzelnen Proteine im Marker weisen folgende Größen auf:

~170 / ~130 / ~100 / ~70 / ~55 / ~40 / ~35 / ~25 / ~15 / ~10 [kD]



**Abbildung 13: PageRuler™, vorgefärbte Proteinleiter der Firma Fermentas (St. Leon-Rot).**

### 2.4.3 Primärantikörper

Antikörper		Verdünnung
<b>DO-1</b> (Calbiochem)	Anti-p53 monoklonaler Antikörper, IgG (Maus)	1:2000
<b>DO-7</b> (Oncogene)	Anti-p53 monoklonaler Antikörper, IgG (Maus)	1:500
<b>CM-1</b> (Biocare Medical)	Anti-p53 polyklonaler Antikörper, IgGs (Kaninchen)	1:500
<b>Pab421</b> (Calbiochem)	Anti-p53 monoklonaler Antikörper, IgG (Maus)	1:200
<b>β-Aktin</b> (Sigma)	Monoklonaler Anti-β-Aktin Antikörper, IgG (Maus)	1:5000
<b>p21</b> (BD Pharmingen)	Anti-p21 monoklonaler Antikörper, IgG (Maus)	1:1000
<b>p73 (Ab-4)</b> (Labvision)	Anti-p73 monoklonaler Antikörper-Cocktail, IgGs (Maus) (Klone ER-13 + ER-15 + GC-15)	1:200
<b>Bax (sc-493)</b> (Santa Cruz)	Anti-Bax polyklonaler Antikörper, IgGs (Kaninchen)	1: 500
<b>Cytochrom C Oxidase Untereinheit IV (10G8)</b> (Molecular Probes)	Anti-Cytochrom C Oxidase Untereinheit IV monoklonaler Antikörper, IgG (Maus)	1:1000
<b>Cytochrom C (Klon 7H8.2C12)</b> (BD Biosciences)	Anti-Cytochrom C monoklonaler Antikörper, IgG (Maus)	1:1000
<b>Caspase-3 (8G10)</b> (Cell Signaling Technology)	Anti-Caspase-3 monoklonaler Antikörper, IgG (Maus)	1:1000
<b>NIR</b> (Arbeitsgruppe Prof. Schüle, Freiburg)	Anti-NIR monoklonaler Antikörper (Kaninchen)	1: 1000

<b>Mdm2 (SMP14)</b> (Santa Cruz)	Anti-Mdm2 monoklonaler Antikörper (Maus)	1:1000
-------------------------------------	---	--------

Alle Antikörper wurden in den angegebenen Verdünnungen eingesetzt.

#### 2.4.4 Sekundärantikörper

<b>Anti-Kaninchen-POX</b> (Sigma)	Peroxidase-gekoppelter anti-Kaninchen Antikörper	1:2000
<b>Anti-Maus-POX</b> (Sigma)	Peroxidase-gekoppelter anti-Maus Antikörper IgG	1:2000
<b>Anti-Maus-TRITC</b> (Sigma)	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat-gekoppelter anti-Maus Antikörper IgG	1:100
<b>Ziege Anti-Maus</b> (Aurion, Holland)	Anti-Maus Antikörper mit 10 nM kolloidalem Gold gekoppelt	1:10

Alle Antikörper wurden in den angegebenen Verdünnungen eingesetzt.

#### 2.5 Bakterienstämme

Zur Plasmidvermehrung und Transformation wurden die *E.coli*-Stämme pMosBlue und DH5 $\alpha$  eingesetzt.

#### 2.6 Nährmedien zur Kultivierung von *E.coli*

LB-Medium: Luria broth base (GIBCO)	2,5 % (w/v)
LB-Agar: Luria's agar (GIBCO)	3,75 % (w/v)

Zur Selektion wurde jeweils Ampicillin (Bayer/Leverkusen; 100 mg/ml) in einer Endkonzentration von 100  $\mu$ g/ml, bzw. Kanamycin (Sigma) in einer Endkonzentration von 30  $\mu$ g/ml zugegeben.

## 2.7 Lösungen zur präparativen Plasmid-DNA-Isolierung

Alle Plasmidaufreinigungen erfolgten mit dem „Plasmid DNA Purification“-Kit von Macherey-Nagel.

Puffer S1 (Resuspensionspuffer)	Tris/HCl	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNaseA	100 µg/ml
		pH 8,0
Puffer S2 (Lysispuffer)	NaOH	200 mM
	SDS	1 %
Puffer S3 (Neutralisationspuffer)	KAc	2,8 M pH 5,1
Puffer N2 (Äquilibrierungspuffer)	Tris	100 mM
	Ethanol	15 %
	KCl	900 mM
	Triton X-100	0,15 %
		ad pH 6,3 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Puffer N3 (Waschpuffer)	Tris	100 mM
	Ethanol	15 %
	KCl	1,15 M
		ad pH 6,3 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
Puffer N5 (Elutionspuffer)	Tris	100 mM
	Ethanol	15 %
	KCl	1 M
		ad pH 8,5 mit H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>

## **2.8 Zelllinien**

### **2.8.1 WS-1**

Humane normale Hautfibroblasten-Zelllinie.

(American Type Culture Collection ATCC CRL-1502™)

### **2.8.2 HCT116**

Humane Kolonkarzinom- Zelllinie mit Wildtyp p53.

(American Type Culture Collection ATCC CCL-247™)

### **2.8.3 HCT116 p53-/-**

Stammt von der oben genannten Zelllinie HCT116 ab, das p53-Gen wurde durch gerichtete, homologe Rekombination ausgeknockt; die Zelllinie wurde uns vom Labor Dr. Bert Vogelstein, Baltimore, zur Verfügung gestellt.

### **2.8.4 HCT116 p53-/- pBabePuro**

Stammt ebenfalls von der oben genannten Zelllinie ab, der retrovirale Leervektor pBabePuro wurde in die Zellen eingebracht. Die Zellen dienen als Kontrollzelllinie.

### **2.8.5 HCT116 p53-/- R175HPuro**

Stammt auch von der oben genannten Zelllinie ab, die p53-Mutante R175H wurde unter Verwendung des retroviralen Vektors pBabePuro in die Zellen eingebracht.

### **2.8.6 HCT116 p53-/- R273HPuro**

Stammt ebenfalls von der oben genannten Zelllinie ab, die p53-Mutante R273H wurde unter Verwendung des retroviralen Vektors pBabePuro in die Zellen eingebracht.

### 2.8.7 MCF7

Humane Mammakarzinom-Zelllinie mit Wildtyp p53.  
(ATCC HTB-22<sup>TM</sup>)

### 2.8.8 H1299

humane, epitheliale Lungenkarzinomzelllinie, die kein p53 exprimiert.  
(ATCC CRL-5803<sup>TM</sup>).

### 2.8.9 HEK 293GP

Humane embryonale Nierenzellen, die stabil mit den viralen Genen gag und pol transfiziert wurden. Sie dienen als Verpackungszelllinie.

## 2.9 Medien und Lösungen für die Zellkultur

McCoy's 5A Medium

Sigma

- mit Glutamax-I
- ohne Serum
- L-Glutamin
- NaHCO<sub>3</sub>

DMEM „Dulbecco's Modified Eagle Medium“

PAA Laboratories

- mit 4,5 mg/ml Glukose
- 1 % Natriumpyruvat
- L-Glutamin

MEM-Medium

PAA Laboratories

- mit „Earle's Salt“
- L-Glutamin

FKS („fetal calf serum“), fötales Kälberserum

PAA Laboratories

- Zu 10 % dem Medium zugesetzt
- Vor Zugabe 30 min bei 55°C inaktivieren

Penicillin-Streptomycin

Gibco (Paisly/Scotland)

## 2.10 Small interfering RNAs (siRNAs)

### 2.10.1 NIR-siRNA

Sequenzen der Doppelstrang siRNA des humanen NIR-Proteins:

Sequenz 1:	Sense	r(GACAGGAAGGAUGAAGACA)dTdT
(=NIR2)	Antisense	r(UGUCUUCAUCCUCCUGUC)dTdT

Sequenz 2:	Sense	r(GACCUGAACUCCCAGAGA)dTdT
(= NIR1)	Antisense	r(UCUCUGGGAAGUUCAGGUC)dTdT

Die Vorlage für die Auswahl dieser Sequenzen stammt von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Roland Schüle von der Frauenklinik der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.

### 2.10.2 p53-siRNA

Sequenzen der Doppelstrang siRNA des humanen p53-Proteins:

Sequenz:	Sense	r(GACUCCAGUGGUAUUCUAC)dTdT
	Antisense	r(GUAGAUUACCACUGGAGUC)dTdT

### 2.10.3 Mdm2-siRNA

Sequenzen der Doppelstrang siRNA des humanen Mdm2-Proteins:

Sequenz:	Sense	r(CCACCUCACAGAUUCCAGC)dTdT
	Antisense	r(GCUGGAAUCUGUGAGGUGG)dTdT

### 2.10.4 Kontroll-siRNA

#### Sequenz der Kontroll (non-silencing)-siRNA

Sense        r(UUCUCCGAACGUGUCACGU)dTdT  
 Antisense    r(ACGUGACACGUUCGGAGAA)dTdT

#### Fluoreszin (FITC)-gekoppelte siRNA zur Kontrolle der Transfektionseffizienz

Die Sequenz der Fluoreszin-gekoppelten siRNA entspricht der der Kontroll-siRNA.  
 Alle siRNA-Produkte wurden von der Firma Qiagen bezogen.

### 2.11 Lösungen für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

1x Laufpuffer für SDS-PAGE	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 % (w/v)
		Ad pH 8,3

### 2.12 Lösungen für den Western-Blot

Western-Transferpuffer	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 % (v/v)

## 2.13 Synthetische Oligonukleotide („Primer“)

### 2.13.1 Primer für die ChIP-Analysen

Gen	Sequenz	Fragmentgröße
<i>p21</i> - Promotor	For 5´ ACCTTTCACCATTCCCCTAC 3´ Rev 5´ GCCCAAGGACAAAATAGCCA 3´	ca. 300 bp
<i>u6</i> - Promotor	For 5´ GGCCTATTTCCCATGATTCC 3´ Rev 5´ ATTTGCGTGTCATCCTTGC 3´	ca. 300 bp

### 2.13.2 Primer für RNA-Analysen

Gen	Sequenz	Fragmentgröße
<i>bak</i>	For 5´ TAGGCGCTGGGGAGACTGATAACT 3´ Rev 5´ AGGCTTGGAGGCTTCTGACACG 3´	440 bp
<i>bax</i>	For 5´ CCCCAGAGAGGTCTTTTTCCGAGTG 3´ Rev 5´ GAAAAATGCCCATGTCCCCCAATC 3´	410 bp
<i>β-aktin</i>	For 5´ GCTGTGCTATGTTGCTCTAGACTTC 3´ Rev 5´ CTCAGTAACAGTCCGCctAGAAGC 3´	500 bp
<i>gadd45</i>	For 5´ ATGACTTTGGAGGAATTCTCGGC 3´ Rev 5´ GAATGTGGATTTCGTCACCAGCAC 3´	400 bp
<i>gapdh</i>	M 5´ TGGTATCGTGGAAGGACTCATGAC 3´ N 5´ AGTCCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC 3´	190 bp
<i>hprt</i>	For 5´ GTTGAGAGATCATCTCCACC 3´ Rev 5´ AGCGATGATGAACCAGGTTA 3´	350 bp
<i>nox</i>	For 5´ ATGCCTGGGAAGAAGGCGCGCAA 3´ Rev 5´ CTTTGATGTATTCCATCTTCCGT 3´	470 bp
<i>redd1</i> ( <i>ddit4</i> )	For 5´ CGTCCTTGCCCCGAACTCC 3´ Rev 5´ GGCAACGACACCCCATCCA 3´	180 bp
<i>p21</i>	For 5´ GGCGGCAGACCAGCATGACAGATT 3´ Rev 5´ ATGAAGCCGGCCACCCAACCTC 3´	350 bp
<i>p53</i> - <i>dinp1α</i>	For 5´ TTGTGGGTGAAGTCAGTTCTTC 3´ Rev 5´ GAGCTTCCACTCTGGGACTACT 3´	460 bp

<i>pig3</i>	For 5' GTGCACTTTGACAAGCCGGGAGGA 3' Rev 5' CAGCCTGGGTTCAGGGTCAATCCCT 3'	350 bp
<i>puma</i>	For 5' TGTAGAGGAGACAGGAATCCACGG 3' Rev 5' AGGCACCTAATTGGGCTCCATCTC 3'	250 bp, 550 bp, 900 bp

### 2.13.3 Primer für die Klonierung des *p53*-Gens in pDsRed-N1

Primer	Sequenz	Fragmentgröße
For	5' cgatataagcttatggaggagccgcag 3'	ca. 1,2 kb
Rev	5' gcaattaagctgtctgagtcaggccc 3'	

### 2.13.4 Primer für die Amplifikation der mitochondrialen Sonden

Die Zahlen in Klammern in der „Sequenz“- Spalte geben die Positionen der Primer im mitochondrialen Genom an.

Sonde	Sequenz	Fragmentgröße
D-Loop	For 5' ggggtaccaaataactcaaagggcctg 3' (15871) Rev 5' ggggtaccgatcgtggtagtagagg 3' (730)	ca. 1,3 kb
Sonde 2	For 5' ggggtacctacctcctcaaagcaatac 3' (591) Rev 5' ggggtaccattggatcaattgagtatag 3' (2891)	ca. 2,15 kb
Sonde 3	For 5' ggggtacctaatttattaatgcaaac 3' (2741) Rev 5' ggggtacccggtagaactgctattattc 3' (5038)	ca. 2,15 kb
Sonde 4	For 5' ggggtaccatcatataccaaatctctc 3' (4891) Rev 5' ggggtaccgataggccgagaaagtgtg 3' (7191)	ca. 2,15 kb
Sonde 5	For 5' ggggtacctgtcctatcaataggagc 3' (7041) Rev 5' ggggtaccgcctagtatgaggagcgta 3' (9331)	ca. 2,15 kb
Sonde 6	For 5' ggggtaccaagcctctacctgcacgac 3' (9181) Rev 5' ggggtaccgcgtattataccatagccg 3' (11480)	ca. 2,15 kb
Sonde 7	For 5' ggggtaccgccaacaacttaatatgac 3' (11331) Rev 5' ggggtaccgcgaggttgacctgttagg 3' (13628)	ca. 2,15 kb
Sonde 8	For 5' ggggtaccggaataaccttcctcacag 3' (13491) Rev 5' ggggtaccacagagaatagttaaattag 3' (16008)	ca. 2,4 kb

## 2.14 Vektoren

### 2.14.1 PCR-Klonierungsvektor

#### 2.14.1.1 pGEM-T (Promega)

Der pGEM-T-Vektor geht aus dem Vektor pGEM<sup>®</sup>-5Zf(+) (Promega) durch einen *EcoRV*-Restriktionsverdau hervor, an dem in Anschluss an beide Seiten ein 3' terminales Thymidin ligiert ist. Durch dieses Thymidin wird zum einen eine Rezirkularisierung des Vektors verhindert und zum anderen ein kompatibler Überhang zur Einklonierung von PCR-Produkten geschaffen. Als Selektionsmarker enthält pGEM-T ein Ampicilligen.

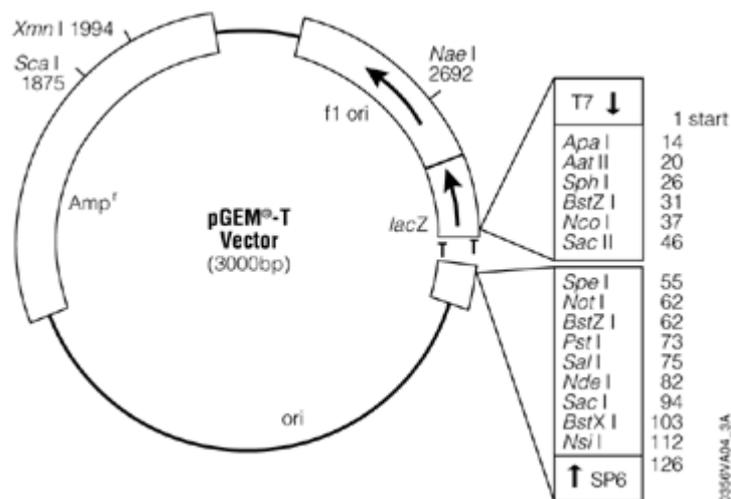


Abbildung 14: Der Vektor pGEM<sup>®</sup>-T

#### 2.14.1.2 pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO

Die Taq-Polymerase produziert PCR-Fragmente mit 3'-dA-Überhängen. Diesen Umstand nutzt man bei der TOPO-Klonierung. Der pCR2.1-Topo-Vektor besitzt komplementäre dT-Überhänge, wodurch das PCR-Produkt ohne Restriktionsverdau eingebaut werden konnte. Das Enzym DNA-Topoisomerase I ist an den Vektor assoziiert und ligiert das PCR-Produkt und den Vektor innerhalb kurzer Zeit.

Weiterhin besitzt der Vektor Bindungsstellen für M13 und T7-Primer, wodurch eine Sequenzierung des Inserts vereinfacht wird.

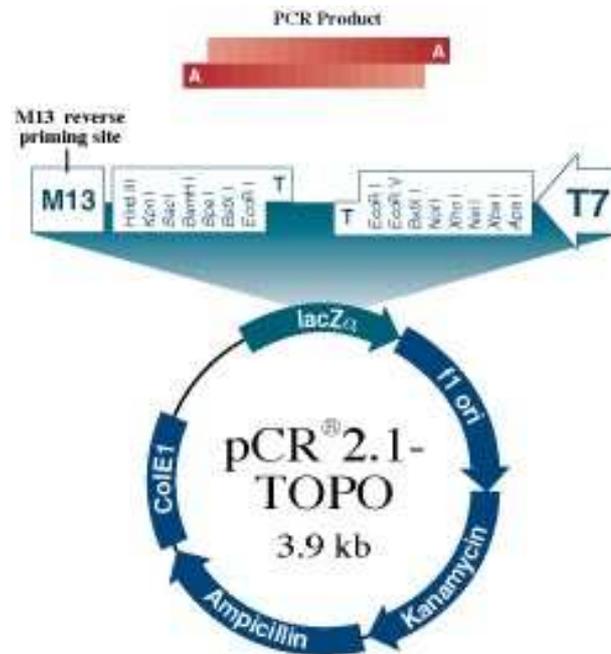


Abbildung 15: Der Vektor pCR®2.1-TOPO

### 2.14.2 Das Reporterplasmid pGL2-Basic

Der pGL2-Basic-Vektor (Promega) enthält im Anschluss an seine MCS („multiple cloning site“) die kodierende Region für das Luziferase-Gen. Diesem Reporter gen nachgeschaltet befindet sich ein SV40-Polyadenylierungssignal. Als Selektionsmarker wird eine Ampicillinresistenz exprimiert.

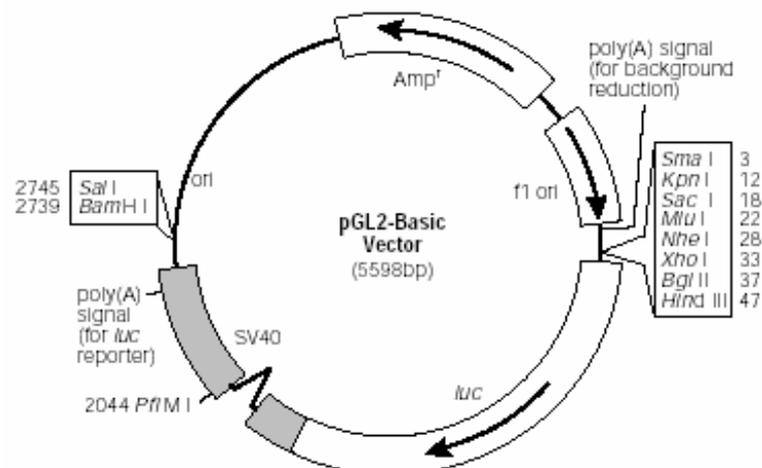


Abbildung 16: Der Vektor pGL2-Basic

## 2.14.3 Effektorplasmide

### 2.14.3.1 pCMV-p53

pCMV-p53 ist ein eukaryotischer Expressionsvektor, der das p53-Gen enthält. Das p53-Gen wird unter der Kontrolle des pCMV-pA-Promotors exprimiert. Dem p53-Gen ist ein SV40-Polyadenylierungssignal nachgeschaltet. Der Vektor beinhaltet eine Ampicillinresistenz ( $Amp^r$ ) als Selektionsgen.

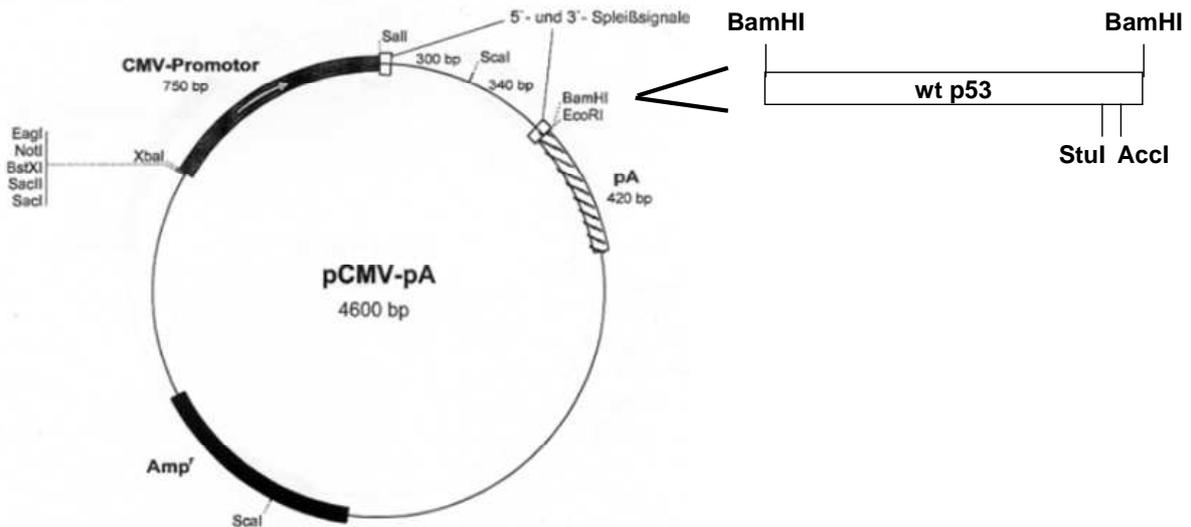


Abbildung 17: Der Vektor pCMV-p53

### 2.14.3.2 pCMX-Flag-Nir

Die für das NIR-Protein kodierende cDNA wurde wie der Vektor mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *NheI* geschnitten und anschließend gerichtet über diese Schnittstellen ligiert (Hublitz *et al.*, 2005). So entsteht der Vektor pCMX-Flag-Vollängen-NIR.

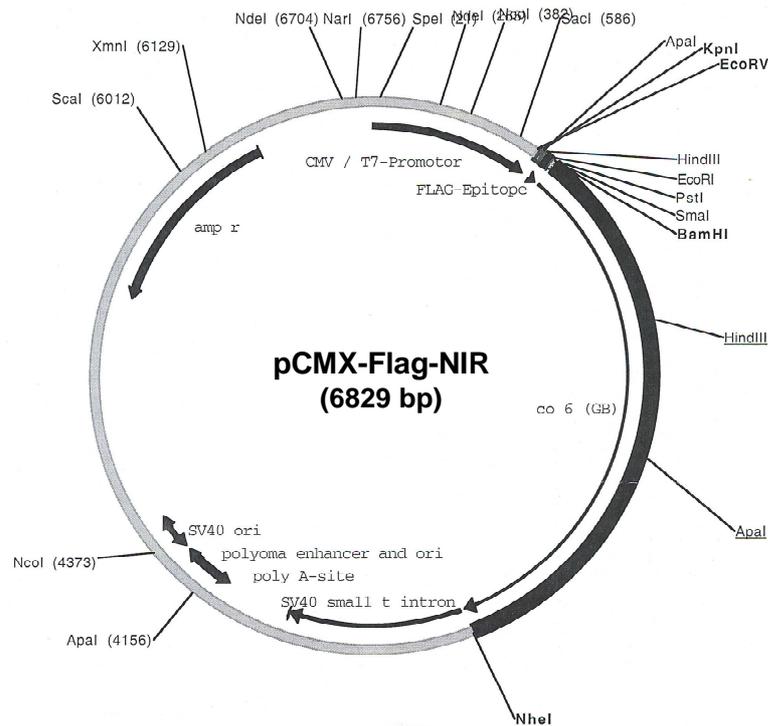


Abbildung 18: Der Vektor pCMX-Flag-NIR

## 2.14.4 Kontrollvektoren

### 2.14.4.1 pCMV-pA

Ein eukaryotischer Expressionsvektor, welcher eine leere Expressionskassette enthält, die sich aus der CMV-Promotorregion und dem SV40-Polyadenylierungssignal zusammensetzt. Dazwischen liegen 5'- und 3'-Spleißsignale. Als Selektionsgen ist eine Ampicillinresistenz ( $Amp^r$ ) enthalten.

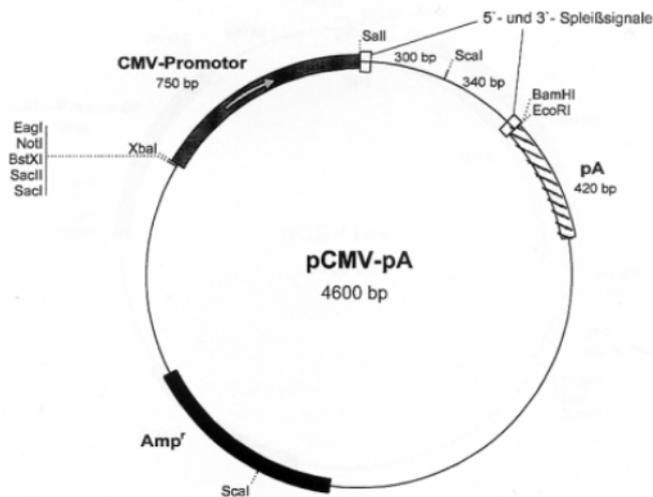


Abbildung 19: Der Vektor pCMV-pA

### 2.14.4.2 pWAF-Luc

Der pWAF-Luc-Vektor besitzt die p53-Bindungsstelle des *p21*-Gens (*CDKN1A*) vor einem Minimalpromotor, dem die codierende Region für das Luciferase-Gen nachgeschaltet ist. Als Selektionsgen dient eine Chloramphenicolresistenz ( $\text{CHR}^R$ ).

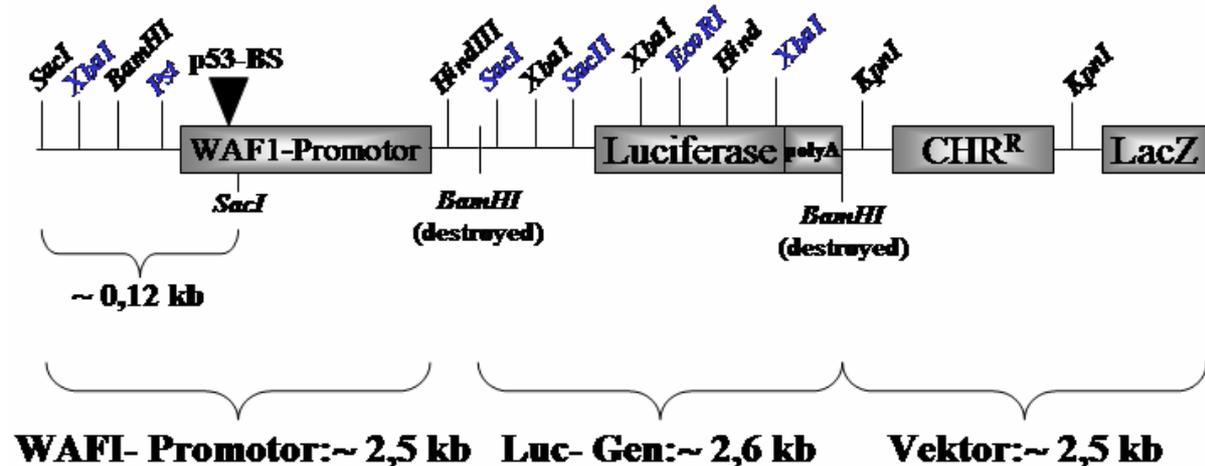


Abbildung 20: Der Vektor pWAF-Luc

### 2.14.4.3 pWAF-Luc $\Delta$ p53-Bindungsstelle

Der pWAF-Luc $\Delta$ p53-Bindungsstelle leitet sich von dem pWAF-Luc-Vektor ab. Aus diesem Plasmid wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym *SacI* die p53-Bindungsstelle

(2,5 kb) entfernt. Es ist weiterhin ein Minimalpromotor vorhanden, dem die codierende Region für das Luciferase-Gen nachgeschaltet ist. Der Minimalpromotor wird allerdings aufgrund des Fehlens der p53-Bindungsstelle nicht mehr aktiviert. Dieser Vektor diene somit als Negativkontrolle.

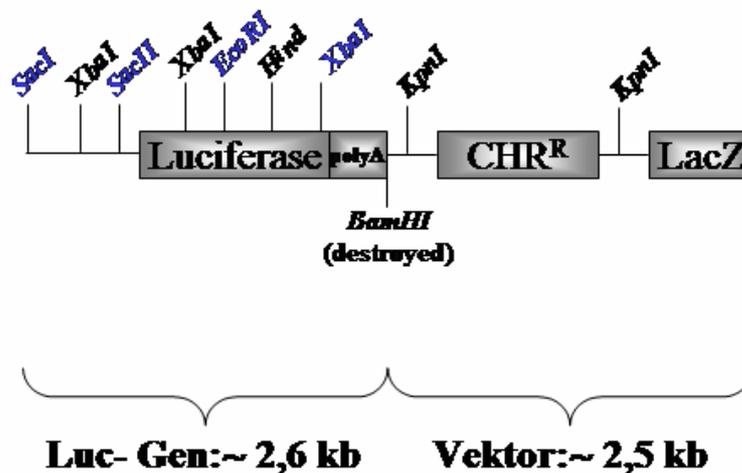


Abbildung 21: Der Vektor pWAF-Luc $\Delta$ p53-Bindungsstelle

## 2.14.5 Fluoreszenzvektoren

### 2.14.5.1 pDsRed-Express-N1

pDsRed-Express-N1 ist ein Expressionsvektor, der für DsRed-Express, einer Variante des roten Fluoreszenzproteins aus *Discosoma sp.*, codiert. Die MCS liegt zwischen einem CMV-Promotor und der Expressionskassette für DsRed-Express. Gene, die in die MCS kloniert werden, werden an den N-Terminus von DsRed-Express fusioniert. Sequenzen, die „upstream“ des *DsRed-Express*-Gens liegen, wurden in eine Kozak-Konsensus-Translations-Initiations-Sequenz umgewandelt, um die Translationseffizienz in eukaryotischen Zellen zu erhöhen. „Downstream“ des *DsRed-Express*-Gens liegt eine SV40-Polyadenylierungssequenz. Der Vektor enthält eine Neomycin-Resistenz-Expressionskassette zur Selektion in Säugerzellen. Zur Vermehrung in *E.coli* dient eine Kanamycin-Resistenz.

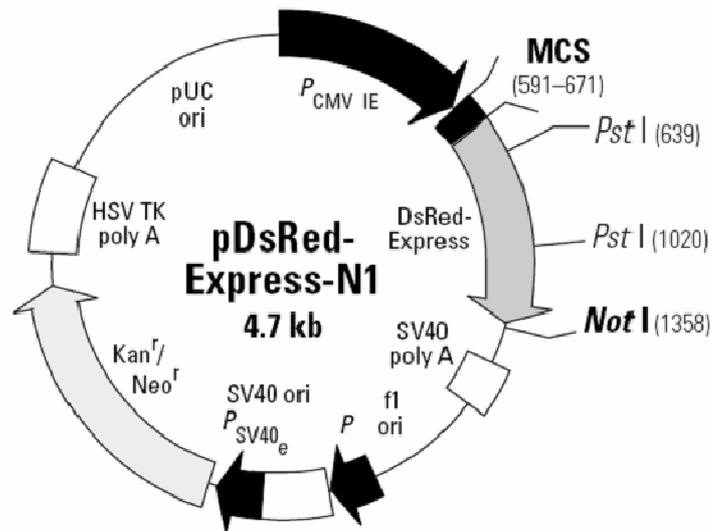


Abbildung 22: Der pDsRed-Express-N1-Vektor

### 2.14.5.2 pDsRed-Express-N1-p53

pDsRed-Express-N1-p53 ist ein eukaryotischer Expressionsvektor, der das p53-Gen enthält. Das p53-Gen wurde über *HindIII* in die „multiple cloning site“ des pDsRed-Express-N1-Vektors kloniert, wodurch ein rot fluoreszierendes p53-Protein exprimiert wird. DsRed-Express wurde durch die Klonierung an den C-Terminus von p53 angehängt.

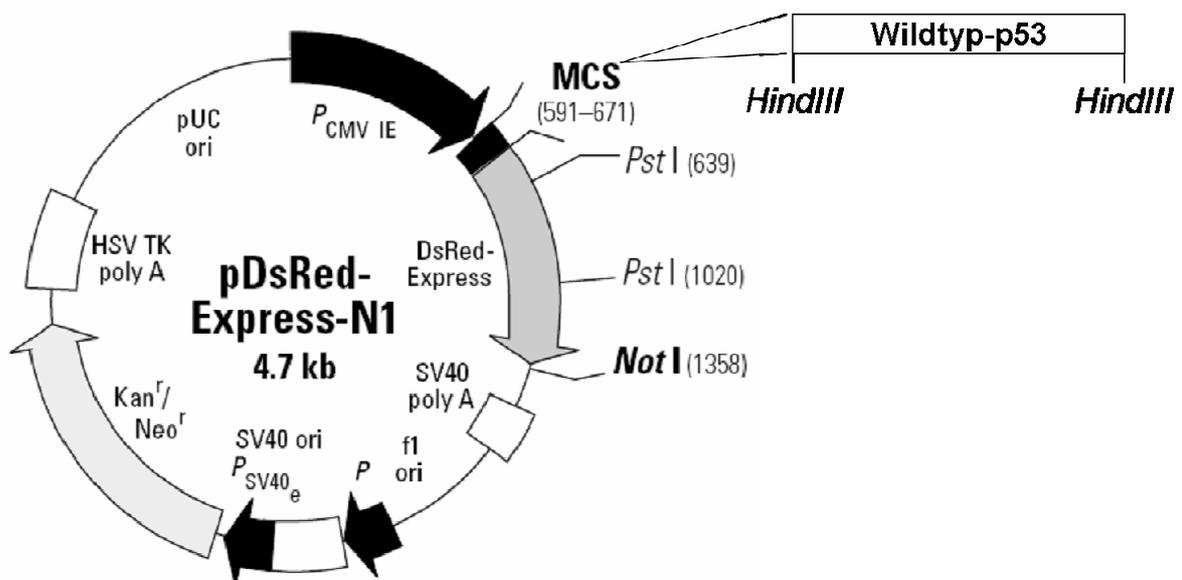


Abbildung 23: Der pDsRed-Express-N1-p53-Vektor

## 2.14.6 Vektoren zur Herstellung stabiler Zelllinien mittels retroviraler Infektion

### 2.14.6.1 Der retrovirale Vektor pLRNL

Der Vektor pLRNL besitzt ein Neomycin- Resistenzgen zur Selektion in eukaryotischen Zellen, das unter der Kontrolle des Rous-Sarkom-Virus-Promotors (RSV) steht und je einem „Long terminal repeat“ (LTR) an beiden Enden. Zur Selektion in Bakterienzellen dient ein Ampicillin-Resistenzgen. Die p53-Mutanten R175H und R273H wurden über die singuläre *BamHI*-Schnittstelle innerhalb der „Multiple Cloning Site“ (MCS) einkloniert.

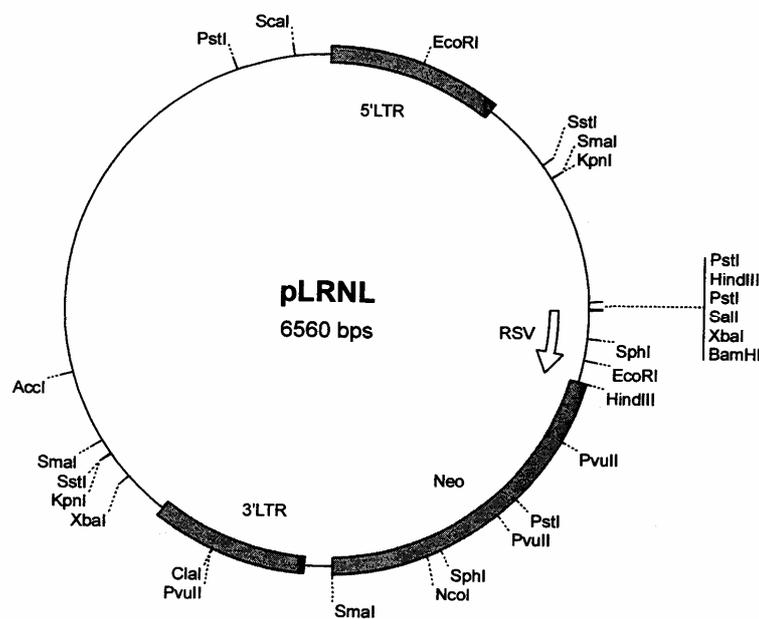


Abbildung 24: Der retrovirale Vektor pLRNL

### 2.14.6.2 Die retroviralen Vektoren pLRNL p53 R175H bzw. R273H

Die Konstrukte p53 R175H bzw. R273H wurden über die *BamHI*-Schnittstelle in den pLRNL-Vektor einkloniert. Im C-Terminus sind die beiden Schnittstellen *StuI* und *AccI* vorhanden.

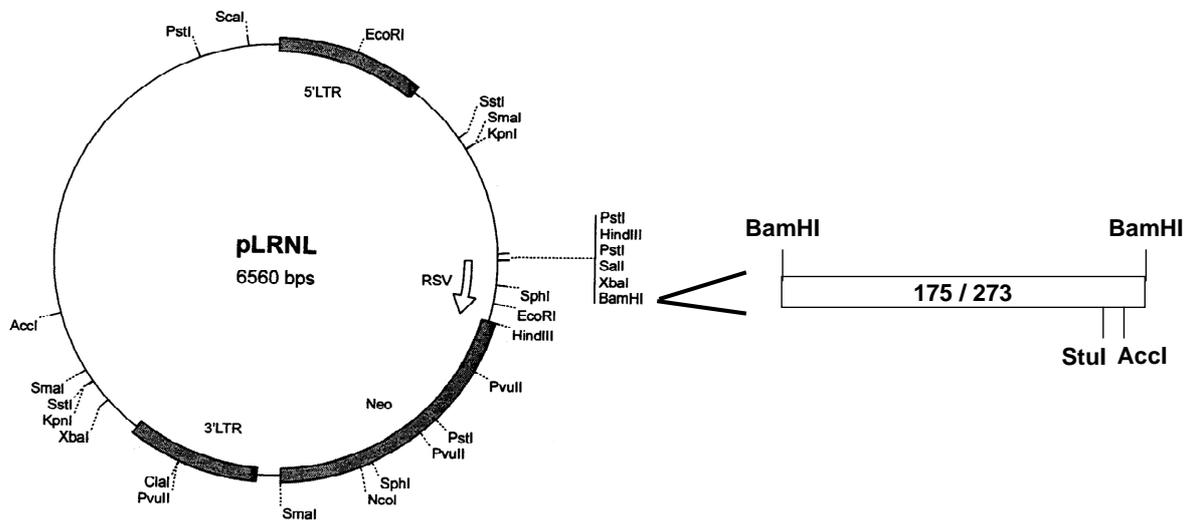


Abbildung 25: Der Vektor pLRNL-R175H bzw. R273H

### 2.14.6.3 Die retroviralen Vektoren pLRNL-p53 R175H $\Delta$ C bzw. R273H $\Delta$ C

Die Konstrukte p53 R175H $\Delta$ C bzw. R273H $\Delta$ C wurden über die *BamHI*-Schnittstelle in den pLRNL-Vektor einkloniert. Die C-terminale *StuI*-Schnittstelle ist weiterhin vorhanden, obwohl der C-Term um 23 Aminosäuren (Aminosäuren 370-393) verkürzt ist. Die *AccI*-Schnittstelle fehlt diesem Vektor.

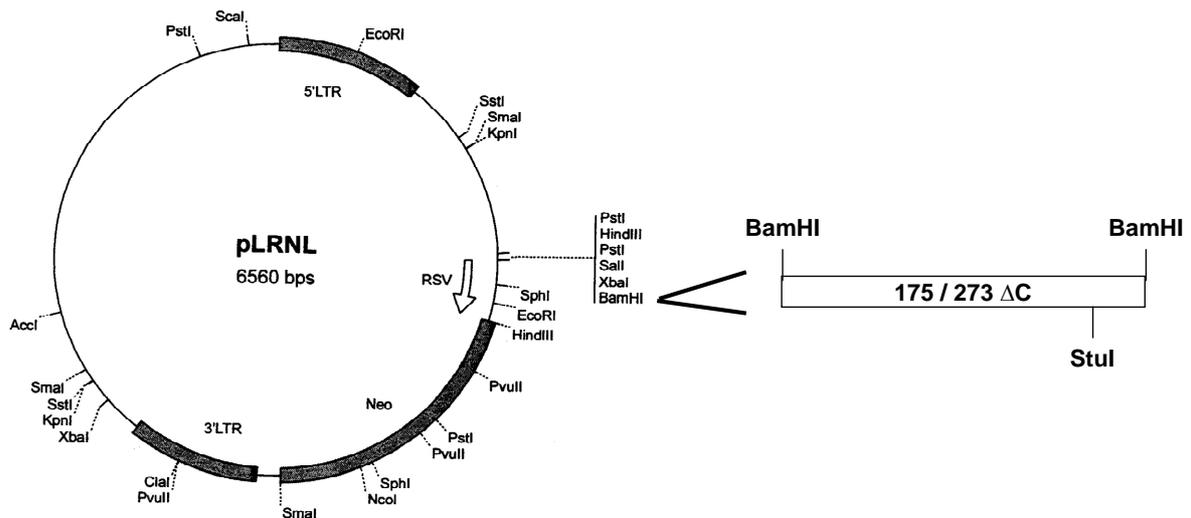


Abbildung 26: Der Vektor pLRNL-R175H $\Delta$ C bzw. R273H $\Delta$ C

#### 2.14.6.4 Die retroviralen Vektoren pLRNL-p53 R175H $\Delta$ O bzw. R273H $\Delta$ O

Die Konstrukte p53 R175H $\Delta$ O bzw. R273H $\Delta$ O wurden über die *Bam*HI-Schnittstelle in den pLRNL-Vektor inkliniert. Die C-terminale *Stu*I-Schnittstelle ist nicht mehr vorhanden, da sie zwischen den AS 327-347 liegt, die in diesem Vektoren deletiert sind. Diesem Vektor fehlt somit die Oligomerisierungsdomäne von p53. Die C-terminale *Acc*I-Schnittstelle ist in diesem Vektor verfügbar.

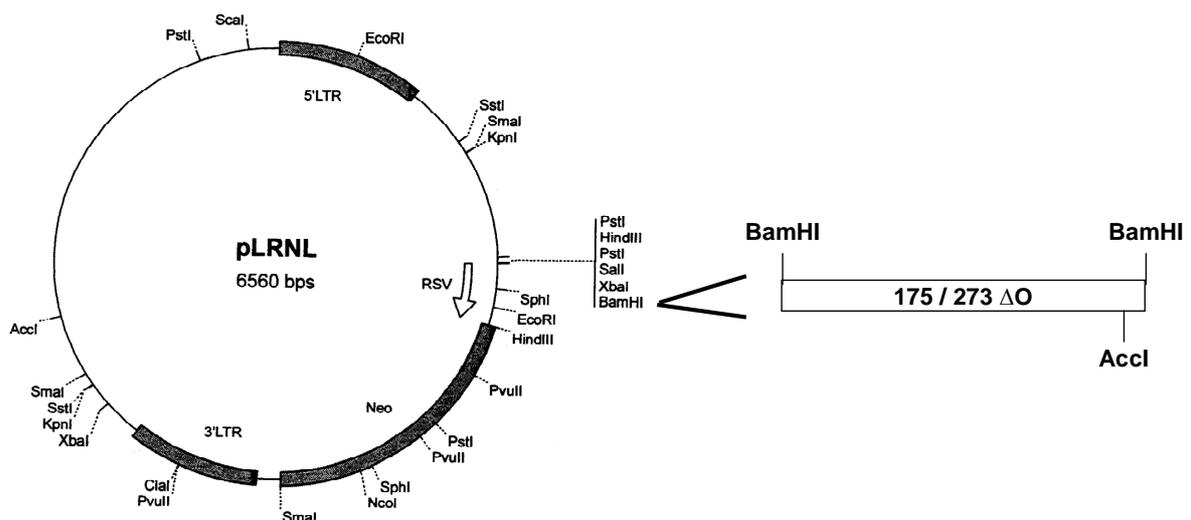


Abbildung 27: Der Vektor pLRNL-R175H $\Delta$ O bzw. R273H $\Delta$ O

### 2.14.6.5 Der retrovirale Vektor pLRNL $\Delta$ N-p73

Der Vektor enthält das Konstrukt  $\Delta$ ex.2/3p73 $\beta$ , im folgenden  $\Delta$ Np73 genannt. Dieses Konstrukt wurde über die *Bam*HI-Schnittstelle in den pLRNL-Vektor eingebaut (Klonierung siehe Diplomarbeit von Herrn cand. biol. Daniel Müller).

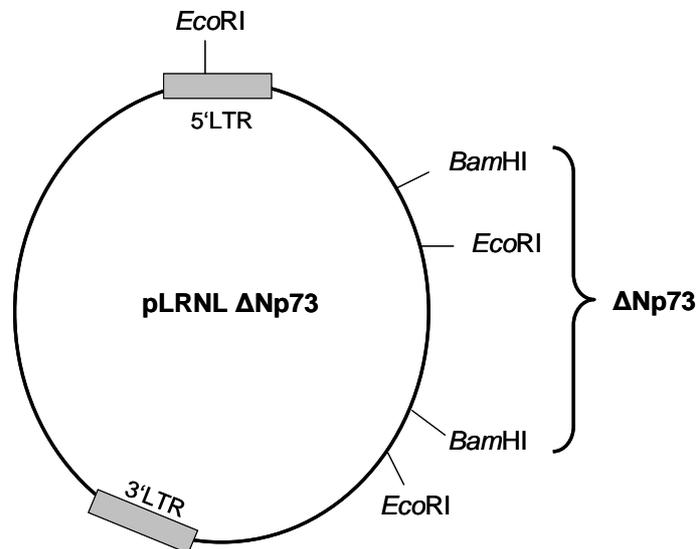


Abbildung 28: Der Vektor pLRNL  $\Delta$ N-p73

### 2.14.6.6 Der retrovirale Vektor pBabePuro

Der Vektor pBabePuro besitzt ein Puromycin-Resistenzgen zur Selektion in eukaryotischen Zelllinien, welches unter der Kontrolle des SV40-Virus-Promotors (SV40) steht. Zu beiden Enden des Promotors findet sich je ein „Long Terminal Repeat“ (LTR). Um eine Selektion in Bakterienzellen durchführen zu können, trägt der Vektor zusätzlich eine für ein Ampicillin-Resistenzgen kodierende Sequenz. Die Mutanten R175H und R273H wurden über die singuläre *Bam*HI-Schnittstelle in die MCS einkloniert.

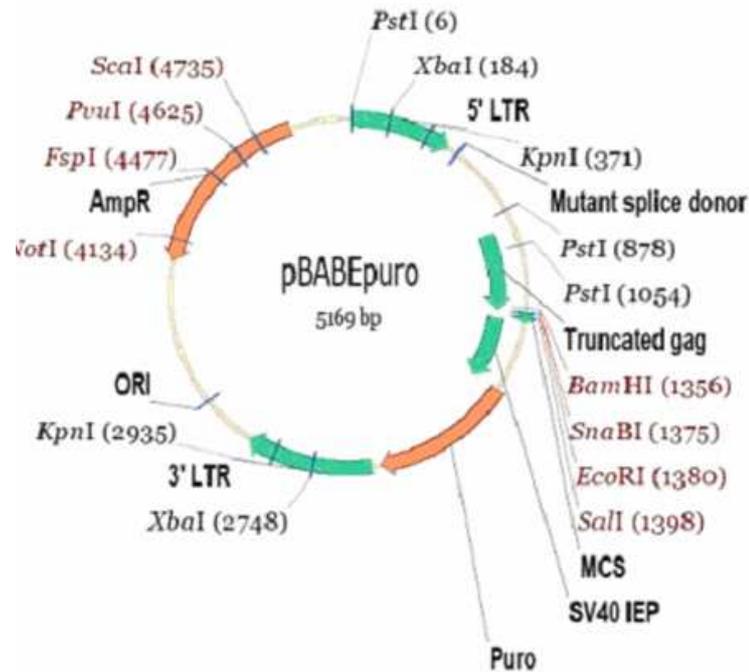


Abbildung 29: Der retrovirale Vektor pBabePuro

#### 2.14.6.7 Der retrovirale Vektor pBabePuro p53-337C

Das p53-337C-Konstrukt ist hier in den retroviralen Vektor pBabePuro inseriert. Die p53-337C-Mutante trägt eine Mutation in der Oligomerisierungsdomäne und ist somit für die Tetramerisierung defekt, ansonsten aber, insbesondere in der DNA-Bindedomäne, intakt. Das Konstrukt wurde über *BamHI* in den retroviralen Vektor eingefügt (Klonierung siehe Diplomarbeit von Herrn cand. biol. Daniel Müller).

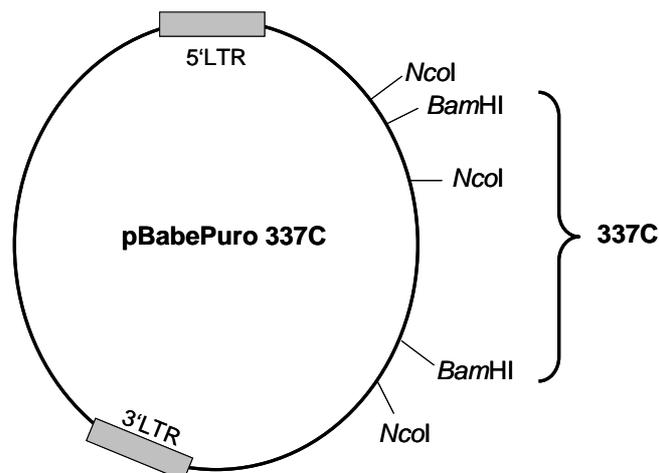


Abbildung 30: Der Vektor pBabePuro-337C

### 2.14.6.8 Der retrovirale Vektor pLXSN-p53 DD

Der Vektor trägt die retroviralen 5'- und 3'-LTR-Elemente sowie eine Ampicillin- und Neomycin-Resistenz. Die „Multiple Cloning Site“ (MCS), in die das Konstrukt p53DD, das aus den ersten 14 Aminosäuren und der Oligomerisierungsdomäne von p53 besteht, eingebracht wurde, ist eingezeichnet. Das p53DD-Konstrukt hat eine Größe von 0,5 kb und wird von zwei *EcoRI*-Schnittstellen flankiert.

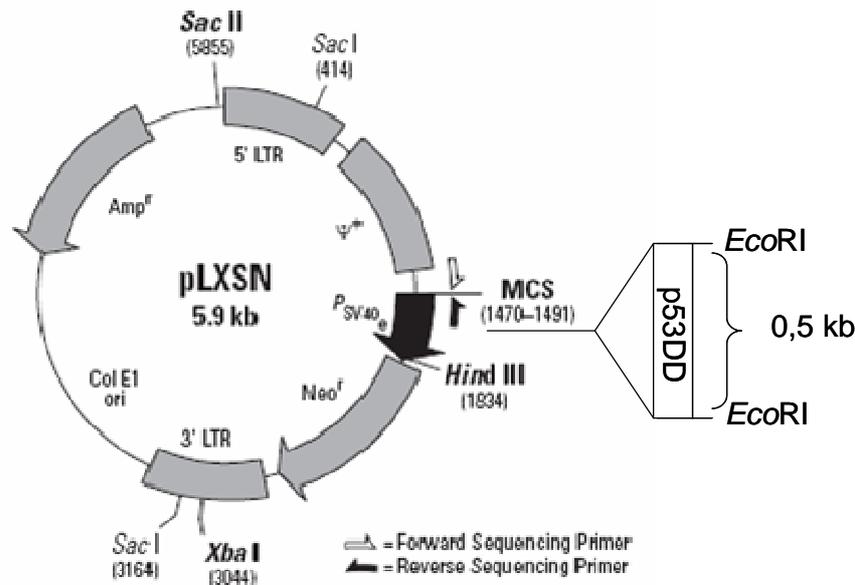
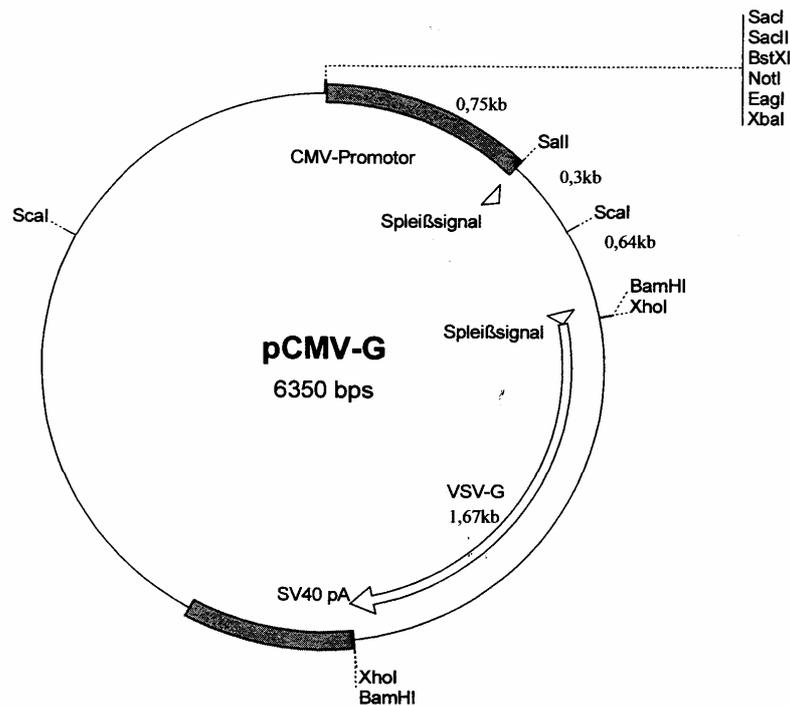


Abbildung 31: Der Vektor pLXSN-p53 DD

### 2.14.6.9 Der Vektor pCMV-G

Der pCMV-G-Vektor enthält die Sequenz für das vaskuläre Stomatitis-Virus-G-Protein (VSV-G), welches für Glycoproteine der viralen Lipidhülle kodiert. Durch Transfektion dieses Vektors werden Zellen, die bereits die viralen Gene *Gag* und *Pol* tragen, durch die Expression des *Env*-Gens pseudotypisiert. Damit wird gewährleistet, dass infektiöse Viren in das Zellkulturmedium abgegeben werden können. Die Expression des *Env*-Gens unterliegt der Kontrolle eines CMV-Promotors und wird durch ein SV40-Polyadenylierungssignal terminiert. Die Selektion in Bakterienzellen wird durch ein Ampicillin-Resistenzgen ermöglicht.



**Abbildung 32: Der Vektor pCMV-G**

## 2.15 Computersoftware

Diese Arbeit wurde mit Hilfe des Textverarbeitungsprogramms WORD aus dem Microsoft Office 2000 Premium Paket erstellt. Für graphische Darstellungen wurde das Präsentationsprogramm Powerpoint (Microsoft Office 2000 Premium Paket) eingesetzt.

Die Bildverarbeitung erfolgte mittels Adobe Photoshop und Corel Photo-Paint 11. DNA- und Proteinsequenzanalysen wurden mit Hilfe folgender Internetadressen durchgeführt:

NCBI Sequences: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

NCBI Blast: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

NEBCutter2: <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>

## 3 Methoden

### 3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Unter Zellkultur versteht man die Kultivierung und Vermehrung eukaryotischer Zellen *in vitro*. Beim Wachstum *in vitro* organisieren sich die Zellen nicht mehr in einem Gewebe, sondern wachsen meist als Einzelschicht (Monolayer) in vielschichtigen Zellschichten (Multilayer) oder in Suspension (Suspensionskultur).

Adhärente Zellen werden dabei in speziellen Kulturgefäßen aus Plastik oder Glas kultiviert, deren Oberflächen zum Teil beschichtet sind, um den Zellen das Wachstum auf der festen Unterlage zu erleichtern.

Unter Zellpassage oder Subkultivierung versteht man das Ablösen der Zellen vom Boden des Kulturgefäßes durch Behandlung mit Trypsin/EDTA. Trypsin ist eine Protease, welche die Proteinbrücken zwischen den einzelnen Zellen sowie zwischen Zellen und Unterlage auflöst. EDTA komplexiert die für diese Proteinwechselwirkungen notwendigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Die dadurch entstehende Suspension von Einzelzellen kann zur Animpfung neuer Kulturschalen verwendet werden.

Um eine möglichst natürliche physiologische Umgebung für die Zellen herzustellen, werden sie in halbsynthetischen Nährmedien gehalten. Diese gepufferten Medien enthalten unter anderem Aminosäuren, Nukleotide, Salze, Vitamine und gewöhnlich einen Zusatz von Serum (meist fötales Kälberserum, „FKS“).

#### 3.1.1 Kultivierung von WS-1-Zellen

Die Stammhaltung erfolgte in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit 13 ml MEM-Medium. Die Temperatur betrug 37°C bei einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 7 % in dem CO<sub>2</sub>-Brutschrank Hera-cell (Heraeus Instruments, Düsseldorf). Die Zellkultur wurde alle drei Tage 1:3 gesplittet.

### **3.1.2 Kultivierung von HCT116-Zellen**

Die Stammhaltung erfolgte in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit 13 ml McCoy's 5A-Medium. Die Temperatur betrug 37°C bei einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 7 % in dem CO<sub>2</sub>-Brutschrank Hera-cell (Heraeus Instruments, Düsseldorf). Die Zellkultur wurde alle zwei bis drei Tage 1:6 gesplittet.

### **3.1.3 Kultivierung von MCF7-Zellen**

Die Stammhaltung dieser Zelllinie erfolgte in 75cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit 13 ml DMEM-Medium. Die Temperatur betrug 37°C bei einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 7 % in dem CO<sub>2</sub>-Brutschrank Hera-cell (Heraeus Instruments, Düsseldorf). Die Zellen wurden zweimal pro Woche 1:4 gesplittet.

### **3.1.4 Kultivierung von H1299-Zellen**

Die Stammhaltung dieser Zellen erfolgte in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit 13 ml DMEM-Medium in CO<sub>2</sub>-begasten Brutschränken (7 % CO<sub>2</sub>) bei 37°C. Das Medium wurde mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FKS) supplementiert. Die Zelllinie wurde zweimal pro Woche 1:8 gesplittet.

### **3.1.5 Kultivierung von HEK 293GP-Zellen**

Die Stammhaltung der HEK 293GP-Zellen erfolgte in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit 13 ml DMEM. Die Temperatur betrug 37°C bei einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 7 % in dem CO<sub>2</sub>-Brutschrank Hera-cell (Heraeus Instruments, Düsseldorf). Die Zellen wurden alle drei Tage 1:6 gesplittet.

Alle Arbeiten mit eukaryotischen Zellen wurden unter einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### 3.1.6 Einfrieren und Auftauen eukaryotischer Zellen

Die Langzeitlagerung eukaryotischer Zelllinien erfolgt in der Regel in flüssigem Stickstoff (-196°C).

Um Monolayer-Zellkulturen einzufrieren, wurden die Zellen zunächst mit Hilfe von Trypsin/EDTA vom Boden des Zellkulturgefäßes abgelöst. Anschließend wurden die Zellen einmal in Medium gewaschen und pelletiert (1600 rpm, 6 Min). Das Zellpellet wurde in kaltem Kulturmedium resuspendiert. In einem Kryotube wurde 1 ml der Zellsuspension mit 100 µl sterilem DMSO vermischt. Im Gegensatz zu Bakterienzellen müssen eukaryotische Zellen langsam eingefroren werden. Als Richtlinie gilt, dass die Temperatur um ca. 1°C pro Minute absinken sollte. Daher wurden die Zellen zunächst für eine Stunde bei -20°C inkubiert, dann für 24 Stunden bei -70°C und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert. In diesem Zustand können die Zellen für mehrere Jahre aufbewahrt werden.

Das Auftauen eingefrorener eukaryotischer Zelllinien muß schnell durchgeführt werden. Zunächst wird die Zellsuspension bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und mit 10 ml vorgewärmtem Kulturmedium versetzt. Anschließend wird die Zellsuspension bei 1600 rpm für 6 Min abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wird nochmals wiederholt, um alle Reste des beim Einfrieren zugesetzten DMSO aus der Kultur zu entfernen. Nach dem zweiten Zentrifugationsschritt wird das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert, in ein Zellkulturgefäß, in das zuvor eine entsprechende Menge Medium vorgelegt wurde, pipettiert und im Brutschrank kultiviert.

### 3.1.7 Zellzahlbestimmung mit dem Zellanalysegerät CASY

Zur Bearbeitung bestimmter Fragestellungen war eine exakte Bestimmung der Zellzahl in dem Zellanalysegerät CASY nötig. Das Gerät erlaubt sowohl die Bestimmung der Zellzahl, als auch die qualitative Beurteilung der Zellpopulation. Parallel zur Zelldichte wird auch die Größenverteilung der Zellpopulation analysiert. Das Messprinzip beruht auf der Tatsache, dass intakte Zellen sich in einem elektrisch leitenden Medium wie ein Isolator verhalten und sich bei der Passage durch die Messzelle der elektrische Widerstand in Abhängigkeit von der Zellgröße ändert. Die zu messenden Zellen wurden in einer Verdünnung von 1:1000 in einer Elektrolytlösung (Casyton) resuspendiert und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch die Messkapillare gesaugt. Bei diesem Durchtritt

der Zellen durch die Kapillare verdrängen sie eine ihrem Volumen entsprechende Menge Elektrolyt aus der Messkammer, welches zu einer Erhöhung des Widerstandes führt. Diese Widerstandsänderung dient als Maß für das Volumen der einzelnen Zellen. Die Größenverteilung wird in Form eines Histogramms angegeben.

### **3.1.8 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen**

Im Gegensatz zur retroviralen Infektion oder stabilen Transfektion eukaryotischer Zellen, bei der eine Integration der DNA in das Zellgenom stattfindet, kommt es bei einer transienten Transfektion nur zu einer vorübergehenden Einschleusung der DNA in die Wirtszellen. Die so eingeschleusten Gene sind nur vorübergehend aktiv und gehen bei weiteren Zellteilungen wieder verloren.

Die transienten Transfektionen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden mit dem Reagenz Nanofectin (PAA) vorgenommen. Dazu wurden die zu 100 % konfluenten Zellen der entsprechenden Monolayerkultur am Vortag der transienten Transfektion in 10 cm-Schalen so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion zu 50-70 % konfluent waren.

### **3.1.9 Transiente Transfektion mit Nanofectin**

Die Transfektion mit Nanofectin ist eine Transfektionsmethode mit hoher Transfektionseffizienz bei Einsatz vergleichsweise geringer DNA-Mengen. Nanofectin besteht aus zwei Komponenten, einem positiv geladenen Polymer, das die DNA bindet, und einem Nanopartikel, in den das Polymer eingebettet ist. Durch diese Einbettung wird der Abbau der DNA durch Nukleasen verhindert. Die Methode zeigt eine geringe Zytotoxizität auf die behandelten Zellen.

Die Transfektion mittels Nanofectin wurde gemäß den Ausführungen des Herstellers durchgeführt.

Dem Medium, welches man während der Transfektion verwendete, wurde ein Antibiotika-Mix (Penicillin/Streptomycin: Ausgangskonzentration 5000 U/ml Penicillin und 5000 µg/ml Streptomycin; Invitrogen) in einer 1:200 Verdünnung zugesetzt.

### 3.1.10 Cotransfektion von Reporter genen und Reporter assays

Es wurden hier sogenannte Luziferase-Reporter-Assays durchgeführt. Als Luziferase-Reporter-Plasmid wurde der Vektor pWAF-Luc verwendet.

Die Luziferase-Reporterassays wurden mittels des „Luciferase Assay System“-Kits der Firma Promega (Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Menge des emittierten Lichts wurde dabei als Maß für die Luziferaseaktivität und damit für die Menge an Luziferase im Ansatz gewertet. Eine definierte Menge an Zellen (meist die Zellen aus einem Loch einer 12-Loch-Schale als „Transfektionseinheit“, TE) wurde im mitgelieferten Lysispuffer (125 µl/TE) lysiert (1 min, RT), Zelltrümmer durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 30 s, 12000 rpm) abgetrennt und der Überstand zur Messung eingesetzt. 10-20 µl (in allen Parallelversuchen konstante Mengen) dieses Überstandes wurden unmittelbar vor der Messung der emittierten Lichtmenge im Luminometer (LUMAT Lb9501, Berthold) mit 100 µl der Substratlösung versetzt, kurz gemischt und innerhalb von Sekunden in das Messgerät eingebracht. Die gemessene Lichtmenge („counts“) wurde anschließend auf die gemessene Anzahl transfizierter Zellen und deren mittlerer Fluoreszenz normalisiert. Angegeben wurde jeweils die relative Luziferaseaktivität.

### 3.1.11 Transiente Transfektionen mit RNAiFect® (Qiagen)

Das RNAiFect®-Transfektionsreagenz basiert auf einem liposomalen Transportmechanismus, durch den speziell siRNAs in die Zellen eingeschleust werden.

Am Tag vor der Transfektion wurden  $1 \times 10^5$ - $2 \times 10^5$  Zellen abhängig vom Zelltyp auf 35 mm-Platten (6-Loch-Platten) ausgesät, so dass sie am darauffolgenden Tag zu 40-60 % konfluent waren. Das dafür auszusäende Volumen der in 6 ml Medium aufgenommenen Zellen einer dicht bewachsenen 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche war vorher mittels CASY-Zellzählgerät bestimmt worden.

Am Tag der Transfektion wurde zunächst das sich auf den Zellen befindende Medium abgenommen und pro 35 mm-Platte 600 µl neues Medium vorsichtig hinzugegeben. Im Anschluß wurden pro Transfektionsansatz (ein Ansatz entspricht einer 35 mm-Platte) 98 µl RNAiFect®-Puffer in ein Reagiergefäß vorgelegt. Zu diesem Puffer wurden 2 µl siRNA sowie 12 µl RNAiFect®-Transfektionsreagenz hinzugegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren miteinander vermischt.

Dieses Gemisch wurde für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, so dass sich die Transfektionskomplexe bilden können. Das Reaktionsgemisch mit FITC-gekoppelter siRNA sollte aufgrund derer Lichtempfindlichkeit während der Inkubationszeit dunkel gestellt werden.

Anschließend wurde das Transfektionsgemisch tröpfchenweise auf die Platten aufgetragen. 5 Stunden nach Transfektion wurden auf jede 35 mm-Platte 1,3 ml Nährmedium zu den 600 µl Medium und den 114 µl Transfektionsgemisch hinzugegeben und bis zur weiteren Verwendung belassen. Die Zellen, die mit FITC-gekoppelter Kontroll-siRNA zur Bestimmung der Transfektionseffizienz transfiziert wurden, erhielten kein zusätzliches Nährmedium.

Alle Arbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### **3.1.12 Stabile Transfektion eukaryotischer Zellen**

#### **3.1.12.1 Pseudotypisierte Retroviren**

Im Vergleich zu den herkömmlichen Plasmidvektoren bieten retrovirale Vektoren für bestimmte experimentelle Ansätze einige Vorteile. Dazu zählt, dass die Infektion einer Zelle mit einem Retrovirus nicht zum Absterben derselben führt und gleichzeitig hohe Virustiter erreicht werden. Ein weiterer Vorteil ist der Einbau des viralen RNA-Genoms in das Wirtsgenom. Dies geschieht in Form einer DNA-Kopie, wodurch sichergestellt wird, dass ein Großteil der infizierten Zellen ein mit dem Virusgenom eingeschleustes Fremdgen exprimieren.

Im Allgemeinen werden für diese Zwecke defekte Retrovirusgenome verwendet, denen Faktoren, die wichtig für die Virusvermehrung sind, fehlen. Diese Faktoren werden durch sog. Verpackungszelllinien, in deren Genom ein mutiertes Provirus integriert wurde, beigesteuert.

In den am einfachsten aufgebauten retroviralen Vektoren wurden alle Strukturgene deletiert. Sie sind als Plasmid-Vektoren konstruiert und tragen ein Ampicillin-Resistenzgen, das eine Vermehrung des Vektors als Plasmid in *E.coli* ermöglicht.

In den viralen Genomen, die aus Vektor-DNA entstehen, fehlen Plasmidsequenzen. Die Expression des einklonierten Fremdgens wird hier durch den Promotor aus der 5'-LTR-Region gesteuert. Um infektiöse Retroviruspartikel herzustellen, wird zunächst die Retrovirus-DNA mit Hilfe geeigneter Methoden (z.B. Nanofectin-

Transfektion) in Zellen einer Verpackungszelllinie eingebracht. Die so entstandenen rekombinanten Retroviruspartikel bezeichnet man als "Pseudoviren", da sie aufgrund ihres defekten Genoms nicht in der Lage sind, ohne die Bereitstellung bestimmter Helferfunktionen von außerhalb, neue infektiöse Viruspartikel zu bilden.

Um den Zellen, die das durch die Retroviren übertragene Fremdgen exprimieren, einen selektierbaren Phänotyp zu verleihen, enthalten retrovirale Vektoren üblicherweise einen Selektionsmarker wie z.B. Resistenzgene gegen die Antibiotika G418 oder Puromycin.

### **3.1.12.2 Herstellung infektiöser Retroviren**

Zur Produktion infektiöser Retroviren wurde die Zelllinie HEK 293GP verwendet. In diesen Zellen ist der Teil des Genoms von Adenovirus Typ 5 enthalten, der für die retroviralen Proteine Gag und Pol kodiert. *Gag* kodiert für virale Capsidproteine und Proteine der Virushülle, während *Pol* für die virusspezifische Reverse Transkriptase und andere virusassoziierte Nukleasen kodiert. Transfiziert man gleichzeitig einen retroviralen Vektor, der ein Effektorgen trägt, und den Vektor pCMV-G, der das den HEK 293GP-Zellen fehlende *Env*-Gen, welches für Glycoproteine und die virale Lipidhülle kodiert, enthält, im Verhältnis 1:1, so werden die Viren durch die Expression des vesikulären Stomatitis-Virus-G-Proteins pseudotypisiert. Im Kulturmedium finden sich Viruspartikel, die das zuvor transfizierte Effektorgen tragen. Um die im Medium enthaltenen Viren von den Zellen abzutrennen, erfolgte eine Filtration durch einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm. Die so hergestellten Virusstöcke wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

### **3.1.12.3 Virusinfektion eukaryotischer Zellen und Herstellung "bulk"-infizierter Zelllinien**

Die durch Sterilfiltration gewonnenen und aufgereinigten Viren wurden mit 4 µg/ml Polybrene versetzt und auf die zu infizierenden Zellen gegeben. Polybrene ist ein kationisches Polymer, das die Effizienz der Infektion um 100- bis 1000-fach erhöht. Anschließend wurden die Zellen für 4 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Durch die Behandlung mit Polybrene entstehen Löcher in der Zellmembran, die es dem Virus ermöglichen, in das Innere der Zelle einzudringen. Da Polybrene

allerdings auch toxisch auf Zellen wirkt, war 4 Stunden nach der Infektion ein Mediumwechsel notwendig.

Um Zelllinien zu generieren, die stabil das durch die Viren transduzierte Effektorgen exprimierten, wurde 48 Stunden nach der Infektion der Zellen mit der Selektion durch geeignete Antibiotika begonnen. Für Zellen, die mit dem Vektor pLRNL infiziert wurden, dienten zur Selektion 400 µg/ml G418. Zellen, die nach der Transfektion den Vektor pBabePuro enthielten, wurden mit 1 µg/ml Puromycin selektiert.

Um einer Selektion auf bestimmte Wachstumseigenschaften der so generierten Zellklone zu vermeiden, wurden sogenannte "bulk"- infizierte Zelllinien hergestellt. Dies bedeutet, dass keine Einzelklone gepickt und angezogen wurden, sondern dass nach einer Selektionsdauer von 7 bis 10 Tagen sämtliche Zellklone "gepoolt" wurden und als eine Zelllinie weiter kultiviert wurden. Um einen ständigen Selektionsdruck aufrecht zu erhalten wurden dem Kulturmedium 100 µg/ml G418 bzw. 0,25 µg/ml Puromycin zugesetzt.

### **3.1.13 Bestimmung der Transfektionseffizienz**

Zur Beurteilung der Transfektionsraten in verschiedenen Experimenten war es von Bedeutung die Transfektionseffizienzen zu bestimmen. Hierzu wählten wir die Transfektion einer Fluoreszin (FITC)-gekoppelten siRNA und die Zählung der fluoreszierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie. Mit Hilfe eines Transfektionsreagenzes wurde die FITC-gekoppelte siRNA in die Zellen eingebracht. 5 Stunden nach Transfektion konnte nun die aufgenommene Menge an FITC-siRNA in den Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt werden. Die Anregung der FITC-Moleküle durch einen Argonlaser erfolgte bei einer Wellenlänge von 480 nm, das Emissionsmaximum betrug 530 nm.

#### **3.1.13.1 Fixierung von mit FITC-gekoppelter Kontroll-siRNA transfizierter Zellen mittels FACS-Fix**

5 Stunden nach Transfektion wurden die 600 µl Nährmedium von den mit FITC-gekoppelter Kontroll-siRNA transfizierten Zellen abgenommen. Durch Zugabe von 500 µl Trypsin auf den Zellrasen wurde dieser bei 37°C z um Ablösen vom Boden der 6-Loch-Platten gebracht. Nach Ablösung wurden die Zellen mit Hilfe des Trypsins in ein Reagiergefäß überführt. Vor der sich anschließenden Zentrifugation (1 min,

13000 rpm) wurde 1 ml PBS hinzugegeben. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500 µl FACS-Fix aufgenommen. Bis zur Bestimmung der Transfektionseffizienz mittels FACS- Analyse sollten die Proben dunkel und bei 4°C gelagert werden.

### **3.1.14 Kolonieformierungsassay**

Das Wachstum einer Zellkultur wird durch verschiedene Parameter beeinflusst. Will man eine Zelllinie hinsichtlich ihrer Wachstumseigenschaften charakterisieren, stellt der Kolonieformierungsassay eine geeignete Methode dar. Desweiteren eignet sich diese Methode auch für die Untersuchung des Einflusses bestimmter Substanzen auf das Wachstum einer Zellkultur und ihre Fähigkeit zur Ausbildung von Kolonien.

Zunächst wurden auf Zellkulturschalen (Durchmesser 10 cm) jeweils  $1 \times 10^3$  Zellen ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Behandlung der Zellen mit den zu testenden Substanzen. Während der Inkubationszeit von 10 Tagen wurde alle 3-4 Tage das Kulturmedium gewechselt.

Nach einer 10-tägigen Inkubation erfolgte die Färbung der Zellen. Zunächst wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 1,25 % Glutaraldehyd (Sigma) für 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Anschließend wurde drei- bis viermal mit PBS gewaschen. Die Färbung der Zellen erfolgte mit 1 % Kristallviolett in PBS für eine Stunde bei RT. Die so gefärbten Kulturen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend bei RT getrocknet.

### **3.1.15 Erstellung von Wachstumskurven**

Zu Erstellung von Wachstumskurven wurden jeweils  $5 \times 10^4$  Zellen pro Loch in 6-Loch-Platten ausgesät. Bei allen Messungen wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. 24 h danach wurde die Bestimmung für den Zeitpunkt 0 h durchgeführt, auf allen anderen Platten wurde das Medium gewechselt. Die Zellzahl wurde bestimmt, indem zunächst der Überstand in ein Eppendorf-Gefäß überführt wurde und dieser bei 13.000 rpm 2 min abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde daraufhin verworfen. Die auf den Platten befindlichen Zellen wurden mit 0,5 ml Trypsin abgelöst und zu dem vorher entstandenen Zellpellet gegeben. Die Zellen wurden bei 13.000 rpm 2 min abzentrifugiert und der Überstand komplett abgenommen. Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden

100 µl der Suspension in vorbereitete Casy®-Röhrchen gegeben, die 10 ml Casyton® beinhalten. Casyton® ist eine isotone Salzlösung, die die Zellen stabilisiert und Aggregationen von Zellen verhindert. Die Zellzahl wurde anschließend mit dem Casy®-Zellzähler (Schärfe System, Reutlingen) ermittelt. Es wurden die Zellzahlen für die Zeitpunkte 0 h, 24 h, 48 h und 72 h ermittelt.

### **3.1.16 Apoptose-Assays**

#### **3.1.16.1 DNA-Färbung mit Propidiumiodid**

Propidiumiodid (PI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in DNA interkaliert und diese so markiert. Durch einen Argonlaser, der Licht mit einer Wellenlänge von 480 nm generiert, wird der Fluoreszenzfarbstoff angeregt. Das emittierte Licht wird durch ein optisches System gemessen. Anhand eines Verteilungsdiagramms kann die Zahl der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen sowie die der apoptotischen Zellen ermittelt werden. Da PI in die DNA interkaliert und in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase auch der DNA- Gehalt in der Zelle variiert, ist eine Differenzierung der einzelnen Zellzyklusphasen sowie apoptotischer Zellen (Fragmentierung der DNA) möglich. Die Zerlegung der DNA stellt ein relatives spätes Ereignis bei der Apoptose-Induktion dar und daher können mit Hilfe der PI-Färbung keine frühen Apoptose-Ereignisse erfasst werden (Im Gegensatz zur Annexin V-Färbung).

Zur Färbung der DNA mit Propidium-Iodid und anschließender FACS-Analyse wurden zunächst  $2 \times 10^5$  Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät. Diese wurden 24 h später mit den entsprechenden Substanzen behandelt. Nach weiteren 24 h wurde der Mediumüberstand verworfen und die Zellen mit 0,5 ml Trypsin abgelöst. Die Zellen wurden in ein 2 ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Hierzu wurde zum Waschen 1,5 ml 1x PBS dazugegeben und 2 min bei 12.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann vollständig abgenommen und das Zellpellet in 200 µl NaCl (0,9 %) resuspendiert. Der Ansatz wurde mit einer 23-gauge-Kanüle aufgezogen und in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß mit bereits vorgelegten 1,8 ml Methanol gegeben. Die Proben wurden bis zur Färbung bei -20°C gelagert (mindestens 1 h).

Zur PI-Färbung wurden die methanolfixierten Zellen 2 min bei 12.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Dann wurde mit 500 µl 1x PBS gewaschen und erneut 2 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde nun sehr vorsichtig abgenommen und in 250 µl PBS plus RNaseA (25 µg/ml)

resuspendiert. Nun wurde für 60 min bei RT inkubiert. Danach wurde PI (25 µg/ml) zu den Proben gegeben, die vorher in FACS-Röhrchen überführt worden waren. Danach wurde kurz gevortext und für 60 min bei RT im Dunklen inkubiert. Anschließend wurde die FACS-Messung durchgeführt.

### 3.1.16.2 Annexin V-Färbung

Das apoptotische Programm ist charakterisiert durch bestimmte morphologische Veränderungen der Zelle, einschließlich Verlust der Plasmamembran-Asymmetrie und -Anheftung, Cytoplasma- und Nukleus-Kondensierung sowie die Fragmentierung der DNA. Der Verlust der Plasmamembran-Assymetrie ist eine der frühesten Veränderungen der Zelle nach Apoptose-Induktion. In apoptotischen Zellen ist das Membran-Phospholipid Phosphatidylserin (PS) von der Innenseite der Plasmamembran auf die Außenseite transloziert, wobei PS dann der externen zellulären Umgebung zugewandt ist. Annexin V ist ein 35-36 kDa  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Phospholipid-bindendes Protein, das eine hohe Affinität für PS besitzt und an Zellen mit nach außen gerichtetem PS bindet. Annexin V kann an Fluorochrome wie Phycoerythrin (PE) konjugiert werden, wodurch die Affinität zu PS nicht verloren geht. Dadurch kann Annexin V-PE als sensitiver Marker in der Durchflusszytometrie eingesetzt werden, um Zellen zu detektieren, die eine Apoptose durchlaufen. Da die Externalisation von PS in einem frühen Stadium der Apoptose stattfindet, kann Annexin V-PE-Färbung Apoptose in einer früheren Phase anzeigen als Assays, die auf nukleären Veränderungen wie DNA-Fragmentierung basieren.

Annexin V-PE-Färbung geht dem Verlust der Membran-Integrität voran, welche die späten Stadien des Zelltodes begleitet, der entweder durch apoptotische oder nekrotische Prozessen eingeleitet wurde. Daher wird die Annexin V-Färbung normalerweise in Verbindung mit dem Avitalfarbstoff 7-Amino-Actinomycin (7-AAD) durchgeführt, um frühe apoptotische Zellen zu identifizieren (Annexin V-PE positiv, 7-AAD negativ). Lebende Zellen sind Annexin V-PE und 7-AAD negativ, Zellen im Stadium der frühen Apoptose sind Annexin V-PE positiv und 7-AAD negativ. Und Zellen, die sich in der späten Phase der Apoptose befinden oder schon tot sind, sind Annexin V-PE und 7-AAD positiv.

Die Annexin V-PE-Färbung wurde mit dem „Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I“ der Firma BD Pharmingen™ gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 3.1.16.3 Durchflusszytometrie

Die FACS („Fluorescence activated cell sorting“) -Analyse, oder auch Durchflusszytometrie genannt, ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Die Zellen werden während der Messung durch Überdruck so stark beschleunigt, dass sie beim Eintreten in die Messkammer vereinzelt und am Messpunkt fokussiert werden. Diesen Vorgang nennt man hydrodynamische Fokussierung. Durch die gleichzeitige Messung des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes kann die relative Größe und Granularität der Einzelzellen bestimmt werden. Dabei korrelieren sowohl Größe als auch Granularität direkt mit der Lichtintensität, die relative Lichtintensität ist daher die Messeinheit der FACS-Analyse.

Nach der PI-Färbung wird der Fluoreszenzfarbstoff mit Hilfe eines Argon-Laser, der Licht mit einer Wellenlänge von 480 nm generiert, angeregt. Das emittierte Licht wird über ein optisches System gemessen. Anhand eines Verteilungsdiagramms kann die Zahl der Zellen in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen sowie die der apoptotischen Zellen ermittelt werden. Da PI in die DNA interkaliert und sich in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase auch der DNA- Gehalt in der Zelle variiert, ist eine Differenzierung der einzelnen Zellzyklusphasen möglich. Darüber hinaus ist die Detektion apoptotischer Zellen möglich, da in diesen Zellen die DNA fragmentiert vorliegt. Zellen, die einen DNA-Gehalt von sub-2n aufweisen, werden zu den apoptotischen Zellen gezählt. Die Analyse wurde mit der BD FACS Diva Software durchgeführt.

## 3.2 Kultivierung von Bakterien

### 3.2.1 Kultivierung von *E.coli*

Die Anzucht einer Flüssigkultur geht von einer Einzelkolonie auf einer Agarplatte mit Selektionsantibiotikum aus. Auf diese Platten wurden zuvor die transformierten Bakterien, die ein entsprechendes Resistenzgen (Ampicillin, Kanamycin) tragen, ausplattiert. Bei ampicillinresistenten Transformanten wurde den Agarplatten, sowie dem Flüssigmedium Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugegeben. Kanamycin wurde in einer Endkonzentration von 30 µg/µl eingesetzt.

Suspensionskulturen wurden bei 37°C unter aeroben Bedingungen auf einem Schüttler gezogen.

### 3.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien (RbCl<sub>2</sub>-Methode)

Normale *E.coli*-Bakterien können keine DNA aus dem Medium aufnehmen. Wenn man die Bakterien jedoch hohen Konzentrationen bestimmter zweiwertiger Kationen aussetzt, so wird ein kleiner Teil von ihnen durch einen bisher noch nicht aufgeklärten Mechanismus für fremde DNA durchlässig.

Zur Herstellung kompetenter Bakterien nach der Rubidiumchlorid-Methode wurden 30 ml SOB-Medium, supplementiert mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 10 mM MgCl<sub>2</sub>, mit dem jeweiligen Bakterienstamm inokuliert und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 8 ml der Übernachtskultur entnommen und in 200 ml frisches SOB-Medium überführt. Die weitere Kultivierung erfolgte bis zu einer optischen Dichte von circa 0,3 bei einer Wellenlänge von 550 nm. Danach konnte die Kultur auf 4 Aliquots à 50 ml aufgeteilt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4000 rpm abzentrifugiert werden. Die pelletierten Bakterien wurden in je 16 ml Transformationspuffer 1 resuspendiert, erneut 15 min auf Eis gestellt und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Abschließend wurden die Bakterienpellets in je 4 ml Transformationspuffer 2 aufgenommen, à 100 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte dann bei -70°C.

**SOB-Medium:** 2 % Trypton; 0,5 % Hefe-Extrakt; 0,06 % NaCl; 0,05 % KCl; ad 1 l mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>, autoklavieren, bei 4°C aufbewahren, kurz vor Gebr auch Zugabe von 10 ml einer Mg<sup>2+</sup>-Lösung

**Mg<sup>2+</sup>-Lösung:** 1 M MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 1 M MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

**Transformationspuffer 1:** 100 mM RbCl; 80 mM MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O; 30 mM CH<sub>3</sub>COOK (pH 7,5); 13 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O; 15 % Glycerol; einstellen auf pH 5,8 mit Hilfe einer 0,2 M CH<sub>3</sub>COOH-Lösung; dann bei 4°C lagern

**Transformationspuffer 2:** 10 mM MOPS (pH 6,5), 10 mM RbCl<sub>2</sub>

### **3.2.3 Transformation von Bakterien**

Als Transformation wird die Aufnahme freier, löslicher DNA von Bakterien bezeichnet. Dazu verwendet man Bakterien, die durch Behandlung mit bestimmten Salzlösungen auf die DNA-Aufnahme vorbereitet wurden, so genannte kompetente Bakterien.

Zur Transformation wurde ein Aliquot der kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut (ca 200 µl, 30 min), mit der Hälfte eines Ligationsansatzes (5 µl) bzw. mit 1 µg Plasmid-DNA vermischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach anschließendem Hitzeschock (90 sec, 42°C) wurde der Transformation ansatz mit 800 µl LB-Medium (ohne Selektionsantibiotikum) aufgefüllt und für 45 min bei 37°C inkubiert (=Vorkultur). Der Ansatz wurde schließlich zur Selektion der transformierten Bakterien auf einer selektionsantibiotikumhaltigen LB-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

### **3.2.4 Herstellung von Bakterienstocks**

Um eine Stammhaltung der transformierten Bakterien herzustellen, wurden 900 µl einer dicht gewachsenen Übernacht- Kultur mit 100 µl DMSO versetzt, gevortext und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

## **3.3 Proteintechniken**

### **3.3.1 Herstellung von Proteinextrakten und Konzentrationsbestimmung**

#### **3.3.1.1 Zellaufschluß unter reduzierten Bedingungen**

Diese Methode diente zur Gewinnung von Gesamtzellextrakten unter denaturierenden Bedingungen.

Die auf 10 cm-Platten gewachsenen adhärennten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit einem Zellschaber vom Schalenboden abgekratzt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1 min, 13000 rpm) und der Überstand verworfen. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von heißem (100°C) 1x SDS-Gel-Ladepuffer (je nach Größe des Zellpellets zwischen 100 und 400 µl). Das mit dem Ladepuffer versetzte Zellpellet wurde leicht resuspendiert, um die Zellen zu

lysieren, und anschließend für 10 Minuten bei 100°C inkubiert. Mit Hilfe des SDS-Ladepuffers werden die Disulfidbrücken reduziert und somit die Tertiärstruktur der Proteine zerstört. Durch diese Denaturierung der Proteine ist das Laufverhalten der Proteine im Gel proportional zum Molekulargewicht.

Die enthaltene chromosomale DNA wird durch wiederholte Passage durch eine 23-gauge-Kanüle geschert. Das nach Zentrifugation (13000 rpm, 10 min) erhaltene Pellet wurde verworfen und die Proteine im Überstand nach Bestimmung der Proteinkonzentration zur Analyse in der SDS-PAGE eingesetzt.

2x SDS-Gel-Ladepuffer	Tris/HCl, pH 6,8	100 mM
	DTT	200 mM
	SDS	4%
	Bromphenolblau	0,2%
	Glycerol	20% (v/v)

### 3.3.1.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung wurden 10 µl des Proteinextraktes in 500 µl 0,1 M NaOH verdünnt und die OD<sub>280nm</sub> im Photometer gemessen. Die Proteinmenge wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$6,4 / OD_{280nm} = x \mu l, \text{ die } 15 \mu g \text{ Protein enthalten}$$

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Photometers „Ultrospec 3100 pro“ der Firma Amersham Biosciences durchgeführt.

### 3.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

In einer SDS-PAGE werden die Proteine in Gegenwart eines Überschusses an SDS (Natriumdodecylsulfat) gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das negativ geladene Detergens SDS lagert sich durch Bindung an die hydrophoben Regionen in konstantem Gewichtsverhältnis an die Proteine an und zerstört fast alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen im nativen Protein. Dabei binden die SDS-Anionen an die Hauptkette der Proteine, ein SDS-Anion pro zwei Aminosäurereste. Dadurch

überdeckt es die Eigenladung der Proteine, so dass deren Bewegung im elektrischen Feld eine lineare Funktion des Logarithmus ihres Molekulargewichts darstellt. Möglicherweise vorhandene Disulfidbrücken von Untereinheiten werden durch Erhitzen mit SDS und DTT dissoziiert.

Die Gelmatrix wird durch die Co-Polymerisation von Acrylamid und quervernetzendem N,N'-Methylenbisacrylamid gebildet. Die Polymerisierungsreaktion wird durch Ammoniumpersulfat (APS) gestartet und durch N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert. Um eine hohe Auflösung bei der Trennung zu erzielen, wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wird das zu analysierende Proteingemisch in einem Gel aufgetrennt, welches aus zwei Gelsystemen mit unterschiedlicher Porengröße und pH-Wert des Puffers besteht. Die Proteine wandern von einem grobporigen Sammelgel, in dem sie konzentriert werden, in ein feinporiges Trenngel, in dem die Auftrennung erfolgt. Die Auftrennungseigenschaften sowie die Porengröße des jeweiligen Gels hängen von der eingesetzten Acrylamid- und Bisacrylamidkonzentration ab.

Zur Bestimmung des relativen Molekulargewichtes der aufgetrennten Proteine wurden Marker, welche Referenzproteine bekannter Größe enthalten, mit aufs Gel aufgetragen.

Herstellung von SDS- Polyacrylamidgelen:

Gelkomponenten	Trenngel				Sammelgel
	8 %	10 %	12 %	13 %	
1M Tris pH 6,8	-	-	-	-	750 µl
1m Tris pH 8,8	4,5 ml	6 ml	6 ml	6 ml	-
10 % SDS	240 µl	320 µl	320 µl	320 µl	120 µl
AA-Stock (30 %)	3,2 ml	5,3 ml	7,4 ml	8 ml	1 ml
Bis-AA-Stock (2 %)	1,28 ml	2,12 ml	2,96 ml	3,2 ml	400 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	2,72 ml	2,26 ml	1,7 ml	-	3,67 ml
APS	50 µl	140 µl	140 µl	140 µl	50 µl
TEMED	10 µl	14 µl	14 µl	14 µl	10 µl

AA-Stock: Acrylamid-Stock

Bis-AA-Stock: Bis- Acrylamid-Stock

### **3.3.3 Western-Blot (Immunoblot)**

Beim Western Blot werden zuvor in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Membran übertragen. Das bei der Auftrennung entstandene Proteinmuster bleibt dabei immobilisiert auf der Membran erhalten. Die Proteine binden bei gleicher Ionenstärke über hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran. Durch den Einsatz spezifischer Antikörper können die Proteine, da ihre Immunreaktivität weitgehend erhalten bleibt, sowohl qualitativ als auch quantitativ identifiziert werden.

#### **3.3.3.1 Proteintransfer**

Die für den Western-Transfer eingesetzte Immobilon-Membran (Millipore) wurde vor dem Zusammenbau des Blots in Methanol äquilibriert und anschließend in Western-Transferpuffer getränkt. Beim Aufbau des Blots in einer mit Western-Transferpuffer gefüllten Wanne wurden auf ein Kunststoffgitter (schwarz) ein Schwammtuch, zwei Whatman-Papiere, das Polyacrylamidgel (seitenverkehrt), die Immobilon-Membran, erneut zwei Whatman-Papiere und ein weiteres Schwammtuch aufgelegt. Nach oben wurde das so entstandene „Sandwich“ durch ein zweites Kunststoffgitter (weiß) abgeschlossen und mit dem schwarzen Gitter in Richtung Kathode in eine mit Western-Transferpuffer gefüllte Kammer eingesetzt. Der Transfer wurde je nach Größe des zu transferierenden Proteins zwischen 1,5 und 2,5 h bei 330 mA durchgeführt. Dabei wurden die zur Anode wandernden negativ geladenen Proteine vom Gel auf die Membran übertragen. Nach dem Transfer wurde die Membran luftgetrocknet und die Markerspür mit einem Skalpell abgetrennt. Die übrige Membran wurde zunächst ebenfalls in Methanol äquilibriert, bevor sie für 30 min in PBS-Puffer mit 5 % Magermilchpulver inkubiert wurde („Blocken“), um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Nach dem Blocken der Membran erfolgte die immunologische Detektion von Proteinen mit Hilfe spezifischer Antikörper.

### 3.3.3.2 Immunologische Detektion von Proteinen

Die auf die Membran transferierten, immobilisierten Proteine wurden zusammen mit Antikörpern gegen das zu analysierende Protein inkubiert. Zunächst fand eine Inkubation der Membran über Nacht bei 4°C mit dem spezifischen Primärantikörper statt. Der an die entsprechenden Proteine gekoppelte Primärantikörper wurde über Peroxidase-gekoppelte und gegen dieses Isotop gerichtete Sekundärantikörper (Inkubation 2 h bei 4°C) detektiert und anschließend durch eine Peroxidase-katalysierte chemische Reaktion nachgewiesen (ECL-Färbung, Pierce und Exposition auf ECL-Hyperfilmen, GE Healthcare).

### 3.3.3.3 Die „Enhanced Chemoluminescence“- Methode

Eine bewährte nicht-radioaktive sensitive Nachweismethode, bei der die Detektion der Proteine auf einer enzymkatalysierten Lichtreaktion beruht, ist die „enhanced Chemiluminescence“-Methode (ECL, Pierce).

Durch den Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper kommt es zu einer Lichtemission (428 nm), wenn  $H_2O_2$  reduziert und Luminol oxidiert wird. Die Detektion wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran mit dem entsprechenden Volumen Detektionsreagenz inkubiert (1 min) und die Lichtemission durch Auflegen eines Films (Hyperfilm ECL, Amersham) detektiert. Der Film wurde anschließend entwickelt und fixiert. Nach der ECL-Detektion konnte die gleiche Membran für weitere immunologische Nachweisreaktionen verwendet werden. Vor der erneuten Immundetektion mussten jedoch die an die Membran gebundenen Primär- und Sekundärantikörper entfernt werden.

### 3.3.3.4 Entfernen gebundener Antikörper nach ECL- Färbung („Stripping“)

In einigen Versuchen war es aus Vergleichsgründen wichtig, dieselbe Membran nacheinander mit verschiedenen Antikörpern anzufärben. Dazu wurde die Immobilon-Membran nach erfolgter ECL-Färbung 30 min in ca. 50 ml Stripping-Puffer bei 55°C im Wasserbad geschüttelt („gestrippt“), um durch das enthaltene SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol die kovalenten Protein-Antikörper-Bindungen zu lösen.

Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min in PBS gewaschen und konnte dann mit weiteren Antikörpern inkubiert werden.

Stripping Puffer	Tris (pH 6,6)	62,5 mM
	$\beta$ -Mercaptoethanol	100 mM
	SDS	2 %

### 3.3.4 Fällen von Proteinen mit Trichloressigsäure

Die wässrige Proteinlösung wird mit 1/10 Volumen 100 %-iger Trichloressigsäure versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Danach folgt ein Zentrifugationsschritt bei 10000 rpm für 5 min. Das Pellet wird 4-5 mal in Aceton gewaschen, d.h. etwa 500  $\mu$ l Aceton zupipettieren, dann 4 min bei höchster Umdrehung zentrifugieren. Nach dem letzten Waschschrift wird das Pellet getrocknet und schließlich in einem angemessenen Volumen 2x SDS-Gel-Ladepuffer aufgenommen.

### 3.3.5 Radioaktive Markierung von Proteinen

Zum Nachweis des Abbaus von Proteinen oder zum Nachweis einer erfolgreichen Inhibition der Protein-Neusynthese ist es möglich, alle Proteine der Zelle während der Translation radioaktiv zu markieren. Dann werden Gesamtproteine isoliert und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgt dann mittels eines radiosensitiven Filmes.

Zur Versuchsdurchführung wurden Zellen in einer 10 cm-Schale so ausgesät, so dass sie am darauf folgenden Tag zu ca. 70-80 % konfluent waren. Diese Zellen wurden zu Beginn des Versuchs mit 37°C warmem Medium mit Cycloheximid in einer Endkonzentration von 20  $\mu$ g/ml für 1 Stunde vorinkubiert. Die Kontrollzellen wurden nicht mit Cycloheximid behandelt. Anschließend wurde dem Medium jeweils 100  $\mu$ Curie  $^{35}\text{S}$  zugegeben, was einem Volumen von 9,5  $\mu$ l entsprach (sowohl den behandelten, als auch den nicht-behandelten Zellen). Nach einer weiteren Stunde wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend Gesamtproteinextrakte isoliert. Es wurden dieselben Volumen Gesamtproteinextrakt von der unbehandelten und auch der behandelten Probe zur Analyse mittels SDS-PAGE eingesetzt. Das Gel wurde anschließend getrocknet und die Lichtemission

nach einigen Tagen Exposition auf einem Photofilm (Hyperfilm ECL, Amersham) erfasst.

### **3.3.6 Nachweis radioaktiv-markierter Proteine durch Autoradiographie**

Um  $^{35}\text{S}$ -markierte Proteine in SDS-Gelen nachzuweisen, wurden die radioaktiven Gele 30 min mit Fixierlösung fixiert, dreimal 15 min in  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen, 1 h in 1 M Natriumsalicylatlösung inkubiert und anschließend mit Hitze unter Vakuum getrocknet und zur Belichtung eines Röntgenfilms eingesetzt. Der Film lag über mehrere Tage bei  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  auf.

**Fixierlösung für radioaktive Gele:** 50 % Methanol; 10 % Eisessig; 40 %  $\text{H}_2\text{O}$

### **3.3.7 Crosslink-Technik zur Untersuchung der p53-Oligomerisierung**

Eine Methode zur Quartärstrukturanalyse, die sich besonders für leicht dissoziierbare oligomere Proteine eignet, verwendet verbrückende Agentien („Cross-Linker“). Die Fähigkeit von p53, Oligomere zu bilden, wurde durch Protein-Crosslinking mit Glutaraldehyd bzw. BMH überprüft.

#### **3.3.7.1 BMH**

BMH (Bis-maleimidohexan) gehört zu den Maleimid-Crosslinkern und verknüpft Sulfhydryl-Gruppen miteinander. Diese Crosslinker sind bifunktional und werden im Allgemeinen verwendet, um Proteinstrukturen oder Proteininteraktionen zu erforschen bzw. zu charakterisieren. Durch die Reaktion der Sulfhydryl-Gruppen mit der Maleimid-Gruppe entstehen stabile Thioether-Bindungen, die weder durch reduzierende Agentien noch durch physiologische Pufferbedingungen gelöst werden können. Diese Reaktion ist jedoch sehr spezifisch bei einem pH von 6,5 bis 7,5.

Um die p53-Proteine mit BMH zu crosslinken, wurde BMH in einer Konzentration von 20 mM in DMSO gelöst.

### **3.3.7.1.1 Crosslink im Gesamtproteinextrakt**

Die gewonnenen Proteine wurden mit Konjugatpuffer in einer Konzentration von 0.1 mM versetzt. Anschließend wurde das gelöste BMH zugegeben, so dass die Endkonzentration von BMH 0,2 mM betrug. Nach einer Inkubationszeit von 1 h auf einem Schüttler bei 37°C wurde die Probe mit demselben Volumen an heißem 2x SDS-Gel-Ladepuffer lysiert. Das Lysat wurde anschließend 10 min in einem Heizblock gekocht und die enthaltene DNA durch wiederholte Passage durch eine 23-gauge Kanüle geschert.

### **3.3.7.1.2 Crosslink an Mitochondrien**

Das zuvor gewonnene Mitochondrien-Pellet wurde in Konjugatpuffer gelöst und mit BMH in einer Konzentration von 1 mM versetzt. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde auf einem Schüttler bei 37°C wurde die Probe durch Zugabe der gleichen Menge an heißem 2x SDS-Gel-Ladepuffer lysiert. Das Lysat wurde anschließend 10 min in einem Heizblock gekocht und die enthaltene mitochondriale DNA durch wiederholte Passage durch eine 23-gauge Kanüle geschert.

### **3.3.7.2 Glutaraldehyd**

Glutaraldehyd ist der Trivialname für Pentan-1,5-dial und ist ein flüssiges, bifunktionales, stechend riechendes Reagenz, das zur Quervernetzung von Enzymen und Proteinen Verwendung findet. Es besitzt zwei reaktive Aldehydgruppen, die mit jeweils einer terminalen Aminogruppe des zu untersuchenden Proteins kovalente Bindungen eingehen können.

#### **3.3.7.2.1 Crosslink im Gesamtproteinextrakt (modifiziert nach Atz et al., 2000)**

15 µg der gewonnenen Proteine wurden mit dem entsprechenden Volumen Lysatpuffer auf 25 µl aufgefüllt. Die Probe wurde dann mit 5 µl 0,03 % Glutaraldehyd versetzt und für 15 min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Lyse der Probe wurde dieselbe Menge an 2x SDS-Gel-Ladepuffer zugesetzt und anschließend 10 min bei 100°C gekocht. Die enthaltene DNA wurde durch wiederholte Passage durch eine 23-gauge Kanüle geschert.

### 3.3.7.2.2 Crosslink an Mitochondrien

Das während der Mitochondrien-Isolierung gewonnene Pellet wurde in PBS gelöst. Anschließend wurde die entsprechende Menge an 0,03 % Glutaraldehyd zugegeben, so dass eine Endkonzentration von 0,0025 % gegeben war. Die Probe wurde für 15 min auf einem Schüttler inkubiert und anschließend mit derselben Menge an 2x SDS-Gel-Ladepuffer versetzt und 10 min bei 100°C gekocht. Die enthaltene mitochondriale DNA wurde durch wiederholte Passage durch eine 23-gauge Kanüle geschert.

### 3.3.8 Co-Immunopräzipitation von Proteinen

Die Co-Immunopräzipitation dient zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Die konstanten Abschnitte von Antikörpern besitzen eine hohe Affinität zu Protein G-Sepharose. Diese Sepharose trägt auf ihrer Oberfläche das Protein G von *Staphylococcus aureus*, welches den Fc-Teil des Antikörpers bindet. Aus Zellextrakten, die mit einem spezifischen Antikörper inkubiert wurden, lassen sich daher entstandene Immunkomplexe durch Zugabe von Protein G-Sepharose präzipitieren. Dabei können nicht nur direkt an den Antikörper gebundene Proteine, sondern auch an sie gebundene Interaktionspartner isoliert werden. Die Pufferbedingungen bei einer Co-Immunopräzipitation müssen so gewählt werden, dass die Bindung des Proteins an den Antikörper gewährleistet wird und dass ebenso die Protein-Protein-Interaktion erhalten bleibt.

In diesem Fall wurde versucht, eine p53-Variante, die ein mutiertes DO-1-Epitop trägt, mit einer p53-Variante, die diese Mutation nicht trägt, zu co-immunpräzipitieren. Nach der Transfektion der Zellen wurden die Zellen nach 24 h mit Hilfe des RIPA-Puffers (supplementiert mit Protease-Inhibitoren) aufgebrochen. Dafür wurden die Zellen abgeschabt, kurz abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen schließlich in 800 µl RIPA-Puffer aufgenommen und 60 min auf Eis inkubiert. Nach der Lyse wurde 30 min bei 13000 rpm abzentrifugiert.

In der Zwischenzeit wurde die Sepharose gewaschen und 1:1 in PBS aufgenommen. Nun wurden 100 µl 1:1-Sepharose-PBS-Gemisch mit 4 µg Antikörper versetzt und 45 min auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert, damit eine Anlagerung des Antikörpers an die Sepharose stattfinden konnte. Nach dieser Inkubation wurde ungebundener Antikörper 3 bis 5x mit PBS gewaschen.

Nach der Zentrifugation der lysierten Zellen wurde der Überstand entnommen und mit 50 µl Antikörper-Sepharose-PBS-Gemisch (entspricht 4 µg Antikörper und 25 µl reiner Sepharose pro Reaktion) versetzt und für 5 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde 4x mit kaltem PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand komplett entnommen und schließlich 30 µl 100°C heißer 1x SDS-Gel-Ladepuffer auf die Proben gegeben und bei 100°C für 10 min inkubiert. Der Überstand wurde zur SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese eingesetzt.

### 3.3.9 Chromatin-Immunpräzipitation

Die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) ist eine *in vivo*-Methode zur Bestimmung, ob gewisse Proteine, meist Transkriptionsfaktoren, bestimmte Teile des endogenen Chromatins lebendiger Zellen binden.

Das Grundprinzip dieser Methode beruht darauf, die zu einem Zeitpunkt bestehenden Protein-DNA-Bindungen durch Fixierung mit Formaldehyd festzuhalten. Anschließend werden die Zellen zerstört und das Chromatin mittels Ultraschall in Stücke von einigen hundert Basenpaaren Länge zertrümmert. Jene DNA-Stücke, die das gewünschte Protein gebunden haben, werden mit einem für das Protein spezifischem Antikörper immunopräzipitiert. Die isolierten DNA-Protein-Komplexe werden gewaschen und von nicht gebundenem Antikörper befreit. Danach wird die Fixierung des DNA-Protein-Komplexes wieder aufgehoben. Die Identität der jeweiligen DNA-Stücke wird durch eine PCR unter Verwendung von Primern, die spezifisch für die vermutete DNA-Region sind, nachgewiesen.

#### 3.3.9.1 Fixierung und Ernten der Zellen

Die auf 10 cm-Schalen gewachsenen Zellen (optimale Zellzahl:  $1 \times 10^7$  beim Zeitpunkt des Erntens) werden mit 37% Formaldehyd (Endkonzentration 1% v/v, d.h. pro 10 ml Medium 270 µl 37% Formaldehyd) bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert (= Fixierung der Zellen). Zum Abstoppen der Reaktion (= Quenching) wird 1,25 M Glycin (Endkonzentration 0,125 M) zugegeben und 5 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Danach wird 3x mit PBS gespült und Trypsin auf die Zellen gegeben. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37°C werden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und bei 700 g für 5 min bei 4°C abgekratzt. Das Zell pellet wird danach in eiskaltem

PBS aufgenommen, resuspendiert und bei 700 g für 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Dieser Schritt wird insgesamt 3x durchgeführt. Beim letzten Waschschrift wird dem PBS PMSF (Endkonzentration: 10 µg/ml) zur Inhibition der Proteasen beigemischt. Nach dem letztem Zentrifugationsschritt wird das PBS komplett entnommen.

### 3.3.9.2 Lyse und Beschallung der Zellen

Nun werden die Zellen aufgebrochen. Dafür wird das Zellpellet in 1 ml Zell-Lysis-Puffer (supplementiert mit Protease-Inhibitoren) pro  $1 \times 10^7$  Zellen aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Nun folgt ein Zentrifugationsschritt bei 4000 rpm für 7 min und 4°C, um die Zellkerne zu pelletieren. Der Überstand wird verworfen. Die Zellkerne werden nun in 1,5 ml Kernlysis-Puffer (supplementiert mit Protease-Inhibitoren) aufgenommen, in ein 15 ml Polystyren-Falkon überführt und 15 min auf Eis inkubiert. Dabei werden die Zellkerne aufgebrochen und die DNA zugänglich gemacht.

Die Proben werden nun im vorgekühlten Ultraschallgerät „Bioruptor“ der Firma „diagenode“ (Stufe M, 7,5 Zyklen, Intervall von 30 sek.) beschallt, um die DNA auf Durchschnitts-Längen zwischen 500 und 1000 bp zu scheren. Nach der Ultraschall-Behandlung werden die Proben in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt und 10 min bei höchster Stufe und 4°C abzentrifugiert, um die Membran-Reste zu entfernen. Nach dem Zentrifugationsschritt wird 1 ml jeder Probe in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Rest der Probe (400 µl) wird eingesetzt zur Kontrolle der gleichmäßigen Zerlegung der DNA nach dem Ultraschall. Dazu wird jede Probe mit 8 µl RNaseA [10 mg/ml] und 24 µl 5 M NaCl über Nacht bei 65°C inkubiert, um die RNA in diesem Ansatz zu entfernen.

Zur Aufreinigung der DNA werden die über Nacht bei 65°C inkubierten Proben mit 8 µl 0,5 M EDTA, 16 µl 1 M Tris pH 6,5 und 1 µl 20 mg/ml konzentrierter Proteinase K für 1 h bei 45°C inkubiert. Dadurch werden die an die DNA gebundenen Proteine aus dem Ansatz entfernt.

Danach erfolgt eine Zugabe von 300 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Sigma) zu jeder Probe. Nun wird für 10 sek gevortext und anschließend 10 min bei höchster Stufe und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird dann in ein neues Reagiergefäß überführt und mit 1 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,2 aufgefüllt und geschüttelt. Durch Zugabe von 20 µg Glykogen (entspricht 5 µl einer 2 mg/ml Stock-

Lösung) und 2 Volumen eiskaltem 100 % Ethanol und 30-minütiger Inkubation bei -80°C wird die DNA schließlich gefällt. Nach einer Zentrifugation von 20 min bei höchster Stufe und RT werden die Pellets mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei höchster Stufe und RT für 10 min wird der Überstand verworfen, das Pellet komplett getrocknet und in 50 µl Wasser aufgenommen. Das Pellet hat sich nach ca. 30 min bei 37°C gelöst und es kann eine Agarosegel-Elektrophorese auf einem 1 %-igem Agarosegel durchgeführt werden (siehe 3.4.4). Dazu sollten von den 50 µl gelöster DNA jeweils 1 µl, 2 µl, 5 µl und 10 µl aufgetragen werden.

Zell-Lysis-Puffer	PIPES pH 8.0	5 mM
	KCl	85 mM
	NP-40	0,5 %
	Leupeptin	10 µg/ml
	PMSF	10 µg/ml
	Aprotinin	10 µg/ml
Kern-Lysis-Puffer	Tris-HCl pH 8	10 mM
	NaCl	0,4 M
	EDTA	20 mM
	IGEPAL	0,5 %
	Desoxycholinsäure	0,5 %
	Leupeptin	10 µg/ml
	PMSF	10 µg/ml
	Aprotinin	10 µg/ml

### 3.3.9.3 Preclearing und Verdünnung der Proben

Zur Weiterverarbeitung der beschallten schockgefrorenen Proben müssen diese langsam auf Eis aufgetaut werden. Danach wird 80 µl gewaschener 1:1-Protein G-Sepharose-PBS-Mix zugegeben und 4 h bei 4°C auf einem Drehrad rotiert. Dieser Schritt dient dazu, Proteine, die auch ohne vorherige Inkubation mit Antikörper unspezifisch an die Sepharose binden, abzufangen. Dadurch werden bei der

späteren eigentlichen Präzipitation keine Bindungsstellen an der Sepharose von unspezifisch bindenden Proteinen besetzt.

Nach der Inkubation werden die Proben bei 3000 rpm und 4°C für 2 min abzentrifugiert. 100 µl des Überstandes werden als Input-Kontrolle entnommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Der Rest der Probe wird in ein Falcon überführt und mit 4 ml Dilution-Puffer (supplementiert mit den Protease-Inhibitoren) verdünnt.

ChIP-Dilution-Puffer	SDS	0,01 %
	Triton X-100	1,1 %
	EDTA	1,2 mM
	Tris-HCl pH 8,1	16,7 mM
	NaCl	167 mM
	Leupeptin	10 µg/ml
	PMSF	10 µg/ml
	Aprotinin	10 µg/ml

### 3.3.9.4 Immunpräzipitation und Bindung der Protein-AK-Komplexe

Von jeder verdünnten Probe wird je 1 ml zur Weiterverarbeitung verwendet. Es werden 2,5 µg (entspricht 25 µl DO-1 in einer Konzentration von 100 µg/ml) Antikörper zugegeben und über Nacht auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Die Input-Kontrolle wird nicht mit Antikörper versetzt, aber auch bei 4°C auf dem Drehrad rotiert.

Am folgenden Tag wird gewaschener 1:1-Protein G-Sepharose-PBS-Mix 30 min mit 10 mg/ml konzentriertem BSA und 10 mg/ml konzentrierter Heringssperma-DNA inkubiert (pro 250 µl 1:1-Sepharose-Mix je 20 µl BSA bzw. Heringssperma-DNA in der angegebenen Konzentration), um diese mit DNA abzusättigen und somit unspezifischer Bindung von zellulärer DNA an die Sepharose vorzubeugen.

Auf jedes Antikörper-Probe-Gemisch werden zwischen 60-100 µl von der abgesättigten Protein G-Sepharose eingesetzt und für 4 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert.

Nach der Inkubation ist der p53-Antikörper-Komplex an die Sepharose gekoppelt. Die Probe wird bei 3000 rpm und 4°C für 2 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

### 3.3.9.5 Waschen des Protein-Antikörper-Sepharose-Komplexes

Die folgenden Waschschritte dienen der Entfernung unspezifisch an die Sepharose gebundener Proteine und DNA. Es wird jeweils mit 1 ml Puffer gewaschen. Dafür wird die Probe abzentrifugiert, der neue Puffer darauf gegeben und anschließend für 5 min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Danach erfolgt der nächste Zentrifugationsschritt. Allen Waschpuffern werden die Protease-Inhibitoren zugesetzt. Die Input-Kontrolle wird in die Waschschritte nicht miteinbezogen.

Es wird in folgender Reihenfolge gewaschen:

- 3x mit ChIP Dilution-Puffer
- 3x mit Low Salt Wasch-Puffer
- 3x mit High Salt Wasch-Puffer
- 3x mit Lithiumchlorid-Immun-Komplex-Wasch-Puffer
- 5x mit TE-Puffer

Low Salt Wasch-Puffer	SDS	0,1 %
	Triton X-100	1 %
	EDTA	2 mM
	Tris-HCl pH 8,1	20 mM
	NaCl	150 mM
	Leupeptin	10 µg/ml
	PMSF	10 µg/ml
	Aprotinin	10 µg/ml
High Salt Wasch-Puffer	SDS	0,1 %
	Triton X-100	1 %
	EDTA	2 mM
	Tris-HCl pH 8,1	20 mM
	NaCl	500 mM
	Leupeptin	10 µg/ml
	PMSF	10 µg/ml
	Aprotinin	10 µg/ml

Lithiumchlorid-Immun-Komplex-Wasch-Puffer	LiCl	0,25 M
	IGEPAL	1 %
	Desoxycholinsäure	1%
	EDTA	1 mM
	Tris-HCl pH 8,1	10 mM
	Leupeptin	10 µg/ml
	PMSF	10 µg/ml
	Aprotinin	10 µg/ml
TE-Puffer	Tris-HCl pH 8,1	10 mM
	EDTA pH 8,0	1 mM

### 3.3.9.6 Elution und reverses Cross-linking

Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wird der Waschpuffer komplett entfernt und 250 µl Elutionspuffer zu den Beads gegeben. Nun wird bei RT für mindestens 30 min heftig gevortext und anschließend für 15 min bei RT auf dem Drehrad inkubiert. Nach einer Abzentrifugation bei 3000 rpm und RT für 2 min, wird der Überstand in ein neues Eppendorfgesäß überführt. Zu der Sepharose werden erneut 250 µl Elutionspuffer gegeben und die Prozedur wiederholt. Am Ende werden beide Überstände gepoolt. Zu den 100 µl Input-Kontrolle werden je 400 µl Elutionspuffer zugegeben.

Nun werden 30 µl 5 M NaCl und 10 µl 10 mg/ml konzentrierte RNaseA zugegeben und über Nacht bei 65°C inkubiert. Dieser Schritt hebt die Protein-DNA-Fixierung auf.

	Komponente	Ausgangskonz.	Endkonz.	Volumen
<b>Elutionspuffer</b>	SDS	10 %	1 %	1 ml
	NaHCO <sub>3</sub>	1 M	100 mM	1 ml
	H <sub>2</sub> O			8 ml

### 3.3.9.7 Aufreinigung der DNA

Zur Aufreinigung der DNA werden die über Nacht bei 65°C inkubierten Proben mit 10 µl 0,5 M EDTA, 20 µl 1 M Tris pH 6,5 und 1 µl 20 mg/ml konzentrierter Proteinase K für 1 h bei 45°C inkubiert. Dadurch werden die an die DNA gebundenen Proteine aus dem Ansatz entfernt.

Danach erfolgt die Zugabe von 300 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Sigma) zu jeder Probe. Nun wird für 10 sek gevortext und anschließend 10 min bei höchster Stufe und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird dann in ein neues Reagiergefäß überführt und mit 1 Volumen 3 M Na-Acetat pH 5,2 aufgefüllt und geschüttelt. Durch Zugabe von 20 µg Glykogen (entspricht 5 µl einer 2 mg/ml Stock-Lösung) und 2 Volumen eiskaltem 100 % Ethanol und 30-minütiger Inkubation bei -80°C wird die DNA schließlich gefällt. Nach einer Zentrifugation von 20 min bei höchster Stufe und RT werden die Pellets mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei höchster Stufe und RT für 10 min wird der Überstand verworfen, das Pellet komplett getrocknet und in 50 µl Wasser aufgenommen. Das Pellet hat sich nach ca. 30 min bei 37°C gelöst und es können nun die entsprechenden PCR-Reaktionen durchgeführt werden.

### 3.3.10 Indirekte Immunfluoreszenz

Am Vortag des Experimentes wurden die zu untersuchenden Zellen auf sterile Deckgläschen, die zuvor in 6-Loch-Platten platziert worden waren, ausgesät.

Nachdem die Zellen für 24 Stunden auf den Deckgläschen gewachsen waren, wurde das Medium abpipettiert und die Zellen einmal mit kaltem PBS-Puffer gewaschen. Zur Fixierung erfolgte eine 15-minütige Inkubation in 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur. Um die Zellen für die anschließende Färbung mit dem Primärantikörper zu permeabilisieren, wurde für 2 Minuten mit 0,2 % Triton-X 100 in PBS auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit 1 µg/ml BSA für 15 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer um unspezifische Antikörperbindungen abzublocken. Nach einem weiteren Waschschrift mit 0,03% Triton-X 100 in PBS wurden 200 µl des Erstantikörpers (DO-1, 1:500) zugegeben und für 45 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert.

Im Anschluß an die Inkubation mit dem Erstantikörper wurden die Zellen dreimal für 5 Minuten mit PBS und einmal mit 0,03 % Triton-X 100 gewaschen. Danach wurden

pro Deckgläschen 200 µl des verdünnten Sekundärantikörpers (Anti-Maus-TRITC, 1:100) zugegeben und für 30 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde wiederum dreimal für 5 Minuten mit kaltem PBS und einmal mit 0,03 % Triton-X 100 gewaschen. Es folgte eine 5-minütige Inkubation mit 0,2 µg/ml DAPI bei 37°C. Durch diese Färbung werden die Zellkerne spezifisch angefärbt und eine Lokalisation der einzelnen Zellen wird somit erleichtert. Nach der DAPI-Färbung wurde noch einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen auf Objektträgern mit einem Tropfen Elvanol eingedeckelt. Zur Haltbarmachung der Präparate wurden die Deckgläschen zusätzlich mit Nagellack auf den Objektträgern fixiert.

### **3.3.11 Präparation von Zellen zur Fluoreszenzmikroskopie**

Am Vortag des Experimentes wurden die zu untersuchenden Zellen auf sterile Deckgläschen, die zuvor in 6-Loch-Platten platziert worden waren, ausgesät. Nachdem die Zellen für 24 Stunden auf den Deckgläschen gewachsen waren, wurde die Transfektion durchgeführt. Nach mindestens weiteren 24 h wurde das Medium abpipettiert und die Zellen zweimal mit kaltem PBS-Puffer gewaschen. Zur Fixierung erfolgte eine 15-minütige Inkubation in 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur. Danach wurde erneut zweimal mit PBS gespült. Es folgte eine 5-minütige Inkubation mit 0,2 µg/ml DAPI bei 37°C. Durch diese Färbung werden die Zellkerne spezifisch angefärbt und eine Lokalisation der einzelnen Zellen wird somit erleichtert. Nach der DAPI-Färbung wurde noch zweimal mit Methanol gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen auf Objektträgern mit einem Tropfen Elvanol eingedeckelt.

### **3.3.12 Mitochondrien-Anfärbung zur Fluoreszenz-Mikroskopie**

Zur Detektion von Mitochondrien mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskops wurde MitoTracker®Green FM eingesetzt (Molecular Probes). Hierbei handelt es sich um einen fluoreszierenden Farbstoff, der selektiv für Mitochondrien ist und nicht durch die Fixierung der Zellen beeinträchtigt wird. Um Mitochondrien anzufärben, werden die Zellen nach der Fixierung mit nanomolaren Konzentrationen der MitoTracker-Probe inkubiert. Der Farbstoff diffundiert passiv durch die Plasmamembran der Zelle und akkumuliert in aktiven Mitochondrien. Die Mitochondrien zeigen nun eine hellgrüne Fluoreszenz. Dieser Farbstoff hat den Vorteil, dass er in wässrigen Lösungen

weitgehend nicht fluoresziert, sondern die Fluoreszenz erst detektierbar wird, wenn er in der Lipidmembran der Mitochondrien akkumuliert. Daher ist die Hintergrund-Fluoreszenz vernachlässigbar gering.

Nach der Präparation zur direkten Immunfluoreszenz wird nach dem Schritt zur Anfärbung der Zellkerne durch DAPI zweimal mit Methanol gewaschen. MitoTracker®Green FM wird in PBS auf eine Endkonzentration von 30 nM gebracht, auf die Zellen gegeben und 20 min in abgedunkeltem Zustand bei RT inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit Elvanol eingedeckelt.

### **3.3.13 Isolierung von Mitochondrien aus Gesamtzellen**

#### **3.3.13.1 Mitochondrien-Isolation über Dichtegradientenzentrifugation**

Die zu untersuchenden Zellen werden zunächst mit Hilfe eines sterilen Zellschabers aus dem Kulturgefäß in kaltem TD-Puffer abgekratzt, durch Zentrifugation pelletiert und in kaltem Ca-RSB-Puffer wiederaufgenommen. Nach einer 10-minütigen Inkubation in diesem Puffer werden die Zellen durch 30 Stöße in einem Dounce-Homogenisator aufgebrochen. Das Homogenisat wird sofort in kaltem 2,5x MS-Puffer zur Stabilisierung der Mitochondrien aufgenommen. Die Probe wird dreimal bei 750 g für 5 min bei 4°C abzentrifugiert, um die Zellkerne und den Zelldebris abzutrennen.

In ein Polyallomer-Zentrifugen-Röhrchen (für den Rotor SW41) wird zunächst 1,5 M Sucrose-Lösung gegeben und 1 M Sucrose-Lösung aufgeschichtet. Die Zellfraktion wird auf diesen diskontinuierlichen Gradienten geladen und bei 80000g in der Beckman-Zentrifuge (SW41) 45 min zentrifugiert.

Die mitochondriale Fraktion wird nach der Zentrifugation an der Grenzfläche zwischen 1,5 M und 1 M Sucrose-Lösung mit Hilfe einer Kanüle abgesaugt und sofort in 3 Volumen 1x MS-Puffer aufgenommen. Die Mitochondrien werden bei maximaler Geschwindigkeit für 15 min in einer Tischzentrifuge pelletiert.

TD-Puffer	NaCl	134 mM
	KCl	5 mM
	Tris (pH 7,5)	25 mM
Ca-RSB-Puffer	NaCl	10 mM
	CaCl <sub>2</sub>	1,5 mM
	Tris (pH 7,5)	10 mM
2,5x MS-Puffer	Mannitol	0,525 M
	Sucrose	175 mM
	EDTA	12,5 mM
	Tris (pH 7,5)	12,5 mM
1,5 M Sucrose	in Tris (pH 7,5)	10 mM
	EDTA	5 mM
	DTT	2 mM
1 M Sucrose	in Tris (pH 7,5)	10 mM
	EDTA	5 mM
	DTT	2 mM

### 3.3.13.2 Mitochondrien-Isolation über differentielle Zentrifugation

Da die Dichtegradientenzentrifugation ein kniffliges zeitintensives Verfahren ist, bei dem man relativ hohe Zellmengen braucht, haben wir außerdem eine Mitochondrienisolation durchgeführt, in der die Zellen chemisch aufgebrochen wurden und die Mitochondrien schließlich durch differentielle Zentrifugation gewonnen wurden. Dazu wurde das Mitochondrien-Präparationskit („Mitochondria Isolation Kit for Mammalian Cells“) der Firma Pierce verwendet. Dazu wurden die auf 5 10 cm-Schalen (entspricht einer Zellmenge von ca.  $1 \times 10^7$  Zellen) ausgesäten und behandelten Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 15 ml-Falcon überführt. Die Zellen wurden 5 min bei 1.200 g und 4°C zentrifugiert. Zur Herstellung des Gesamtproteinextrakts wurden zuvor 350 µl der Zellsuspension abgenommen. Nun wurden die Reagenzien A und C zur Verwendung vorbereitet, indem ihnen der

Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma) im Verhältnis 1:100 zugesetzt wurde. Das Zellpellet wurde in 800 µl Reagenz A resuspendiert (5 sec Vortex, mittlere Stufe) und in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die Probe wurde 2 min auf Eis inkubiert. Es wurden 10 µl Reagenz B zur Probe gegeben und der Ansatz erneut gevortext (5 sec, höchste Stufe). Danach wurde 5 min auf Eis inkubiert und alle 60 sec wieder gevortext (5 sec, höchste Stufe). Schließlich wurde 800 µl Reagenz C hinzugegeben und durch Inversion gemischt. Die Probe wurde 10 min bei 4°C und 700 g abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Das Pellet bestand aus Zellkernen und -trümmern. Dieser Schritt wurde insgesamt drei Mal durchgeführt. Anschließend wurde der Überstand 15 min bei 4°C und 3.000 g abzentrifugiert. Das Pellet stellte nun die mitochondriale Fraktion dar. Diese wurde mit 500 µl Reagenz C gewaschen und 5 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Dieser Zentrifugationsschritt wurde auch mit dem Gesamtproteinextrakt durchgeführt. Anschließend wurden je nach Pelletgröße 1x SDS-Ladepuffer (100°C) zum Zellpellet des Gesamtproteinextrakts bzw. zum mitochondrialen Pellet gegeben. Die Proben wurden 10 min bei 100°C gekocht und konnten anschließend zur Proteinkonzentrationsbestimmung eingesetzt werden.

### **3.3.14 Cytochrom C-Release-Assay**

Wenn p53 an die Mitochondrien transloziert und mit den Mitgliedern der Bcl2-Familie eine Interaktion eingegangen ist, wird als letzte Konsequenz die Mitochondrienmembran permeabilisiert und Cytochrom C kann austreten. Dadurch wird die Caspase-Signalkaskade ausgelöst und Apoptose induziert. Cytochrom C ist ein rein mitochondriales Protein und kommt nur nach Apoptose-Induktion im Cytoplasma vor. Cytochrom C im Cytoplasma ist daher ein Merkmal für Apoptoseinduktion.

Zellen werden auf einer 10 cm-Schale ausgesät, so dass sie am kommenden Tag 70-80 % konfluent waren. 24 h später wurden sie mit den entsprechenden Chemikalien behandelt. 48 h nach Behandlung wird die cytosolische Fraktion der Zellen mit dem „Mitochondria Isolation Kit“ gemäß den Angaben des Herstellers gewonnen. Da nur ein Viertel der Zellen eingesetzt wurde, wurden die Zellen in 250 µl Reagenz A aufgenommen, mit 2,5 µl Reagenz B aufgebrochen und danach 250 µl Reagenz C zugegeben. Nun wurden drei Zentrifugationsschritte bei 700 g, ein

Zentrifugationsschritt bei 3000 g und ein Zentrifugationsschritt bei 12000 g jeweils bei 4°C durchgeführt. Der Überstand wird aufbewahrt.

Die cytosolische Fraktion wurde dann aufkonzentriert mit Microcon® Centrifugal Filter Devices YM-10 (Millipore). Diese Filter sind dazu in der Lage, makromolekulare Lösungen einfach und effizient aufzukonzentrieren und zu entsalzen. Alle Moleküle, die ein nominales Molekulargewichtslimit (NMWL) kleiner 10000 haben, können den Filter passieren, während größere Moleküle den Filter nicht durchdringen können. Dafür wird die komplette Probe, die bei der Fraktionierung gewonnen wurde, auf die Säule gegeben und bei 14000 g und RT für 30 min zentrifugiert. Der Durchfluß wird verworfen und die Komponente, die sich noch überhalb des Filters befindet, wird nochmals zentrifugiert. Dafür wird das Probenreservoir verkehrt herum auf ein neues Eppendorfgefäß gesetzt und 3 min bei 1000 g zentrifugiert. Die Probe wird schließlich in einem entsprechenden Volumen 2x SDS-Gel-Ladepuffer aufgenommen und 10 min bei 100°C gekocht.

### **3.3.15 Immunogold-Elektronenmikroskopie an Mitochondrien**

Ein Elektronen-Mikroskop ist ein Mikroskop, das das Innere oder die Oberfläche einer Probe mit Elektronen abbilden kann. Da schnelle Elektronen eine sehr viel kleinere Wellenlänge als sichtbares Licht haben und die Auflösung eines Mikroskops durch die Wellenlänge begrenzt ist, kann mit einem Elektronenmikroskop eine deutlich höhere Auflösung (derzeit 0,1 nm) erreicht werden als mit einem Lichtmikroskop (etwa 200 nm).

Um biologische Proben ansehen zu können, bedarf es einer Reihe von Vorbereitungen. Zunächst müssen die Ansätze fixiert werden, um sie realistischer darstellen zu können. Verwendet werden Glutaraldehyde zur Vernetzung und damit Verhärtung der Proteine und Osmiumtetroxid, welches Lipide schwarz färbt und gleichzeitig fixiert. Danach erfolgt eine Fixierung der Zellen in Agarose. Nun müssen die Proben dehydriert werden, d.h. durch schrittweise Erhöhung der Ethanol-Konzentration wird der Probe das Wasser entzogen. Dehydrierte Proben werden nun eingebettet, um sie später sektionieren zu können. Hierzu werden meist Acrylharze eingesetzt. Danach erfolgt die Sektionierung, d.h. das Schneiden der Proben in dünne Scheiben (70-80 nm). Schließlich kann die Anfärbung der Proben mittels Antikörper erfolgen.

Bei der Immunogold-Elektronen-Mikroskopie ist der sekundäre Antikörper konjugiert mit kolloidalen Gold-Partikeln. Dieser Antikörper ist spezifisch für einen primären Antikörper, der an bestimmten Molekülen wie zum Beispiel Proteinen angreifen kann. Da der Gold-Partikel elektronen-undurchlässig ist, erscheint er als schwarzer Punkt auf dem Elektronenmikroskop. Die Methode detektiert nur konjugierte Antikörper auf der Oberfläche des Schnittes.

In dieser Arbeit sollte p53 auf der äußeren mitochondrialen Membran mit Hilfe der Immunogold-Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden. Dafür wurden zunächst Gesamtzellen isoliert, in 4 % Formaldehyd/0,05 % Glutaraldehyd aufgenommen in 0,1 M Cacodylat-Puffer (pH 7,4) bei RT fixiert und über Nacht bei 4°C gelagert. Die Pellets wurden in 2 % niedrigschmelzender Agarose bei 40°C resuspendiert und auf Eis fest werden lassen. Gesamtzellen wurden mit dem Formaldehyd/Glutaraldehyd-Fixativ im Agarosegel fixiert. Nach einmaligem Waschen des Gels mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,2), wurden kleine Blöcke mit einer maximalen Größe von 2x2x2 mm<sup>3</sup> ausgeschnitten und durch schrittweise Verminderung der Temperatur und progressive Erhöhung der Ethanolkonzentration dehydriert. Die folgenden Ethanolkonzentrationen und Temperaturen wurden eingesetzt: 30 % bei 0°C, 50 % bei -20°C, 70 %, 90 %, 100 % bei -35°C jeweils für eine Stunde.

Dehydrierte Blöcke wurden infiltriert und bei -35°C in das Acrylharz Lowicryl K4M (Polysciences, Eppelheim) eingebettet. Das Harz wurde mit Hilfe von UV-Strahlung polymerisiert: 24 h bei -35°C, 24 h bei 0°C und weitere 24 h bei RT. Ultradünne Schnitte (70-80 nm) werden auf Tröpfchen (30 µl) der folgenden Chemikalien inkubiert: Glycin (50 mM in PBS), Blocking Solution, Anti-p53-Antikörper DO-1 oder der IgG-Kontrolle verdünnt in Blocking Solution, Ziegen Anti-Maus Antikörper, der mit 10 nM kolloidalem Gold gekoppelt ist (Aurion, Holland), Blocking Solution, PBS, 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphat-Puffer, PBS und Wasser. Die Inkubationen mit den Antikörpern wurden über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Schließlich wurden die Schnitte getrocknet und mit Uranyl-Acetat und Methylcellulose gefärbt. Die Aufnahmen wurden mit dem Transmissions-Elektronenmikroskop TECNAI G2 der Firma FEI bei einer 68000-fachen Vergrößerung gemacht und mit einer Software für morphometrische Analysen (Analysis, SIS, Deutschland) ausgewertet.

Cacodylatpuffer	Natrium-Cacodylat	0,1 M
		ad pH 7,4 bis 7,6 mit HCl und filtrieren
Blocking Solution	Kaltwasser-Fisch-Gelatine	0,5 %
	BSA	0,5 %
	Tween-20	0,01 %
	gelöst in PBS	
<b>Sörensen Phosphatpuffer 0,1 M</b>		
<i>Stammlösung A</i>		<i>Stammlösung B</i>
0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O		0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
36 ml		14 ml
ad 100 ml mit H <sub>2</sub> O dest., pH-Wert sollte dann 7,2 betragen, wenn nicht mit 1 M NaOH einstellen		

### 3.3.16 Mitochondrienmassen-Bestimmung

Zur Mitochondrienmassen-Bestimmung wird der kationische Farbstoff JC-1 (Molecular Probes) eingesetzt. Er passiert die Plasma- und auch die Mitochondrienmembran und akkumuliert spannungsabhängig in den Mitochondrien, wodurch diese angefärbt werden und mittels Durchflusszytometer (Fluoreszenz-Emissionsverschiebung von grün (~529 nm) zu rot (~590 nm)) erfasst werden können.

$2 \times 10^5$  exponentiell wachsende Zellen werden am Vortag des Experimentes in 6-Loch-Platten ausgesät. 24 h später wird das Medium entfernt und die Zellen mit Hilfe von Trypsin/EDTA vereinzelt. Die Zellen werden bei 1200 rpm zentrifugiert, das Trypsin abgenommen und verworfen. Die Zellen werden in 500  $\mu$ l Medium supplementiert mit 0,2 % FKS aufgenommen und JC-1 in einer Endkonzentration von 2  $\mu$ M zugefügt. Nun wird für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend die rote und die grüne Fluoreszenz im FACS gemessen.

### 3.4 DNA-Techniken

#### 3.4.1 Analytische Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien: Minipräparation

Zur schnellen Isolierung von Plasmid-DNA dient die so genannte Minipräparation. Zwar liefert sie nur geringe Mengen an DNA, diese reicht jedoch zur Analyse von Klonierungsschritten aus. In dieser Arbeit kam die so genannte TENS-Methode zum Einsatz.

Bei dieser Methode werden die Bakterienzellen lysiert und die Zellproteine sowie die chromosomale DNA mit Natriumacetat gefällt. Durch eine Zentrifugation wird die Plasmid-DNA von den Zellbestandteilen getrennt und kann nach einer Fällung mit Ethanol in RNase-haltigem Puffer aufgenommen werden.

Zuerst wurden 1,5 ml einer über Nacht bei 37°C im Inkubationsschüttler inkubierten Kultur bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl LB<sub>Amp</sub>-Medium (100 µg/ml) resuspendiert, mit 300 µl TENS-Lösung und 150 µl 3 M Natrium-Acetat (NaAc, pH 5,2) versetzt und durch Invertieren vermischt. Das gefällte Protein, die chromosomale DNA und die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (13000 rpm, 5 min). Der Überstand mit der darin enthaltenen Plasmid-DNA wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit 800 µl eiskaltem 100 % Ethanol versetzt und für 6 min mit 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die Plasmid-DNA in 30 µl TE-Puffer plus RNaseA (100 µg/ml) gelöst.

TENS-Puffer	Tris/HCl (pH 8,0)	10 mM
	EDTA (pH 8,0)	1 mM
	NaOH	0,1 M
	SDS	0,5 %
	H <sub>2</sub> O	ad 100 ml

### 3.4.2 Präparative Plasmid-DNA-Isolierung

Bei Bedarf großer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurde die Aufbereitung mittels alkalischer Lyse und Ionenaustauschchromatographie an Nucleobond<sup>®</sup>-Säulen (Macherey-Nagel) nach Firmenvorschrift durchgeführt.

Mit Hilfe der Nucleobond<sup>®</sup>-Säulen (AX-100) können 100 ml-Bakterienkultur bei erwarteter DNA-Ausbeute von 20-100 µg aufgearbeitet werden.

Dazu wurde eine Übernachtskultur plasmidtragender Bakterien bei 4°C abzentrifugiert (Sorvall RC-5B, Rotor GS 3, 5000 rpm, 10 min), der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 4 ml Puffer S1 resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer S2 wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Das im Puffer enthaltene SDS löst die bakterielle Zellmembran auf und führt zur Lyse der Zellen und zur Freisetzung der Zellbestandteile. NaOH denaturiert die chromosomale und die Plasmid-DNA, sowie die Proteine. Durch anschließende Zugabe von 4 ml Puffer 3 und einer Inkubation von 5 min auf Eis wurde das Lysat neutralisiert. Die kleinere kovalent geschlossene Plasmid-DNA renaturiert wieder und bleibt in Lösung, während die chromosomale Wirts-DNA präzipitiert. Der Ansatz wurde bei 4°C abzentrifugiert (13000 rpm, 25 min), durch einen Papierfilter filtriert und anschließend auf die zuvor mit 2,5 ml Puffer N2 äquilibrierte Nucleobond<sup>®</sup>-Säule gegeben. Aufgrund der Salz- und pH-Bedingungen im Lysat bindet nur die Plasmid-DNA an die Säule und wird zurückgehalten. Nach Waschen der Säule zur Entfernung von Proteinen mit 2x 5 ml Puffer N3 wurde die Plasmid-DNA mit 5 ml Puffer N5 eluiert und mit 3,5 ml Isopropanol (100 %) bei Zentrifugation (13000 rpm, 1 h, 4°C) gefällt. Das erhaltene Pellet wurde mit 2 ml eiskaltem Ethanol (70 %) gewaschen, getrocknet und in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst.

### 3.4.3 Spektrometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Absorptionsspektroskopie erlaubt die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration einer Lösung. Dabei ist zu beachten, dass Nukleinsäuren in Lösung ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm besitzen. Bei dieser Wellenlänge absorbiert einzelsträngige DNA aufgrund des Hyperchromizitätseffektes

stärker als doppelsträngige DNA. Eine gemessene optische Dichte bei 260 nm von 1,0 (Schichtdicke der Küvette: 1 cm) entspricht:

- bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml
- bei einzelsträngiger DNA und RNA einer Konzentration von 40 µg/ml
- bei einzelsträngigen Oligonukleotiden einer Konzentration von 33 µg/ml

Proteine, die als Verunreinigung in DNA-Lösungen auftreten, besitzen ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm. Der Quotient  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  ermöglicht es, den Reinheitsgrad einer nukleinsäurehaltigen Lösung einzuschätzen. Bei einer reinen DNA-Lösung wird ein Wert zwischen 1,65-1,85 erreicht. Höhere Werte sind auf RNA-Verunreinigungen, niedrigere Werte auf Proteinverunreinigung und Phenolreste zurückzuführen.

Die DNA- bzw. RNA-Konzentrationen wurde mit Hilfe des Photometers „Ultrospec 3100 pro“ der Firma Amersham Biosciences ermittelt.

### 3.4.4 Agarosegelelektrophorese doppelsträngiger DNA

In der Agarosegelelektrophorese werden DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt.

Die jeweilige Agarosekonzentration des Gels richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente.

**Tabelle 2: Ideale Agarosekonzentrationen für bestimmte DNA-Trennbereiche**

Agarosemenge (%)	DNA-Trennbereich (kbp)
0,3	60-5
0,6	20-1
0,7	10-0,8
0,9	7-0,5
1,2	6-0,4
1,5	4-0,2
2	3-0,1

Die entsprechende Agarosemenge wurde in dem entsprechenden Volumen 1x TAE-Puffer unter Aufkochen gelöst und die Gellösung nach Abkühlen auf ca. 50°C und Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) in die vorbereitete Gießapparatur gegossen. Vor der Elektrophorese wurden die aufzutrennenden DNA-Proben mit 5x Probenpuffer versehen und in einer horizontalen Elektrophoresekammer in 1x TAE-Puffer bei einer Feldstärke von 5-7 V/cm aufgetrennt. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, der der Gellösung beigefügt wurde, interkaliert in doppelsträngige DNA, so dass die DNA-Fragmente nach dem Lauf unter UV-Licht als orangefarbene Banden erkennbar waren.

Präparative Gele wurden unter langwelligem UV-Licht ( $\lambda = 366$  nm) ausgewertet, während analytische Gele unter kurzwelligem UV-Licht ( $\lambda = 254$  nm) betrachtet und bei Bedarf zur Dokumentation mit einem digitalisierten System (CCD-Kamera; MWG Biotech Gel Print 200i) fotografiert und anschließend entweder auf digitalem Medium gespeichert oder auf einem Thermodrucker wiedergegeben wurde.

5x Probenpuffer	EDTA	50 mM
	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Glycerin	50 % (v/v)
Agarosegel	Agarose	1-3 % (w/v)
	Ethidiumbromid	0,5 µg/ml

### 3.4.5 Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Zur Isolierung von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen wurde das QIAmp DNA Blood Mini Kit der Firma Qiagen verwendet und nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Aufbewahrung der DNA erfolgte bei -20°C.

### 3.4.6 Modifikationen von DNA

#### 3.4.6.1 Spaltung von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Zur gezielten Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen, welche palindromatische Sequenzen erkennen und schneiden, unter den vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen eingesetzt. Die einzusetzende Enzymmenge wird durch DNA-Konzentration und Enzymaktivität bestimmt. Aufgrund des hohen Glycerin-Gehaltes der Enzymlösung beträgt die einzusetzende Enzymmenge 1/10 des Reaktionsansatzes.

#### 3.4.6.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um die Rezirkularisierung von zuvor mit Restriktionsenzymen linearisierten DNA-Doppelsträngen zu verhindern, wurde die Phosphatgruppe an den 5'-Enden der DNA durch Behandlung mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm („calf intestinal phosphatase“, CIP, Roche, Mannheim) abgespalten. Eine Ligation kann im Anschluß nur noch mit dem phosphorylierten Insert erfolgen. Die linearisierte DNA wurde mit 20 U Alkalischer Phosphatase für 1 h bei 37°C inkubiert.

#### 3.4.6.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe der T4-DNA-Ligase können *in vitro* die Enden zweier Nukleinsäuremoleküle verknüpft werden. Dieses Enzym katalysiert die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 3'-Hydroxy- und einem 5'-Phosphatende und wird für die Bildung einer intakten doppelsträngigen DNA benötigt. Die Enden der beiden zu ligierenden Nukleinsäuremoleküle müssen dabei kompatibel sein. Zur Ligation wurden der CIP-behandelte Vektor und die Insert-DNA in äquimolarem Verhältnis eingesetzt und mit Ligase-Puffer sowie 1 µl (40 U) Ligase (New England Biolabs bzw. Fermentas) für 2 h bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 16°C inkubiert. Mit dem Ligationsansatz wurden Bakterien des *E. Coli*-Stammes pMosBlue oder DH5α transformiert.

### 3.4.7 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Vermehrung von Nukleinsäuresequenzen definierter Länge und Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen. Es werden dabei die Eigenschaften von DNA-Polymerasen zur Hilfe genommen, die, ausgehend von einem DNA-Einzelstrang als Matrize (Template), einen neuen komplementären Strang synthetisieren können.

In einem ersten Schritt wird die zunächst doppelsträngige DNA bei 94°C vollständig denaturiert, d.h. in Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). In einem zweiten Schritt erfolgt nach Abkühlung des Reaktionsansatzes auf eine geeignete Temperatur (variiert je nach Primer) die spezifische Anlagerung der Oligonukleotide an den jeweiligen Einzelstrang (Annealing). Die Oligonukleotide werden dabei so gewählt, dass sie jeweils Start- und Endpunkt der zu amplifizierenden Sequenz definieren. Die angelagerten Oligonukleotide bilden einen kurzen doppelsträngigen DNA-Bereich mit einem freien 3'-Hydroxy-Ende, den die Polymerase für ihre Verlängerungsreaktion benötigt. In Anwesenheit von Desoxynukleotiden (dNTP's) werden nun in einem dritten Schritt die mit Primern verbundenen Matrizen zu einem Doppelstrang aufgefüllt (Extension). Die neusynthetisierten DNA-Stränge sind zunächst von unbestimmter Länge, besitzen jedoch durch die Primer definierte Ausgangspunkte, die so den zu amplifizierenden Sequenzbereich genau festlegen.

Diese neusynthetisierten DNA-Doppelstränge werden in einem zweiten Reaktionszyklus nach erneuter Denaturierung ebenfalls zu Matrizen und können mit den entsprechenden Oligonukleotiden hybridisieren. In einem sich nun anschließenden dritten Reaktionszyklus entstehen daher nur noch doppelsträngige DNA-Moleküle, die von den Primern flankiert sind. Durch mehrmalige Wiederholung dieser Reaktionsfolge aus DNA-Denaturierung, Primer-Anlagerung und Auffüllreaktion wird die Zielsequenz exponentiell amplifiziert.

Die Taq-Polymerase, welche für die PCR verwendet wurde, stammt aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*. Da es sich hierbei um ein thermophiles Bakterium handelt, hat dessen DNA-Polymerase ein Temperaturoptimum von 72°C und ist darüber hinaus für kurze Zeit bei Temperaturen von bis zu 95°C stabil. Dieses ist Voraussetzung dafür, dass alle notwendigen Reaktionsschritte ohne Zerstörung des Enzyms im gleichen Reaktionsansatz automatisiert durchgeführt werden können.

Um die Spezifität der Amplifikation zu erhöhen, wurde die so genannte HotStarTaq-Polymerase von Qiagen benutzt. An diese Polymerase ist ein Enzym gekoppelt, das

die Polymerase zunächst in einem inaktiven Stadium hält. Erst durch 15-minütige Inkubation bei 95°C wird die Polymerase aktiviert. Dies minimiert die Vervielfältigung unspezifischer PCR-Produkte, von unspezifischem Hintergrund sowie die Bildung von Primer-Dimeren.

Die verwendeten Primer wurden in lyophilisierter Form von der Firma Operon bezogen, in sterilem Wasser aufgenommen und in einer Endkonzentration von 0,5 µM in der PCR eingesetzt. Zur Durchführung der PCR wurde der Thermocycler PTC-200 (Peltier Thermal Cycler) der Firma MJ Research eingesetzt.

Der PCR-Ansatz wurde nach folgendem Schema in 500 µl-PCR-Gefäße pipettiert:

**Tabelle 3: Pipettierschema eines 50 µl Standard-PCR-Ansatzes für RNA-Analysen**

Komponente	Menge / Volumen	Endkonzentration
10x Reaktionspuffer	5 µl	1x
dNTP`s	je 1µl	0,2 mM
For-Primer	1 µl	0,5 µM
Rev-Primer	1 µl	0,5 µM
cDNA	1 µl	-
Taq Polymerase	0,5 µl	0,05 U
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 50 µl	

Als Template diente die RNA, die nach der RNA-Isolierung in cDNA umgeschrieben wurde.

**Tabelle 4: Pipettierschema eines 20 µl Standard-PCR-Ansatzes für ChIP-Analysen**

Komponente	Menge / Volumen	Endkonzentration
10x Reaktionspuffer	2 µl	1x
dNTP`s	0,3 µl	0,15 mM
For-Primer	0,3 µl	0,38 µM/µl
Rev-Primer	0,3 µl	0,38 µM/µl
DNA	2 µl	-
Taq Polymerase	0,1 µl	0,025 U
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 20 µl	

Als Template diente die bei der ChIP-Analyse gewonnene DNA.

**Tabelle 5: Pipettierschema eines 50 µl Standard-PCR-Ansatzes für die Klonierung des p53-Gens in den pDsRed-N1-Vektor**

Komponente	Menge / Volumen	Endkonzentration
10x Reaktionspuffer	5 µl	1x
dNTP`s	1 µl	0,2 mM
For-Primer	1 µl	0,5 µM
Rev-Primer	1 µl	0,5 µM
DNA	1 µl	0,002 µg/µl
Taq Polymerase	0,5 µl	0,05 U
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 50 µl	

Als Template-DNA diente der Vektor pcDNA 3.1 Hyg(-) wtp53.

**Tabelle 6: Pipettierschema eines 50 µl Standard-PCR-Ansatzes für die Amplifikation der mitochondrialen Sonden**

Komponente	Menge / Volumen	Endkonzentration
10x Reaktionspuffer	5 µl	1x
dNTP`s	1 µl	0,2 mM
For-Primer	1 µl	0,5 µM
Rev-Primer	1 µl	0,5 µM
DNA	1 µl	-
Taq Polymerase	0,5 µl	0,05 U
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 50 µl	

Als Template-DNA diente aus HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen isolierte mitochondriale DNA.

Zur Überprüfung auf etwaige Kontaminationen wurde stets ein H<sub>2</sub>O-Kontrollansatz (komplett, aber ohne Template-DNA) angesetzt. Abschließend wurde jeweils die Hälfte eines Reaktionsansatzes (mit 1/5 Volumen an Blaumarker versetzt) im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

**Tabelle 7: Schema des verwendeten PCR-Standardprogramms für die Gene *bax*, *bak*, *nox* und *redd 1***

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	15 min.
Denaturierung	95°C	30 sec.
Annealing	65°C	30 sec.
Extension	72°C	30 sec.
		} x 35
Letzte Extension	72°C	10 min.

**Tabelle 8: Schema des verwendeten PCR-Standardprogramms für die Gene *p21* und *gapdh***

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	15 min.
Denaturierung	95°C	50 sec. } 50 sec. } x 25 1 min. }
Annealing	64°C	
Extension	72°C	
Letzte Extension	72°C	10 min.

**Tabelle 9: Schema des verwendeten PCR-Standardprogramms für die Gene *stathmin*, *survivin* und *gadd45***

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	15 min.
Denaturierung	95°C	50 sec. } 50 sec. } x 30 3 min. }
Annealing	58°C	
Extension	72°C	
Letzte Extension	72°C	10 min.

**Tabelle 10: Schema des verwendeten PCR-Standardprogramms für das Gen *dinp1α***

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	15 min.
Denaturierung	95°C	50 sec. } 50 sec. } x 32 3 min. }
Annealing	58°C	
Extension	72°C	
Letzte Extension	72°C	10 min.

**Tabelle 11: Schema des verwendeten PCR-Standardprogramms für das Gen *puma***

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	15 min.
Denaturierung Annealing Extension	95°C 58°C 72°C	50 sec. 50 sec. 3 min. } x 40
Letzte Extension	72°C	10 min.

**Tabelle 12: Schema des verwendeten PCR-Standardprogramms für das Gen *pig3***

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	15 min.
Denaturierung Annealing Extension	95°C 58°C 72°C	50 sec. 50 sec. 3 min. } x 35
Letzte Extension	72°C	10 min.

**Tabelle 13: Schema des verwendeten PCR-Standardprogramms für das Gen *hprt***

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	15 min.
Denaturierung Annealing Extension	95°C 60°C 72°C	30 sec. 30 sec. 1 min. } x 29
Letzte Extension	72°C	10 min.

**Tabelle 14: Schema des verwendeten PCR-Standardprogramms für das Gen *β-aktin***

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	15 min.
Denaturierung Annealing Extension	95°C 62°C 72°C	30 sec. 30 sec. 30 sec. } x 30
Letzte Extension	72°C	10 min.

**Tabelle 15: Schema des verwendeten PCR-Standardprogramms für den *p21*- und den *u6*-Promotor**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	15 min.
Denaturierung Annealing Extension	95°C 56°C 72°C	30 sec. 30 sec. 2 min. } x 42
Letzte Extension	72°C	10 min.

**Tabelle 16: Schema des verwendeten PCR-Standardprogramms für die Amplifikation des *p53*-Gens aus dem pcDNA 3.1 Hyg(-) wtp53-Vektor.**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	15 min.
Denaturierung Annealing Extension	94°C 60°C 72°C	50 sec. 50 sec. 2 min. } x 37
Letzte Extension	72°C	10 min.

**Tabelle 17: Schema des verwendeten PCR-Standardprogramms für die Amplifikation der mitochondrialen Sonden 1, 2, 4, 5, 6 und 7**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	15 min.
Denaturierung	94°C	1 min. } x 30 1 min. } 3 min. }
Annealing	63°C	
Extension	72°C	
Letzte Extension	72°C	10 min.

**Tabelle 18: Schema des verwendeten PCR-Standardprogramms für die Amplifikation der mitochondrialen Sonden 3 und 8**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	15 min.
Denaturierung	94°C	1 min. } x 30 1 min. } 3 min. }
Annealing	56°C	
Extension	72°C	
Letzte Extension	72°C	10 min.

### 3.4.8 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen oder Restriktionsverdauen wurden „NucleoSpin®“-Säulen der Firma Macherey-Nagel gemäß den Angaben des Herstellers eingesetzt. Durch das Säulenmaterial werden die DNA-Fragmente von Primern, uninkorporierten Desoxynukleosidtriphosphaten, der Taq-Polymerase, dem Restriktionsenzym und Salzen befreit.

Die zu isolierenden DNA-Fragmente wurden unter langwelligem UV-Licht (366 nm) aus dem Gel herausgeschnitten. Die Säulen absorbieren Nukleinsäuren ab einer Größe von ca. 100 bp in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze und bei einem pH-Wert < 7,5 (max. Bindungskapazität pro Säule: 10 µg), während Oligonukleotide, Enzyme und Salze abzentrifugiert werden. Die so gereinigte DNA wurde nach Konzentrationsbestimmung entweder direkt zur Ligation in PCR-Klonierungsvektoren oder nach Verdau mit Restriktionsenzymen zur Ligation eingesetzt.

### 3.4.9 Dot Blot

Der Dot Blot ist eine Technik, um Biomoleküle zu detektieren. Sie ersetzt entweder den Northern Blot, den Southern Blot oder den Western Blot. In diesem Verfahren werden die Biomoleküle nicht durch Elektrophorese aufgetrennt, sondern das Gemisch, das die zu detektierenden Biomoleküle möglicherweise enthält, wird direkt punktförmig („Dot“) auf die Membran („Blot“) aufgetragen. Darauf folgt dann direkt die Detektion entweder durch Nukleotid-Sonden (Nachweis von RNA bzw. DNA) oder durch Antikörper (Nachweis von Proteinen). Die Technik bietet eine immense Zeitersparnis verglichen mit Northern, Southern oder Western Blot, erlaubt jedoch keine Aussage über die Größe der Biomoleküle, die man nachgewiesen hat.

In dieser Arbeit wurde der Dot Blot angewandt, um mitochondriale DNA nachzuweisen.

#### 3.4.9.1 Immobilisierung der DNA

Zur Durchführung wurden 10, 5, 2,5, 1,25 und 0,625 µg genomischer und beschallter DNA auf eine Nitrocellulosemembran aufgetropft. Nach dem Trocknen der Membran wurde die DNA durch Crosslinken ( $2 \times 120 \text{ Joule/m}^2$ ) auf der Membran fixiert.

#### 3.4.9.2 Herstellen einer markierten Gensonde

Als Gensonde bezeichnet man jede Art von Nukleinsäuren, mit deren Hilfe man ein gesuchtes Gen oder eine bestimmte Nukleinsäuresequenz im Genom eines Organismus nachweisen kann. Die eingesetzten Sonden müssen dazu in ihrer Basensequenz zu dem gesuchten Gen oder Teilen davon komplementär sein.

Die Markierung der in dieser Arbeit verwendeten Gensonden erfolgte für den Dot Blot mit dem „AlkPhos DIRECT™-Labeling- + Detection“-Kit (Amersham Biosciences) und wurde, wie vom Hersteller angegeben, eingesetzt. Es wurden jeweils 100 ng einer genomischen DNA-Sonde (β-Aktin) oder der mitochondrialen DNA-Sonde 6 (Abbildung 77) markiert.

### 3.4.9.3 Dot Blot-Hybridisierung

Der Dot Blot erlaubt die Identifikation spezifischer DNA-Moleküle aus auf einer Nitrocellulose-Membran immobilisierter genomischer DNA. Dieser Nachweis erfolgt durch Hybridisierung der auf die Membran getropften DNA mit einer geeigneten und markierten Gensonde. Die Dot-Blot-Hybridisierung erfolgt nach Angaben des „AlkPhos DIRECT™-Labeling- + Detection“-Kit (Amersham Biosciences). Es wurde allerdings über Nacht bei 62°C inkubiert. Nach der Hybridisierung erfolgen einige Waschschriffe nach Angaben des „AlkPhos DIRECT™-Labeling- + Detection“-Kit (Amersham Biosciences).

primärer Waschpuffer für Dot Blot	Urea	2M
	SDS	0,1 %
	0,5M Na-Phosphat pH 7,0	50mM
	NaCl	150 mM
	MgCl <sub>2</sub>	1mM
	Blocking reagent	0,2%
sekundärer Waschpuffer für Dot Blot (20x)	Tris base	1M
	NaCl	2M

### 3.4.9.4 Detektion des Dot-Blot-Signals

Das „CDP-Star™ chemiluminescent detection reagent“ (Amersham Pharmacia Biotech) katalysiert, in Kombination mit der an die Sonden kovalent gebundenen alkalinen Phosphatase, die Zersetzung eines stabilisierten Dioxetansubstrats, welches zu einer Lichtemission führt. Diese Lichtemission kann auf einem Photofilm (Hyperfilm ECL, Amersham) detektiert werden.

## 3.5 RNA-Techniken

### 3.5.1 RNA-Isolierung mit der Phenol-Chloroform-Methode

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen wurden diese in 10 cm-Schalen kultiviert. Nach Abnahme des Mediums von den Zellen wurde sofort 1 ml Lösung D auf die Zellen gegeben. Durch das in Lösung D enthaltene Guanidiniumthiocyanat werden im Zusammenwirken mit  $\beta$ -Mercaptoethanol und N-Guanosyl-Sarcosin die Zellen unmittelbar lysiert und gleichzeitig die Proteine, darunter auch Ribonukleasen, denaturiert. Anschließend wurden 0,1 ml 2 M Natriumacetat (pH 4,0), 1 ml wassergesättigtes Phenol und 0,2 ml eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (49:1) zupipettiert. Nach Zugabe jedes einzelnen Reagenz wurde der Ansatz durch Inversion gemischt. Letztendlich wird das Gemisch für 10 sec kräftig geschüttelt, 15 min auf Eis gestellt und anschließend bei 4°C abzentrifugiert (4.000 g, 60 min). Danach wurde die RNA-enhaltende Oberphase (die DNA befindet sich in der Interphase) vorsichtig abgenommen und in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt. Zum Fällern der RNA wurde 1 ml 100 % Isopropanol zugegeben, über Nacht bei -20°C inkubiert und die RNA durch Zentrifugation pelletiert (13.000 rpm, 20 min, 4°C). Anschließend wurde das Pellet in 0,3 ml Lösung D resuspendiert und mit 0,3 ml 100 % Isopropanol für 1 h bei -20°C erneut gefällt. Die durch Zentrifugation (13.000 rpm, 10 min) pelletierte RNA wurde einmal in 70 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Das gewonnene RNA-Pellet konnte nun in 50  $\mu$ l  $H_2O_{dest.}$  gelöst und die Konzentration bestimmt werden. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

Solution D (Stock)	Guanidium-Thiocyanat	250 g in 293 ml $H_2O$ -DEPC
	0,75 M Natriumcitrat pH 7	17,6 ml
	10 % Sarcosyl-L	26,4 ml

Zu 50 ml der Stocklösung wurde 0,36 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol zugegeben.

### 3.5.2 DNase-Verdau isolierter RNA

Zur Entfernung von DNA-Verunreinigungen aus der isolierten RNA wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurde die RNA mit 3 µl (30 Units) RNase-freier DNase versetzt und für 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNase inaktiviert (15 min, 70°C).

Zur Kontrolle des DNase-Verdau wurde eine *gapdh*-PCR auf die isolierte und DNase-verdaute RNA durchgeführt. *Gapdh* ist ein so genanntes Haushaltsgen und somit geeignet, um genomische DNA nachzuweisen.

10x DNase Puffer	Natriumacetat	0,1 M
	MgSO <sub>4</sub>	5 mM

### 3.5.3 Herstellung von cDNA: Reverse Transkription

Unter cDNA („complementary DNA“) versteht man die mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase aus RNA hergestellte DNA. Als Startpunkt für die Erststrangsynthese dienen sogenannte „random Hexamer“-Oligonukleotide, die sich nach dem Zufallsprinzip entlang der RNA anlagern und so Startpunkte für die reverse Transkription definieren. An diese Oligonukleotide lagert sich nun die Reverse Transkriptase an und erstellt in Anwesenheit von dNTPs einen komplementären DNA-Strang.

Die Herstellung von cDNA erfolgte mit Hilfe der Superscript III Reversen Transkriptase (Invitrogen). Die Reaktion wird nach Herstellerangaben mit 4 µg zuvor DNase-verdauter RNA durchgeführt. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase durch eine 15-minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die gewonnene cDNA bei 4°C gelagert

### 3.5.4 Agarosegelelektrophorese von RNA

Gemische von RNA-Molekülen werden im elektrischen Feld im Agarosegel gemäß ihrem Molekulargewicht voneinander getrennt. Dies geschieht nach denselben Prinzipien, die bereits für die Trennung von DNA-Gemischen beschrieben worden sind.

Da RNA-Moleküle jedoch stark zur Ausbildung von Sekundärstrukturen neigen, welche das Wanderungsverhalten während der Elektrophorese beeinflussen, erfolgt die Auftrennung in Anwesenheit von Formaldehyd, also unter denaturierenden Bedingungen.

#### 3.5.4.1 Herstellung von Formaldehyd-Agarosegelen; Gelelektrophorese von RNA

Zur Auftrennung der zellulären Gesamt-RNA wurden 1 %-ige denaturierende Agarosegele hergestellt. Dazu wurden für einen 50 ml Ansatz 0,5 g Agarose in 37,5 ml sterilem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  und 10 ml sterilem 5x MSE-Puffer im Mikrowellenherd unter Aufkochen gelöst. Zu der auf etwa 50°C abgekühlten Gellösung wurden nun 2,5 ml 37 % Formaldehyd tropfenweise zugegeben, gut durchmischt und das Gel in eine zuvor mit einer 1 %-igen SDS-Lösung und 70 % Ethanol gereinigten horizontale Elektrophoresekammer gegossen. Mittels eines PVC-Kamms wurden Taschen zum Laden der RNA-Proben ausgespart. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde die Elektrophoresekammer mit sterilem 1x MSE-Puffer gefüllt.

Zur Präparation der RNA-Proben wurden 10-15 µg RNA-Lösung mit 25 µl frisch hergestelltem RNA-Ladepuffer versetzt und für 15 min bei 65°C inkubiert, wodurch die Proteine vollständig denaturiert wurden. Dem Ansatz wurde nun 1 µl Ethidiumbromid (Endkonzentration: 1 µg/µl) zur Sichtbarmachung der RNA unter UV-Licht zugefügt. Nach dem Laden der Probenaschen erfolgte die Auftrennung der RNA-Moleküle durch Anlegen einer konstanten Spannung von 100 V für etwa 50 min. Danach wurde das Gel unter UV-Licht ( $\lambda=254$  nm) mit angelegtem Lineal fotografiert. Dabei wurden pro Spur zwei breite Banden sichtbar: die bei 4,4 kb laufende 28S rRNA und die bei 1,6 kb laufende 18S rRNA. Die Laufhöhen dieser beiden internen Längenmarker wurden am Rande des Gels mit einem Skalpell markiert.

5x MSE-Puffer	MOPS (pH 7,0)	0,2 M
	Na-Acetat	50 mM
	EDTA (pH 8,0)	5 mM
Ladepuffer für RNA- Agarosegelelektrophorese	Formamid (deionisiert)	0,75 ml
	5x MSE-Puffer	0,15 ml
	Formaldehyd (37%)	0,24 ml
	50% Glycerin (v/v)	0,2 ml
	Bromphenolblau	0,025% (w/v)

### 3.5.5 Northern Blot

Der Northern Blot ist ein molekularbiologisches Verfahren, bei dem nach der elektrophoretischen Auftrennung von RNA die Moleküle aus der Gelmatrix eines Trenngels auf eine Trägermembran aus Zellulose oder Nylon übertragen und dort immobilisiert werden. Dabei bleibt das im Gel entstandene Trennmuster der Moleküle erhalten. Deshalb verbindet diese Technik das hohe Auflösungsvermögen der Gelelektrophorese mit der Möglichkeit, aufgetrennte RNA-Moleküle nach Übertragung auf Filter weiter zu analysieren.

Das zu blottende Gel wurde für 20 min bei Raumtemperatur in 10x SSC-Puffer äquilibriert, während eine auf Gelgröße zugeschnittene Nylonmembran (S&S Nytran Membran, Schleicher & Schuell) bzw. eine Nitrocellulosemembran (Schleicher & Schuell) zuerst mit Wasser angefeuchtet und anschließend ebenfalls in 10x SSC-Puffer äquilibriert wurde. Als Blotting-Technik wurde das Nass-Blotting-Verfahren (Kapillar-Transfer) angewandt. Dazu wurde das äquilibrierte Gel auf eine mit 10x SSC-Puffer angefeuchtete 6-fache Papierfilterschicht (Whatmanpapier) gelegt, deren beide Enden in ein Puffereservoir mit 20x SSC-Puffer eintauchten. Direkt auf das Gel wurde die äquilibrierte Nylonmembran gelegt und mit drei Lagen feuchtem Whatmanpapier bedeckt.

Bei dieser Schichtung musste genau darauf geachtet werden, dass alle Luftblasen zwischen Gel, Membran und Whatmanpapier entfernt wurden. Dies geschah durch wiederholtes Überrollen der einzelnen Schichten mit einer sterilen Plastikpipette.

Obenauf folgten nun viele Lagen an trockenem, saugfähigem Filterpapier. Der ganze Aufbau wurde durch ein Gewicht beschwert. Aufgrund von Kapillarkräften wanderte

der Transferpuffer aus dem Puffereservoir langsam durch das Gel hindurch. Dabei wurde die RNA aus dem Gel eluiert und an die Nylonmembran gebunden. Dieser Transfer dauerte ungefähr 18 h.

Anschließend wurde die Blotting-Apparatur abgebaut und die RNA durch Crosslinken (120 mJ, UV Stratalinker 1800, Stratagene) auf der Membran fixiert. Um den Hintergrund bei der folgenden Hybridisierung zu reduzieren, wurde die Membran in 1x SSC mit 0,01 % SDS für 1 h bei 65°C gewaschen.

20x SSC-Puffer	NaCl	3 M
	Tri-Na-Citrat-2'-hydrat	0,3 M
		ad pH 7,0

### 3.5.5.1 Herstellen einer markierten Gensonde

Als Gensonde bezeichnet man jede Art von Nukleinsäuren, mit deren Hilfe man ein gesuchtes Gen oder eine bestimmte Nukleinsäuresequenz im Genom eines Organismus nachweisen kann. Die eingesetzten Sonden müssen dazu in ihrer Basensequenz zu dem gesuchten Gen oder Teilen davon komplementär sein.

Die Markierung der in dieser Arbeit verwendeten Gensonden für die Northern Blot-Analysen erfolgte mit „High Prime“ (Roche). Dabei wird die DNA mit radioaktiven dCTP durch Einsatz von Random-Oligonukleotiden als Primer markiert. Es wurde jeweils 25 ng DNA zur Markierung eingesetzt. Das Kit wurde wie vom Hersteller angegeben eingesetzt. Es wurde jedoch 60 min bei 37°C inkubiert. Um nicht inkorporierte Desoxyribonukleotide zu entfernen, wurde eine Ethanol-Präzipitation durchgeführt. Das heißt, es wurden 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat (pH 5,2) und 2 Volumen 100 %-iges Ethanol mit dem Ansatz vermischt und 20 min bei -70°C gefällt. Danach wurde 10 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, zu dem Pellet 1 ml 70 %-iges Ethanol zugegeben und für weitere 10 min gefügt. Das Pellet wurde getrocknet, in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, für 10 min bei 100°C gekocht und auf die Membran zum Prähybridisierungspuffer pipettiert.

Prähybridisierungspuffer	Formamid deionisiert	50 %
	Denhardts	5x
	SDS	0,5 %
	Heringssperma-DNA	100 µg/ml
	SSPE	5x
100x Denhardts	Ficoll 400	2 %
	Polyvinylpyrrolidon	2 %
	BSA	2 %
20x SSPE	NaCl	3 M
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 M
	EDTA	0,02 M
		pH 7,4

### 3.5.5.2 Northern Blot-Hybridisierung

Die Northern Blot-Technik erlaubt die Identifikation spezifischer RNA-Moleküle aus einem elektrophoretisch aufgetrennten und auf einer Membran fixierten RNA-Gemisches. Dieser Nachweis erfolgt durch Hybridisierung der auf die Membran geblotteten RNA mit einer geeigneten und markierten Gensonde. Die Northern Blot-Hybridisierung erfolgte mit der Sonde, die mit Hilfe von „High Prime“ (Roche) hergestellt wurde. Die Membran wurde jedoch vor der eigentlichen Hybridisierung in Prähybridisierungspuffer bei 42°C für 1-2 h vorinkubiert. Es wurde in derselben Lösung nach Zupipettieren der radioaktiv markierten Gensonde für ca. 18 h bei 42°C hybridisiert. Nach der Hybridisierung erfolgen folgende Waschschriffe:

- 2x in 6x SSC mit 0,1 % SDS bei Raumtemperatur
- 2x in 1x SSC mit 0,1 % SDS bei 37°C
- 2x in 0,1x SSC mit 0,1 % SDS bei 50°C

### **3.5.5.3 Detektion des Northern Blot Signals**

Die Detektion des Northern-Blot-Signals erfolgte über eine Autoradiographie für mehrere Tage mit einem Photofilm (Hyperfilm ECL, Amersham) bei  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Mitochondriales p53 ist resistent gegen dominant-negative Effekte

#### 4.1.1 p53-abhängiger transaktivierungsunabhängiger Zelltod in HCT116-Zellen nach $\alpha$ -Amanitin bzw. $\alpha$ -Amanitin und 5FU

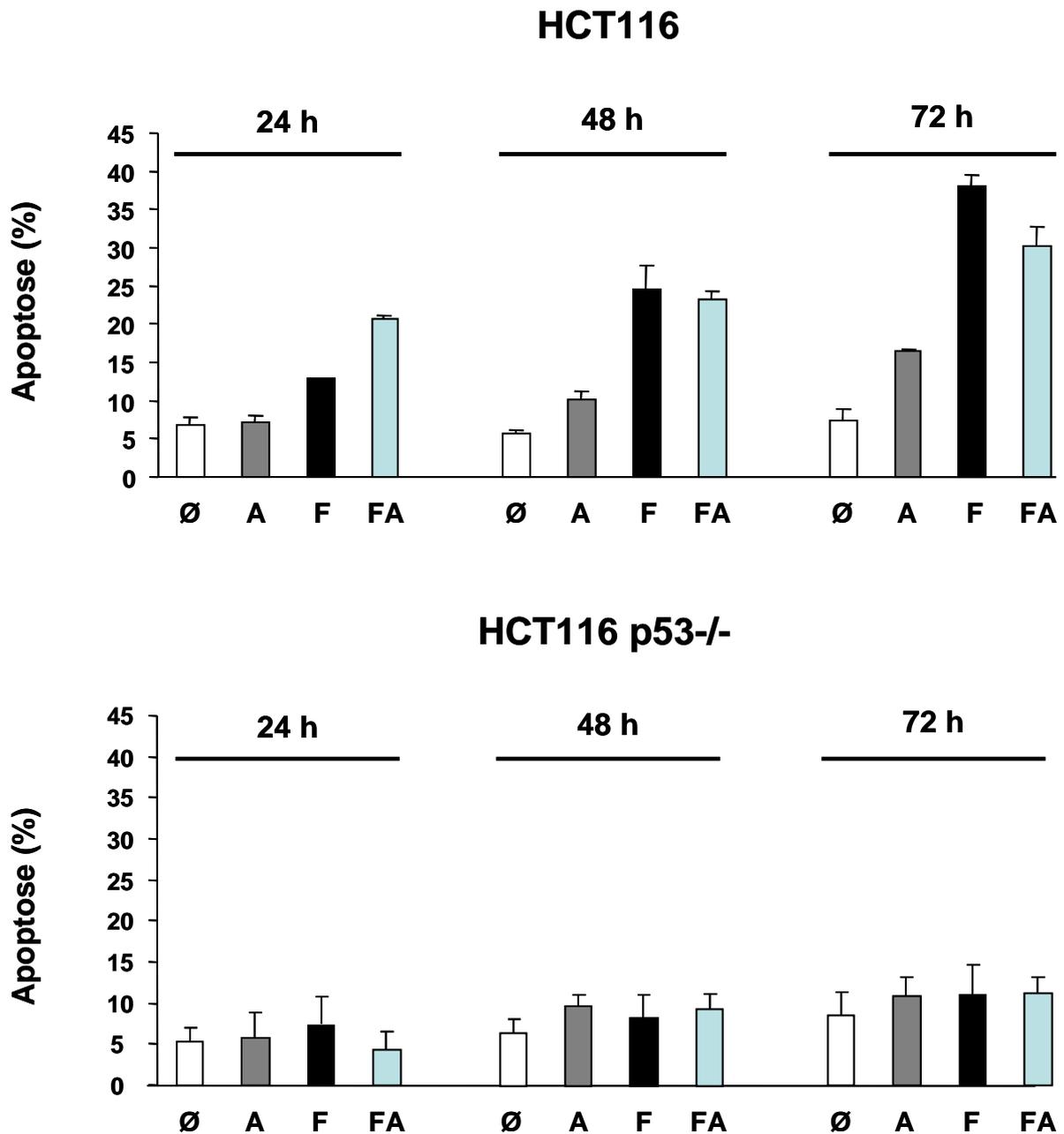
Die folgenden Studien wurden vor allem in HCT116-Zellen durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine wenig differenzierte, Wachstumsfaktor-insensitive humane kolorektale Adeno-Karzinom-Zelllinie. Die Zelllinie zeigt im Phänotyp eine Mikrosatelliten-Instabilität (MIN) als Ergebnis einer Defizienz für hMLH1, dem humanen Homolog des bakteriellen Mut L-Proteins und essentiellen Faktor von DNA-Mismatch-Reparatur. HCT116-Zellen reagieren auf verschiedene Arten von Stress wie zum Beispiel DNA-Schäden oder onkogener Expression. Dies rührt daher, dass die Zelllinie einen funktionalen p53/p21/pRb-Tumorsuppressor-Signalweg besitzt. Der p53-Tumorsuppressor wird durch verschiedene Stress-Stimuli stabilisiert und aktiviert und zeigt die erwarteten Reaktionen der Zellen wie Apoptose und Zellzyklus-Arrest (Bunz *et al.*, 1998; Bunz *et al.*, 1999; Kaeser *et al.*, 2004).

5-Fluorouracil (5FU) stellt die Grundlage der Chemotherapie für Kolon-Karzinome dar. Die Substanz wird in 5-Fluoro-Desoxy-UMP umgewandelt, was die Thymidilat-Synthase inhibiert. Dadurch kommt es zur Depletion des intrazellulären dTTP-Pools. Was aber scheinbar wichtiger für die Apoptose-Induktion zu sein scheint, ist die Tatsache, dass 5FU mit dem RNA-Metabolismus interferiert. 5FU wird in Ribo- und Desoxyribonukleotide metabolisiert, die dann in RNA und DNA inkorporiert werden. Es ist bekannt, dass dieser Stoff in HCT116-Zellen eine Apoptose induziert, die p53-abhängig ist (Bunz *et al.*, 1999).  $\alpha$ -Amanitin ist ein hochgiftiges Reagenz aus dem Grünen Knollenblätterpilz. Es ubiquitinyliert die RNA-Polymerase II, die für die Gentranskription zuständig ist. Dadurch wird die RNA-Polymerase II seiner Degradation zugeführt und somit globale Transkriptions-Inhibition verursacht. Arima und Kollegen konnten 2005 zeigen, dass diese Substanz ebenfalls eine p53-abhängige Apoptose induzieren kann (Arima *et al.*, 2005). Da durch  $\alpha$ -Amanitin eben eine Transkriptionsblockade ausgelöst wird, muß dieser Zelltod auf den p53-

---

Funktionen an den Mitochondrien beruhen und nicht auf der Transaktivierung Apoptose-induzierender Gene.

Wenn exponentiell wachsende HCT116-Zellen mit  $\alpha$ -Amanitin (10  $\mu$ M) behandelt, die DNA der Zellen hinterher mit Propidiumiodid angefärbt und diese anschließend mit dem Durchfluß-Zytometer analysiert wurden, so stieg die Zahl der Zellen mit einem Sub-2n-Gehalt, der die apoptotischen Zellen anzeigt, mit der Zeit (Abbildung 33).



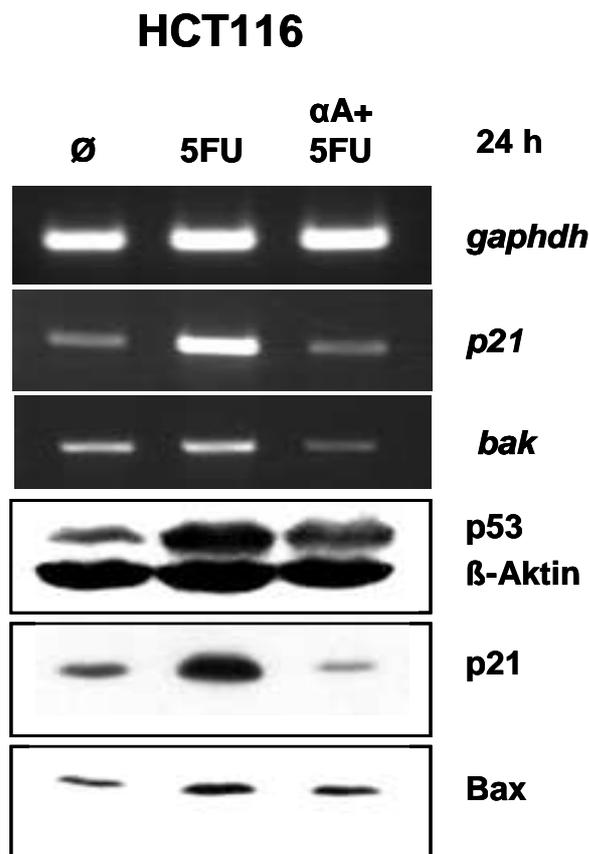
**Abbildung 33: Transaktivierungsunabhängige p53-abhängige Apoptose in HCT116-Zellen.**

Exponentielle wachsende HCT116- und HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen wurden schein-behandelt (Ø) oder  $\alpha$ -Amanitin (10  $\mu$ M, A), 5FU (375  $\mu$ M, F) oder einer Kombination von beiden (FA) ausgesetzt. Zu den angegebenen Zeiten wurde der Anteil der apoptotischen Zellen durch Messung der Zellzahl mit einem Sub-2n-DNA-Gehalt nach PI-Färbung bestimmt.

Dieser Anstieg war jedoch nicht so hoch, wie von anderen Gruppen, die mit demselben Zelltyp gearbeitet haben, beobachtet wurde (Arima *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu deren Daten induzierte 5FU (375  $\mu$ M) eine robuste Apoptose unter ähnlichen Bedingungen. In Übereinstimmung mit vorherigen Daten (Arima *et al.*,

2005; Bunz *et al.*, 1999; Mahyar-Roemer *et al.*, 2004) riefen beide Agentien Apoptose in Abhängigkeit von p53 hervor, da HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen nicht auf diese Art und Weise reagierten. Auch eine Behandlung von 5FU und  $\alpha$ -Amanitin zusammen löste eine robuste, p53-abhängige, aber transaktivierungsunabhängige Apoptose in HCT116-Kulturen aus.

Wie erwartet, blockierte die Zugabe von  $\alpha$ -Amanitin die Stimulation des *p21Waf/Cip1*-, sowie des *bak*-Gens durch p53, die normalerweise in Anwesenheit von 5FU auf RNA-, sowie auf Protein-Ebene beobachtet wird (Abbildung 34).



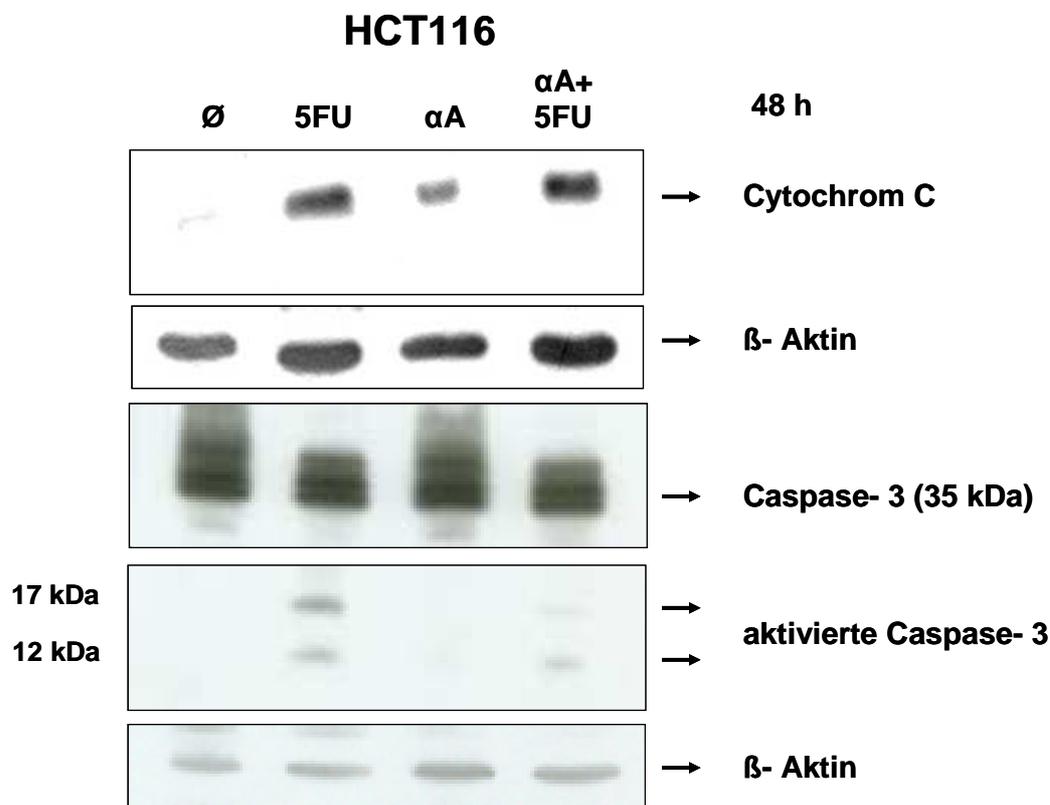
**Abbildung 34: Blockade der Transaktivierung p53-responsiver Gene nach simultaner Behandlung mit 5FU und  $\alpha$ -Amanitin.**

Es wurde RNA aus HCT116-Zellen, die 24 h mit den entsprechenden Substanzen behandelt wurden, isoliert, RT-PCR durchgeführt und die relativen Transkript-Level der p53-responsiven Gene *p21* und *bak*, sowie *gaphdh* als Kontrolle bestimmt. Western Blot-Analysen bestätigten die fehlende Stimulation von p21 unter der Transkriptionsrepression durch  $\alpha$ -Amanitin. p53 wurde mit dem anti-p53-Antikörper DO-1 (Verdünnung 1:2000),  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle mit anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper (1:5000) und p21 mit anti-p21-Antikörper (1:1000) detektiert.

Dies zeigte somit, dass kombinierte Behandlung mit 5FU und  $\alpha$ -Amanitin in HCT116-Zellen in Abwesenheit von RNA-Polymerase II vermittelter transkriptioneller

Transaktivierung einen p53-abhängigen Zelltod triggert, was mit früheren Befunden aus anderen Arbeitsgruppen konsistent war (Arima *et al.*, 2005).

Der induzierte Zelltod war apoptotisch, da er von Cytochrom C-Freisetzung aus dem mitochondrialen Intermembranraum und Caspase-3-Aktivierung begleitet wurde (Abbildung 35).



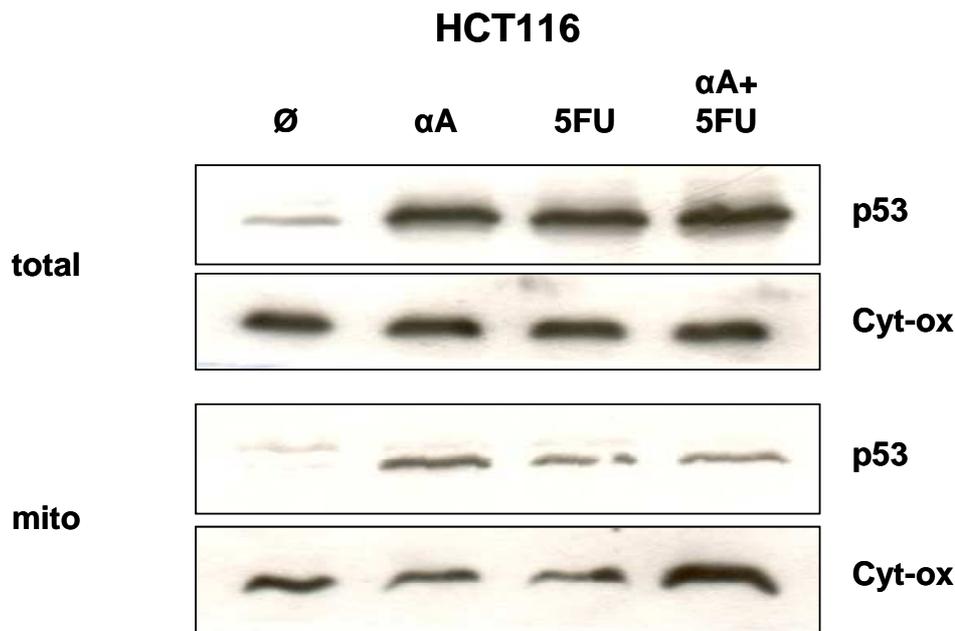
**Abbildung 35: Der durch 5FU und  $\alpha$ -Amanitin induzierte Zelltod ist apoptotisch.**

Apoptose-Induktion in HCT116-Zellen durch 5FU und  $\alpha$ -Amanitin und die Kombination beider Reagenzien wird durch Cytochrom C-Freisetzung aus dem Intermembran-Raum der Mitochondrien und Caspase-Aktivierung vermittelt. 15  $\mu$ g cytoplasmatisches Protein (für Cytochrom C-Freisetzung) bzw. 30  $\mu$ g Gesamtprotein (für Caspase-3-Aktivierung) aus Zellen, die entsprechend 48 h lang behandelt wurden, wurden Western-Blot-Analysen unterzogen. Der anti-Cytochrom C-Antikörper und der anti-Caspase-3-Antikörper, der sowohl die inaktive Pro-Caspase, sowie die aktivierte Caspase detektiert, wurden beide 1:1000 verdünnt.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass  $\alpha$ -Amanitin plus 5-FU in HCT116-Zellen einen p53-abhängigen, aber transaktivierungsunabhängigen Zelltod auslöst.

#### 4.1.2 Anwesenheit von Wildtyp- und mutiertem p53 in der mitochondrialen Fraktion von HCT116-Zellen nach entsprechender Behandlung

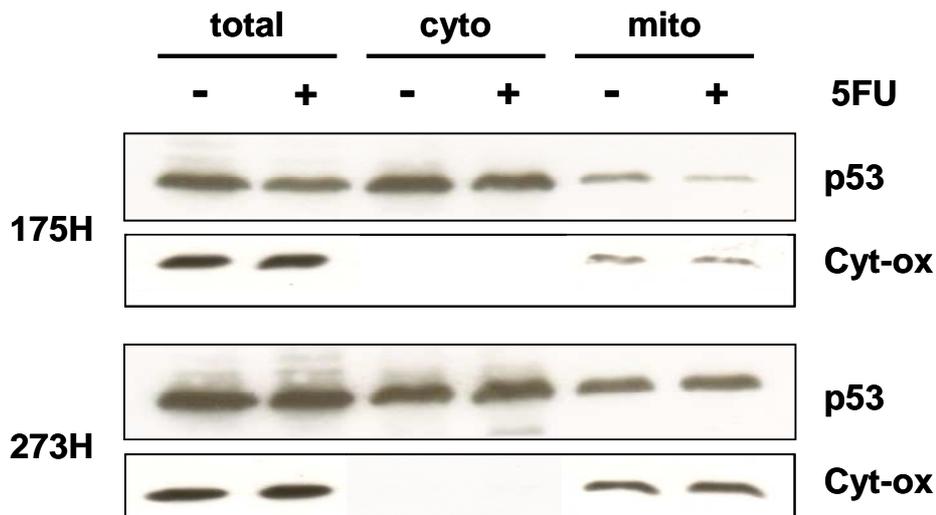
Der Apoptose, die durch 5FU,  $\alpha$ -Amanitin oder der Kombination beider Reagenzien (FA) induziert wurde, ging ein erhöhtes Auftreten von p53 in der mitochondrialen Fraktion voraus, die durch biochemische Fraktionierung gewonnen wurde.



**Abbildung 36: p53 transloziert in HCT116-Zellen nach Behandlung mit 5FU,  $\alpha$ -Amanitin oder 5FU plus  $\alpha$ -Amanitin zu den Mitochondrien.**

HCT116-Zellen wurden für 24 h schein-behandelt ( $\emptyset$ ) oder 10  $\mu$ M  $\alpha$ -Amanitin ( $\alpha$ A), 375  $\mu$ M 5FU bzw. einer Kombination beider Substanzen ( $\alpha$ -A+5FU) ausgesetzt. Die Zellen wurden fraktioniert und 15  $\mu$ g Gesamtprotein (total) bzw. mitochondriales Protein (mito) wurden Western-Blot-Analysen mit anti-p53-Antikörper DO-1 (1:2000) oder anti-Cytochrom-Oxidase IV-Antikörper (Cyt-ox; 1:1000) unterzogen.

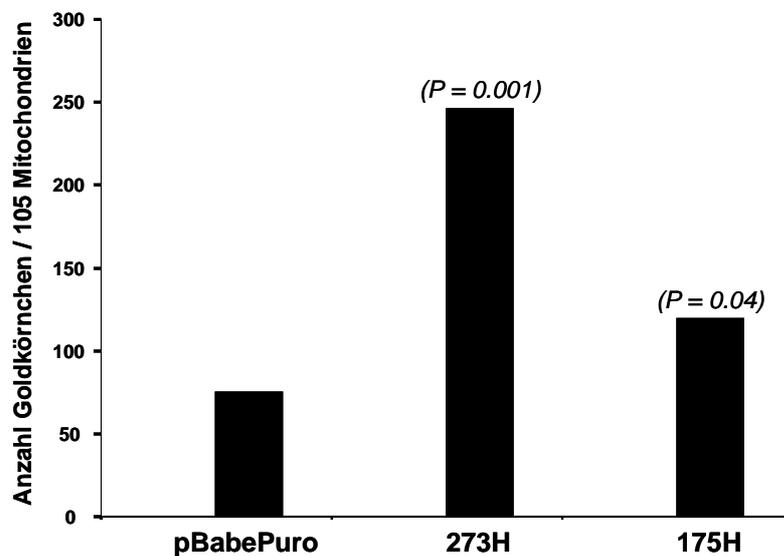
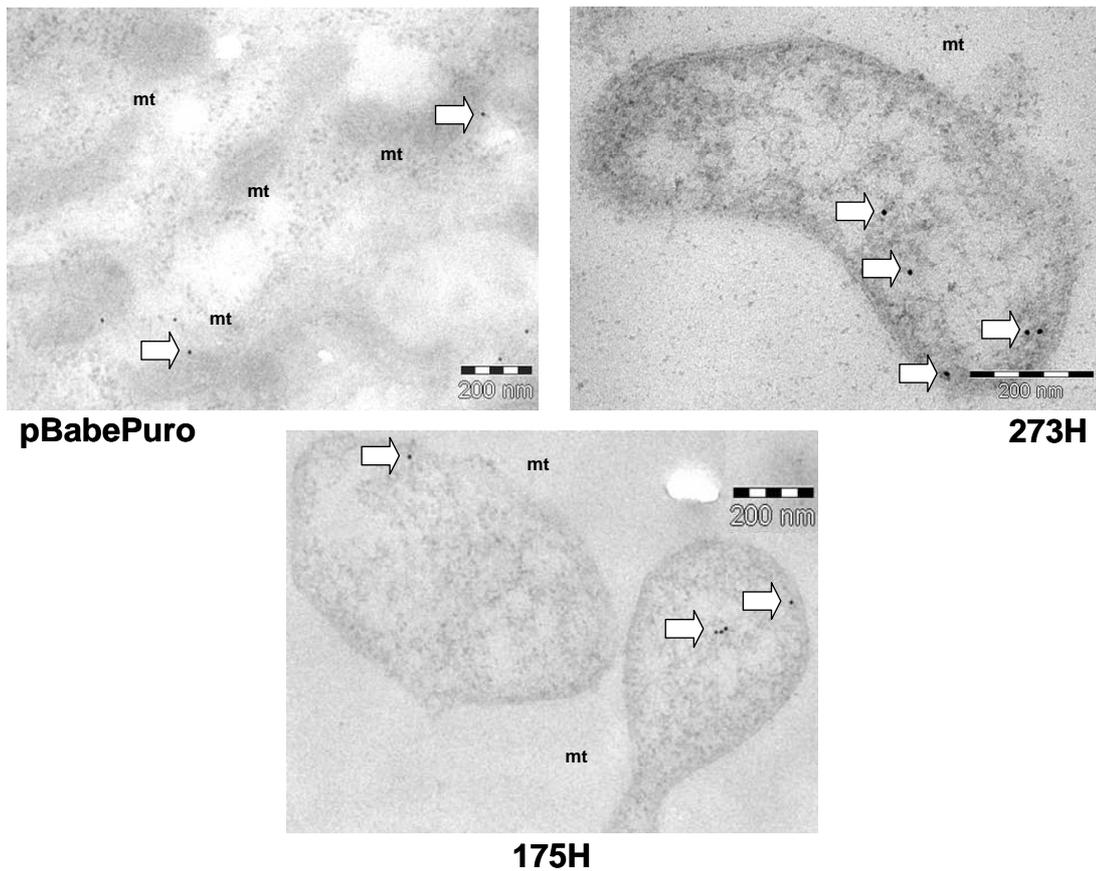
Bemerkenswerterweise und in Übereinstimmung mit vorangegangenen Veröffentlichungen (Marchenko *et al.*, 2000; Mihara *et al.*, 2003) hatten HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen, die retroviral infiziert waren und die p53-Konformationsmutante R175H oder die DNA-Kontakt-Mutante R273H exprimierten, mutiertes p53 in der mitochondrialen Fraktion auch ohne Anwesenheit von Zellstress (Abbildung 37).



**Abbildung 37: Mutiertes p53 ist auch ohne Anwesenheit von Stress in der mitochondrialen Fraktion in HCT116-Zellen.**

HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen wurden mit Retroviren mit einer Infektionsrate von <1 pfu / Zelle bulk-infiziert, um entweder die Vollängen-p53-Mutante R175H oder R273H von einer einzelnen Genkopie pro Zelle zu exprimieren. Die Zellen wurden für 24 h schein-behandelt (-) oder mit 375 µM 5FU und wurden dann fraktioniert und 15 µg im Western Blot analysiert. Total = Gesamtzellextrakt, cyto = Cytoplasma, mito = mitochondriale Fraktion. Die Proteine wurden auch hier mit anti-p53-Antikörper DO-1 und anti-Cytochrom-Oxidase IV-Antikörper detektiert.

Um die Anwesenheit von mutiertem p53 an den Mitochondrien in Abwesenheit von Stress zu bestätigen, wurden nun immun-elektronenmikroskopische Untersuchungen dieser Zelllinien durchgeführt. Die Anzahl der Goldkugeln an den Mitochondrien wurde unter Mitarbeit von Frau Gabi Kiefer (Technische Assistentin der Abteilung Elektronenmikroskopie, Prof. Dr. Mestres) in einer Blind-Studie bestimmt. Abbildung 38 zeigt, dass die Anzahl der Mitochondrien-assoziierten Goldkugeln in p53-exprimierenden Zelllinien verglichen mit der Zelllinie, die nur den Kontroll-Vektor pBabePuro inseriert hatte, signifikant höher war (Chi<sup>2</sup>-Test: P < 0,001 für R273H und P < 0,04 für R175H).

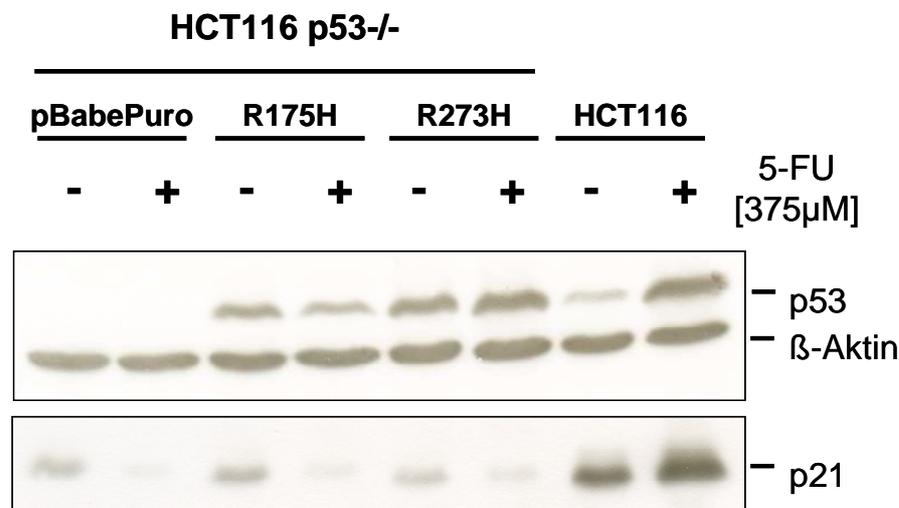


### Abbildung 38: Immunelektronen-Mikroskopie detektiert mutiertes p53 an den Mitochondrien.

HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen, die retroviral infiziert wurden, um den Leervektor pBabePuro, R175H bzw. R273H zu exprimieren, wurden immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen unterzogen. Gold-Kügelchen (10 nM, Pfeile), die die Bindung von anti-p53-Antikörper DO-1 anzeigen, wurden häufiger an Mitochondrien (mt) von Zellen detektiert, die p53 exprimieren, als in Zellen ohne p53. Das Diagramm im unteren Teil der Abbildung zeigt die Anzahl der Goldkügelchen, die in einer Blindstudie erfasst wurden, an 105 ausgewerteten Mitochondrien aus zufällig ausgewählten mikroskopischen Feldern. P-Werte wurden mit dem Chi<sup>2</sup>-Test bestimmt.

Daraus ließ sich also schließen, dass mutierte Formen des p53-Tumorsuppressors in der mitochondrialen Fraktion von HCT116-Zellen, sowie an den Mitochondrien selbst zu finden sind.

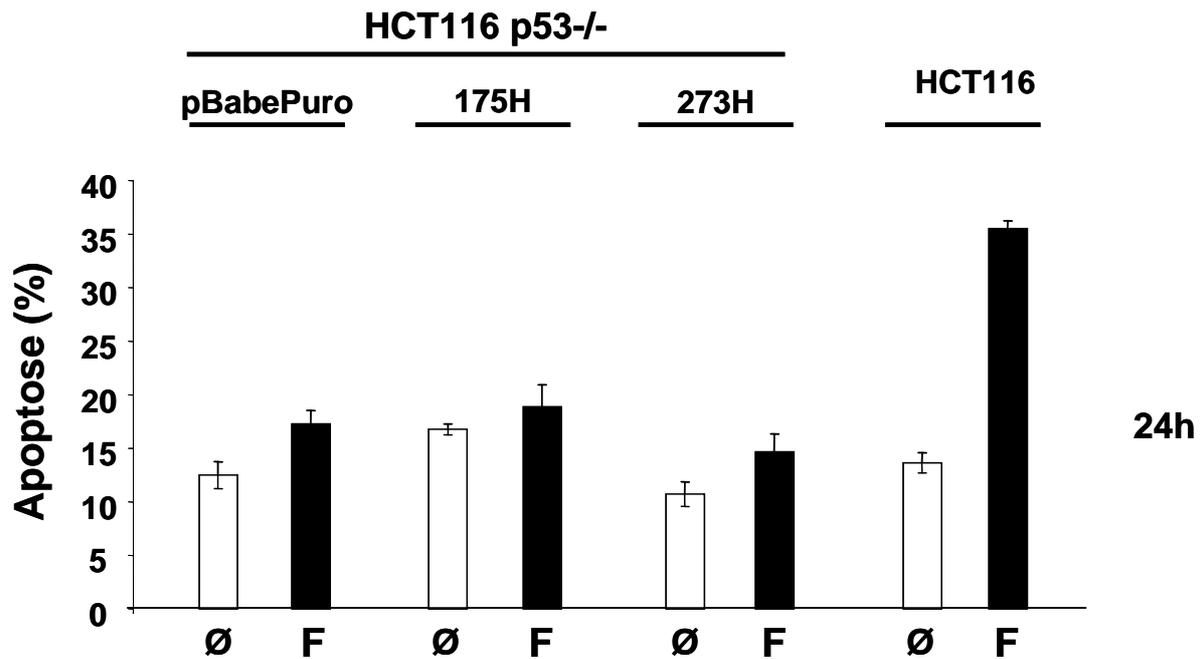
Die p53-Mutanten, die retroviral in die HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen eingebracht wurden, waren nicht durch 24-stündige Behandlung mit 5FU (375 µM) stabilisierbar, ganz im Gegensatz zu Wildtyp-p53 aus der HCT116-Zelllinie. Wie erwartet, wurde auch die Expression des p53-responsiven Zielgens *p21Waf/Cip1* in den Zelllinien mit den p53-Mutanten nicht stimuliert, wohingegen eine deutliche Hochregulierung in der Wildtyp-p53-beinhaltenen HCT116-Zelllinie detektierbar war (Abbildung 39).



**Abbildung 39: Mutiertes p53 ist durch 5FU nicht aktivierbar.**

HCT116 p53<sup>-/-</sup>, die retroviral transduziert wurden, um den Leervektor pBabePuro, bzw. die p53-Mutanten R175H oder R273H zu exprimieren, und HCT116-Zellen, die als Positivkontrolle dienten, wurden 24 h mit 5FU (375 µM) behandelt, anschließend Gesamtproteine isoliert und 15 µg im Western Blot analysiert. p53 wurde mit dem anti-p53-Antikörper DO-1 (Verdünnung 1:2000), β-Aktin als Ladekontrolle mit anti-β-Aktin-Antikörper (1:5000) und p21 mit anti-p21-Antikörper (1:1000) detektiert.

Da die Mutanten weder p53-responsive Gene transaktivieren (siehe p21-Expression in Abbildung 39), noch mit Proteinen der Bcl2-Familie interagieren können (Mihara *et al.*, 2003; Tomita *et al.*, 2006), war außerdem nach 24-stündiger Behandlung mit 5FU (375 µM) in diesen Zellen auch keine verstärkte Apoptose detektierbar, wohingegen in HCT116-Zellen mit Wildtyp-p53 eine robuste Apoptose gezeigt werden konnte (Abbildung 40).



**Abbildung 40: Zellen mit mutiertem p53 durchlaufen nach Behandlung mit 5FU keinen programmierten Zelltod.**

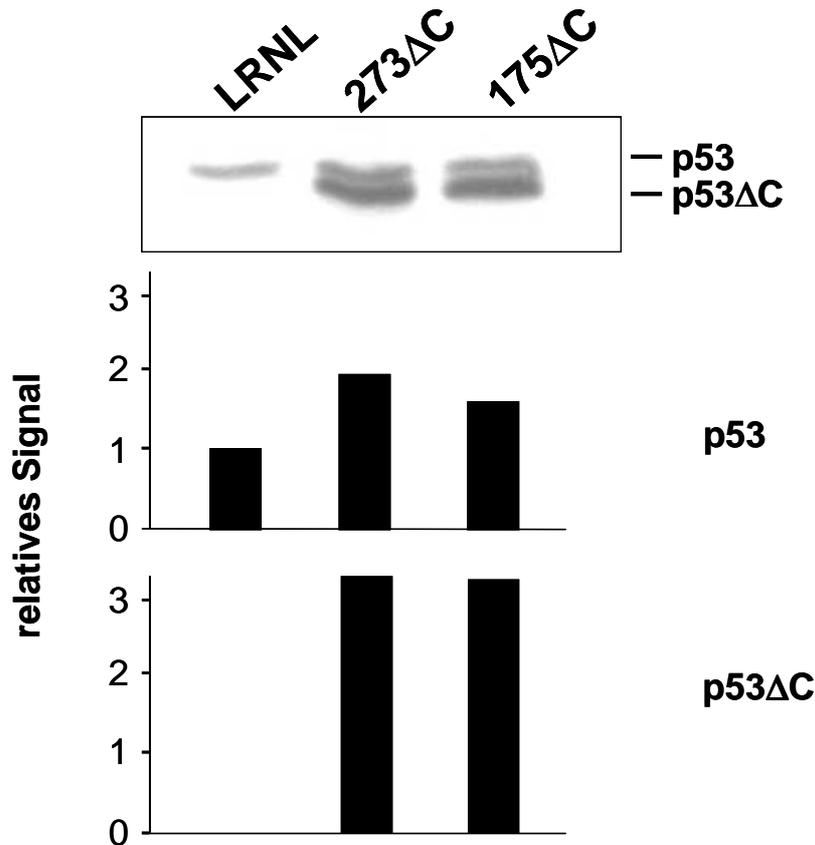
Exponentielle wachsende HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen, die retroviral transduziert wurden, um den Leervektor bzw. die p53-Mutanten R175H oder R273H zu exprimieren, und HCT116-Zellen, die als Positivkontrolle dienten, wurden schein-behandelt (Ø) oder mit 5FU (375 µM, F). 24 h nach Behandlung wurde der Anteil der apoptotischen Zellen durch Messung der Zellzahl mit einem Sub-2n-DNA-Gehalt nach PI-Färbung bestimmt.

Insgesamt zeigte sich also, dass die Mutanten 175H und 273H vollkommen disfunktionell waren.

#### 4.1.3 Expression, mitochondriale Lokalisation und Oligomerisierung von p53-Mutanten

Um dominant-negative Effekte von mutierten Formen des Tumorsuppressors p53 auf die extra-nukleären mitochondrialen Funktionen von endogenem Wildtyp-p53 zu untersuchen, wurde die parentale Wildtyp-p53 exprimierende HCT116-Zelllinie mit retroviralen Vektoren mit einer Infektionsrate von < 1 Kolonie bildenden Einheit pro Zelle infiziert, um entweder kein Transgen (Leervektor), oder die Mutanten 175H bzw. 273H mit einem um 26 AS verkürzten C-Term (175ΔC bzw. 273ΔC) zu exprimieren. Diese trunkierten Proteine wurden eingesetzt, um exogenes mutiertes p53 von endogenem Wildtyp-p53 im Western Blot unterscheiden zu können (Abbildung 41) und um die Proteine in ihrer Fähigkeit zu beeinträchtigen, potentiell

die Resultate beeinflussende „gain-of-function“-Aktivitäten, die oft mit dem C-Term assoziiert sind, auszuüben (Frazier *et al.*, 1998; Lanyi *et al.*, 1998).

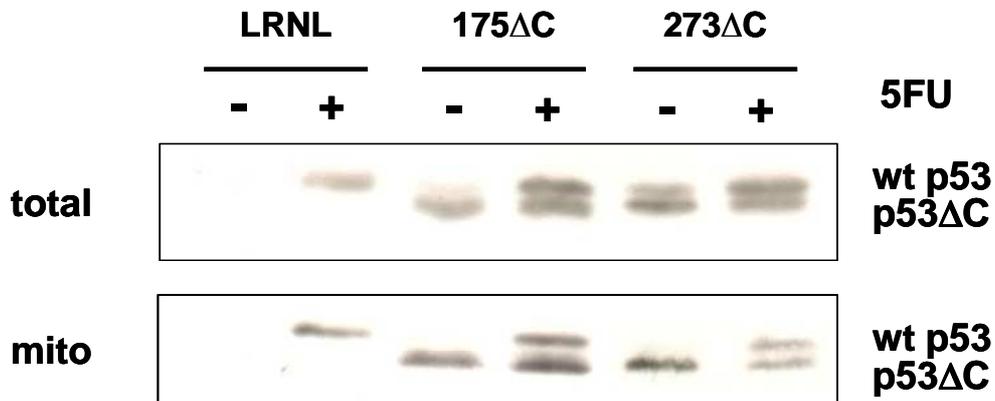


**Abbildung 41: Expression der p53-Mutanten in der parentalen Wildtyp-p53 exprimierenden HCT116-Zelllinie.**

HCT116-Zellen, die endogenes Wildtyp-p53 exprimieren, wurden mit Retroviren infiziert, um entweder den Leervektor (LRNL) oder eine der beiden C-terminal trunkierten 175H- bzw. 273H-Mutanten (175ΔC bzw. 273ΔC) von einer einzelnen Genkopie pro Zelle zu exprimieren. 15 µg Gesamtproteinextrakt wurden Western Blot-Analysen unterzogen und p53 mit dem anti-p53-Antikörper DO-1 (1:2000) detektiert. Das Diagramm zeigt die Intensität der Signale, die von Wildtyp-p53 bzw. den trunkierten mutierten p53-Proteinen produziert werden. Die Intensitäten wurden mit einem Densitometer bestimmt und anhand des Signal von Wildtyp-p53 in den Leervektor infizierten Kontrollzellen willkürlich auf 1 gesetzt.

Alle p53-Proteine (endogenes und exogenes) hatten Arginin im Codon 72, welches das vorwiegende Allel in der kaukasischen Bevölkerung darstellt. Diese p53-Isoform ist diejenige, die am effizientesten zu den Mitochondrien transloziert (Dumont *et al.*, 2003). Im Durchschnitt wurden in diesen bulk-infizierten Kulturen die mutierten p53-Proteine, die von einer einzelnen Genkopie pro Zelle exprimiert wurden, 1,5- bis 2-fach stärker exprimiert als Wildtyp-p53. Die Anwesenheit von mutiertem p53 beeinflusst den Wildtyp-p53-Level kaum (Abbildung 41).

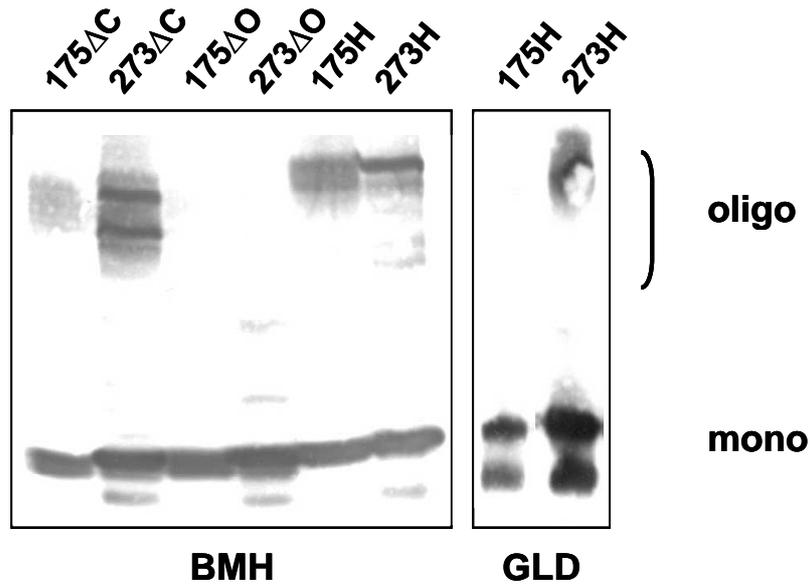
Wie die Vollängen-Mutanten auch waren 175 $\Delta$ C und 273 $\Delta$ C in der mitochondrialen Fraktion von ungestressten Zellen aufzufinden (Abbildung 42, vergleiche mit Abbildung 37). Im Gegensatz dazu translozierte Wildtyp-p53 in diesen mit mutiertem p53 transduzierten Zellen nur nach Einwirkung von 5FU zu den Mitochondrien (Abbildung 42).



**Abbildung 42: Die p53-Mutanten 175 $\Delta$ C und 273 $\Delta$ C sind in der mitochondrialen Fraktion ungestresster Zellen detektierbar.**

Western Blot-Analysen mit anti-p53-Antikörper DO-1 auf 15  $\mu$ g Gesamtproteinextrakt (total) bzw. 15  $\mu$ g mitochondriale Proteine (mito), die durch Zellfraktionierung gewonnen wurden, 24 h nach Schein-Behandlung (-) der drei Zelllinien oder nach Behandlung mit 375  $\mu$ M 5FU (+).

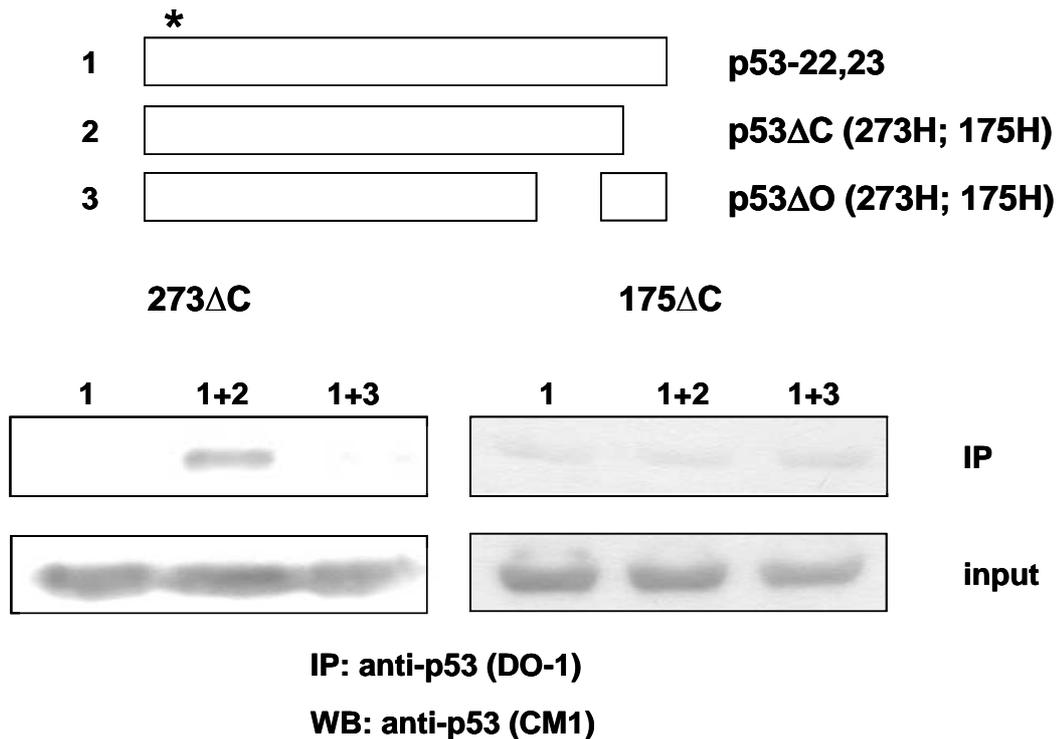
Diese Resultate zeigten also, dass die induzierbare Translokation von Wildtyp-p53 an die Mitochondrien durch die Expression von mutiertem p53 nicht beeinflusst wird. Es stellte sich nun die Frage, ob die Mutanten den Wildtyp durch Heterooligomerisierung beeinflussen können. Die beiden am C-Term verkürzten p53-Mutanten 175 $\Delta$ C und 273 $\Delta$ C waren, genau wie die Vollängen-Mutanten, dazu befähigt eine Homo-Oligomerisierung zu durchlaufen. p53-Mutanten, die eine Deletion in ihrer Oligomerisierungsdomäne haben (175 $\Delta$ O und 273 $\Delta$ O), sind hingegen nicht mehr oligomerisierungs-kompetent. Dies wurde gezeigt durch chemisches Cross-Linking mit *Bis*-Maleimidohexan (BMH), das Sulfhydryl-Gruppen vernetzt, und Glutaraldehyd (GLD), das Aminogruppen vernetzt (Abbildung 43). Interessanterweise zeigten die 175H- und die 175 $\Delta$ C-Mutante konsistent eine schwächere Neigung, in diesem Zelltyp Homo-Oligomere auszubilden, als 273H oder 273 $\Delta$ C. Diese Eigenschaft konnte mit beiden Crosslinkern, sowohl BMH als auch GLD, gezeigt werden.



### Abbildung 43: Oligomerisierung der p53-Mutanten.

Exponentielle wachsende HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen wurden mit der entsprechenden p53-Mutante transient transfiziert. Die  $\Delta O$ -Mutanten tragen eine Deletion in der Oligomerisierungsdomäne. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen einem Crosslink mit entweder Bis-Maleimidohexan (BMH) oder Glutaraldehyd ausgesetzt (GLD). Oligomere wurden mit dem anti-p53-Antikörper DO-1 (1:2000) in 15  $\mu$ g Gesamtproteinextrakt, das unter Standard-SDS-PAGE aufgetrennt wurde, detektiert.

Der Hang der 175H-Mutanten, schwächer zu homo-oligomerisieren, zeigte sich auch in einer Untersuchung zur Hetero-Oligomerisierung. Die Mutanten wurden eingesetzt, um eine Volllängen-p53-Mutante, die eine Mutation im anti-p53-Antikörper DO-1-Epitop trägt, über eine Co-Immunpräzipitation mit diesem Antikörper zu fällen. 273ΔC schien, in HCT116-Zellen stabile Oligomere mit der Volllängen-Mutante zu bilden, so dass die Epitop-defekte Volllängen-Mutante co-präzipitiert werden konnte. Dies war jedoch bei 175ΔC nicht zu beobachten (Abbildung 44).



**Abbildung 44: Heterooligomerisierung zwischen mutiertem p53 und einer Volllängen-p53-Variante mit mutiertem DO-1-Epitop.**

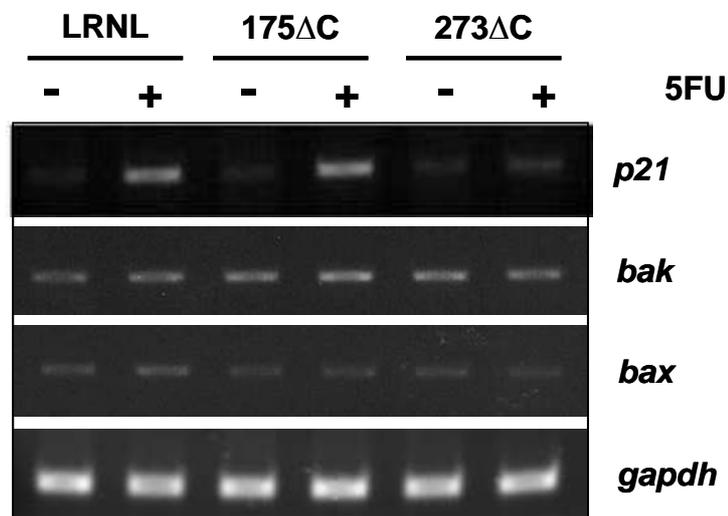
HCT116-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für Konstrukt 1 (p53 22,23\*) plus Leervektor, Konstrukt 1 plus Konstrukt 2 (p53-Mutanten 273H oder 175H mit verkürztem C-Term) oder Konstrukt 1 plus Konstrukt 3 (p53-Mutanten 273H oder 175H mit deletierter Oligomerisierungsdomäne) transient transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Deletionsmutanten mit anti-p53-Antikörper immunpräzipitiert und konnten p53 22,23 über Hetero-Oligomerisierung co-immunpräzipitieren. p53 wurde im Western Blot mit dem polyklonalen p53-Antikörper CM-1 (1:500) detektiert.

Insgesamt zeigten diese Daten demnach, dass die Anwesenheit der Mutanten 175 $\Delta$ C oder 273 $\Delta$ C in annähernd 2-fach erhöhter Menge verglichen mit dem Wildtyp (vergleiche Abbildung 41) nicht mit 5FU-induzierter mitochondrialer Translokation von Wildtyp-p53 interferiert, obwohl zumindest 273 $\Delta$ C mit Wildtyp-p53 effizient zu heterooligomerisieren vermochte.

#### 4.1.4 Dominante Inhibition von Wildtyp-p53 durch die Mutanten 175 $\Delta$ C und 273 $\Delta$ C

Als nächstes fragten wir uns, ob die p53-Mutanten dominant-negativ auf die Transaktivierungsfunktion von Wildtyp-p53 nach 5FU-Behandlung wirken können. Dafür untersuchten wir die Aktivierung p53-responsiver Gene auf RNA-Ebene mittels RT-PCR-Analysen sowie auf Proteinebene.

Die 273 $\Delta$ C-Mutante war in der Lage, in HCT116-Zellen die 5FU-induzierte Stimulation des *p21Waf/Cip1*-Gens abzuschwächen. *Bax*, *bak* und *gapdh* wurden weder von p53 transaktiviert, noch messbar von der p53-Mutante beeinflusst (Abbildung 45).

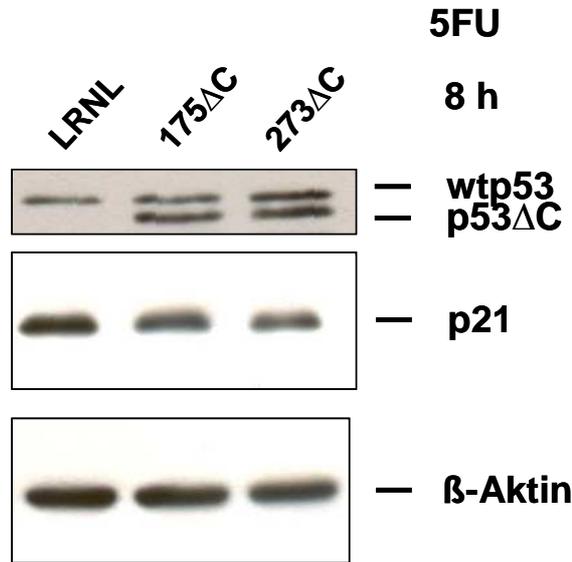


**Abbildung 45: Dominante Inhibition von Wildtyp-p53 durch 273 $\Delta$ C auf RNA-Ebene in HCT116-Zellen.**

RT-PCR-Analysen der drei infizierten Zelllinien, die entweder den Leervektor, 175 $\Delta$ C oder 273 $\Delta$ C exprimierten, nach Schein-Behandlung (-) oder Exposition mit 375  $\mu$ M 5FU (+) für 24 h. Die Expressionslevel des *p21Waf/Cip1*-, des *bak*- und des *bax*-Gens, sowie des *gapdh*-Kontrollgens wurden untersucht.

In Übereinstimmung mit der relativen Inkompetenz der 175 $\Delta$ C-Mutante zur Oligomerisierung (vergleiche Abbildung 43 + Abbildung 44) konnte man in diesem Versuch keine dominant-inhibitorischen Effekte dieser Mutante auf Wildtyp-p53 nachweisen. Dies weist daraufhin, dass eher die Hetero-Oligomerisierung als die Konkurrenz um limitierte Faktoren der primäre Mechanismus der dominanten Inhibition durch 273 $\Delta$ C darstellt. Die Diskrepanz des dominant-negativen Effektes

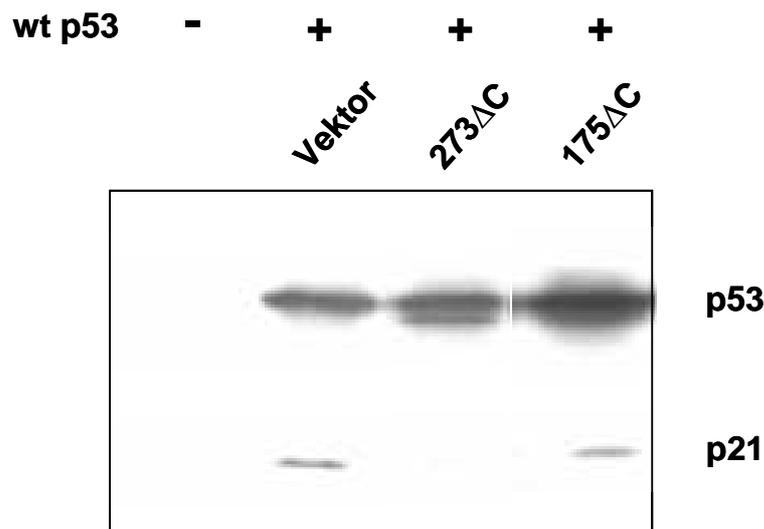
zwischen 273 $\Delta$ C und 175 $\Delta$ C konnte auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abbildung 46).



#### Abbildung 46: Dominante Inhibition von Wildtyp-p53 durch 273 $\Delta$ C auf Proteinebene in HCT116-Zellen

Aus den drei infizierten Zelllinien, die entweder den Leervektor, 175 $\Delta$ C oder 273 $\Delta$ C exprimierten, wurden 8 h nach Exposition mit 375  $\mu$ M 5FU (+) Gesamtproteinextrakte isoliert. 15  $\mu$ g Protein wurden aufgetrennt und die Expressionslevel von p21Waf/Cip1 mit Hilfe des anti-p21-Antikörpers (1:1000) untersucht.

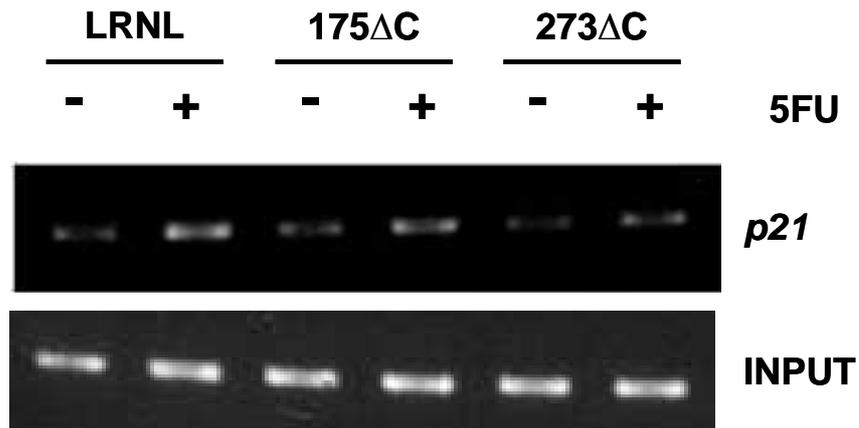
Auch nach transienter Transfektion von p53-Expressionsplasmiden zeigte sich diese Ungleichheit der Dominanz zwischen der DNA-Kontakt-Mutante 273 $\Delta$ C und der Konformationsmutante 175 $\Delta$ C: 273 $\Delta$ C inhibierte endogene p21Waf/Cip1-Proteinexpression, während die 175 $\Delta$ C-Mutante dies nicht vermochte (Abbildung 47).



**Abbildung 47: Dominante Inhibition von Wildtyp-p53 durch 273ΔC auf Proteinebene nach transienter Transfektion.**

Exponentiell wachsende HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen wurden transient transfiziert, um entweder den Leervektor oder Wildtyp-p53 in Kombination mit einer der angezeigten Mutanten zu exprimieren. 24 h nach Transfektion wurden Gesamtprotein-Extrakte isoliert. 15 µg Extrakt wurden Western-Immunoblot-Untersuchungen unterzogen. p53 wurde mit dem anti-p53-Antikörper DO-1 (1:2000) und p21 mit dem anti-p21-Antikörper (1:1000) nachgewiesen.

Um die inhibitorischen Effekte der 273ΔC-Mutante auf die induzierte Expression des *p21Waf/Cip1*-Gens zu bestätigen, wurden Chromatin-Immunpräzipitationen durchgeführt. Übereinstimmend mit einer ineffizienten Promotor-Okkupation durch die gebildeten Hetero-Oligomeren aus Wildtyp- und mutiertem p53, konnte die Promotor-Sequenz des *p21Waf/Cip1*-Gens aus Zellen mit der 273ΔC-Mutante mit einem p53-Antikörper weniger gut präzipitiert werden als aus Zellen, die den Leervektor beinhalten. Außerdem konnten wiederum keinerlei Unterschiede zwischen der Kontroll-Zelllinie und der 175ΔC-exprimierenden Zelllinie gezeigt werden (Abbildung 48).

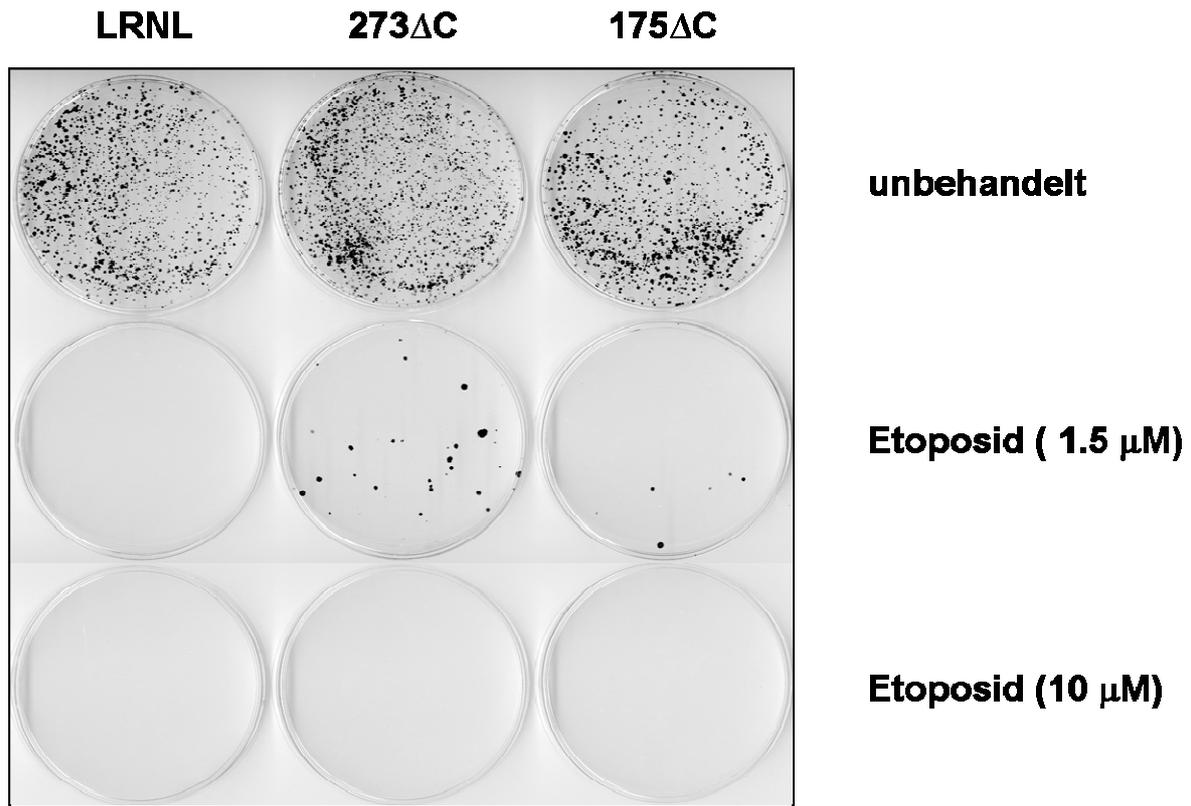


**Abbildung 48: Fehlende p53-Promotor-Okkupation des *p21Waf/Cip1*-Gens in Zellen mit der 273 $\Delta$ C-Mutante nach Einfluss von Zellstress.**

Chromatin-Immünpräzipitations-Analysen der drei infizierten Zelllinien, die entweder den Leervektor, 175 $\Delta$ C oder 273 $\Delta$ C exprimierten. Dargestellt sind die relativen Mengen der *p21*-Promotor-DNA, die sich 24 h nach Scheinbehandlung (-) bzw. Behandlung mit 375  $\mu$ M 5FU (+) durch den anti-p53-Antikörper DO-1 fällen ließen. INPUT zeigt, dass die Gesamtmenge der *p21*-Promotor-DNA in allen Proben gleich war.

Insgesamt zeigten uns diese Resultate also, dass 273 $\Delta$ C durch Hetero-Oligomerisierung die transaktivierende Funktion von Wildtyp-p53 hemmen konnte und entsprechend dominant-negativ wirkte.

Als nächstes fragten wir uns, ob die beobachteten Effekte der 273 $\Delta$ C-Mutante auf die p53-regulierte Transaktivierung auch einen Phänotyp erzeugen. Das Aussäen von 1000 lebenden Zellen der entsprechenden Zelllinie auf 10 cm-Schalen und die Haltung dieser Zellen unter stress-freien Bedingungen resultierte in annähernd gleicher Anzahl von Kolonien. Setzte man die Zellen jedoch unterschiedlichen sub-letalen Konzentrationen der DNA-schädigenden Substanz Etoposid aus, konnten nur Zellen, die mutiertes p53 exprimierten, Kolonien bilden (Abbildung 49). Auch in diesem Versuch verhielt sich die 175 $\Delta$ C-Mutante wieder weniger dominant als die 273 $\Delta$ C-Variante.



**Abbildung 49: p53-Mutanten zeigen auch phänotypisch dominant-inhibitorischen Effekt auf Wildtyp-p53 nach Behandlung der Zellen mit Etoposid.**

Kolonie-Formierungs-Analysen an HCT116-Zellen infiziert mit Leervektor oder Vektoren, die 175 $\Delta$ C bzw. 273 $\Delta$ C exprimieren. 1000 lebende Zellen wurden auf 10 cm-Schalen ausgesät und scheinbehandelt bzw. mit 10  $\mu$ M und 0,5  $\mu$ M Etoposid. Nach 10 Tagen in Kultur wurden die Kolonien fixiert und mit Kristallviolett gefärbt.

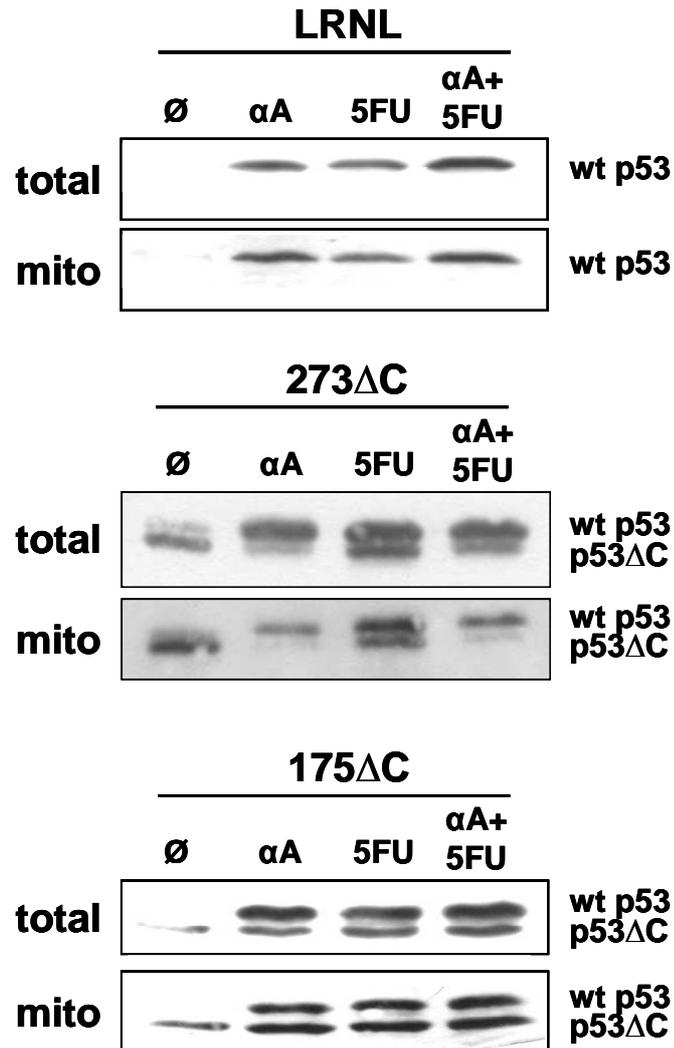
Etoposid wurde als Stressor ausgesucht, weil es in HCT116-Zellen primär Zellzyklus-Arrest induziert, wohingegen 5FU in diesem Zelltyp im wesentlichen Apoptose auslöst (Bunz *et al.*, 1999; Mahyar-Roemer and Roemer *et al.*, 2001).

Insgesamt indizierten die Daten demnach, dass die p53-Mutante 273 $\Delta$ C, die von einer einzelnen Genkopie exprimiert wurde und durchschnittlich annähernd 1,5-mal so stark produziert wurde wie endogenes Wildtyp-p53, in HCT116-Zellen dominant-inhibitorisch auf die Transaktivierung von p53-regulierten Genen und die Unterdrückung der Kolonie-Bildung durch Wildtyp-p53 wirken konnte. Die 175 $\Delta$ C-Mutante schien in diesen Untersuchungen aufgrund ihrer reduzierten Fähigkeit zur Oligomerisierung den dominant-negativen Effekt auf Wildtyp-p53 betreffend, beeinträchtigt zu sein.

#### **4.1.5 Mitochondriale Lokalisation von p53 und Apoptose in mit mutiertem p53 infizierten HCT116-Zellen**

Nun wollten wir untersuchen, ob die p53-Mutanten, die retroviral in die HCT116-Zellen mit endogenem Wildtyp-p53 eingebracht worden waren, auch dominant-inhibitorisch auf die p53-abhängige mitochondriale Apoptose wirkt, die unabhängig von der Transaktivierungsfähigkeit von Wildtyp-p53 ist. Dafür behandelten wir, wie in den ersten Versuchen, die drei verschiedenen Zelllinien, die entweder den Leervektor LRNL, die Konformationsmutante 175H oder die DNA-Kontaktmutante 273H (beide C-terminal trunziert: 175 $\Delta$ C bzw. 273 $\Delta$ C) zusätzlich zu endogenem Wildtyp-p53 exprimieren, mit 5FU,  $\alpha$ -Amanitin und mit einer Kombination aus 5FU und  $\alpha$ -Amanitin und sahen uns zunächst die Lokalisation von p53 und nachfolgend die Apoptose zu verschiedenen Zeitpunkten an.

Wie bei den parental HCT116-Zellen (Abbildung 36) resultierte die Behandlung der Zelllinien HCT116 LRNL (Leervektorkontrolle), HCT116 175 $\Delta$ C und HCT116 273 $\Delta$ C mit  $\alpha$ -Amanitin, 5FU oder beiden zusammen (FA) in einer Akkumulation von endogenem Wildtyp-p53 in der mitochondrialen Fraktion, während die mutierte Form des p53-Tumorsuppressors auch ohne Einwirkung von Zellstress bereits an den Mitochondrien vorzufinden war (Abbildung 50).



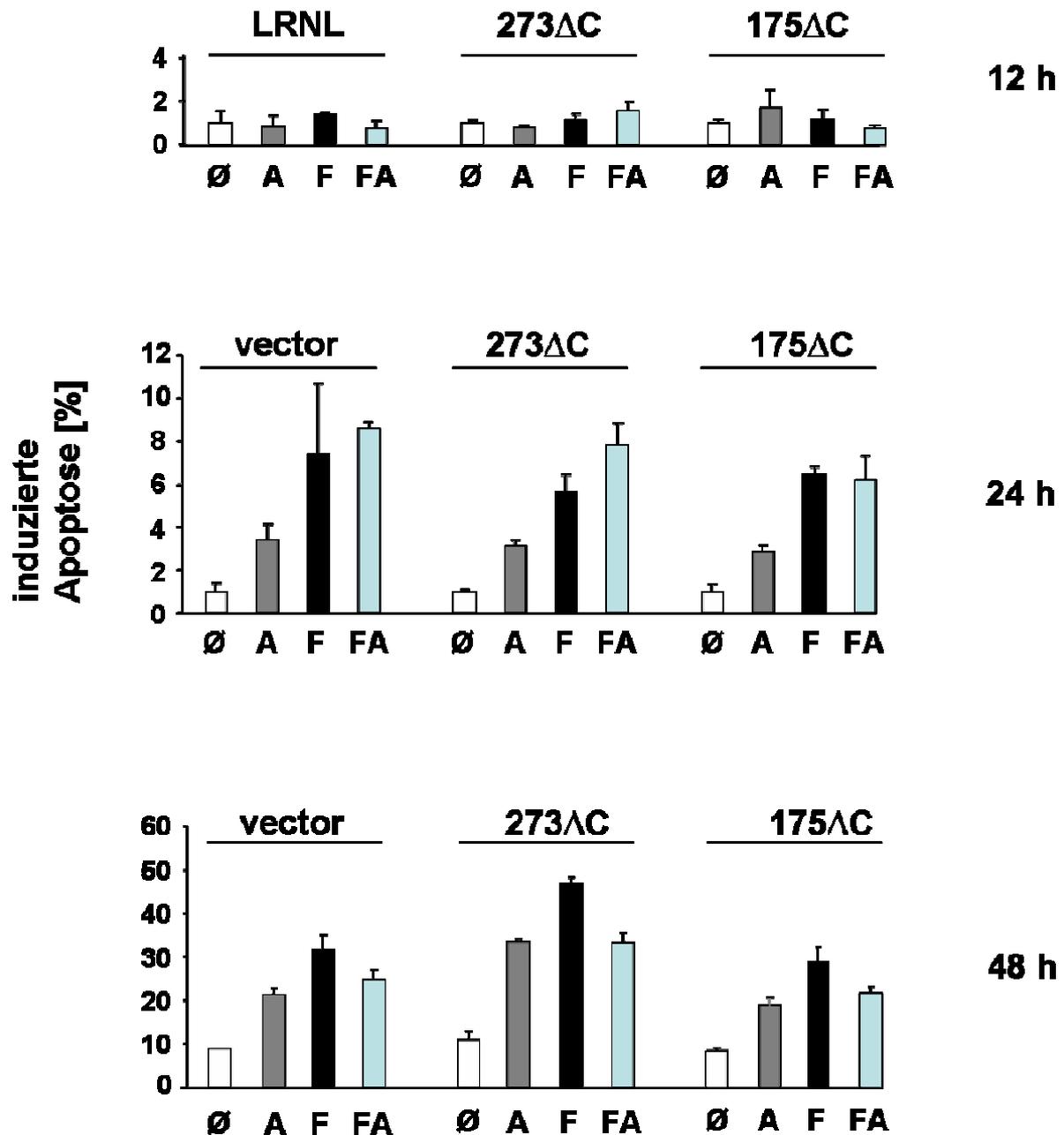
**Abbildung 50:** Akkumulation von endogenem Wildtyp-p53 in der mitochondrialen Fraktion nach Behandlung mit 5FU,  $\alpha$ -Amanitin und einer Kombination beider Substanzen in HCT116 LRNL, 175 $\Delta$ C und 273 $\Delta$ C.

Western Blots auf 15  $\mu$ g Gesamtprotein (total) oder mitochondriale Proteine (mito), die 24 h nach Schein-Behandlung ( $\emptyset$ ) oder Exposition mit  $\alpha$ -Amanitin (10  $\mu$ M;  $\alpha$ -A), 5FU (375  $\mu$ M) oder einer Kombination von beiden ( $\alpha$ -A + 5FU) aus den indizierten Zelllinien gewonnen wurden. p53 wurde mit anti-p53-Antikörper DO-1 (1:2000) detektiert. p53 $\Delta$ C: eine der angezeigten Formen der C-terminal verkürzten Variante von mutiertem p53.

Als nächstes quantifizierten wir die Apoptoserate in den drei Zelllinien auf zwei verschiedene Weisen. Der Zelltod, der durch  $\alpha$ -Amanitin, 5FU oder FA innerhalb von 12 und 24 h induziert wurde (frühe Apoptose), wurde durch Messung der Bindung von PE-konjugiertem Annexin V an Phosphatidyl-Serin mittels des Durchflusszytometers an nicht-fixierten Zellen nachgewiesen. Nekrotische Zellen

---

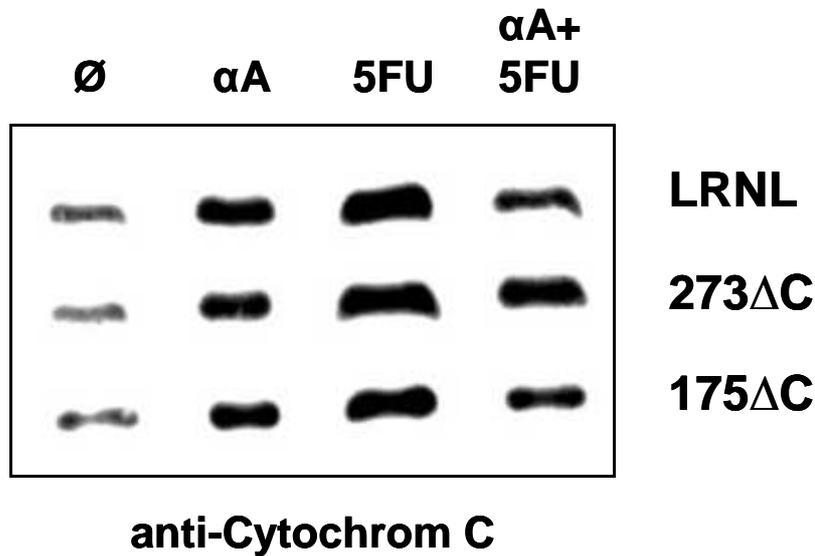
wurden über eine Gegenfärbung mit Propidiumiodid ausgeschlossen. Nachfolgend quantifizierten wir die DNA-Fragmentierung nach 48 h über Bestimmung der Anzahl der Zellen mit einem Sub-2n-DNA-Gehalt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 51 zusammengefasst. Keiner der Stoffe konnte innerhalb von 12 h eine signifikante Apoptose induzieren. Nach 24 und 48 h jedoch war in den behandelten Kulturen eine klare Apoptose detektierbar.



**Abbildung 51: Apoptose in HCT116 LRNL, 175ΔC und 273ΔC 12, 24 und 48 h nach Behandlung mit α-Amanitin, 5FU und einer Kombination beider Reagenzien.**

Anteil der apoptotischen Zellen in Kulturen der angezeigten Zelllinien, die durchflusszytometrisch gemessen wurde. Die Zellen wurden entweder schein-behandelt (∅) oder mit α-Amanitin (10 μM, A), 5FU (375 μM, F) oder beiden zusammen (FA). Apoptose nach 12 und 24 h (frühe Apoptose) wurde durch Messung der Annexin V-Bindung bestimmt. Späte Apoptose (nach 48 h) wurde durch Messung des Sub-2n-DNA-Gehaltes bestimmt.

Diese Apoptose wurde begleitet von einem charakteristischen Anstieg des Cytochrom C-Levels in der cytoplasmatischen Fraktion in allen drei Zelllinien (Abbildung 52).



**Abbildung 52: Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien nach Behandlung mit  $\alpha$ -Amanitin, 5FU und einer Kombination von beiden.**

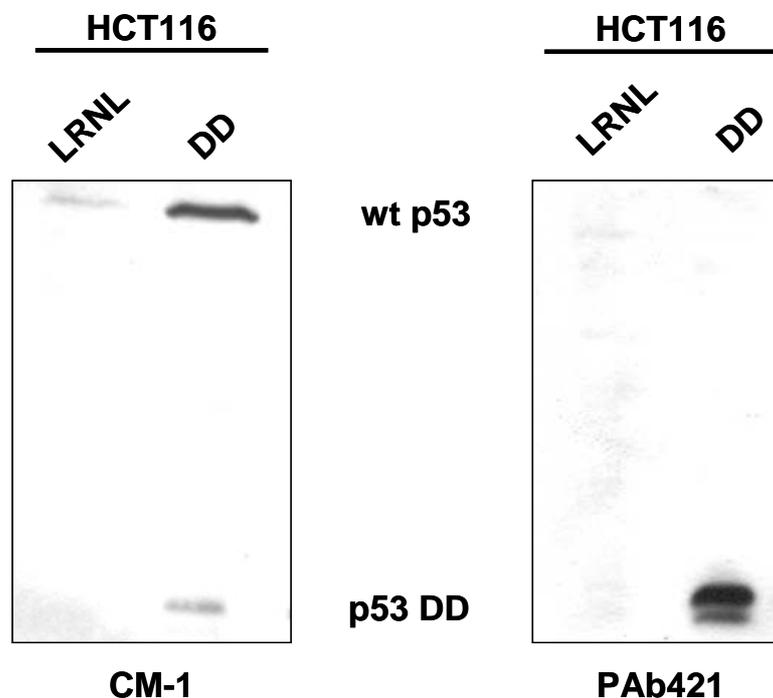
Western Blot-Analyse auf die cytoplasmatische Fraktion der indizierten Zelllinien 48 h nach Schein-Behandlung oder Behandlung mit  $\alpha$ -Amanitin (10  $\mu$ M,  $\alpha$ A), 5FU (375  $\mu$ M) und einer Kombination von beiden. Cytoplasmatische Akkumulation von Cytochrom C als ein Merkmal der Apoptose wurde sichtbar nach Färbung des Blots mit anti-Cytochrom C-Antikörper (1:1000). LRNL = Leervektor-Kontrolle; 273 $\Delta$ C: HCT116-Zellen infiziert mit retroviralem Vektor, der R273H-Mutante mit trunkiertem C-Terminus exprimiert; 175 $\Delta$ C: HCT116-Zellen infiziert mit retroviralem Vektor, der R175H-Mutante mit deletiertem C-Terminus exprimiert.

Bemerkenswerterweise zeigte sich also, dass weder in den Kulturen, die mit 5FU alleine behandelt wurden (d.h. p53 an den Mitochondrien und intakte Transkription), noch in Kulturen, die mit 5FU und  $\alpha$ -Amanitin zusammen behandelt wurden (p53 an den Mitochondrien und blockierte Transkription), ein dominant-inhibitorischer Effekt der Mutanten detektierbar war.

Dies wies erstmals darauf hin, dass im Gegensatz zu der Transaktivierung die mitochondrialen Funktionen von p53 resistent gegenüber dominanter Inhibition sind.

#### 4.1.6 Dominant-inhibitorische Effekte von p53 DD auf die Transkription, aber nicht auf mitochondriale Apoptose

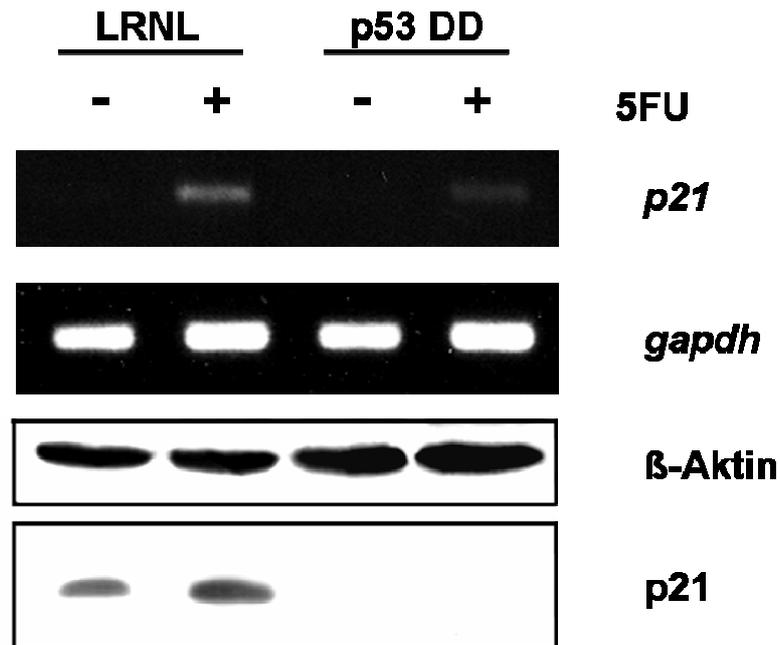
Die Inhibition der p53-kontrollierten Transkription durch eine 1,5-fach erhöhte Expression der 273 $\Delta$ C-Mutante war subtil (vergleiche Abbildung 45 + Abbildung 48). Um zu untermauern, dass die dominante Inhibition die extra-nukleäre Apoptose, die durch p53 induziert wurde, ausspart, haben wir uns nun des artifiziellen p53-Miniproteins p53 DD bedient. Es besteht aus der Oligomerisierungsdomäne und aus einem kleinen Teil des N-Terminus (AS 1-14 und 302-390) von murinem p53 (Shaulian *et al.*, 1992) (siehe Abbildung 8). Es konnte gezeigt werden, dass p53 DD in Zellen von menschlicher und muriner Herkunft stark dominant-inhibitorisch wirken kann (siehe 1.6.3) (zum Beispiel Cui *et al.*, 2007; Gottlieb *et al.*, 1994; Sheard *et al.*, 2003). Im Zuge der Diplomarbeit von Herrn cand. biol. Daniel Müller, die von mir mitbetreut wurde, generierten wir über retrovirale „bulk“-Infektion HCT116-Zelllinien, die eine einzelne Kopie des *p53 DD*-Gens enthielten, und testeten sie auf dominante Inhibition und Apoptose. Abbildung 53 zeigt, dass p53 DD exprimiert wird und Stabilisierung von endogenem p53 induzieren kann.



**Abbildung 53: Expression von p53 DD im Hintergrund von Wildtyp-p53**

Western Immunoblot-Analysen auf 30  $\mu$ g Gesamtproteinextrakt von HCT116-Zellen, die p53 DD exprimieren. Der Blot auf der rechten Seite wurde mit CM-1 (1:500) angefärbt und somit konnte deutlich die Expression von endogenem p53 und p53 DD-Expression schwach gezeigt werden. Der rechte Blot wurde mit PAb421 (1:200) inkubiert, wodurch die Expression von p53 DD deutlicher wurde.

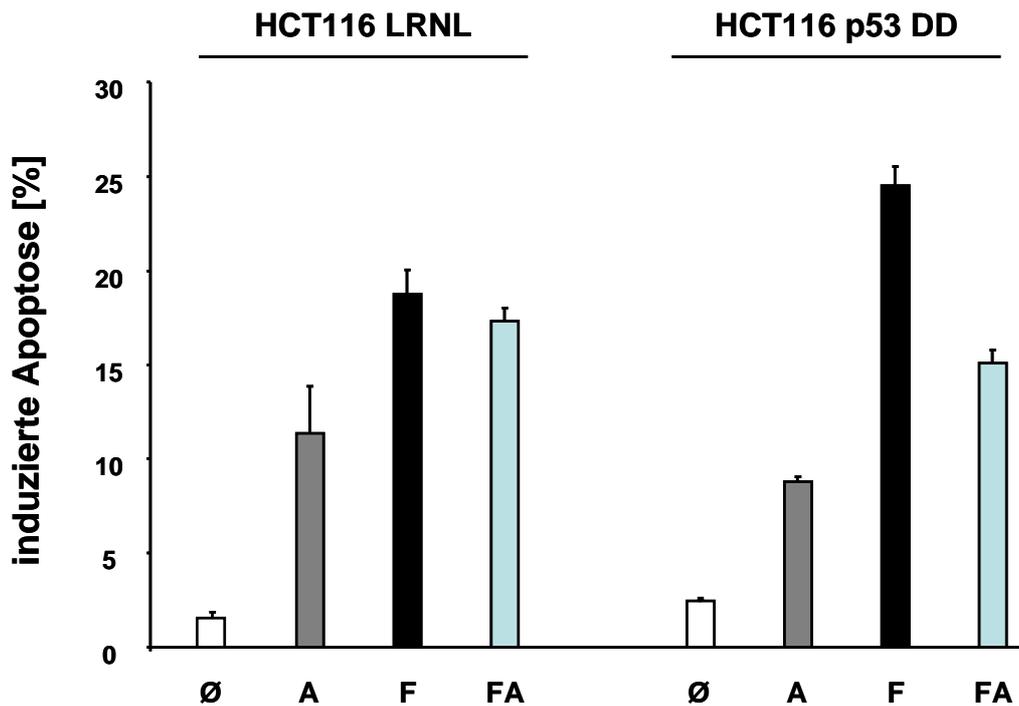
Danach wollten wir untersuchen, welche Auswirkungen die Expression von p53 DD auf die Transkriptionslevel des *p21Waf/Cip1*-Gens nach Einwirkung von Zellstress hat. In Abbildung 54 sieht man auf RNA- und Proteinebene, dass die stress-induzierte Transaktivierung von p21 in HCT116 p53 DD-Zellen beeinträchtigt war, was mit der dominanten Inhibition in früheren Arbeiten übereinstimmte (Cui *et al.*, 2007; Gottlieb *et al.*, 1994; Sheard *et al.*, 2003).



**Abbildung 54: Dominant-negativer Effekt von p53 DD auf Wildtyp-p53 in HCT116-Zellen 24 h nach Behandlung mit 5FU.**

Es wurde RNA aus HCT116-Zellen, die retroviral infiziert wurden, um entweder den Leervektor oder die artifizielle p53-Variante p53 DD zu exprimieren, und für 24 h scheinbehandelt (-) bzw. mit 5FU (375  $\mu$ M) behandelt wurden, isoliert und RT-PCR durchgeführt und die relativen Transkript-Level der p53-responsiven Gens *p21Waf/Cip1*, sowie *gapdh* als Kontrolle bestimmt. Western Blot-Analysen bestätigten die fehlende Stimulation von p21 bei Expression von p53 DD.  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle wurde mit anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper (1:5000) und p21 mit anti-p21-Antikörper (1:1000) detektiert.

Dennoch vermochte p53 DD, wie die 273 $\Delta$ C-Mutante, die transaktivierungsunabhängige Apoptose in diesen Zellen nicht zu inhibieren (Abbildung 55).



**Abbildung 55: Apoptose in HCT116 LRNL und HCT116 p53 DD 48 h nach Behandlung mit  $\alpha$ -Amanitin, 5FU und einer Kombination von beiden.**

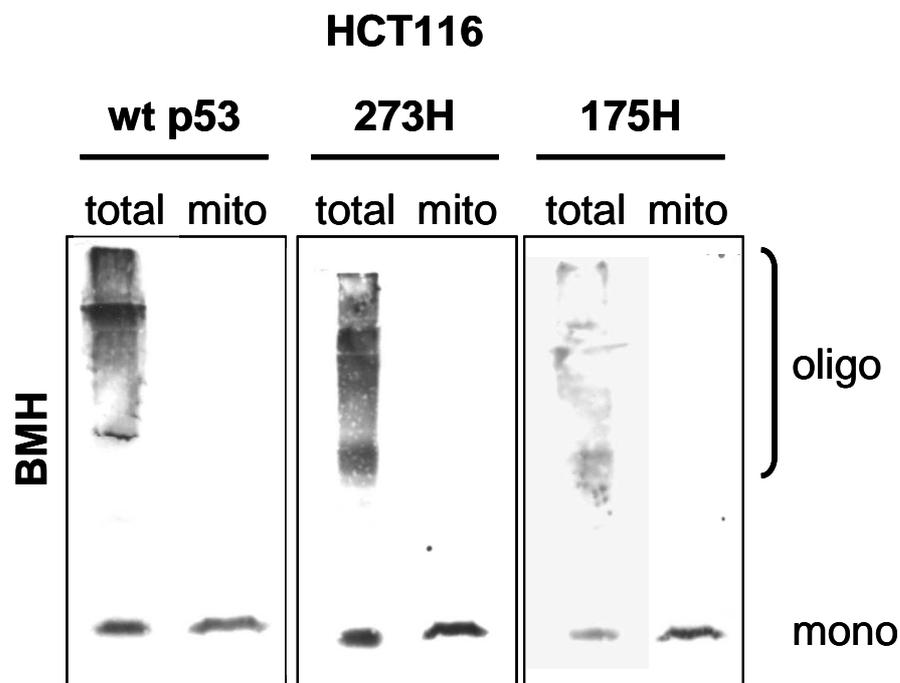
Anteil der apoptotischen Zellen in Kulturen der angezeigten Zelllinien, die durchflusszytometrisch gemessen wurde. Die Zellen wurden entweder schein-behandelt ( $\emptyset$ ) oder mit  $\alpha$ -Amanitin (10  $\mu$ M, A), 5FU (375  $\mu$ M, F) bzw. beiden zusammen (FA). Die Apoptose wurde durch Messung des Sub-2n-DNA-Gehaltes nach PI-Färbung bestimmt.

Diese Daten untermauerten und bestätigten deshalb, dass die mitochondrialen Apoptose-Funktionen von p53 in HCT116-Zellen gegen dominante Inhibition relativ resistent sind.

#### 4.1.7 p53-Monomere und –Oligomere in der Zelle und an den Mitochondrien

Eine mögliche Erklärung für die Beeinträchtigung von mutiertem p53, mit Wildtyp-p53 an den Mitochondrien zu interferieren, wäre, dass p53-Mutanten mitochondriale p53-Oligomere nicht über Hetero-Oligomerisierung kontaminieren können, weil zum Beispiel der Mechanismus, über den Wildtyp-p53 nach Einwirkung von Zellstress zu den Mitochondrien transloziert wird, für Wildtyp-p53-Tetramere selektiv ist. Da es nicht gelang, mutiertes p53 mit Wildtyp-p53 aus der mitochondrialen Fraktion co-immunopräzipitieren, haben wir uns entschieden, den Oligomerisierungsstatus von

p53 an den Mitochondrien mittels Cross-Linking zu untersuchen. In Übereinstimmung mit vorherigen Untersuchungen (Jiang *et al.*, 2006) konnte die Anwesenheit von Bax-Oligomeren nach einem apoptotischen Stimulus im Gesamtzellextrakt sowie in der mitochondrialen Fraktion nach chemischen Crosslinking mit BMH und nachfolgender Immunoblot-Analyse klar gezeigt werden (cand. Dr. med. vet. Katrin Schmitt und Kristina Heyne; Dissertation von Katrin Schmitt). Dies zeigte, dass wir mittels dieser Methode prinzipiell Oligomere in der mitochondrialen Fraktion detektieren können. Ebenso waren wir nun in der Lage, mit Hilfe dieser Prozedur p53-Oligomere in der Gesamtzellfraktion von HCT116-Zellen, die entweder Wildtyp-p53, die Mutante p53 273H oder die p53-Mutante 175H exprimieren, zu detektieren. Erstaunlicherweise waren jedoch in der mitochondrialen Fraktion keine Oligomere nachweisbar (Abbildung 56).

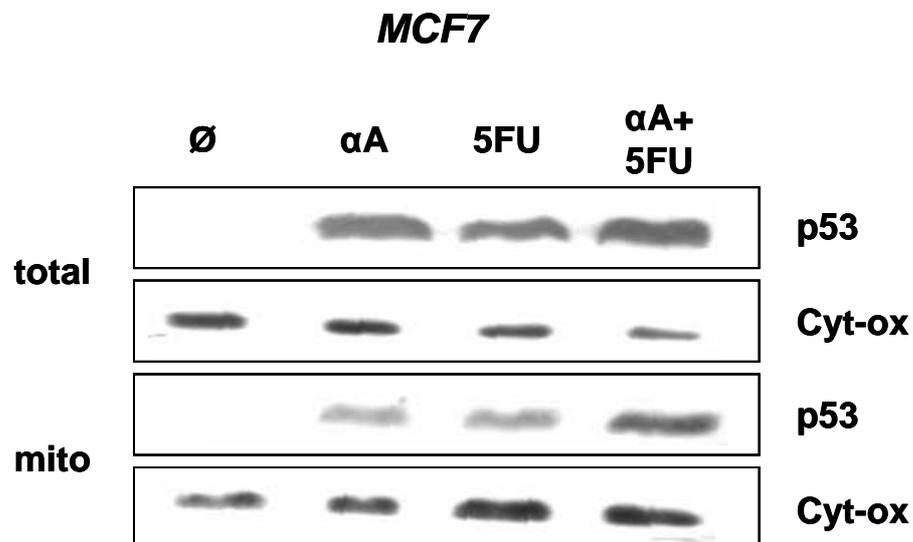


**Abbildung 56: Untersuchungen zur Oligomerisierung von Wildtyp-p53, 273H und 175H in HCT116-Zellen.**

Analoge Untersuchung des p53-Oligomerisierungsstatus in den angezeigten Zelllinien nach 24-stündiger Behandlung mit 5FU (375µM). BMH: *Bis*-Maleimidohexan; total: Gesamtzellfraktion; mito: mitochondrialer Extrakt; oligo: Oligomere; mono: Monomere. Oligomere wurden im Standard-SDS-PAGE mit dem anti-p53-Antikörper DO-1 (1:2000) nachgewiesen. Wtp53: HCT116-Zellen mit endogenem Wildtyp-p53; 273H und 175H: HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen, die mit je einem der beiden retroviralen Vektoren, der entweder 273H oder 175H exprimiert, infiziert wurden.

BMH vernetzt Sulfhydryl-Gruppen, während Glutaraldehyd (GLD) Aminogruppen miteinander verbindet. Um die Abwesenheit von detektierbaren p53-Oligomeren in der mitochondrialen Fraktion zu bestätigen, wurde eine ähnliche Studie mit GLD durchgeführt. Wieder konnten wir zeigen, dass GLD p53 in der Gesamtzellfraktion zu vernetzen vermochte, wohingegen auch mit diesem Cross-Linker die p53-Oligomere in der mitochondrialen Fraktion ausblieben (Dissertation von Katrin Schmitt).

Um zu untersuchen, ob dies ein Zelltyp-spezifischer Effekt und nur auf HCT116-Zellen limitiert ist, wurde von uns darüber hinaus auch der Oligomerisierungsstatus von p53 in der mitochondrialen Fraktion von MCF7-Zellen untersucht. MCF7-Zellen sind humane Brust-Adenokarzinom-Zellen mit einem intakten p53-Signalweg. Das Chemotherapeutikum 5FU war auch in diesen Zellen befähigt, eine mitochondriale p53-Translokation zu induzieren (Abbildung 57).



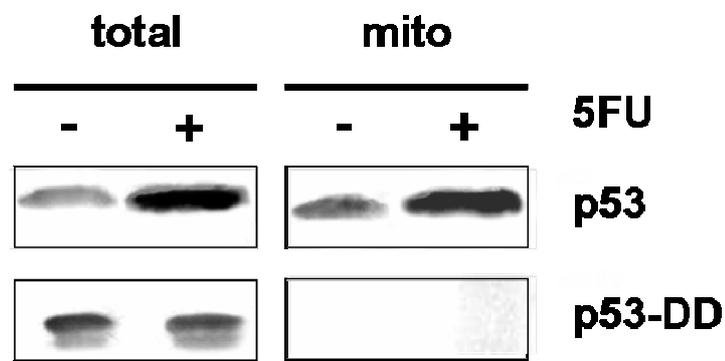
**Abbildung 57: p53-Translokation zu den Mitochondrien nach 24 h Behandlung mit α-Amanitin, 5FU und einer Kombination von beiden in MCF7-Zellen.**

Wildtyp-p53 transloziert in MCF7-Zellen nach Behandlung mit α-Amanitin (10 µM; αA), 5FU (375 µM) oder einer Kombination aus beiden (αA + 5FU) zu den Mitochondrien. Nach Schein-Behandlung (Ø) war dieses Phänomen nicht zu beobachten. Die Zellen wurden 24 h behandelt und danach fraktioniert. 15 µg Gesamt- (total) bzw. mitochondriale (mito) Proteine wurden Western-Blot-Analysen mit anti-p53-Antikörper DO-1 (1:2000) oder anti-Cytochrom-Oxidase-Untereinheit IV-Antikörper (Cyt-Ox, 1:1000) ausgesetzt.

Frau Katrin Schmitt und die Autorin konnten in den MCF7-Oligomerisierungsstudien zeigen, dass, wie in HCT116-Zellen die mitochondriale Fraktion nach BMH- und

GLD-Cross-Link frei von p53-Oligomeren war, während im Gesamtzellextrakt sehr wohl p53-Oligomere detektierbar waren.

Insgesamt deuteten die Daten also darauf hin, dass die Mehrheit des mitochondrialen p53, sei es Wildtyp oder mutiert, monomer vorlag. Wir konnten allerdings nicht ausschließen, dass mitochondriales p53 aus instabilen Oligomeren besteht, die im Zuge der Untersuchungen in Monomere zerfallen. Die p53-Variante p53 DD, die dazu in der Lage ist, in HCT116 p53 DD-Zellen Hetero-Oligomere mit Wildtyp-p53 zu bilden, war, die Monomer-These unterstützend, ebenfalls nicht an den Mitochondrien detektierbar, während Wildtyp-p53 in dieser Zelllinie in der mitochondrialen Fraktion gefunden wurde (Abbildung 58).



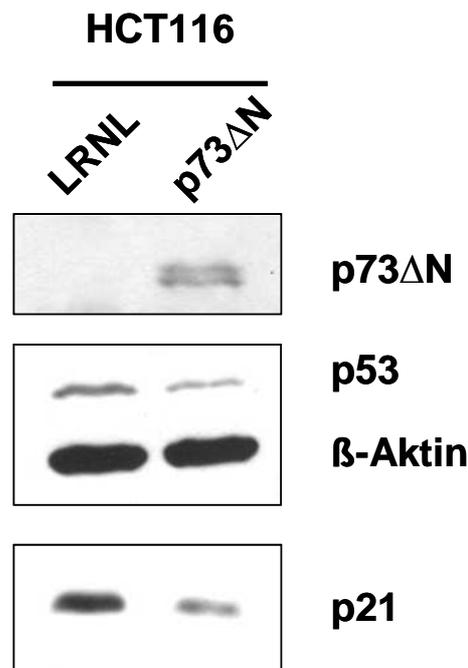
**Abbildung 58: Die p53-Variante p53 DD transloziert nach Einwirkung von Zellstress in HCT116-Zellen nicht zu den Mitochondrien.**

HCT116-Zellen, die retroviral infiziert wurden, die p53-Variante p53 DD zu exprimieren, wurden 24 h entweder schein-behandelt (-) oder mit 5FU (375  $\mu$ M; +) und danach eine Zellfraktionierung durchgeführt. 15  $\mu$ g des Gesamtzellextrakts (total) und 15  $\mu$ g mitochondriale Proteine (mito) wurden im Western Blot untersucht. Endogenes p53, das nach Behandlung stabilisiert und mitochondrien-assoziiert aufgefunden wurde, wurde mit DO-1 (1:2000) nachgewiesen, während p53 DD, das nach 5FU-Behandlung nicht stabilisiert wurde und auch nicht an den Mitochondrien gebunden vorlag, wurde mit dem monoklonalen p53-Antikörper PAb421 (1:200) detektiert.

#### 4.1.8 Dominant-inhibitorischer Effekt von p73 $\Delta$ N auf die Transkription, aber nicht auf mitochondriale Apoptose

Dominante Inhibition über Hetero-Oligomerisierung scheint nicht sehr effizient zu sein, vergleicht man sie mit der dominanten Inhibition, die über eine Besetzung der Promotoren von p53-Zielgenen durch Isoformen der p53-Familie, denen die Transaktivierungsdomäne fehlt, erreicht wird (Chan *et al.*, 2004; Nicholls *et al.*, 2002). Die p73 $\Delta$ TA-Isoformen, die keine Transaktivierungsdomäne besitzen, gehören

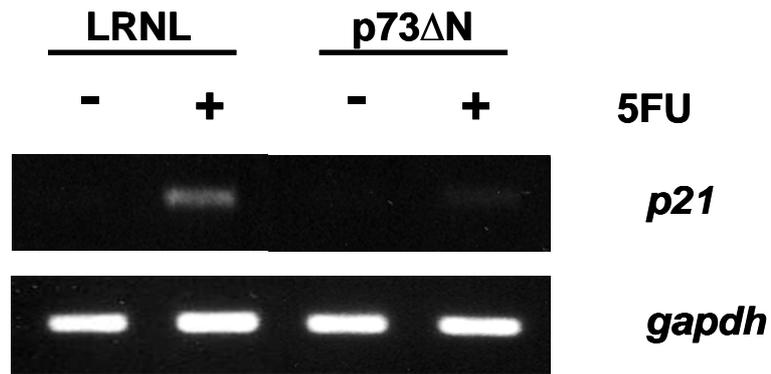
beispielsweise zu den stärksten transkriptionellen Konkurrenten von p53, sowohl bei der Entwicklung von Tumoren als auch bei der Embryonalentwicklung. Um herauszufinden, ob die tumor-assoziierte p73 $\Delta$ N-Isoform, die Exon 2 und 3 und somit ebenfalls die Transaktivierungsdomäne fehlt, die mitochondriale p53-vermittelte Apoptose zu beeinträchtigen vermag, wurden HCT116-Zellen retroviral transduziert, um diese Isoform im Hintergrund von endogenem p53 zu exprimieren (Abbildung 59).



#### Abbildung 59: Expression von p73 $\Delta$ N

Western Immunoblot auf 30  $\mu$ g Gesamtproteinextrakt aus HCT116-Zellen, die entweder nur den Leervektor (LRNL) oder p73 $\Delta$ N exprimieren. p73 wurde mit dem monoklonalen Antikörper-Cocktail p73 Ab-4 (1:200), p53 mit dem anti-p53-Antikörper DO-1 (1:2000),  $\beta$ -Aktin mit dem anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper (1:5000) und p21 mit dem anti-p21-Antikörper (1:1000) detektiert.

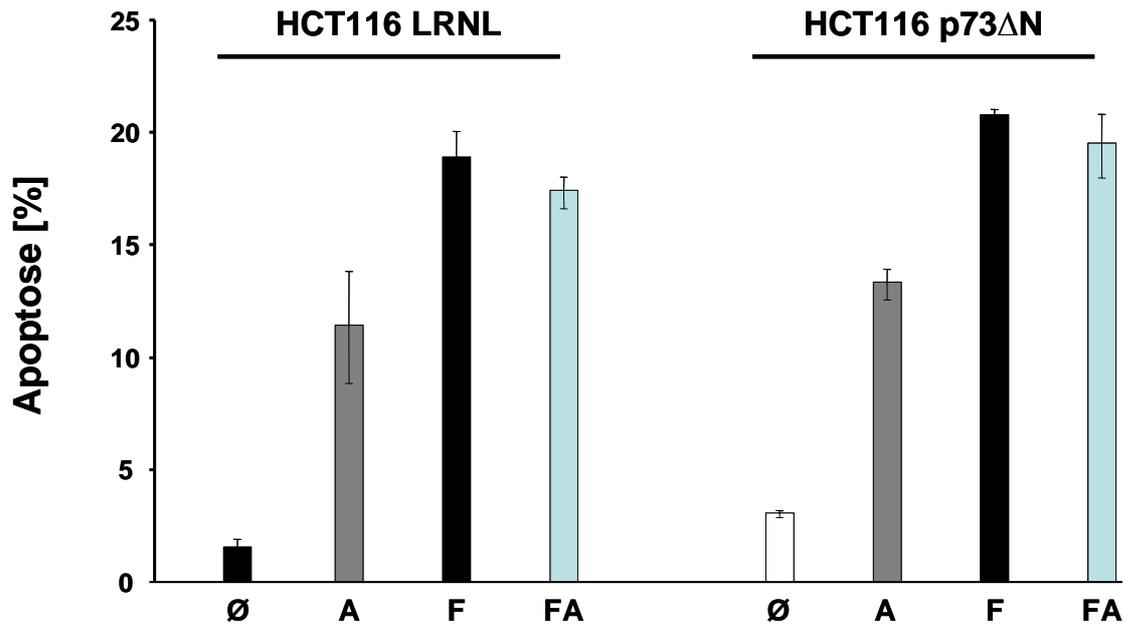
Es ließ sich deutlich erkennen, dass p73 $\Delta$ N die Expression von p53 verminderte und dass bereits ohne Einwirkung von Zellstress die Expression des p53-responsiven p53-Zielgens *p21* herunterreguliert wurde, was auf eine dominante Inhibition von Wildtyp-p53 durch p73 $\Delta$ N hindeutete. Auch auf RNA-Ebene konnten wir nachweisen, dass die p53-abhängige Stimulation der *p21*-Transkription durch p73 $\Delta$ N blockiert wurde, und zwar noch stärker als von p53 DD (Abbildung 60, vergleiche mit Abbildung 54).



**Abbildung 60: Dominant-negativer Effekt von p73 $\Delta$ N auf Wildtyp-p53 in HCT116-Zellen 24 h nach Behandlung mit 5FU.**

RT-PCR auf RNA, die 24 h nach Schein-Behandlung (-) oder Behandlung mit 5FU (375  $\mu$ M, +) aus den angezeigten Zelllinien präpariert wurde. Die Primer waren spezifisch für das p53-regulierte *p21*-Transkript und für das Haushaltsgen *gapdh* als Kontrolle.

Wurden diese Zellen jedoch auf p53-abhängige, transkriptionsunabhängige Apoptose durch mitochondriales p53 untersucht, so fand sich trotz des detektierbaren dominant-inhibitorischen Effekts auf die Transkription keine Blockade der transkriptions-unabhängigen Apoptose (Abbildung 61).



**Abbildung 61: Apoptose in HCT116 LRNL und HCT116 p73ΔN 48 h nach Behandlung mit α-Amanitin, 5FU und einer Kombination von beiden.**

Anteil der apoptotischen Zellen in Kulturen der angezeigten Zelllinien, die durchflusszytometrisch gemessen wurde. Die Zellen wurden entweder schein-behandelt (Ø) oder mit α-Amanitin (10 μM, A), 5FU (375 μM, F) bzw. beiden zusammen (FA). Die Apoptose wurde durch Messung des Sub-2n-DNA-Gehaltes nach PI-Färbung bestimmt.

Zusammengefasst zeigen diese Daten also, dass die extra-nukleären apoptotischen p53-Funktionen an den Mitochondrien relativ resistent gegenüber dominanter Inhibition durch Hetero-Tetramerisierung und Promotor-Okkupation sind. Dieser Apoptose-Weg könnte sich demnach als "fail-safe"-Mechanismus gegen dominante Inhibition im Laufe der Evolution entwickelt haben.

## 4.2 Untersuchungen zur Herkunft von mitochondrialem p53

Der p53-Tumorsuppressor übt seine antineoplastischen Funktionen hauptsächlich über die Induktion eines pleiotropen Apoptose-Programms hervor, das nach Zellschädigung angeschaltet wird, und über transaktivierungsabhängige, aber auch -unabhängige Mechanismen wirkt. Induziertes p53 transloziert relativ schnell zu den Mitochondrien, wo es inhibitorische und aktivierende Komplexe mit anti- und proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-Familie bildet. Dies induziert insgesamt eine Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran und Freisetzung von apoptotischen Aktivatoren (Marchenko *et al.*, 2000; Sansome *et al.*, 2001; Mihara *et al.*, 2003; Nemajero *et al.*, 2005) (siehe 1.5). Die Herkunft und Mechanismen der mitochondrialen p53-Translokation bleiben bisher dennoch relativ unklar.

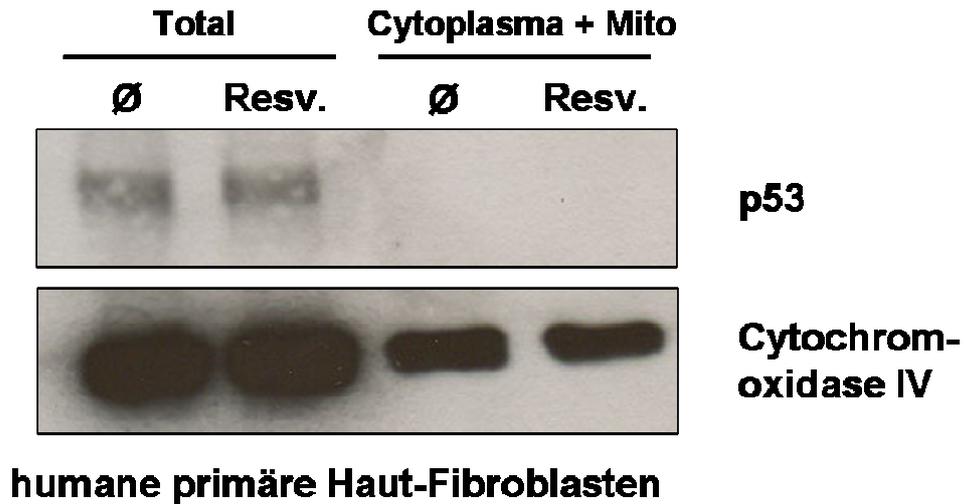
Um dieser Frage der Herkunft des mitochondrialen p53 (Kern oder Cytoplasma) genauer auf den Grund zu gehen, haben wir uns sowohl p53-kompetente (HCT116 und MCF-7) als auch p53-defiziente Zelllinien nach Transfektion von Wildtyp-p53 (HCT116 p53<sup>-/-</sup> und H1299) bezüglich der Lokalisation von p53 nach verschiedenen Stress-Stimuli angesehen. Als Stresssignal haben wir einerseits Adriamycin (= Doxorubicin) verwendet und auf der anderen Seite Resveratrol.

Adriamycin stellt ein Zytostatikum dar, welches zur Therapie von malignen Tumoren eingesetzt wird. Es blockiert die DNA- und RNA-Synthese, wobei die Körperzellen in der S-Phase des Zellzyklus am empfindlichsten auf die Substanz reagieren. Deshalb sind die schnell proliferierenden Tumorzellen stärker als gesunde Zellen von der toxischen Wirkung betroffen. Die Wirkung von Adriamycin wird von zwei Hauptmechanismen getragen: Adriamycin interkaliert in DNA und blockiert dadurch die Transkription; außerdem hemmt es die Topoisomerase II, ein Schlüsselenzym der DNA-Synthese. Die Behandlung von Tumorzellen mit Adriamycin ruft primär einen Zellzyklus-Arrest in der G2 / M-Phase hervor (Bunz *et al.*, 1999; Mahyar-Roemer *et al.*, 2004), aber keinen programmierten Zelltod. Dieser Zellzyklus-Arrest ist p53-abhängig (Bunz *et al.*, 1999; Mahyar-Roemer *et al.*, 2004).

Resveratrol wird von einer Vielzahl von Pflanzen als Abwehrstoff gegen z.B. Schimmelpilzbefall synthetisiert. Viele dieser Pflanzen sind Bestandteil unserer Nahrung (Erdnüsse, Maulbeeren, Trauben) (Jang *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass Resveratrol neben seinen antiinflammatorischen und kardioprotektiven

Eigenschaften zudem antikanzerogen wirkt. Als Radikalfänger verhindert die Substanz die Bildung von freien Radikalen, wodurch DNA-Schädigungen erheblich reduziert werden können und somit auch die Initiation der Tumorgenese. Auch die Tumorpromotion und –progression werden von Resveratrol negativ beeinflusst, so dass man die Substanz als Tumorpräventivum eingestuft hat. Resveratrol triggert Apoptose speziell in Tumorzellen, wobei normal proliferierende Gewebe meist unbeeinflusst bleiben (Bhat *et al.*, 2001; Gautam *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass durch Resveratrol hauptsächlich der mitochondriale Apoptose-Signalweg aktiviert wird und dass diese Apoptose p53-vermittelt sein kann (Huang *et al.*, 1999). Durch Resveratrol werden hauptsächlich die Bcl2-Familienmitglieder Bax und Bak aktiviert (Pöhland *et al.*, 2006), die wahrscheinlich über die bereits erwähnte p53-Translokation zu den Mitochondrien induziert werden (siehe 1.5).

Zu Beginn wollten wir uns der Frage widmen, ob Resveratrol tatsächlich tumorspezifisch wirkt. Wenn die humane primäre Hautfibroblasten-Zelllinie WS-1 in Eagle's Minimum Essential Medium supplementiert mit 10 % FKS kultiviert wurde und die Kulturen dann entweder schein-behandelt oder mit 100 µmol / l Resveratrol behandelt wurden, zeigte sich nach Isolierung der Gesamtproteinextrakte, dass in der Tat keine Stabilisierung und Aktivierung von p53 nach Behandlung mit Resveratrol detektierbar war (Abbildung 62).



**Abbildung 62:** In normal proliferierenden primären Zellen wird p53 durch Resveratrol nicht aktiviert.

Die humane primäre Hautfibroblasten-Zelllinie WS-1 wurde im exponentiell wachsendem Stadium entweder schein-behandelt (∅) oder mit 100 µmol/l Resveratrol (Resv.). 24 h später wurden Gesamtproteinextrakte und cytoplasmatische Protein einschließlich mitochondrialen Proteinen isoliert. Jeweils 15 µg Protein wurden Western Immunoblot-Analysen unterzogen. p53 wurde mit dem monoklonalen anti-p53-Antikörper DO-1 (1:2000) und Cytochrom-Oxidase Untereinheit IV, das als Ladekontrolle benutzt wurde, mit dem anti-Cytochrom-Oxidase IV-Antikörper (1:1000) nachgewiesen.

Weiterhin konnte p53 nicht in der cytoplasmatischen Fraktion, die in diesem Fall auch die Mitochondrien-Fraktion enthielt, nachgewiesen werden. p53 translozierte demnach in diesen Zellen nicht zu den Mitochondrien, um Apoptose zu induzieren. Wurden hingegen die beiden Tumorzelllinien HCT116 und MCF7 (Mamma-Karzinom-Zellen), die beide endogenes Wildtyp-p53 enthalten, auf die Ansprechbarkeit von p53 nach Resveratrol-Behandlung untersucht, zeigte sich bereits 6 Stunden nach Behandlung in beiden Zelllinien eine p53-Stabilisierung und -Aktivierung, die nach 24 h noch deutlicher war (Abbildung 63).



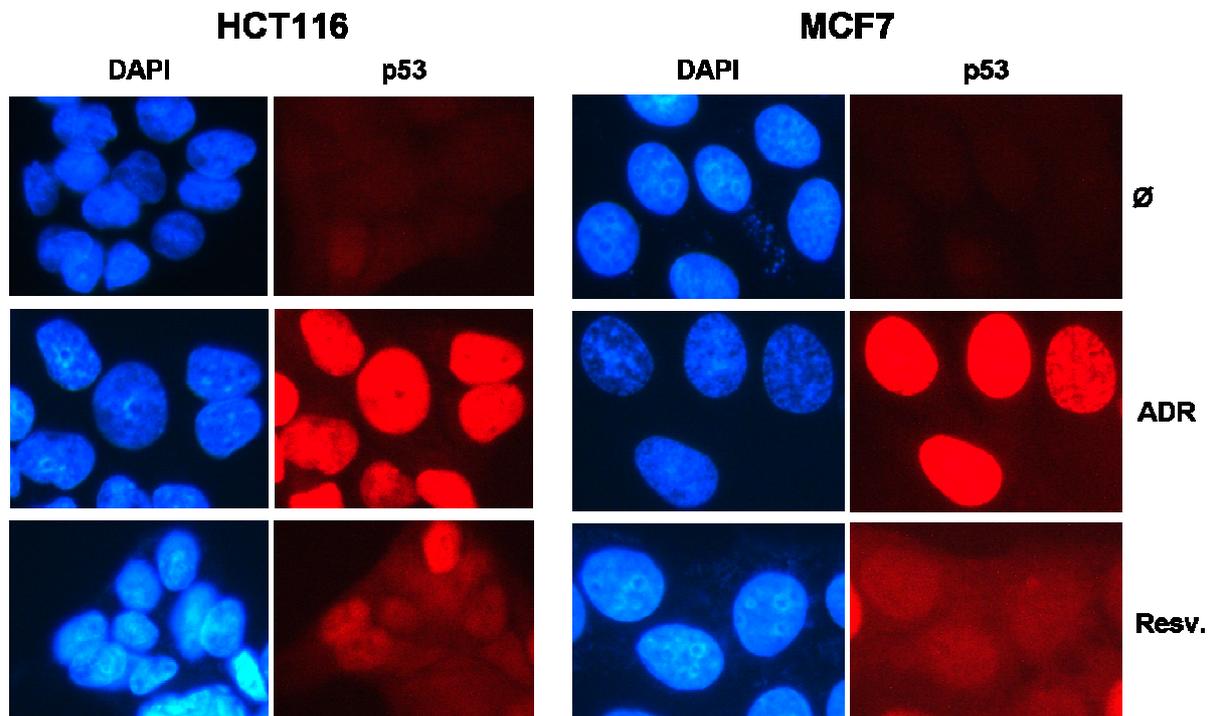
**Abbildung 63: Resveratrol verursacht eine p53-Stabilisierung in HCT116- und MCF7-Zellen.**

Exponentiell wachsende HCT116- und MCF7-Zellen wurden entweder schein-behandelt (∅) oder mit 100 µmol/l Resveratrol. 6 h bzw. 24 h nach Behandlung wurden Gesamtproteinextrakte isoliert und jeweils 15 µg im Western Blot auf die Expression von p53 (anti-p53-Antikörper DO-1 in einer Verdünnung von 1:2000) und β-Aktin als Ladekontrolle (anti-β-Aktin-Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000) untersucht.

Diese Daten zeigten also insgesamt, dass Resveratrol p53 in nicht entarteten Zellen (WS-1) nicht zu aktivieren vermochte. In Tumorzellen hingegen induzierte Resveratrol eine starke p53-Aktivierung. Adriamycin war bereits als Aktivator von p53 in Zellen bekannt (Mahyar-Roemer *et al.*, 2004).

Als nächstes wollten wir anhand der beiden oben beschriebenen Substanzen, Adriamycin und Resveratrol, die subzelluläre Lokalisation von p53 genauer untersuchen. HCT116- und MCF7-Zellen wurden auf Deckgläschen in 6-Loch-Platten ausgesät und 24 h nach Aussäen mit den entsprechenden Substanzen behandelt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen fixiert und p53 anhand DO-1 und einem sekundären TRITC-konjugierten anti-Maus-IgG-Antikörper detektiert sowie, um die Zellkerne sichtbar zu machen, mit DAPI, das hauptsächlich in DNA interkaliert und somit die Zellkerne anfärbt, gegengefärbt. Es wurde deutlich, dass unter Schein-Behandlung p53 in beiden Zelllinien kaum nachweisbar exprimiert wird, was auch in den Western Blot-Analysen deutlich wurde (Abbildung 63). Es konnte demnach nur eine leichte Hintergrundfärbung beobachtet werden. Nach Adriamycin-Behandlung wurde jedoch eine deutliche p53-Akkumulation im Zellkern sichtbar. Dies war im Einklang mit vorherigen Veröffentlichungen, in denen gezeigt wurde, dass Adriamycin-Behandlung in diesen Zellen nicht zum Zelltod, sondern lediglich zu einem Zellzyklus-Arrest führt (Bunz *et al.*, 1999; Mahyar-Roemer *et al.*, 2004). Setzte

man die Zellen einer Behandlung mit Resveratrol aus, so fand sich auch hier eine p53-Stabilisierung, allerdings nicht im Zellkern, sondern p53 war diffus in der kompletten Zelle verteilt (Abbildung 64). Hier zeigte sich also erstmals, dass das anti-tumorigen wirksame Resveratrol im Gegensatz zu Adriamycin Apoptose auslöst und dass dieser Effekt mit der Lokalisation von p53 im Cytoplasma korreliert war.



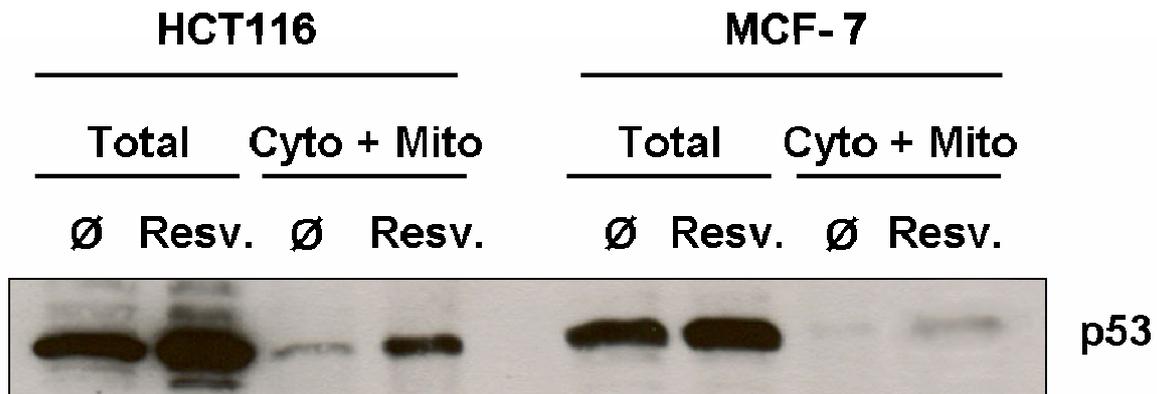
**Abbildung 64: Adriamycin induziert in HCT116 und MCF7-Zellen eine p53-Akkumulation im Zellkern, während Resveratrol eine diffuse p53-Verteilung im Cytoplasma hervorruft.**

$3 \times 10^5$  exponentiell wachsende HCT116- und MCF7-Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und 24 h später entweder schein-behandelt ( $\emptyset$ ), mit  $1,36 \mu\text{M}$  Adriamycin (ADR) oder mit  $100 \mu\text{mol/l}$  Resveratrol. 24 h später wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert, p53 mit anti-p53-Antikörper DO-1 (1:1000) und TRITC-konjugiertem anti-Maus-IgG-Sekundär-Antikörper (1:100) detektiert. Um die Zellkerne zu detektieren, wurden die Zellen mit DAPI ( $0,2 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) gegengefärbt. Schließlich wurden die Präparate mit einem Fluoreszenz-Mikroskop angeschaut.

Es stand uns nun ein System zur Verfügung, mit dem wir die p53-Lokalisation untersuchen konnten: Adriamycin hatte eine p53-Stabilisierung und -Akkumulation im Zellkern zur Folge, während man mit Resveratrol eine p53-Stabilisierung mit Distribution in der kompletten Zelle beobachten konnten.

Als nächstes wollten wir bestätigen, dass wir diese zelluläre p53-Akkumulation nach Resveratrol-Behandlung auch biochemisch nachweisen konnten. Dazu wurden HCT116- und MCF7-Zellen mit Resveratrol behandelt. Nach 24 h Behandlung

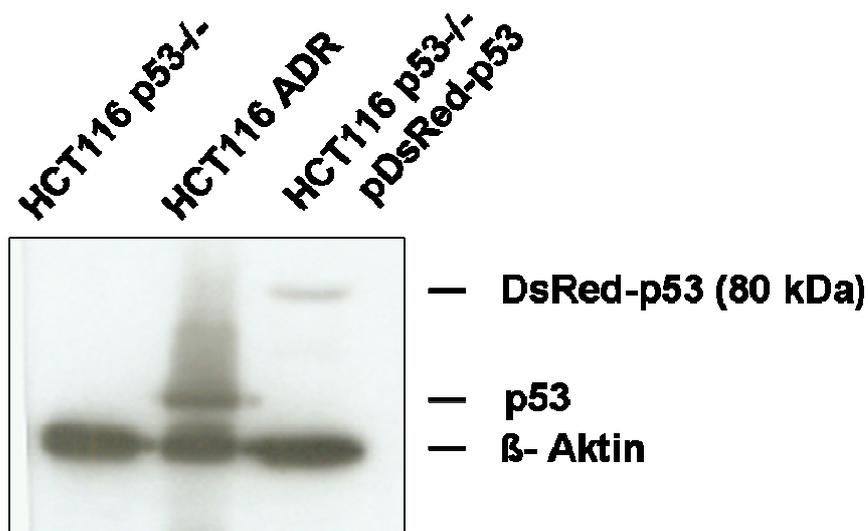
wurden die Zellen abgeschabt, ein kleiner Teil als Gesamtproteinextrakt gesichert und von dem Rest die cytoplasmatische Fraktion inklusive Mitochondrien präpariert. Western Blot-Untersuchungen bestätigten die im Fluoreszenz-Mikroskop beobachtete p53-Akkumulation. In der cytoplasmatischen Fraktion ließ sich eindeutig eine Anreicherung nach Resveratrol-Behandlung feststellen, die jedoch am stärksten in HCT116-Zellen vorhanden war (Abbildung 65).



**Abbildung 65: Biochemischer Nachweis der p53-Akkumulation im Cytoplasma nach Resveratrol-Behandlung in HCT116- und MCF7-Zellen.**

Exponentiell wachsende HCT116- und MCF7-Zellen wurden auf 10 cm-Schalen ausgesät und bei einer Zelldichte von 70-80 % mit 100  $\mu\text{mol/l}$  Resveratrol (Resv.) behandelt. Nach 24 h wurden einerseits Gesamtproteine (Total) und andererseits cytoplasmatische Proteine inklusive mitochondrialen Proteinen (Cyto + Mito) isoliert. 15  $\mu\text{g}$  beider Fraktionen wurden Western Blot-Analysen mit anti-p53-Antikörper DO-1 (1:2000) unterzogen.

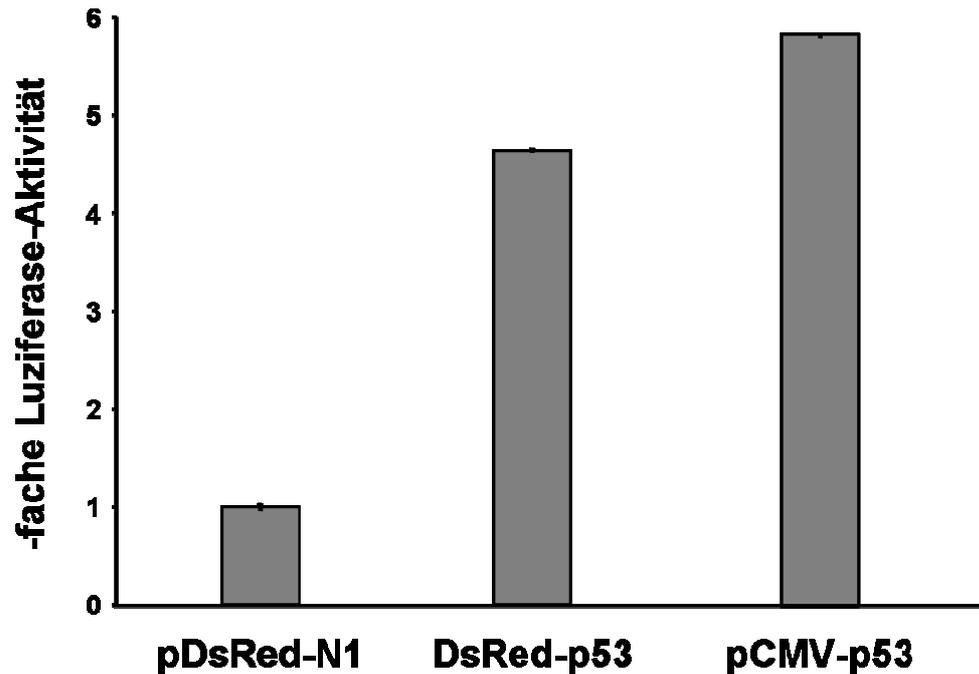
Als nächstes wurden eine HCT116-Zelllinie, bei der p53 durch homologe Rekombination ausgeknockt war (Bunz *et al.*, 1998), und andererseits die humane, epitheliale Lungenkarzinomzelllinie H1299, die ebenfalls kein p53 exprimiert, eingesetzt. Anstatt Wildtyp-p53 in die Zellen zu transfizieren und darauf mit Hilfe eines p53-Antikörpers die Expression und die Lokalisation des Tumorsuppressors nachzuweisen, bedienten wir uns des Expressionsvektors pDsRed-N1, der es ermöglichte, Wildtyp-p53 fusioniert mit dem roten Fluoreszenzprotein zu exprimieren und schließlich im Fluoreszenzmikroskop zu detektieren. Nach der Klonierung des p53-Gens in den pDsRed-N1-Expressionsvektor wurde zunächst die Expression dieses neuen Plasmids überprüft. Nach Transfektion von HCT116 p53<sup>-/-</sup> mit pDsRed-N1-p53 ließ sich in Western Blot-Untersuchungen eindeutig ein 80 kDa großes Fusionsprotein nachweisen (Abbildung 66).



**Abbildung 66: Expressionskontrolle von pDsRed-N1-p53.**

$4 \times 10^5$  HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen wurden pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät und 24 h später bei 60-70 %iger Zelldichte mit 3  $\mu$ g pDsRed-N1-p53 transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden Gesamtproteine isoliert und 15  $\mu$ g davon Western Blot-Analysen ausgesetzt. p53 wurde mit dem anti-p53-Antikörper DO-1 (1:2000) nachgewiesen. HCT116 Wildtyp-Zellen, die 24 h mit 1,36  $\mu$ M Adriamycin (HCT116 ADR) behandelt waren, dienten als Positivkontrolle, untransfizierte HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen als Negativkontrolle.  $\beta$ -Aktin, das mit dem  $\beta$ -Aktin-Anikörper (1:5000) nachgewiesen wurde, fungierte als Ladekontrolle.

Um zu erfahren, ob p53 in diesem Kontext auch noch funktionell war, untersuchten wir zunächst, ob Ds-Red-p53 seine Funktion als Transkriptionsfaktor weiterhin erfüllen konnte. Dafür wurden transiente Transfektionen mit einem Reporterplasmid und einem Effektorplasmid in HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen durchgeführt. Das Reporterplasmid setzte sich aus dem Promotor des *p21Waf/Cip1*-Gens, das durch p53 transaktivierbar ist, und einem nachgeschalteten Luziferase-Gen zusammen. Da in den Experimenten die HCT116 p53-negative Zelllinie verwendet wurde, konnte der *p21*-Promotor nur durch Cotransfektion mit einem p53-exprimierenden Effektorplasmid transaktiviert werden. Die Luziferase-Aktivität wurde mittels eines Luminometers bestimmt. Es sollte nun untersucht werden, ob das neue Konstrukt, das das DsRed-p53-Fusionsprotein exprimiert, dazu in der Lage ist, den *p21*-Promotor zu transaktivieren. Zur Durchführung der Luziferase-Assays wurde das Luziferase-Assay-Kit der Firma Promega verwendet. In 6-Loch-Platten wurden die Zellen ausgesät und bei einer Zelldichte von 60-70 % mittels Nanofectin kotransfiziert. Nach 24 h wurden die Luziferase-Aktivitäten bestimmt (Abbildung 67).



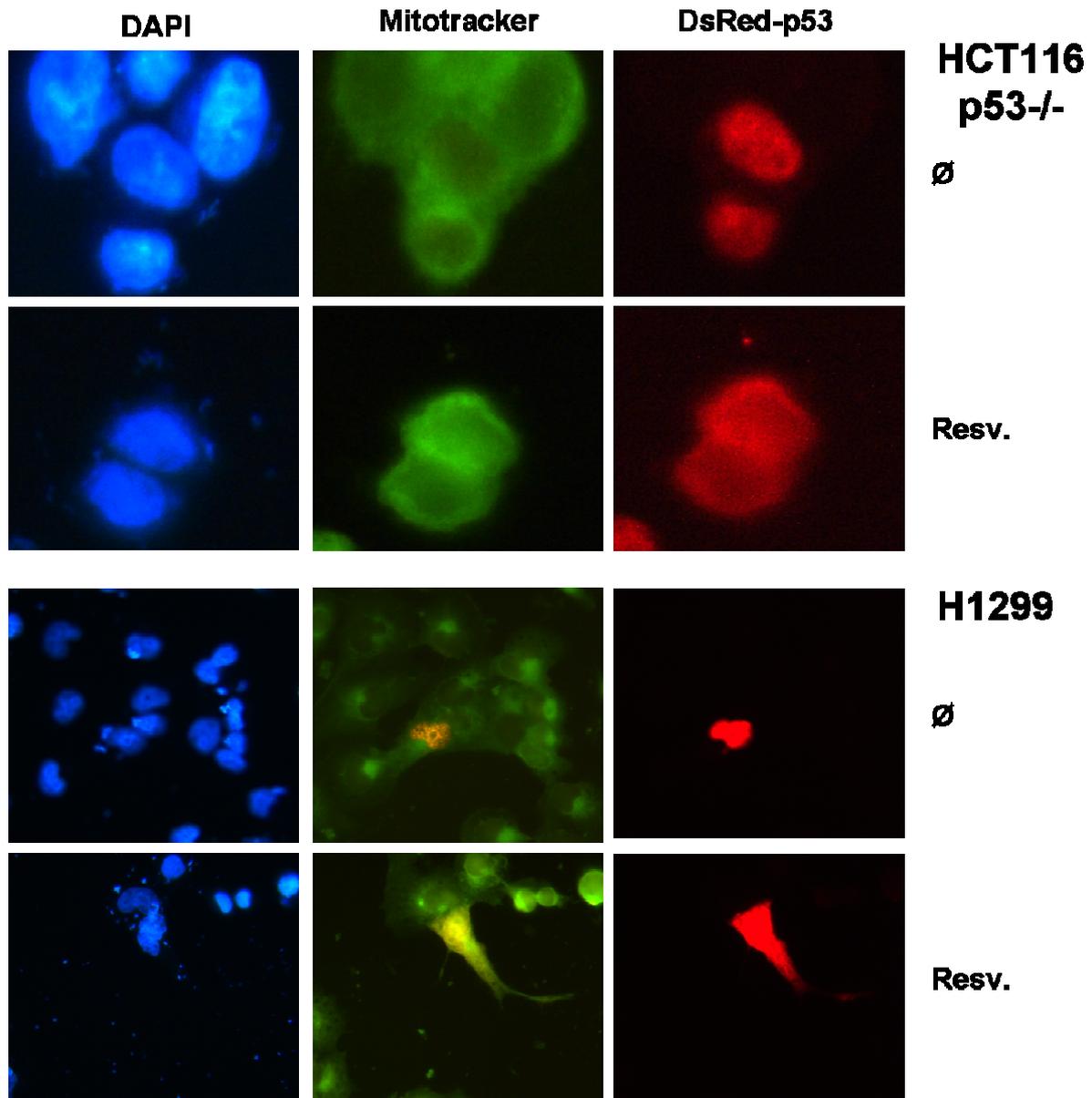
**Abbildung 67: Das Fusionsprotein DsRed-p53 vermag weiterhin, den p21-Promotor zu transaktivieren.**

$4 \times 10^5$  HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen wurden pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät und 24 h später bei einer Konfluenz von 60-70 % transient mit dem Reporterplasmid *p21Waf/Cip1-Luc* und dem angezeigten Effektorplasmid (Verhältnis jeweils 1:1) mit dem Transfektionsreagenz Nanofectin I kotransfiziert. 24h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die relative Luziferase-Aktivität nach Zupipettieren des Substrats Luziferin in einem Luminometer bestimmt. pDsRed-N1 diente als Negativkontrolle und pCMV-p53 diente als Positivkontrolle.

Der pDsRed-N1-Vektor kotransfiziert mit *p21Waf-Luc* stellte die Negativkontrolle dar. Die Luziferaseaktivität wurde hier willkürlich gleich 1 gesetzt. Im Gegensatz zu der Negativkontrolle zeigte die Positivkontrolle *p21-Waf-Luc* kotransfiziert mit pCMV-p53 eine etwa 6-fache Luziferaseaktivität. Auch DsRed-p53 war in der Lage, den *p21*-Promotor 4,5-fach stärker zu transaktivieren als der Leervektor. Dies zeigte, dass p53 trotz C-terminaler Fusion mit dem fluoreszierenden Protein noch dazu in der Lage war, Gene zu transaktivieren. Da das Konstrukt seine Aufgabe als Transkriptionsfaktor zu erfüllen schien, war davon auszugehen, dass es im Zellkern exprimiert wurde.

Um die subzelluläre Lokalisation nach Einwirkung von Resveratrol zu untersuchen, wurden HCT116 p53<sup>-/-</sup> und H1299-Zellen auf Deckgläschen in 6-Loch-Platten ausgesät und 24 h später bei einer Zelldichte von 60-70 % mit dem pDsRed-N1-p53-Konstrukt transfiziert. Nach weiteren 24 h wurde schließlich die Resveratrol-

Behandlung angeschlossen und 24 h später wurden die Zellen fixiert. Die Zellkerne wurden wieder mit DAPI sichtbar gemacht. Die Mitochondrien wurden mit dem grün-fluoreszierendem Mitochondrien-Farbstoff MitoTracker®Green FM (Invitrogen™), der ungeachtet des Mitochondrien-Membran-Potentials zu den Mitochondrien lokalisiert, angefärbt. So sollte eine eventuelle p53-Lokalisation an den Mitochondrien sichtbar werden. Abbildung 68 macht deutlich, dass der Mitochondrien-Farbstoff MitoTracker®Green FM in der Tat nur die Mitochondrien anzufärben scheint, da sowohl in HCT116 p53<sup>-/-</sup> als auch in H1299-Zellen die Zellkerne durch diesen Farbstoff ausgespart wurden. Das Fusionsprotein DsRed-p53 war in unbehandelten Zellen nur im Zellkern nachweisbar. Nach Resveratrol-Behandlung war eine eindeutige Anreicherung im Cytoplasma und eine partielle Co-Lokalisation mit den Mitochondrien detektierbar.



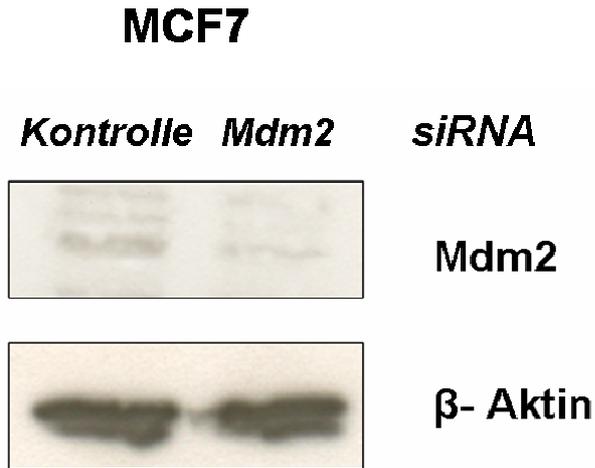
**Abbildung 68: Resveratrol induziert in HCT116 p53-/- und H1299-Zellen nach Transfektion von pDsRed-N1-p53 eine p53-Akkumulation im Cytoplasma.**

$4 \times 10^5$  HCT116 p53-/- und H1299-Zellen wurden pro Loch einer 6-Loch-Platte auf Deckgläschen ausgesät. Nach 24 h und 60-70 % Zelldichte wurde mit Hilfe von Nanofectin I je 3  $\mu\text{g}$  pDsRed-N1-p53 pro Loch in die Zellen eingebracht. Weitere 24 h danach wurde entweder schein-behandelt ( $\emptyset$ ) bzw. mit 100  $\mu\text{mol/l}$  Resveratrol (Resv.) für 24 h behandelt. Schließlich wurden die Zellen fixiert, mit DAPI die Zellkerne und mit MitoTracker®Green FM die Mitochondrien angefärbt. Die Präparate wurden mit einem Fluoreszenz-Mikroskop angeschaut und aufgenommen.

Insgesamt zeigten diese Resultate folglich, dass sowohl endogenes Wildtyp-p53 als auch ein DsRed-N1-p53-Fusionsprotein unter Anwesenheit des Chemopräventivums Resveratrol im Cytoplasma akkumuliert.

Als nächstes untersuchten wir, ob p53 unter Resveratrol vermehrt aus dem Zellkern exportiert wird. Roth und Mitarbeiter hatten 1998 gezeigt, dass Mdm2 für den p53-Export aus dem Zellkern notwendig ist. Die Gruppe um Wei Gu konnte weiterhin demonstrieren, dass in Abwesenheit von Mdm2 p53 vor allem im Zellkern lokalisiert ist, es aber ins Cytoplasma transloziert, wenn geringe Menge an Mdm2 zugesetzt werden (Li *et al.*, 2003). Auch Dumont und Mitarbeiter machten eine stärkere Bindung und Ubiquitylierung der Arg72-Variante durch Mdm2 dafür verantwortlich, dass diese Form besser aus dem Zellkern exportiert wird und somit effizienter an die Mitochondrien translozieren kann als die Pro72-Variante (Dumont *et al.*, 2003). Zur Untersuchung, ob p53 unter Resveratrol durch Mdm2 aus dem Zellkern exportiert wird, haben wir uns entschlossen, die Mdm2-Expression mittels RNA-Interferenz zu unterdrücken und danach die subzelluläre Lokalisation von p53 zu untersuchen.

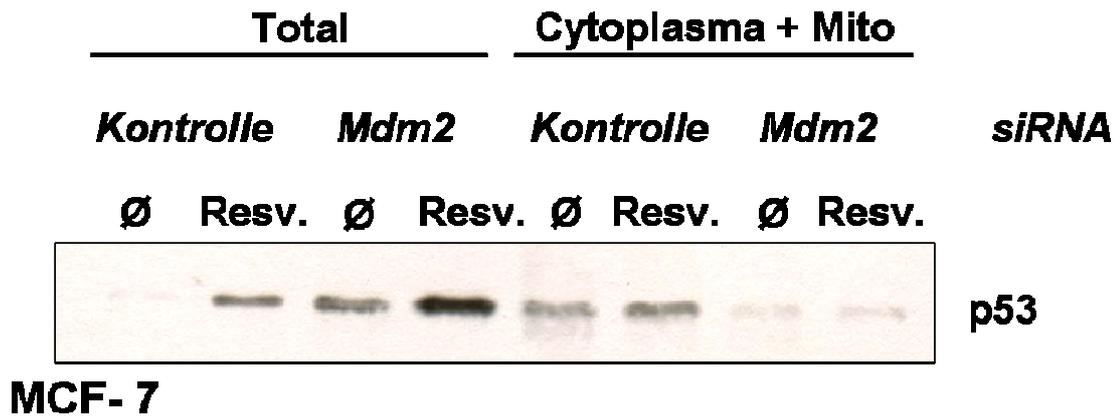
Am Tag vor der Transfektion wurden  $2 \times 10^5$  MCF7-Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte bzw.  $1,63 \times 10^6$  MCF7-Zellen auf eine 10 cm-Schale ausgesät, so dass diese am darauf folgenden Tag eine Konfluenz von ca. 70 % erreicht hatten. Für die Transfektion der 6-Loch-Platten wurden 2 µg Mdm2- oder Kontroll-siRNA eingesetzt, für die 10 cm-Schalen 16,3 µg. Die Transfektionseffizienz wurde anhand einer FITC-gekoppelten siRNA im Durchflusszytometer bestimmt und erreichte Werte über 90 %. Um die Unterdrückung von Mdm2 auf Proteinebene zu bestimmen, wurde von je einer 35 mm-Schale Gesamtprotein isoliert und die Mdm2-Level in Kontroll-siRNA-transfizierten mit Mdm2-siRNA-transfizierten Zellen verglichen. Der Level an Mdm2-Protein konnte mittels der spezifischen siRNA um mindestens 50 % gesenkt werden (Abbildung 69).



**Abbildung 69: Mdm2-Level in MCF7-Zellen nach Mdm2-Repression mittels RNA-Interferenz.**

Es wurden  $2 \times 10^5$  MCF7-Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät. Nachdem die Zellen eine Dichte von ca. 70 % erreicht hatten, wurden sie entweder mit Kontroll-siRNA oder mit siRNA, die gegen Mdm2 gerichtet war, transfiziert. 48 h später wurden Gesamtproteinextrakte isoliert und 15  $\mu$ g wurden Western Blot-Analysen unterzogen. Mdm2 wurde mit einem anti-Mdm2-Antikörper (1:500) nachgewiesen.  $\beta$ -Aktin wurde als Ladekontrolle eingesetzt und mit anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper nachgewiesen (1:5000).

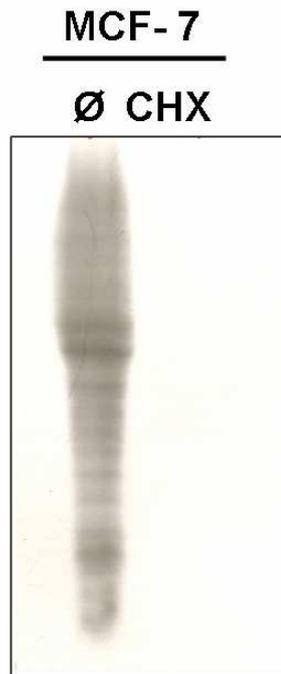
Die 10 cm-Schalen wurden 24 h nach siRNA-Transfektion mit Resveratrol behandelt und weitere 24 h danach wurden dann einerseits Gesamtproteinextrakte und andererseits cytoplasmatische inklusive mitochondrialen Proteinen isoliert und jeweils in Immunoblots auf p53-Expression überprüft. Es zeigte sich zunächst, dass p53 nach Resveratrol-Behandlung und in unbehandelten Zellen unter Mdm2-Knockdown akkumulierte (Abbildung 70). Dies war zu erwarten, weil Mdm2 auch in MCF7-Zellen das zentrale p53-abbauende Enzym darstellt. Bemerkenswerterweise verhinderte der Knockdown von Mdm2 jedoch die Akkumulation von p53 im Cytoplasma! Dies deutet darauf hin, dass Mdm2 die Lokalisation von p53 ins Cytoplasma durch Beschleunigung des nukleären Exports und/oder durch Inhibition des nukleären Imports von p53 kontrollieren kann. Neueste Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von Ute Moll aus New York City zeigten kurz nach der Erarbeitung dieser Resultate, dass Mdm2 in der Tat ein Inhibitor des nukleären Transports von p53 ist.



**Abbildung 70: Mdm2-Repression reduziert die cytoplasmatischen p53-Level in MCF7-Zellen erheblich.**

Es wurden  $1,63 \times 10^6$  MCF7-Zellen auf eine 10 cm-Schale ausgesät, so dass sie am darauf folgenden Tag eine Konfluenz von ca. 70 % erreicht hatten. Es folgte eine Transfektion entweder mit Kontroll-siRNA oder Mdm2-siRNA. 24 h danach wurden die Zellen schein-behandelt (∅) oder mit 100  $\mu\text{mol/l}$  Resveratrol (Resv.) behandelt und weitere 24 h inkubiert. Es wurden schließlich Gesamtproteinextrakte (Total) und cytoplasmatische inklusive mitochondrialen Proteine (Cytoplasma + Mito) isoliert und 15  $\mu\text{g}$  jeder Fraktion im Western Blot untersucht. Zur p53-Detektion wurde der anti-p53-Antikörper DO-1 (1:2000) eingesetzt.

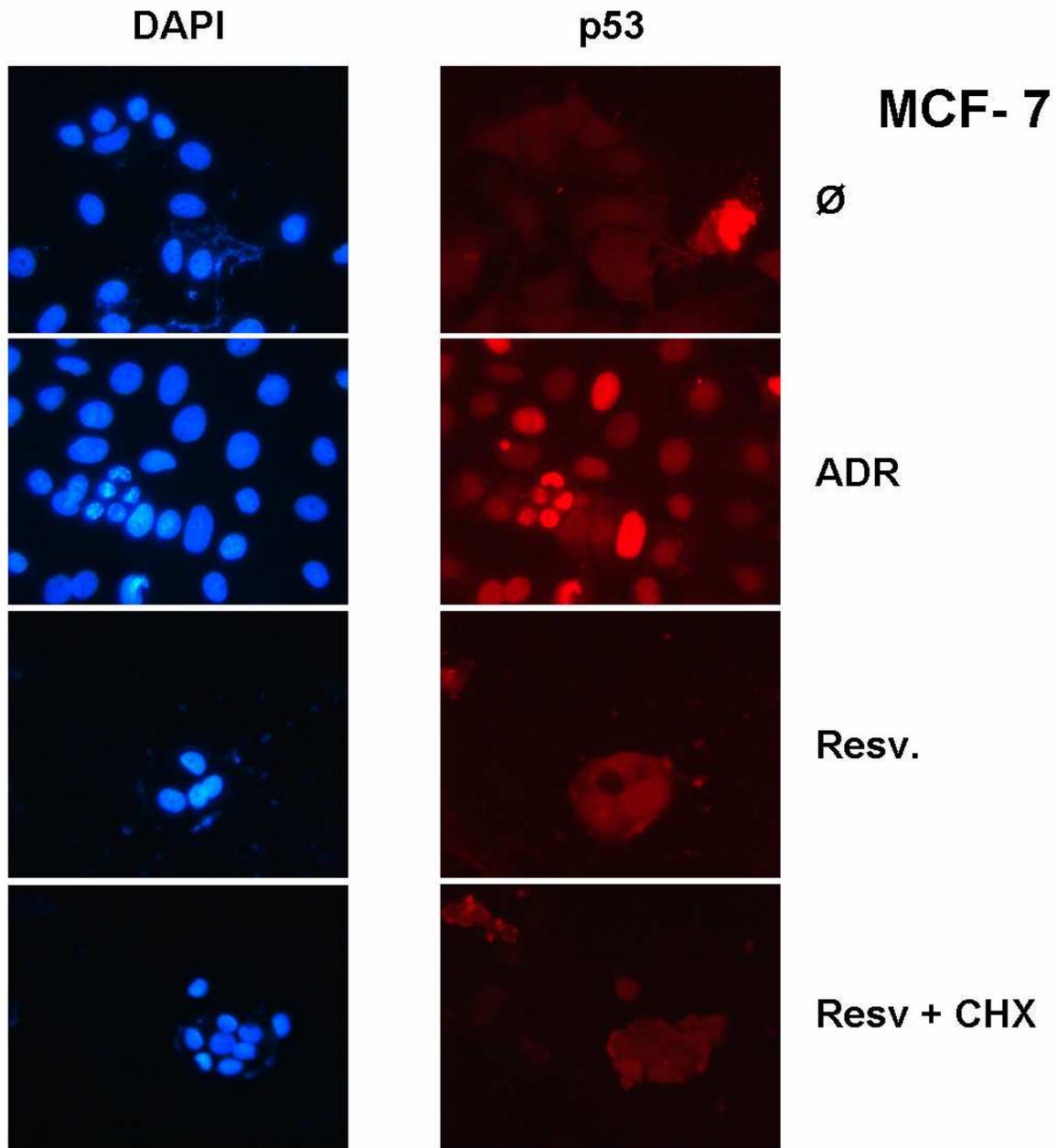
Nachfolgend wollten wir untersuchen, ob ein Teil des unter Resveratrol beobachtbaren cytoplasmatischen p53's aus dem Zellkern exportiert wird. Zunächst zeigten wir, dass die Protein-Neusynthese durch Cycloheximid (CHX) gehemmt werden kann (Abbildung 71).



**Abbildung 71: Blockade der Proteinneusynthese durch Cycloheximid in MCF7-Zellen.**

MCF7-Zellen wurden auf 10 cm-Schalen ausgesät. Einen Tag später und einer Zelldichte von ca. 80 % wurden die Zellen für 60 min entweder schein-behandelt (Ø) oder mit Cycloheximid (CHX, 20 µg/ml). Nach dieser Stunde wurden die neu synthetisierten Proteine mit 100 µCurie <sup>35</sup>S für 60 min radioaktiv markiert. Nach 2 Waschschrinen mit PBS wurden Gesamtproteinextrakte isoliert und eine normale SDS-PAGE mit Autoradiographie für einige Tage durchgeführt.

Dann wurden  $3 \times 10^5$  MCF7-Zellen in 6-Loch-Platten auf Deckgläschen ausgesät, 24 h später mit den entsprechenden Substanzen behandelt und für weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, sowie p53 mit DO-1 angefärbt und im Fluoreszenz-Mikroskop analysiert (Abbildung 72).



**Abbildung 72: In MCF7-Zellen wird p53, das nach Resveratrol-Behandlung im Cytoplasma zu finden ist, aus dem Zellkern exportiert.**

Es wurden  $3 \times 10^5$  MCF7-Zellen in 6-Loch-Platten auf Deckgläschen ausgesät und 24 h später scheinbehandelt ( $\emptyset$ ), mit  $0,36 \mu\text{M}$  Adriamycin (ADR), mit  $100 \mu\text{mol/l}$  Resveratrol (Resv.) oder einer Kombination aus  $100 \mu\text{mol/l}$  Resveratrol und Cycloheximid ( $20 \mu\text{g/ml}$ ) (Resv+CHX) und für weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, p53 mit DO-1 (1:1000) und einem TRITC-konjugierten anti-Maus-IgG-Sekundär-Antikörper (1:100) detektiert. Um die Zellkerne zu detektieren, wurden die Zellen mit DAPI ( $0,2 \mu\text{g} / \text{ml}$  in Methanol) gegengefärbt. Schließlich wurden die Präparate mit einem Fluoreszenz-Mikroskop angeschaut.

In unbehandelten MCF7-Zellen war p53, wie erwartet, nur ganz schwach zu detektieren (vergleiche Abbildung 70). Erst nach Behandlung mit Adriamycin wurde eine p53-Stabilisierung sichtbar. Hier akkumulierte p53 vorwiegend im Zellkern wie auch in unseren vorherigen Untersuchungen (vergleiche Abbildung 64). Nach Resveratrol-Behandlung hingegen befand sich p53, wie erwartet, auch im Cytoplasma. Nach einer Kombination von Resveratrol und Cycloheximid ergab sich das gleiche Resultat wie nach Resveratrol-Behandlung allein: p53 war im Cytoplasma detektierbar. Da die Neusynthese blockiert war, musste das p53 demnach aus dem Zellkern exportiert worden sein.

Zusammengefasst zeigen diese Resultate also, dass Adriamycin vor allem eine p53-Akkumulation im Zellkern induziert. Resveratrol hingegen bewirkt eine Akkumulation von p53 im Cytoplasma, vermutlich auch durch Export von p53 aus dem Zellkern. In Übereinstimmung zeigten Pöhland und Mitarbeiter 2006, dass Resveratrol in HCT116-Zellen eine ausgeprägte Apoptose induzieren kann. Außerdem ist die cytoplasmatische Lokalisation von p53 zumindest zum Teil von Mdm2 abhängig.

### 4.3 Untersuchungen zum Effekt von p53 auf die mitochondriale Transkription

Das p53-Protein ist vorherrschend im Zellkern aufzufinden, wo es als homotetramerer Transkriptionsfaktor durch verschiedene Arten von Stress stabilisiert und aktiviert wird (Vousden und Lu, 2002). In diesem Zustand kann p53 an bestimmte Zielgene binden und diese aktivieren. Dies löst hauptsächlich entweder einen Zellzyklus-Arrest oder Apoptose aus. Seit die Gruppe um Ute Moll 2000 publiziert hatte, dass p53 auch an den Mitochondrien zu finden ist und hier die Mitochondrienvermittelte Apoptose triggert und weiterhin vermutet wurde, dass p53 sich sogar innerhalb der mitochondrialen Matrix befindet, wo bis zu 10 mitochondriale DNA-Genome pro Mitochondrium lokalisiert sind, stellte sich die Frage, ob p53 in seiner klassischen Rolle als Transkriptionsfaktor an der Transkription und Replikation der mitochondrialen DNA-Genome (mtDNA) mitwirken kann (Marchenko *et al.*, 2000; Mahyar-Roemer *et al.*, 2004).

Die Autorin der vorliegenden Arbeit hatte sich bereits im Rahmen ihrer Diplomarbeit gefragt, ob das mitochondriale Genom putative p53-Bindungsstellen enthält. p53 bindet vorwiegend an Sequenzen, die aus 2 10-meren (Halbseiten) mit dem degenerierten Konsensus 5'-r r r-C(A/T)(A/T)G-y y y-3' (r = Purin; y = Pyrimidin) bestehen und durch 0-13 bp voneinander getrennt sind (el-Deiry *et al.*, 1992). Das humane mitochondriale Genom ist zirkulär und besteht aus 16569 Basenpaaren (Accession-Number: NC 001807; Andrews *et al.*, 1999). Innerhalb der mtDNA konnten von uns 7 Kandidaten-Sequenzen, die als p53-Konsensus-Sequenzen in Frage kamen, identifiziert werden (Heyne *et al.*, 2004). Diese Sequenzen wurden in ein Reporterplasmid mit einem Minimal-Promotor und einer Luciferase-Expressionskassette inseriert, um das Ansprechen dieser Sequenzen in transienten Transfektionen im Kontext des Zellkerns zu untersuchen. Nach Transfektion dieser Plasmide zusammen mit einem Wildtyp-p53-exprimierenden Effektor-Vektor in die p53-negative humane Osteosarcom-Zelllinie Saos-2 erwies sich nur eine der 7 vermeintlichen p53-Bindungsstellen im Kontext des Zellkerns als transaktivierbar, was auch in den p53-defizienten Lungenadenokarzinom-Zellen H1299 bestätigt werden konnte. Nachfolgend führten wir *in vitro*-DNA-Bindungsstudien auf der Basis

Southwestern-Blots durch. Bei diesen Studien stellte sich heraus, dass p53 in der Tat direkt an identifizierte Sequenz zu binden vermochte (Heyne *et al.*, 2004).

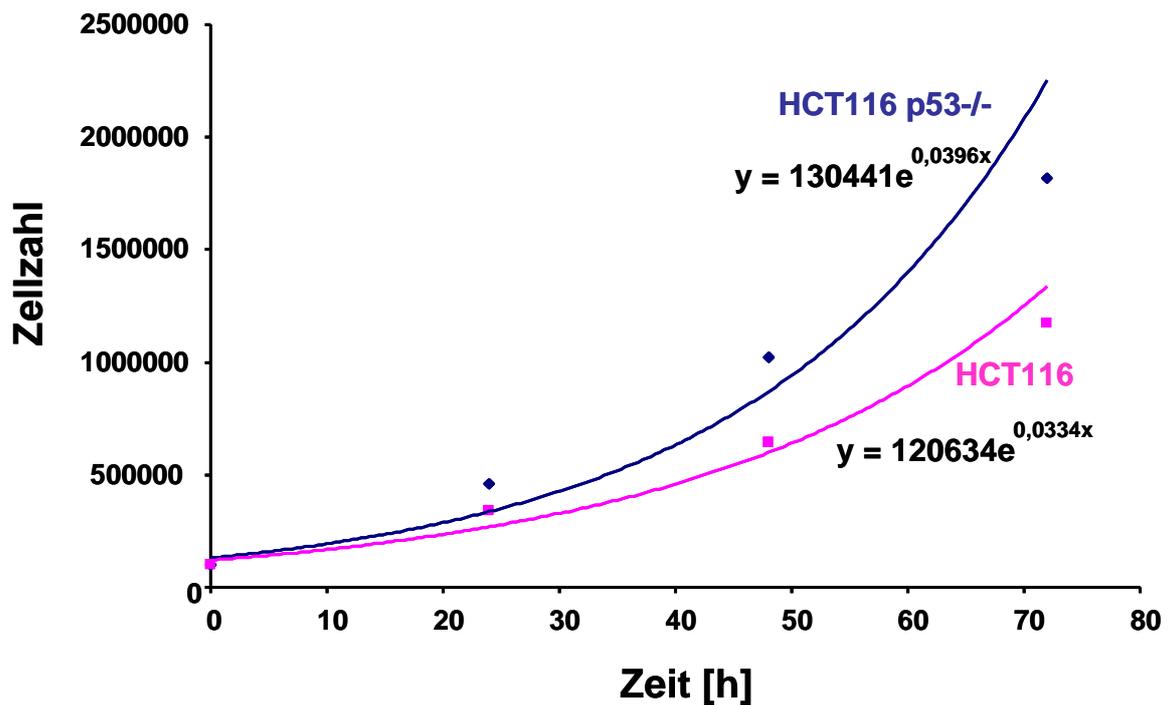
In den nun folgenden Experimenten wollten wir prüfen, ob sich in Abhängigkeit vom p53-Status (inaktiv oder aktiviert durch Zellstress) die Transkript-Level mitochondrialer RNA ändern. Dazu sollten Northern Blot-Analysen durchgeführt werden.

Für diese Studien griffen wir auf die humane kolorektale Adeno-Karzinom-Zelllinie HCT116 zurück. Die in 4.1.1 diskutierten Vorteile dieser Zelllinie und die Verfügbarkeit eines p53-negativen Derivats dieser Zelllinie (Bunz *et al.*, 1998), bei der das p53-Gen durch homologe Rekombination ausgeknockt worden war, machten diese Zellen zu einem wertvollen Werkzeug für diese Studien.

### **4.3.1 Charakterisierung der Zelllinien**

#### **4.3.1.1 Erstellen von Wachstumskurven von HCT116- und HCT116 p53-/- Zellen**

Zuerst einmal mußten die beiden Zelllinien charakterisiert und deren Verhalten miteinander verglichen werden. Zu diesem Zweck haben wir das Wachstumsverhalten von HCT116-Zellen und ihres Derivats HCT116 p53-/- Zellen analysiert. Es wurden  $5 \times 10^4$ -Zellen von jeder Zelllinie pro Loch in 6-Loch-Platten ausgesät. Dann wurden die Zellzahlen für die Zeitpunkte 0 h, 24 h, 48 h und 72 h mit Hilfe des Zellzählers Casy® bestimmt (Abbildung 73).



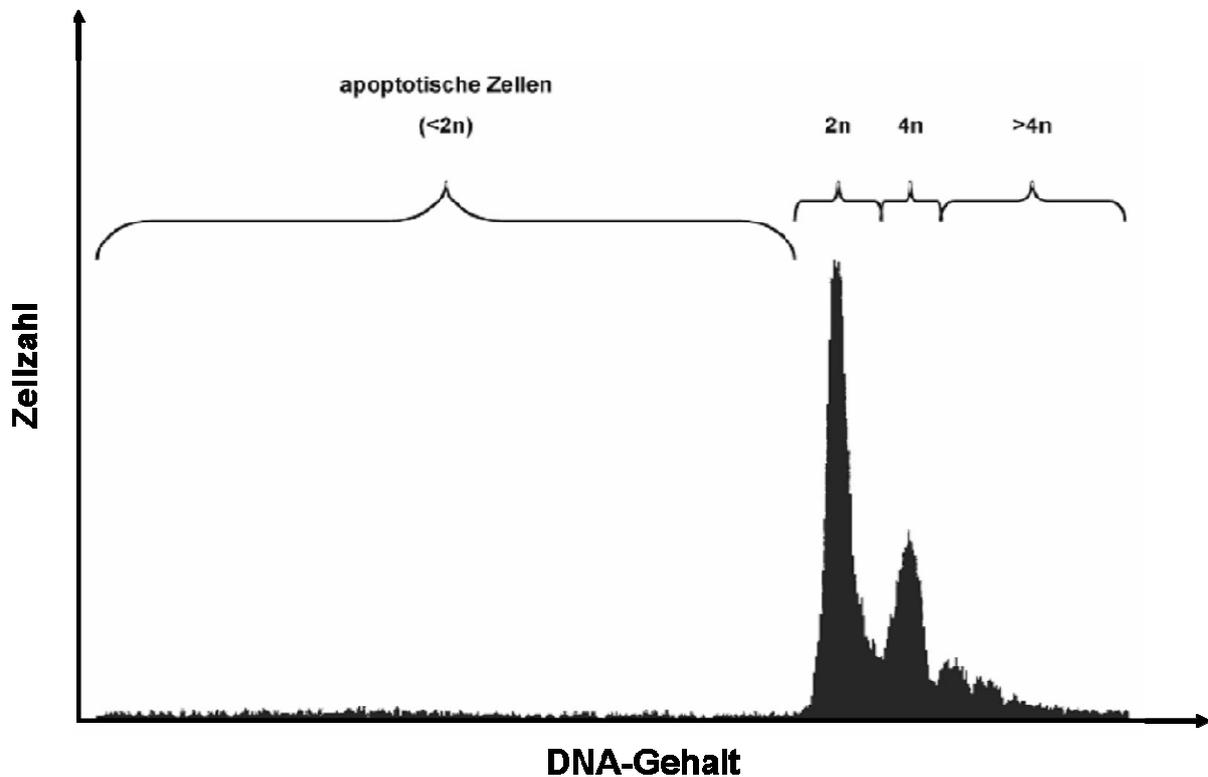
**Abbildung 73: Wachstumskurven von HCT116 und HCT116 p53-/- Zellen.**

Es wurden  $5 \times 10^4$  Zellen je Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät und die Zellzahl jeweils zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h und 72 h bestimmt. Für beide Zelllinien wurden bei allen Messungen Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die erhaltenen Messwerte wurden in exponentielle Funktionen umgewandelt.

Die Wachstumskurven der Zelllinien HCT116 und HCT116 p53-/- deuteten darauf hin, dass die HCT116-Zelllinie, der endogenes Wildtyp-p53 fehlte, gegen den unter normalen Bedingungen vorhandenen Stress (Produktion von reaktivem Sauerstoff etc.) weniger sensibel war. Die p53-negativen Zellen wuchsen also etwas schneller.

### 4.3.1.2 Zellzyklus-Verteilung in HCT116- und HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen

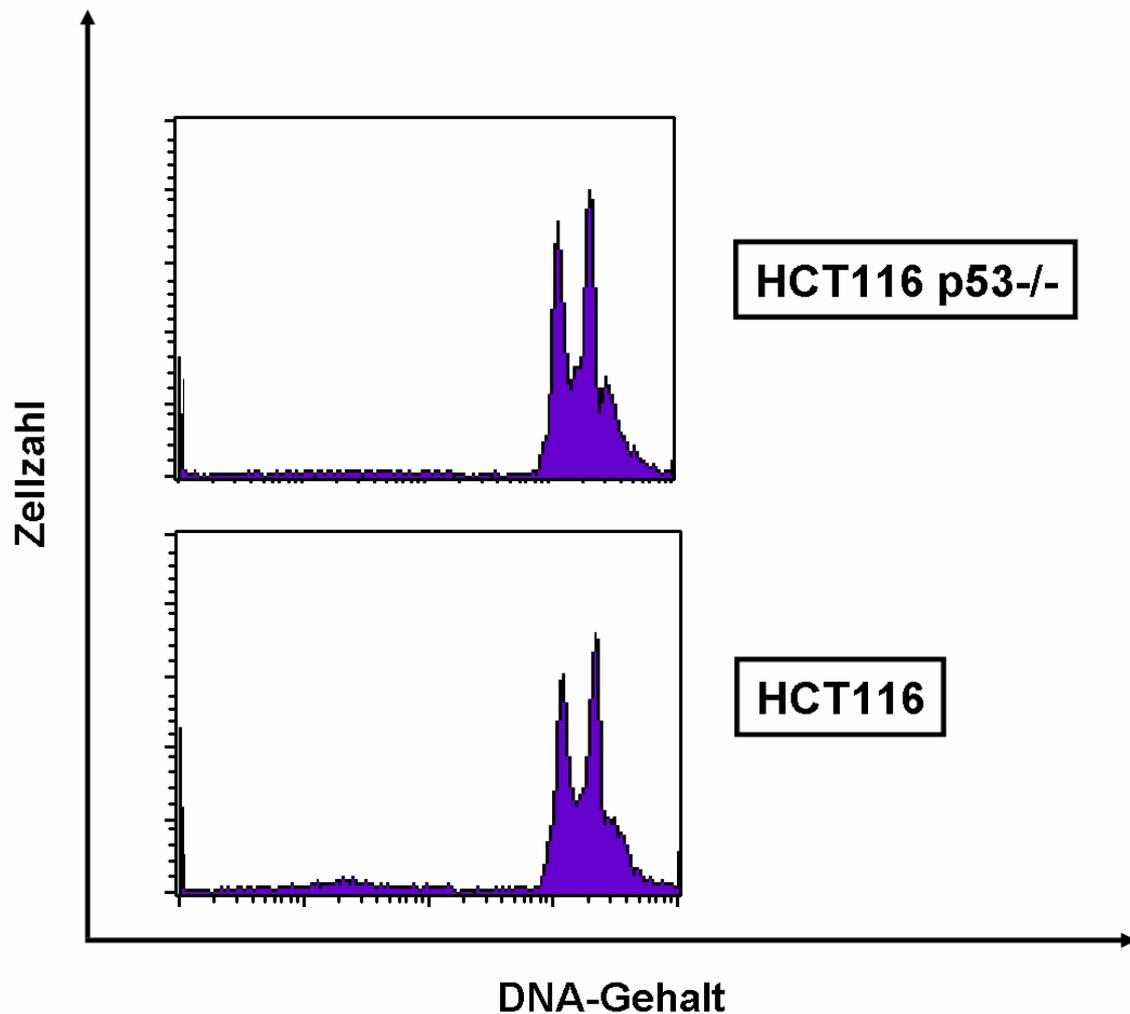
Nachfolgend wurden die beiden Zelltypen in der FACS-Analyse auf Unterschiede in der Zellzyklusverteilung untersucht. Abbildung 74 vermittelt ein Beispiel für eine typische FACS-Verteilung.



**Abbildung 74: Beispiel FACS-Profil**

Schematische Darstellung eines FACS-Profiles der HCT116-Zellen nach Färbung der DNA mit Propidiumiodid (PI). Markiert sind die verschiedenen Zellzyklusphasen, in der sich die Zellen befinden. In der G1-Phase beträgt der Chromosomensatz  $2n$ , in der G2/M-Phase, kurz vor der Zellteilung,  $4n$ . Bei allen Zellen mit einem DNA-Menge  $<2n$  handelt es sich per Definition um apoptotische Zellen. Alle Zellen mit einem DNA-Gehalt  $>4n$  werden als polyploid bezeichnet.

Zellen mit  $2n$  DNA-Gehalt befinden sich in der G1-Phase, Zellen mit einem  $4n$  in der G2- und Mitose-Phase, alle Zellen dazwischen synthetisieren neue DNA (S-Phase). Zellen mit  $>4n$  DNA-Gehalt sind polyploid und Zellen mit  $<2n$  DNA-Gehalt erleiden Apoptose.



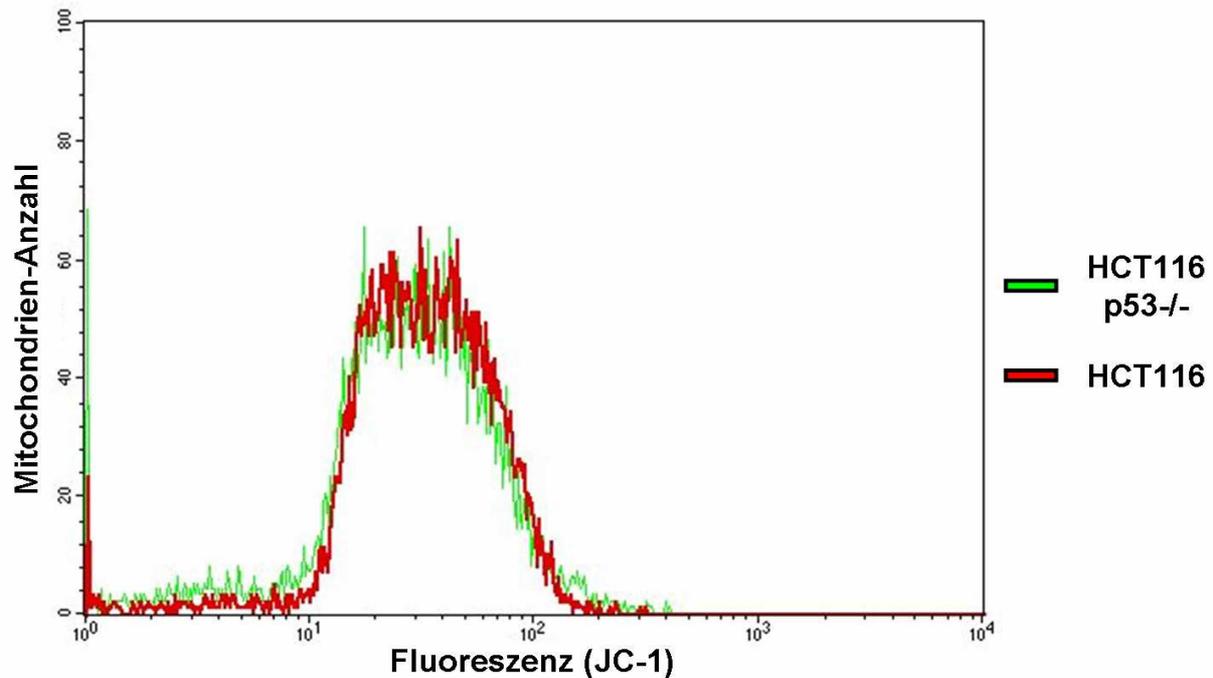
**Abbildung 75: Zellzyklus-Verteilung in HCT116 und HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen.**

Es wurden pro Loch einer 6-Loch-Platte  $3 \times 10^5$  Zellen ausgesät, nach 24 h wurde das Medium gewechselt und weitere 24 h später wurden die Zellen fixiert, mit Propidiumiodid gefärbt und das Zellzyklus-Profil mittels Durchflußzytometrie ermittelt.

Ein typisches FACS-Profil zeigte, dass, ungeachtet der leichten Unterschiede in der Wachstumskurve, beide Zelltypen eine etwa gleiche Zellzyklusverteilung aufwiesen. Lediglich etwas mehr Apoptose war in den HCT116-Kulturen zu sehen-wahrscheinlich aufgrund von stress-induzierter Aktivierung von p53 (Abbildung 75).

### **4.3.1.3 Vergleich der Mitochondrienanzahl und der mitochondrialen Genome in HCT116 und HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen**

Nachdem nun gezeigt worden war, dass beide Zelltypen ein etwa gleiches Wachstumsverhalten zeigen, sollte die relative Zahl der Mitochondrien und Mitochondrien-Genome pro Zelle bestimmt werden. Eine typische Zelle (zum Beispiel eine Leberzelle) enthält etwa 500 bis 2000 Mitochondrien, die etwa 20 % des Gesamtvolumens einnehmen. Bei Zellen mit einem sehr hohen Energiebedarf nehmen die Mitochondrien allerdings einen wesentlich höheren Anteil des Gesamtvolumens ein. So ist das Volumen in Zapfen-Sinnesrezeptoren des Auges bei ca. 80 %, im äußeren Augenmuskel bei ungefähr 60 %. In den Herzmuskelzellen liegt der Anteil an Mitochondrien bei ca. 40 %, in Thrombozyten sind hingegen nur 2-6 Mitochondrien vorhanden und in Erythrozyten findet man gar keine Mitochondrien. Wegen dieser Diskrepanz, die Mitochondrien-Menge pro Zelle betreffend, und auch weil die Menge der Mitochondrien einer Zelle, auch der Zellen in Kultur, deren Energiebedarf angepasst wird, schwankt, wollten wir bestimmen, ob in den ausgewählten Zelllinien die Mitochondrien-Menge annähernd gleich ist, da sich ansonsten keine Aussage über eventuelle Unterschiede bezüglich der mitochondrialen Transkript-Level treffen ließe. Zur Mitochondrienmassen-Bestimmung bedienten wir uns des Farbstoffs JC-1. Er passiert die Plasma- und auch die Mitochondrienmembran, wodurch die Mitochondrien angefärbt werden und mittels Durchflusszytometer gemessen werden können. Nach Anfärbung der Mitochondrien von HCT116- und HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen mit JC-1 und anschließender FACS-Messung wurde deutlich, dass in beiden Zelllinien etwa die gleichen Mitochondrienmengen vorhanden waren (Abbildung 76).



**Abbildung 76: Mitochondrienmassenbestimmung in HCT116- und HCT116 p53-/- Zellen**

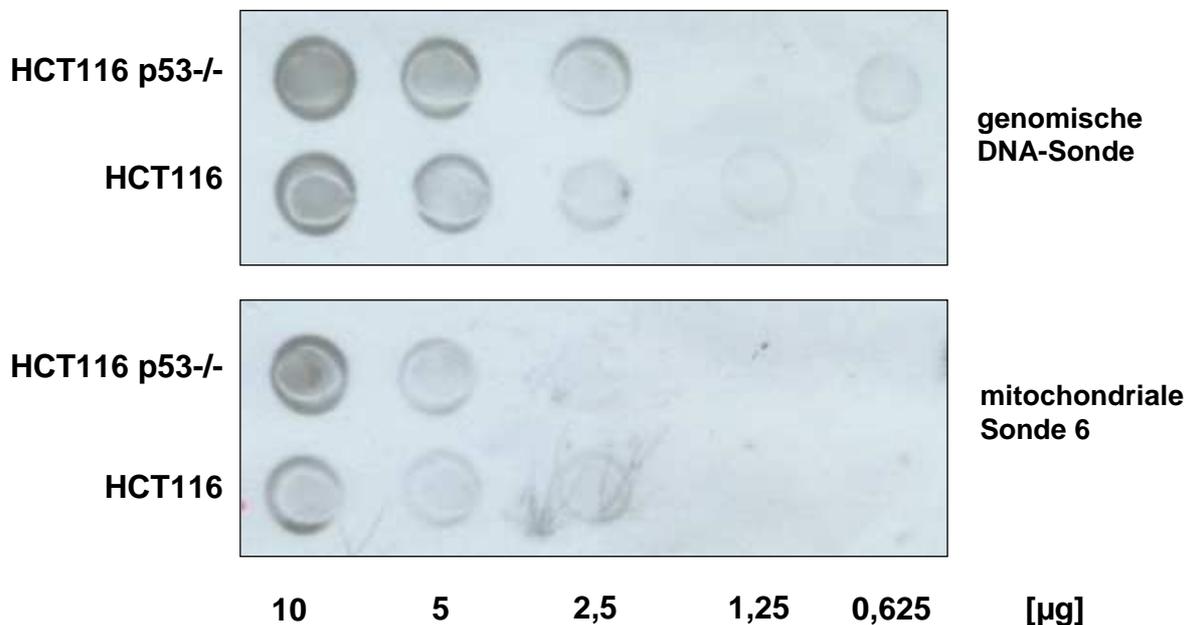
Es wurden  $2 \times 10^5$  HCT116- bzw. HCT116 p53-/- Zellen ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und vereinzelt, in Medium plus 0,2 % FKS aufgenommen und mit JC-1 (Endkonzentration: 2  $\mu$ M) 30 min bei 37°C gefärbt. Schließlich wurden die Zellen im Durchflußzytometer im Fluoreszenzkanal FL-1 gemessen.

Die Anzahl der Mitochondrien-Genome pro Mitochondrium variiert zwischen 10 und 15, d.h. die Anzahl der mtDNA-Moleküle schwankt je nach Zelltyp zwischen 100 und 10000 Kopien. Um auszuschließen, dass eventuelle Unterschiede der Transkriptlevel einfach nur auf unterschiedliche Mengen mitochondrialer Genome zurückzuführen ist, haben wir in der Folge Dot Blot-Analysen zur mtDNA-Bestimmung durchgeführt. Dazu mussten zunächst DNA-Sonden, die die mitochondriale DNA erkennen, generiert werden. Das mitochondriale Genom, das eine Größe von 16 kb hat, wurde in kleinere, etwa 2 kb große Stücke aufgeteilt. Um dies zu erreichen, bedienten wir uns der Methode der Polymerase- Kettenreaktion (PCR). Die Primer wurden so ausgesucht, dass die Fragmente sich 150 bp überlappen, damit man das komplette Genom überprüfen konnte (Abbildung 77).



Über eine an die Primer synthetisierte *KpnI*-Schnittstelle konnten die Fragmente nach Klonierung in den Klonierungsvektor pGEM®-T wieder aus dem Plasmid ausgeschnitten, über Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe des „NucleoSpin®“- Säulen der Firma Macherey- Nagel gemäß den Angaben des Herstellers aus dem Gel aufgereinigt werden. Diese aufgereinigten DNA-Fragmente dienten uns in den folgenden Versuchen als DNA-Sonden.

Für die Dot Blot-Analyse wurden verschiedene Mengen (10 µg, 5 µg, 2,5 µg, 1,25 µg und 0,625 µg) von mit dem „QIAmp DNA Blood Mini Kit“ (Qiagen) aufgereinigter und spektrometrisch vermessener und beschallter Gesamt-zellulärer DNA der beiden Zelllinien auf einer Nitrocellulose-Membran immobilisiert. Mit Hilfe einer mitochondrialen DNA-Sonde (in diesem Fall Sonde 6, Abbildung 77) wurde nun die Menge der mitochondrialen Genome in den HCT116- und den HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen miteinander verglichen. Ein weiterer Dot Blot, der mit einer genomischen DNA-Sonde ( $\beta$ -Aktin) inkubiert wurde, diente als Kontrolle, ob gleiche Mengen an DNA auf die Membran aufgetropft wurden (Abbildung 79).



**Abbildung 79: Dot Blot mit genomischer und mitochondrialer Sonde auf genomische DNA aus unbehandelten HCT116- und HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen**

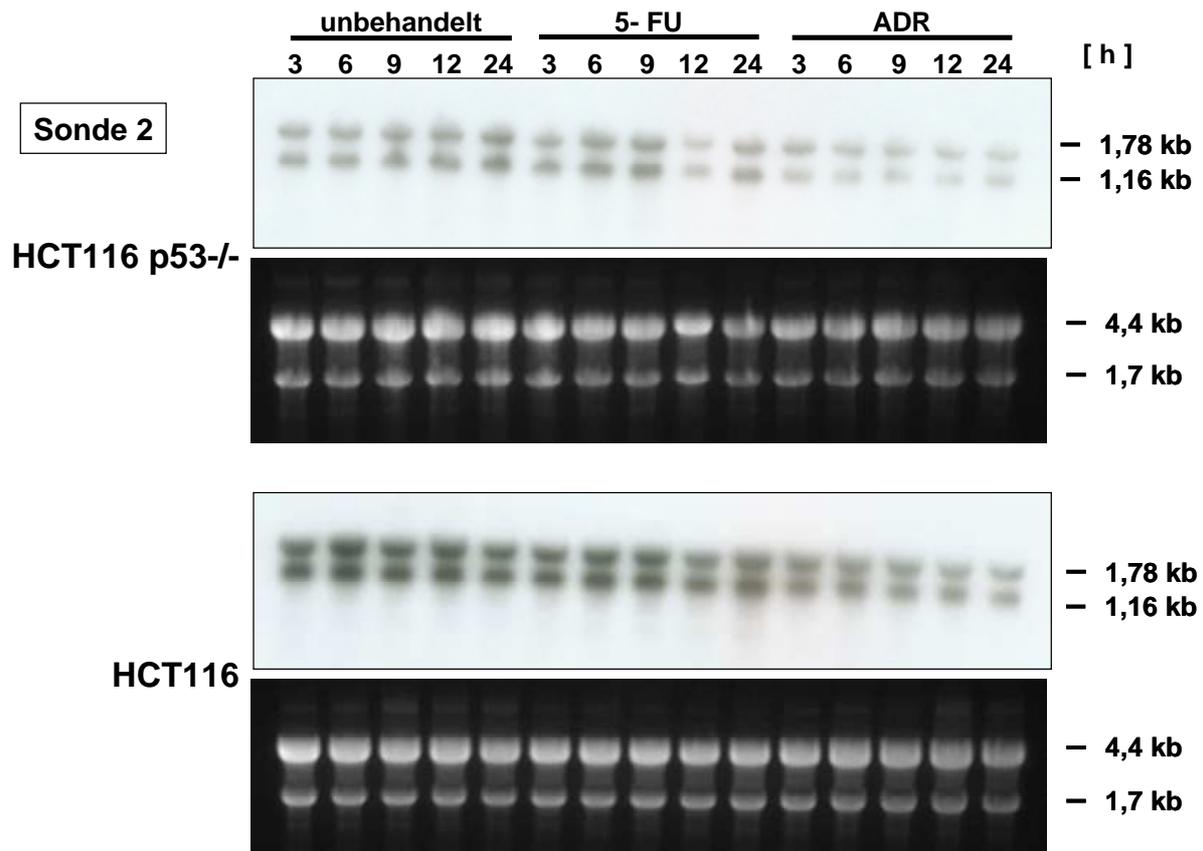
Jeweils 10, 5, 2,5, 1,25 und 0,625 µg genomischer und beschallter DNA jeder Zelllinie wurde auf einer Nitrocellulose-Membran immobilisiert, bei 65°C prähybridisiert und mit jeweils 100 ng einer genomischen DNA-Sonde ( $\beta$ -Aktin) oder der mitochondrialen DNA-Sonde 6 über Nacht bei 62°C inkubiert. Nach einigen Waschschritten wurde mit Hilfe des „CDP-Star<sup>TM</sup> chemiluminescent detection reagent“ entwickelt und auf einem Photofilm (Hyperfilm ECL, Amersham) für 2 h exponiert.

Es zeigte sich, dass von beiden Zelllinien annähernd die gleichen Mengen an genomischer DNA aufgetropft wurde, da die erhaltenen Signale aus HCT116- als auch aus HCT116 p53-/- vergleichbar waren. Außerdem zeigten diese Analysen insgesamt, dass beide Zelltypen nicht nur gleiche Mitochondrienmassen, sondern auch etwa gleiche Kopienzahlen an Mitochondrien-DNA aufwiesen.

### **4.3.2 Northern Blot-Untersuchungen an HCT116- und HCT116 p53 -/- Zellen**

Wir wollten nun untersuchen, ob sich die Transkriptlevel mitochondrialer Gene ändern, wenn sich der p53-Status ändert, das heißt in An- und Abwesenheit von p53. Außerdem sollten ungestresste Zellen mit genotoxisch gestressten Zellen verglichen werden.

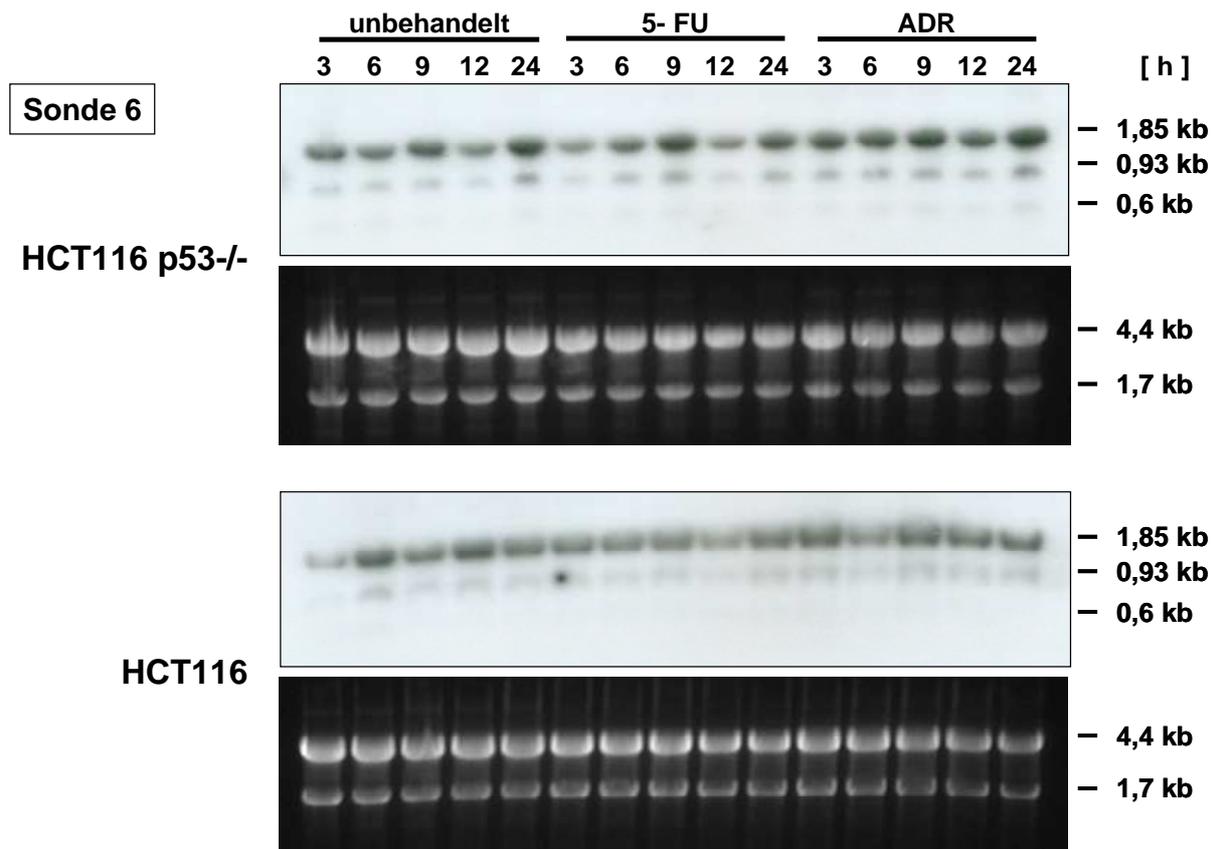
Das mitochondriale Genom enthält 37 Gene, von denen 13 für Proteine, 22 für tRNAs und 2 für rRNAs codieren. Das Genom besteht aus einem schweren Strang und einem leichten Strang. Die mitochondriale Transkription startet von 2 verschiedenen Promotoren, die sich beide in der regulatorischen Region der mtDNA, dem so genannten „D-Loop“ befinden. mtTFA initiiert die Transkription bidirektional, wodurch polyzistronische Transkripte in gegensätzlicher Richtung entstehen. Diese polyzistronischen Transkripte werden bereits während ihrer Synthese in reife mRNAs prozessiert (Clayton, 2000). Für unsere Studien konnten wir uns der unter 4.3.1.3 beschriebenen Sonden (Abbildung 77) bedienen. Abbildung 80 zeigt einen Northern Blot, bei dem die beiden Transkripte mit Hilfe der mitochondrialen Sonde 2 sichtbar gemacht wurden.



**Abbildung 80: Northern Blot mit mitochondrialer Sonde 2 auf RNA aus HCT116- und HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen behandelt mit 5FU oder Adriamycin.**

Aus HCT116- und HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen, die scheinbehandelt bzw. mit 5FU (375  $\mu$ M) oder Doxorubicin (ADR, 0,34  $\mu$ M) behandelt wurden, wurde zu den angezeigten Zeitpunkten RNA isoliert und 15  $\mu$ g auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Die Agarosegele wurden fotografiert. Man sieht, dass die Lademengen der RNAs relativ gleichmäßig waren (jeweils die unteren Bilder). Die RNA wurde dann über einen Kapillar-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und über Nacht mit 25 ng der radioaktiv markierten mitochondrialen Sonde 2 inkubiert und die Lichtemission durch Auflegen eines Films (Hyperfilm ECL, Amersham) detektiert.

Nach Northern Blot mit der mitochondrialen Sonde 2 ließen sich 2 Fragmente erkennen, ein 1,78 kb- und ein 1,16 kb-Transkript, die die erwarteten Größe der Transkripte, die die Sonde abdeckt, besitzen. Ohne Einwirkung von Stress blieben in beiden Zelllinien die Transkriptlevel der mitochondrialen Gene, die von dieser Sonde abgedeckt wurden, annähernd gleich. Bezüglich des p53-Status ließen sich jedoch, auch nach gentoxischem Stress durch 5FU oder Adriamycin, keine signifikanten und reproduzierbaren Unterschiede detektieren, die auf eine Funktion von p53 oder p53-regulierter Faktoren bei der mitochondrialen Transkription hätten schließen lassen.



**Abbildung 81: Northern Blot mit mitochondrialer Sonde 6 auf RNA aus HCT116- und HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen behandelt mit 5FU oder Adriamycin.**

Aus HCT116- und HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen, die scheinbehandelt bzw. mit 5FU (375  $\mu$ M) oder Doxorubicin (ADR, 0,34  $\mu$ M) behandelt wurden, wurde zu den angezeigten Zeitpunkten RNA isoliert und 15  $\mu$ g auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Die Agarosegele wurden fotografiert. Man sieht, dass die Lademengen der RNAs relativ gleichmäßig waren (jeweils die unteren Bilder). Die RNA wurde dann über einen Kapillar-Blot auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und über Nacht mit 25 ng der radioaktiv markierten mitochondrialen Sonde 6 inkubiert und die Lichtemission durch Auflegen eines Films (Hyperfilm ECL, Amersham) detektiert.

Bei Inkubation der geblotteten RNA mit der mitochondrialen Sonde 6 (Abbildung 77) waren 3 Fragmente detektierbar, die die erwartete Größe der Transkripte haben, nämlich 1,85 kb, 0,93 kb und 0,6 kb. Es traten bereits sowohl in den scheinbehandelten p53-defizienten als auch in den p53-kompetenten Zellen erhebliche Schwankungen auf, die wahrscheinlich darauf zurückzuführen sind, dass die Zellen nicht synchronisiert waren, sondern alle Phasen des Zellzyklus vorhanden waren (vergleiche Abbildung 75). Letztendlich hatten diese Untersuchungen also nicht die gewünschten Resultate gezeigt: Aufgrund der natürlichen Schwankungen in der Transkription der mitochondrialen Gene war eine Abhängigkeit von p53 nicht

---

detektierbar. Es bleibt bis auf weiteres also offen, ob p53 auf die mitochondriale Transkription Einfluß nehmen kann.

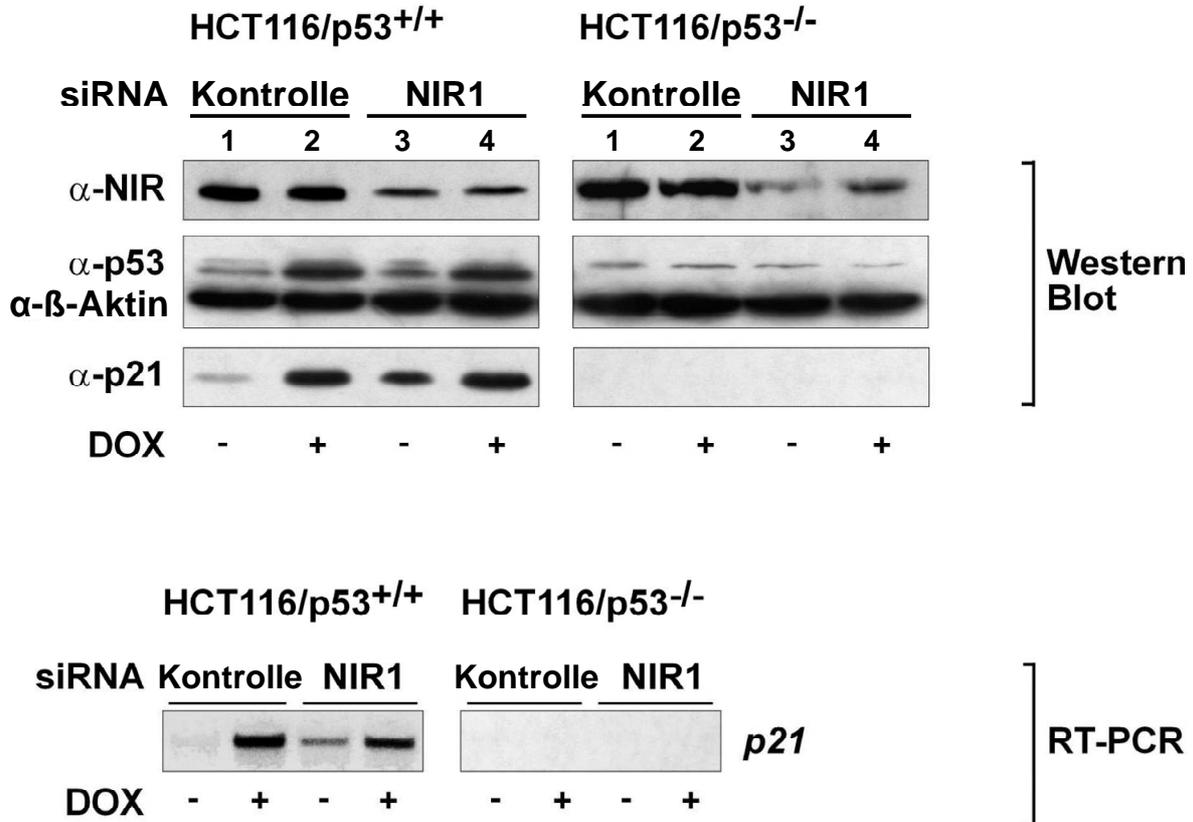
#### 4.4 Untersuchungen zur transkriptionellen Regulierung von p53 durch NIR

p53 transaktiviert Gene, die eine Zelle am Wachstum hindern oder aber zu programmiertem Zelltod führen. Das bedeutet, dass p53 auf alle Zellen potentiell toxisch wirkt. Jahrelang hatte man angenommen, dass p53 erst nach Einwirkung von Zellstress an die Promotoren der Zielgene wandert, um diese zu transaktivieren. Neuere Erkenntnisse haben jedoch überraschend gezeigt, dass p53 offenbar bereits ohne Einwirkung von Stress an den Promotoren einiger Zielgene gebunden ist, ohne diese jedoch zu transaktivieren (Kaeser und Iggo, 2002). Das warf die Frage auf, wie Promotor-assoziiertes p53 von Faktoren in Schach gehalten wird, damit es nicht schon im „Normalbetrieb“ der proliferierenden Zelle Gentranskription auslöst.

Wir konnten 2005 mit einer kooperierenden Arbeitsgruppe aus Freiburg einen neuen, gemeinsam mit p53 an den Promotoren der p53-Zielgene assoziierten Inhibitor von Histon-Acetyltransferasen (INHAT) identifizieren (Hublitz *et al.*, 2005) (siehe 1.4.3.2.4.1 und 1.4.3.2.4.2), den man NIR für „Novel INHAT Repressor“ nannte. Nachdem wir zeigen konnten, dass NIR alle Eigenschaften eines INHAT besitzt und mit p53 interagiert, wollten wir die biologische Relevanz der Interaktion zwischen p53 und NIR analysieren. In transienten Transfektionen einer Reihe von p53-defizienten Tumorzelllinien erwies sich NIR als potenter Repressor der Aktivierung von plasmidständigen und endogenen p53-responsiven Genen. Überexprimiertes NIR vermochte außerdem, die Stimulation von Promotoren durch aktiviertes p53 unter Einwirkung von genotoxischem Stress zu blockieren. ChIP-Assays demonstrierten, dass p53 NIR an diverse p53-responsive Promotoren rekrutieren kann. Interessanterweise verblieb NIR nach genotoxischem Stress zusammen mit p53 an den Promotoren.

Um die Effekte von endogenem NIR auf die p53-Funktionen weiter zu untersuchen, wurden von der Autorin zunächst HCT116-Zellen mit gegen NIR gerichteten siRNAs transient transfiziert. In Abwesenheit von zellulärem Stress induzierte ein NIR-Knockdown in p53-positiven, nicht aber in p53-defizienten HCT116-Zellen nach 48 h einen signifikanten Anstieg der endogenen p21-Protein- und mRNA-Expression (vergleiche Bahnen 1+3, Abbildung 82). Dies wies darauf hin, dass die beobachtete Erhöhung der p21-Expression nach NIR-Knockdown p53-abhängig ist. Unter

gentoxischem Stress war die p53-Antwort allerdings noch steigerbar, was auf die Relevanz weiterer negativer Regulatoren hindeutete (Bahnen 2+4, Abbildung 82).

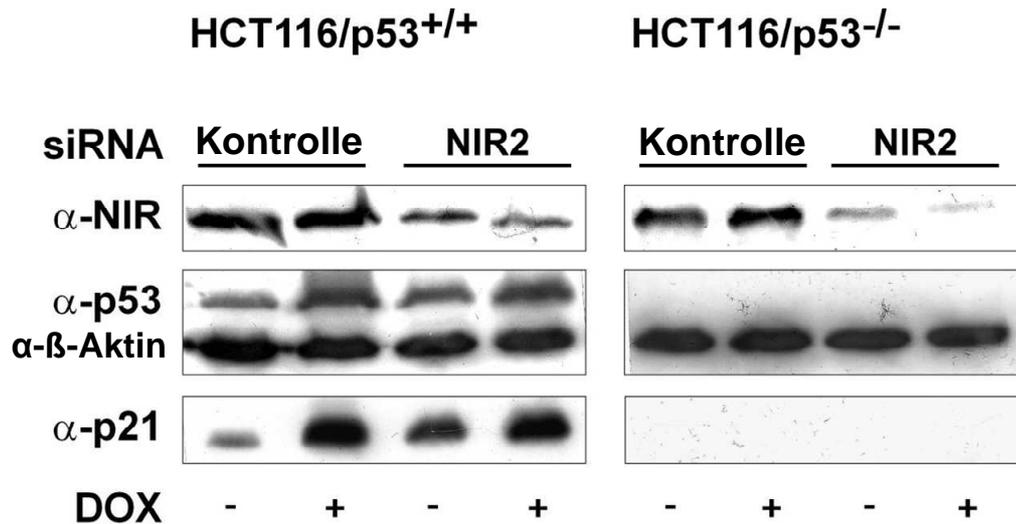


**Abbildung 82: NIR-Knockdown führt zu erhöhter p21-Protein- und mRNA-Expression in ungestressten HCT116-Zellen.**

3x10<sup>5</sup> Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und 24 h nach Aussäen mit irrelevanter Kontroll- oder NIR-siRNA transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen entweder schein-behandelt (-) oder mit 0,36 µM Doxorubicin (DOX; +). 3 d nach Transfektion und 24 h nach Behandlung wurden Gesamtproteine bzw. RNA isoliert. 15 µg Gesamtprotein wurden Western-Blot-Analysen mit anti-NIR-Antikörper (1:1000), anti-p53-Antikörper DO-1 (1:2000), anti-p21-Antikörper (1:1000) und anti-β-Aktin-Antikörper (1:5000) ausgesetzt. β-Aktin diente als Ladekontrolle. 4 µg der isolierten RNA wurden in cDNA umgeschrieben und die Expressionslevel des *p21Waf/Cip1*-Gens mit spezifischen Primern untersucht.

Der p53-Protein-Level selbst wurde bei Abwesenheit von Stress nicht signifikant beeinflusst.

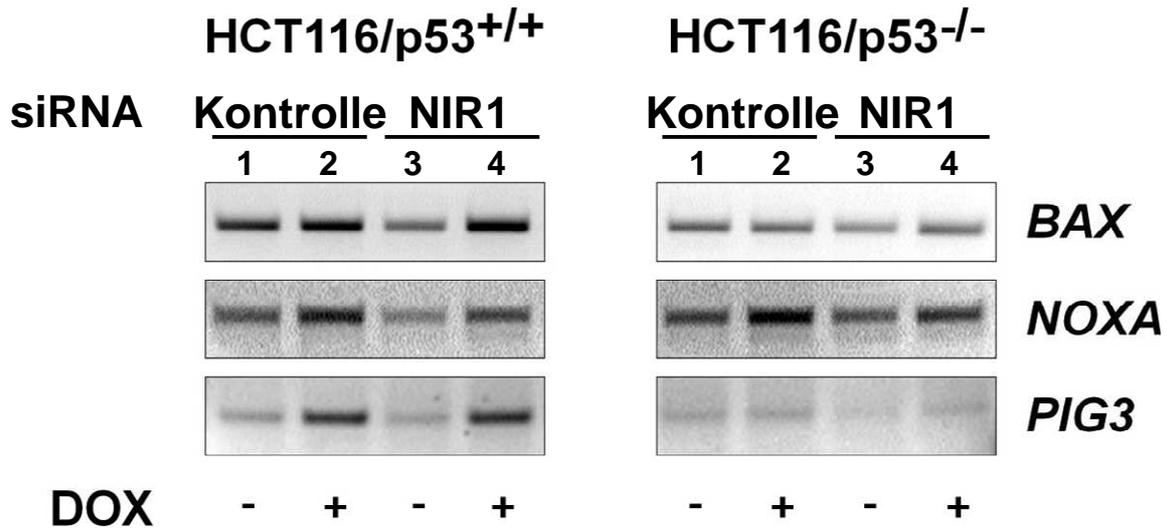
Ähnliche Resultate wurden auch mit einer zweiten unabhängigen NIR siRNA erhalten (Abbildung 83).



**Abbildung 83: NIR-Knockdown führt zu erhöhter p21-Protein- und mRNA-Expression in ungestressten HCT116-Zellen.**

$3 \times 10^5$  Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und 24 h nach Aussäen mit irrelevanter Kontroll- oder einer zweiten unabhängigen NIR-siRNA (NIR2) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen entweder schein-behandelt (-) oder mit  $0,36 \mu\text{M}$  Doxorubicin (DOX; +). 3 d nach Transfektion und 24 h nach Behandlung wurden Gesamtproteine isoliert.  $15 \mu\text{g}$  Gesamtprotein wurden Western-Blot-Analysen mit anti-NIR-Antikörper (1:1000), anti-p53-Antikörper DO-1 (1:2000), anti-p21-Antikörper (1:1000) und anti- $\beta$ -Aktin-Antikörper (1:5000) ausgesetzt.  $\beta$ -Aktin diente als Ladekontrolle.

Im Gegensatz zu p21 wurde die Expression von proapoptotischen p53-Zielgenen wie *bax*, *pig3* und *noxa* durch Depletion von NIR in Abwesenheit von Stress nicht signifikant beeinflusst (vergleiche Bahnen 1+3, Abbildung 84).

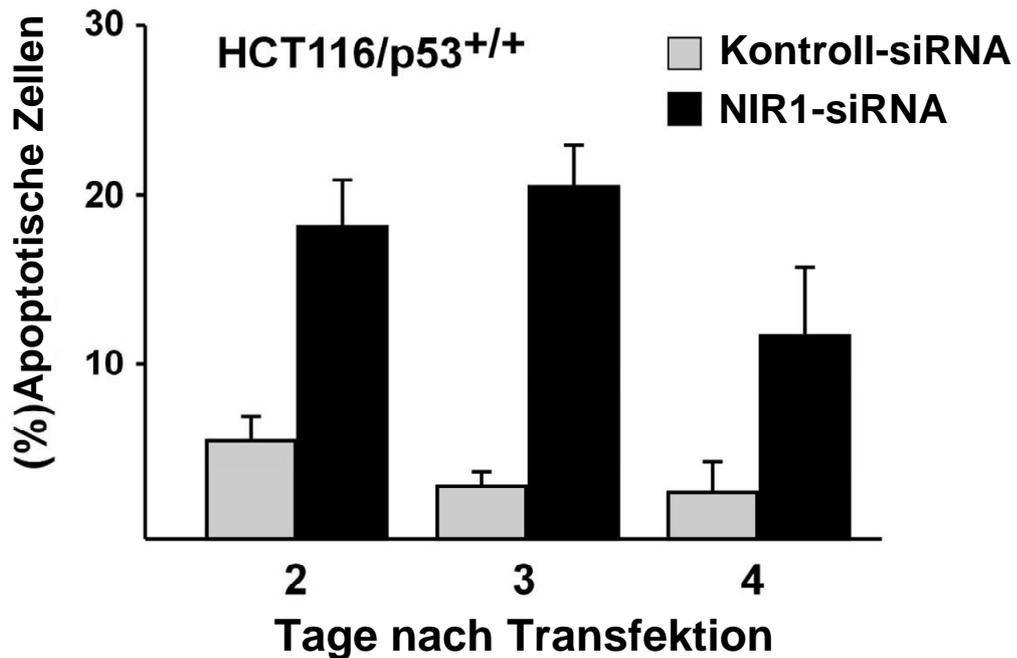


**Abbildung 84: NIR-Knockdown beeinflusst die Expression von proapoptotischen p53-Zielgenen in ungestressten HCT116-Zellen nicht.**

$3 \times 10^5$  Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und 24 h nach Aussäen mit irrelevanter Kontroll- oder NIR-siRNA (NIR1) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen entweder schein-behandelt (-) oder mit  $0,36 \mu\text{M}$  Doxorubicin (DOX; +). 3 d nach Transfektion und 24 h nach Behandlung wurde Gesamt-RNA isoliert.  $4 \mu\text{g}$  der isolierten RNA wurden in cDNA umgeschrieben und die Expressionslevel des *bax*-, des *noxa*- und des *pig3*-Gens mit spezifischen Primern untersucht.

Insgesamt zeigten die Resultate also, dass NIR ein *bona fide*-Co-Repressor von p53 ist, der nach Rekrutierung die Acetylierung der Histone an den p53-regulierten Promotoren *in vivo* blockiert.

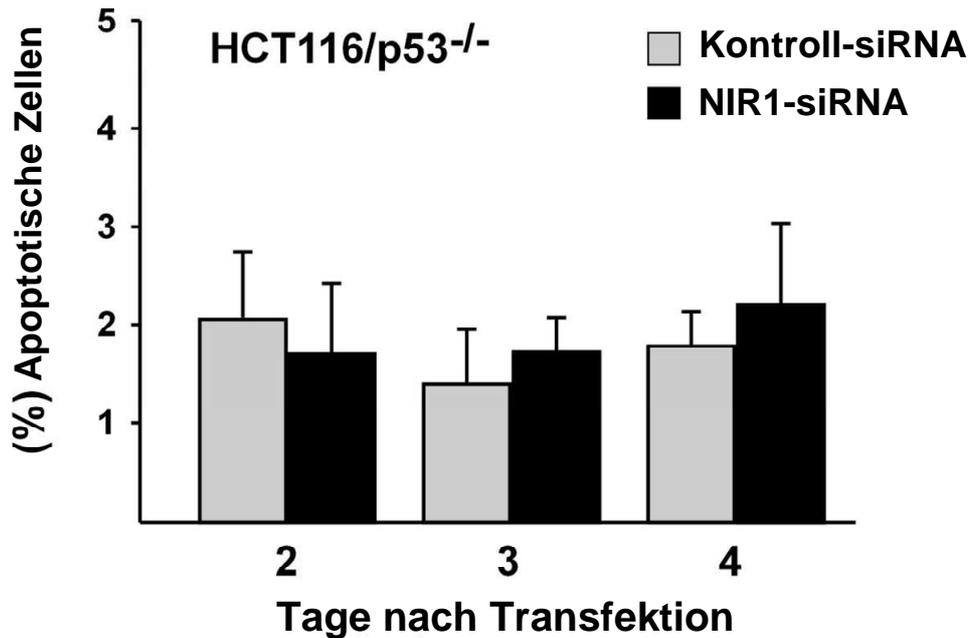
Anschließend fragten wir uns, ob NIR auch die p53-abhängige Apoptose reguliert. In HCT116-Zellen mit endogenem p53 resultierte ein NIR-Knockdown in einer signifikanten Erhöhung der Apoptoserate, während Behandlung der Zellen mit irrelevanter Kontroll-siRNA nur in einer minimalen Erhöhung der apoptotischen Zellen endete (Abbildung 85).



**Abbildung 85: NIR-Knockdown führt in HCT116-Zellen zu einer starken Apoptose-Antwort.**

$3 \times 10^5$  p53-positive HCT116-Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und 24 h nach Aussäen entweder mit Kontroll- oder NIR-siRNA (NIR1) transfiziert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet, fixiert, PI gefärbt und die Apoptoserate mittels FACS bestimmt.

Die Apoptose, die durch NIR-Depletion verursacht wurde, war an Tag 3 am höchsten. Im Gegensatz dazu wurde das Zellüberleben in p53-defizienten HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen durch NIR-Knockdown nicht beeinflusst (Abbildung 86).

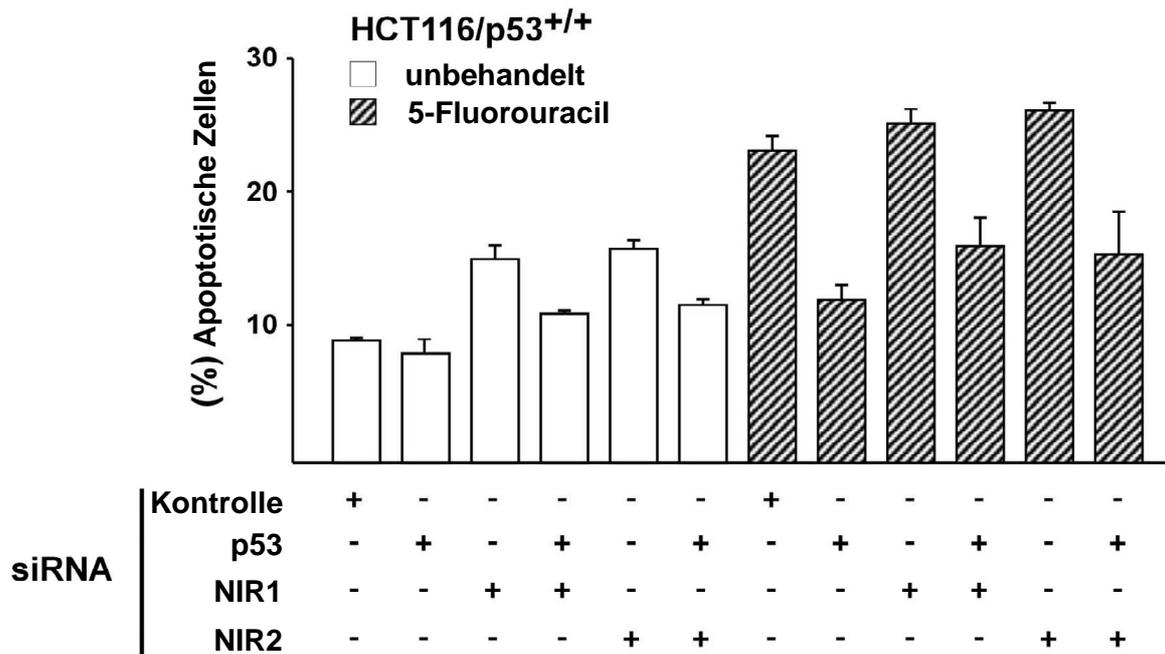


**Abbildung 86: NIR-Knockdown hat in HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen keinen Einfluß auf die Apoptose-Antwort.**

3x10<sup>5</sup> p53-negative HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und 24 h nach Aussäen entweder mit Kontroll- oder NIR-siRNA (NIR1) transfiziert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet, fixiert, PI gefärbt und die Apoptoserate mittels FACS bestimmt.

Zusammen mit der Beobachtung (Abbildung 84), dass NIR-KO nicht die p53-regulierten proapoptotischen Gene aktiviert, indizieren diese Daten, dass NIR-KO eine p53-abhängige Apoptose auslöst, welche über die bekannte Repression von anti-apoptotischen Genen durch p53 anstelle von Transaktivierung der proapoptotischen Gene vermittelt werden könnte.

Schließlich wurde eine gut-charakterisierte siRNA, die gegen p53 gerichtet war (QIAGEN, kommerziell erhältliche siRNA #1027020), eingesetzt, um p53 in HCT116-Zellen herunterzuregulieren. Abbildung 87 zeigt, dass die Depletion von NIR durch zwei unabhängige siRNAs (NIR1 und NIR2) die Apoptose in ungestressten HCT116-Zellen und in Abhängigkeit von p53 signifikant erhöht im Vergleich zu irrelevanter Kontroll-siRNA.



**Abbildung 87: Simultaner Knockdown von p53 und NIR resultiert in einer signifikanten Reduktion der Apoptose-Rate.**

$3 \times 10^5$  p53-kompetente HCT116-Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und 24 h nach Aussäen entweder mit Kontroll-, p53-, NIR1- oder NIR2-siRNA bzw. mit p53- und NIR1-siRNA oder p53- und NIR2-siRNA transfiziert. Die Zellen wurden 24 h entweder scheinbehandelt (weiß) oder mit  $375 \mu\text{M}$  5FU (schraffiert). 24 h später wurde geerntet, fixiert, PI gefärbt und die Apoptoserate mittels FACS bestimmt.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse dieses Teilprojektes demnach, dass das p53-interagierende, HAT-inhibierende NIR unmittelbar (in Abwesenheit von genotoxischem Stress) auf die Regulation von Genen durch p53 sowie auf das p53-abhängige Überleben einer Zelle Einfluß nehmen kann. Ob dieser potentiell wichtige Regulator auch andere Mitglieder der p53-Genfamilie zu regulieren und auf diese Weise Einfluß auf die Embryonalentwicklung zu nehmen vermag, wird gegenwärtig in unserer Arbeitsgruppe untersucht.

## 5 Diskussion

### 5.1 Mitochondriales p53 ist resistent gegen dominant-negative Effekte

p53 bindet an sein DNA-Erkennungsmotiv als Tetramer. Monomere des p53-Proteins können nicht als Transkriptionsfaktor wirken (Kitayner *et al.*, 2006). Multimere Transkriptionsfaktoren aber können, im Gegensatz zu monomeren Transkriptionsfaktoren, durch dominante Inhibition inaktiviert werden. So vermögen a) die Sequestrierung limitierender Faktoren durch eine überexprimierte Mutante, b) Promotor-Besetzung durch transaktivierungs-defekte Isoformen oder c) aber Kontamination des Multimers durch mutierte Monomere die Aufgaben des multimeren Transkriptionsfaktor erheblich zu beeinträchtigen. Obwohl von den letzten beiden Mechanismen bekannt ist, dass sie p53 *in vitro* und *in vivo* negativ beeinflussen (Übersicht in Blagosklonny, 2000; Roemer, 1999; Sigal und Rotter, 2000), wurden in letzter Zeit Beobachtungen gemacht, die das Konzept der dominant-negativen Einwirkungen auf p53 angefochten haben. Zweifellos hat die Beobachtung, dass von 159 beschriebenen humanen Tumoren, die bis Mitte 2007 auf „Loss-of-Heterozygosity“ untersucht wurden und von denen jeder eines aus 90 verschiedenen mutierten p53-Allelen exprimiert, annähernd 60 % das Wildtyp-Allel verloren haben (Olivier und Hainaut in Dearth *et al.*, 2007) die globale Bedeutung der Dominanz in Frage gestellt. In dieser Hinsicht ebenso negativ war die Beobachtung, dass fast 50 % der Tumore, die in Li-Fraumeni-Patienten mit einem geerbten Allel für mutiertes Volllängen-p53 entstehen, das Wildtyp-p53-Allel verloren haben (Birch *et al.*, 1998; Varley *et al.*, 1997). Auf der anderen Seite gibt es auch einige wichtige Beobachtungen, die die Bedeutung der Dominanz hervorheben. So sind beispielsweise nur 50 % der Li-Fraumeni-Tumoren mit einem Allel für mutiertes Volllängen-p53 Wildtyp-p53-defizient, während sich dieses Phänomen in fast 100 % der Li-Fraumeni-Tumoren mit einem geerbten defekten p53-Allel, das gar kein Protein produziert, beobachten lässt (Birch *et al.*, 1998; Varley *et al.*, 1997).

Ein weiteres starkes Argument, das für dominante Inhibition spricht, kommt aus Studien mit transgenen Mäusen, obwohl in diesem System die Dominanz aus zwei Gründen schwieriger einzuschätzen ist: Erstens zeigen die beiden p53-Mutationen 172H und 270H (äquivalent den humanen 175H bzw. 273H), die in zwei zentralen

Studien (Lang *et al.*, 2004; Olive *et al.*, 2004) über Knock-In in die Keimbahn der Maus eingebracht wurden, zusätzliche Wildtyp-p53-unabhängige onkogene Funktionen, nämlich „Gain-of-Function“, die die dominant-negativen Effekte überlagern könnten. Zweitens behalten murine p53<sup>+/-</sup> Zellen, im Gegensatz zu humanen p53<sup>+/-</sup> Zellen, bei maligner Transformation ihr Wildtyp-p53-Allel (Venkatachalam *et al.*, 1998). Dies zeigt, dass Mäuse, im Gegensatz zu Menschen, eine Gendosisreduktion aufweisen können, die einen kompletten p53-Verlust (hinsichtlich Tumorentstehung) nachstellt. Dennoch zeigten Studien in primären Fibroblasten von 172H/+ und 270H/+ Mäusen, die mit Zellen aus +/- Tieren verglichen wurden, dass die mutierten Proteine dominant-negativ wirken können (Lang *et al.*, 2004; Olive *et al.*, 2004). Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Daten also, dass Hetero-Tetramerisierung Wildtyp-p53 in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor außer Gefecht setzen kann (Blagosklonny, 2000; Roemer, 1999; Sigal und Rotter, 2000; Vousden und Lane, 2007). Der Grad der Inhibition durch eine Mutante ist abhängig von dem Verhältnis Mutante/Wildtyp, der Lokalisation der Mutation sowie dem Zelltyp (Chan *et al.*, 2004; Dearth *et al.*, 2007; Nicholls *et al.*, 2002).

Unsere hier vorgestellten Ergebnisse sehen Hinweise, dass der extranukleäre mitochondriale Apoptose-Signalweg, der von p53 induziert wird, relativ resistent gegenüber dominanter Inhibition ist, weil mitochondriales p53 hauptsächlich monomer vorliegt. Dies führt zu der Frage, ob monomeres p53 überhaupt mitochondriale Apoptose auslösen kann. Die Gruppe um Ute Moll hat in überzeugender Weise demonstriert, dass zu den Mitochondrien geleitetes monomeres p53 nicht nur dazu in der Lage war, Apoptose hervorzurufen, sondern auch der effizienteste Zelltod-Induktor aller getesteten p53-Proteine war (Marchenko *et al.*, 2000). Diese Gruppe zeigte ebenfalls, dass zu den Mitochondrien geleitetes p53 selbst in den Zellen Apoptose induzieren kann, in denen eine p53-Mutante exprimiert wird (Palacios und Moll, 2006). Damit ist indiziert, dass monomeres p53 an den Mitochondrien tatsächlich Zelltod hervorrufen kann.

Weiterhin stellt sich die Frage, warum 40 % der Tumoren, die ein mutiertes und ein Wildtyp-Allel enthalten und in denen die dominante Inhibition somit aktiv ist, nicht über diesen Signalweg sterben, wenn die p53-vermittelte mitochondriale Apoptose resistent gegenüber dominanter Inhibition ist. Verschiedene Aspekte sind hier von Bedeutung. Erstens könnten solche Tumoren andere Mittel und Wege entwickelt

haben, um den mitochondrialen Zelltodweg beeinträchtigt zu haben, wie zum Beispiel die Überexpression von Bcl2 oder BclXL, bzw. die Herunter-Regulation von Bax oder Bak.

Zweitens benötigt die Translokation von Wildtyp-p53 zu den Mitochondrien weiterhin ein Stress-Signal, selbst in Zellen, die mutiertes p53 exprimieren (siehe auch Abbildung 42). Folglich könnte die p53-abhängige Apoptose in diesen Tumoren ablaufen trotz der Inhibition der p53-Kernfunktionen als Transkriptionsfaktor durch die Mutante, aber dies erfordert Stress, wie zum Beispiel Chemotherapie, um in Erscheinung treten zu können.

Drittens konnten Chipuk und Mitarbeiter zeigen, dass Zelltypen existieren, in denen die effiziente mitochondriale Apoptose, die durch p53 eingeleitet wird, von der Transaktivierung des p53-Zielgens *PUMA* abhängig ist. *PUMA* zerlegt einen inaktiven cytosolischen p53/BclXL-Komplex und aktiviert somit proapoptotisches Bax durch freies cytoplasmatisches p53 (Chipuk *et al.*, 2005). Infolgedessen wäre natürlich die extranukleäre Apoptose-Induktion durch p53 beeinträchtigt, wenn Tumoren, die Wildtyp-p53 und dominant-negativ wirkende Mutanten co-exprimieren, zu einem solchen Zelltyp gehören würden, trotz der Resistenz von mitochondrialem p53 gegenüber dominanter Inhibition durch Heterotetramerisierung.

Viertens könnten sich einige dieser *PUMA*-sensitiven Tumoren aus Zellen entwickelt haben, die dazu fähig sind, die p53-verwandten Proteine p63 und p73 zu mobilisieren, damit diese zur Transaktivierung von *PUMA* beitragen. In solchen Tumoren spielt es eine Rolle, ob es sich bei der p53-Mutante um eine Klasse I-Mutante mit Wildtyp-p53-Konformation oder um eine Klasse-II-Mutante mit veränderter Konformation handelt. Klasse-II- aber nicht Klasse-I-Mutanten können an p63 und p73 binden, um diese zu inhibieren. Dies wird als einer der „Gain-of-Function“-Mechanismen betrachtet (Li und Prives, 2007). Folglich könnten Tumoren mit dem Genotyp Wildtyp-p53/Klasse-II-Mutante einen „Gain-of-Function“-Phänotyp bezüglich der Beeinträchtigung der mitochondrialen Apoptose zeigen, während Wildtyp-p53/Klasse-I-Mutante-Tumoren diesen Phänotyp nicht zeigten.

Wesentlich ist, dass all diese Hypothesen experimentell überprüft werden können. Zusammengefasst sollte die Resistenz des mitochondrialen monomeren p53 gegenüber dominanter Inhibition durch Heterotetramerisierung den Selektionsdruck auf gestresste Tumoren mit einem mutierten *p53*-Allel erhöhen, die mitochondriale Apoptose-Funktion zu verlieren.

Kontamination des Wildtyp-p53-Tetramers mit mutiertem p53 über Heterotetramerisierung ist ein sehr ineffizienter Weg, p53 zu inaktivieren (Chan *et al.*, 2004; Nicholls *et al.*, 2002), wohingegen dominante Inhibition über transaktivierungsdefekte ( $\Delta N$  oder  $\Delta TA$ ) Isoformen, zum Beispiel  $\Delta TA$ -p53 oder  $\Delta TA$ -p73, sehr viel effizienter erscheint (Chan *et al.*, 2004; Stiewe *et al.*, 2002). Dieser Mechanismus kann die Bildung von Hetero-Tetrameren zwischen Wildtyp-p53 und  $\Delta N$ -p53 miteinbeziehen, wobei offenbar ein einziges verkürztes Protein pro Tetramer ausreicht (Chan *et al.*, 2004), um die Transaktivierung durch p53 zu blockieren. Es kann natürlich auch kompetitive Promotor-Besetzung durch  $\Delta N$ -p53 oder  $\Delta N$ -p73 involvieren (Chan *et al.*, 2004; Stiewe *et al.*, 2002). Die immense Effizienz dieses inhibitorischen Mechanismus' könnte ein Grund für die Tatsache sein, dass er eine wichtige Bedeutung in einigen physiologischen Prozessen spielt. Beispielsweise stellt  $\Delta N$ -p73 einen sehr effizienten und vielleicht sogar den primären Inhibitor p63-vermittelter Apoptose während der neuronalen Entwicklung sowie p53-vermittelter Apoptose als Antwort auf Schädigung adulter Nervenzellen und Neurodegeneration dar (Miller und Kaplan, 2007). Aufgrund dieser effizienten Inhibition scheint es nicht verwunderlich, dass  $\Delta TA$ -Isoformen des p73-Proteins ebenfalls in Tumoren gefunden wurden.  $\Delta TA$ -p73-Überexpression ist jedoch, insgesamt gesehen, in Tumoren ziemlich selten, verglichen mit p53-Mutationen, obwohl diese Isoform ein sehr effizienter Inhibitor von sowohl p53 als auch proapoptotischem Volllängen-p73 ist (Stiewe *et al.*, 2002). Man könnte daher spekulieren, dass sich die mitochondriale Apoptose-Funktion von p53, die  $\Delta TA$ -p73-resistent erscheint, zumindest in einigen Zelltypen als „Absicherungs-(fail-safe-)Mechanismus“ entwickelt hat, um den starken dominant-negativen Effekten dieser Moleküle entgegenzuwirken.

Monomeres p53 entgeht nicht nur der dominanten Inhibition über Heterotetramerisierung, sondern auch der Ubiquitylierung über die E3/E4-Ubiquitin-Ligase Mdm2, da Mdm2 ausschließlich an tetrameres p53 zu binden vermag (Marston *et al.*, 1995). Auf der anderen Seite kann (Multi-) Mono-Ubiquitylierung von p53 durch Mdm2, im Gegensatz zu Poly-Ubiquitylierung, die mit p53-Degradation assoziiert ist, die mitochondriale p53-Translokation fördern (Marchenko *et al.*, 2007). In Übereinstimmung damit konnte die Apoptose- und Tetramerisierungs-defekte p53-Mutante 337C (Atz *et al.*, 2000), die man in Li-Fraumeni-Patienten findet, nach Zellstress nicht zu den Mitochondrien translozieren (unsere unveröffentlichten Beobachtungen). Anhand dieser Beobachtungen und dem

kürzlichen Befund, dass cytoplasmatisches p53, das durch cytoplasmatisches Mdm2 mono-ubiquitinyliert wurde, zu den Mitochondrien transloziert, ohne Mdm2 mitzunehmen (Marchenko *et al.*, 2007), deutet sich an, dass die Monomerisierung von p53 in gestressten Zellen irgendwo zwischen dieser Modifizierung und der Aktivität von p53 an den Mitochondrien abläuft.

## 5.2 Die Herkunft von mitochondrialem p53

p53 transloziert nach Zellstress an die Mitochondrien, um dort ein transkriptionsunabhängiges Apoptose-Programm zu induzieren, durch das es zu einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrien-Membran und somit zur Freisetzung apoptotischer Faktoren aus dem Intermembranraum der Mitochondrien kommt (zusammengefasst in Moll *et al.*, 2007). Dies führt schließlich zur Aktivierung der Caspase-Kaskade und zum Selbstmord der geschädigten Zelle. Die Herkunft von mitochondrialem p53 blieb jedoch bislang ungeklärt. So ist es möglich, dass p53 direkt nach seiner Translation im Cytoplasma verbleibt, ohne in den Zellkern transportiert zu werden, um dann an den Mitochondrien nach Einwirkung von onkogenen Schäden schneller zwecks Apoptose-Induktion zur Verfügung zu stehen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass p53 nach seiner Translation zuerst in den Zellkern transportiert wird und hier in einen nukleären p53-Pool wandert. Dies schien vor allem wegen der Anwesenheit eines nukleären Importsignals am C-Terminus des p53-Proteins einleuchtend. Auch die Beobachtung der Arbeitsgruppe um Arnold Levine 1998, dass der nukleäre p53-Gegenspieler Mdm2 zur p53-Translokation vom Kern ins Cytoplasma unbedingt notwendig ist (Roth *et al.*, 1998), sprach eher dafür, dass cytoplasmatisches/mitochondriales p53 aus dem Zellkern stammt.

Andererseits gab es auch Arbeiten, die diesen Beobachtungen widersprachen. So konnten Natasha Marchenko und Mitarbeiter 2007 zeigen, dass das Cytoplasma einen separaten p53-Pool enthält, der allem Anschein nach die Hauptquelle von mitochondrialem p53 ist. Wir sind dieser bedeutenden Frage ebenfalls auf den Grund gegangen. Dafür bedienten wir uns Tumorzellen, die mit den Reagenzien Resveratrol oder Adriamycin behandelt wurden. Unsere Daten zeigen, dass Resveratrol ein tumorspezifisches Chemopräventivum darstellt, das keinerlei Wirkung etwa auf die primäre Hautfibroblasten-Zelllinie WS-1 zeigt. In Kolonkarzinom-, Brustkrebs sowie

Lungenkrebs-Zellen verursacht Resveratrol hingegen eine robuste Apoptose, die dadurch ausgelöst wird, dass p53 nach Resveratrol-Behandlung aktiviert wird und an die Mitochondrien transloziert, um dort Bax und Bak zu aktivieren (Pöhland *et al.*, 2006). Durch diese p53-induzierte Aktivierung vermögen die beiden Proteine zu homooligomerisieren und somit die äußere Mitochondrienmembran zu permeabilisieren, wodurch die apoptotischen Co-Faktoren ins Cytoplasma austreten und die Zelle schließlich stirbt.

Im Einklang mit vorherigen Daten verursachte Adriamycin-Behandlung hingegen keine vergleichbare Apoptose trotz ähnlicher Aktivierung des p53-Proteins (Mahyar-Roemer *et al.*, 2004). Dies liegt daran, dass p53 nach Adriamycin-Behandlung im Zellkern akkumuliert und nicht ins Cytoplasma transportiert wird (siehe Abbildung 64), um direkt an den Mitochondrien Zelltod auszulösen. Adriamycin scheint im Zellkern zu verbleiben, um das p53-Zielgen *p21* zu transaktivieren, damit dieses einen G2/M-Arrest (Bunz *et al.*, 1999) oder einen G1-Arrest (Mahyar-Roemer *et al.*, 2004) auslösen kann. Damit bleibt der Zelle genügend Zeit, den Schaden zu reparieren, falls dieser nicht zu groß ist. Adriamycin jedenfalls diente in unseren Untersuchungen als Kontrolle für eine nukleäre Akkumulation von p53. Resveratrol dagegen induzierte eine p53-Translokation zu den Mitochondrien.

Nach Herunter-Regulierung der zellulären Mdm2-Level mittels RNA-Interferenz und anschließender Behandlung mit Resveratrol konnten wir nach Zellfraktionierung beobachten, dass die cytoplasmatischen p53-Level deutlich reduziert waren (siehe Abbildung 70). Dies zeigte uns, dass mit Mdm2 ein Faktor fehlte, um p53 im Cytoplasma zu lokalisieren. Wir deuten dies als indikativ, dass Mdm2 tatsächlich notwendig ist für eine effiziente p53-Translokation aus dem Kern an die Mitochondrien, eine Deutung, die im Einklang mit vorherigen Daten ist (Roth *et al.*, 1998). Auch Li und Mitarbeiter zeigten 2003, dass Mdm2 für eine p53-Translokation ins Cytoplasma ein entscheidender Faktor ist: Mdm2 vermag p53 zu monoubiquitinylieren, wodurch dieses an die Mitochondrien transportiert wird. Als wir die Proteinneusynthese hemmten, um ausschließen zu können, dass cytoplasmatisches p53 neu gebildet wurde, konnten wir beobachten, dass nach Resveratrol-Behandlung p53 dennoch im Cytoplasma zu detektieren war. Dies unterstrich, dass nach Schädigung der Zelle mit Resveratrol eine Translokation des Tumorsuppressorproteins p53 aus dem Zellkern ins Cytoplasma stattfindet.

Auch die Daten aus unserer Gruppe aus dem Jahre 2004 deuten eher auf die Herkunft mitochondrialen p53's aus dem Zellkern. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass mitochondriales p53 am Serin 15 eine Phosphorylierung trägt. Diese Phosphorylierung wurde durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitoren Wortmannin und Koffein blockiert, was darauf schließen lässt, dass die rein im Zellkern vorkommenden Kinasen ATM und ATR für die Serin 15-Phosphorylierung verantwortlich sind (Mahyar-Roemer *et al.*, 2004). Auch die Untersuchungen an den beiden p53-Varianten p53 Arg72 und p53 Pro72 zeigen, dass mitochondriales p53 eher aus dem Zellkern kommt als aus dem Cytoplasma. Dumont und Mitarbeiter konnten nämlich zeigen, dass die beiden p53-Varianten dieselbe transkriptionelle Aktivität besitzen, die Arg72-Variante jedoch weitaus potenter erscheint, den programmierten Zelltod zu induzieren. Dieser Unterschied im apoptotischen Potential resultiert offenbar aus der unterschiedlichen Fähigkeit der beiden p53-Varianten, mit dem Kernexport-Protein CRM-1 zu interagieren und somit zu den Mitochondrien zu translozieren. Auch dadurch, dass Arg72 stärker ubiquitinyliert wird als Pro72, kommt es zu einem verstärkten Export dieser Variante.

Zusammengefasst unterstützen unsere bisherigen Resultate also, dass mitochondriales p53 aus dem Zellkern kommt und nicht aus einem separaten p53-Pool aus dem Cytoplasma stammt.

### **5.3 Hat p53 Effekte auf die mitochondriale Transkription?**

Die Hauptaufgabe des Tumorsuppressorproteins p53 ist die Transaktivierung diverser kernständiger Gene, deren Genprodukte es nach Einwirkung von Zellstress bedarf, damit die Zelle nicht zu einer Krebszelle mutiert. Es wurde vor einigen Jahren publiziert, dass p53 nicht nur AN den Mitochondrien zu finden ist (Marchenko *et al.*, 2000), sondern auch innerhalb der mitochondrialen Matrix, in der bis zu 10 mitochondriale DNA-Genome zu finden sind (Mahyar-Roemer *et al.*, 2004). Nun stellte sich die Frage, ob p53 in seiner klassischen Rolle als Transkriptionsfaktor auch an der Transkription des mitochondrialen Erbguts beteiligt sein könnte.

Die Transkription des zirkulären mitochondrialen Genoms wird in gegensätzlicher Richtung von zwei verschiedenen Promotoren (Promotor für den „heavy strand“ P<sub>H</sub> und Promotor für den „light strand“ P<sub>L</sub>, siehe Abbildung 77) initiiert. Die Promotoren

befinden sich direkt neben dem annähernd 1 kb großen dreisträngigen Displacement-Loop (D-Loop), einer nicht-codierenden regulatorischen Sequenz innerhalb der mitochondrialen DNA. Die Transkription der mitochondrialen DNA erfordert die Aktivität Kern-codierter Faktoren oder Enzyme. So wird die Transkription von einer Bakteriophagen-homologen nukleär-codierten mitochondrialen RNA-Polymerase durchgeführt. Die Transkription resultiert in der Bildung von drei polyzistronischen RNAs, die bereits während der Synthese in die reifen RNAs gespalten werden (Clayton, 2000). Sowohl der „heavy strand promotor (HSP)“ als auch der „light strand promotor (LSP)“ werden durch den mitochondrialen Transkriptionsfaktor A (mtTFA) und durch die Transkriptionsfaktoren TFBM1 und 2, die die Kern-RNA-Polymerasen kontaktieren, reguliert (Falkenberg *et al.*, 2002).

Mitochondriale Transkriptionsfaktoren tragen eine mitochondriale Targeting-Sequenz, während dies auf p53 nicht zutrifft. Gibt es also vielleicht Präzedenzen für nukleäre Transkriptionsfaktoren, die offenbar über andere Wege ins Mitochondrium gelangen? Es wurde berichtet, dass nukleäre Transkriptionsfaktoren der Steroid-Rezeptoren-Superfamilie direkt in die mitochondriale Transkription involviert sind, ohne eine typische N-terminale mitochondriale Import-Sequenz zu besitzen. So konnte gezeigt werden, dass eine aminoterminal verkürzte Form des kernständigen Triiodthyronin-Rezeptors c-ErbA $\alpha$ 1 in Abhängigkeit des T3-Liganden Sequenzen aus der mitochondrialen D-Loop, die Ähnlichkeit mit der nukleären T3-Erkennungssequenz aufweisen, erkennt und die mitochondriale Protein-Synthese stimuliert (Enriquez *et al.*, 1999; Casas *et al.*, 1999). Das verkürzte c-ErbA $\alpha$ 1-Protein kann wie p53 nicht effizient an DNA binden, wenn es als Monomer vorliegt. Dies legt nahe, dass entweder die mitochondrialen Import-Mechanismen die multimere Struktur des c-ErbA $\alpha$ 1-Protein beibehalten oder dass die Multimere sich in der mitochondrialen Matrix zurückformen können. Spätere Veröffentlichungen haben gezeigt, dass eine verkürzte Form des Retinolsäure-X-Rezeptors (RXR)  $\alpha$  ebenfalls in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und dazu in der Lage ist, die mitochondriale Transkription entweder durch Hetero-Dimerisierung mit dem c-ErbA $\alpha$ 1-Protein oder durch Homo-Dimerisierung in Abhängigkeit des Liganden zu regulieren (Casas *et al.*, 2003). Die Östrogen-Rezeptoren ER $\alpha$  und  $\beta$  wurden auch innerhalb der Mitochondrien gefunden und Erkennungselemente für die beiden Rezeptoren im mitochondrialem Genom identifiziert (Chen *et al.*, 2004a; Chen *et al.*, 2004b).

Während die mitochondrialen Östrogen-Rezeptor-Level bei über 10 % im Vergleich zum Gesamtzell-ER-Level liegen (Chen *et al.*, 2004a), scheint nur 2 % des Gesamtzell-p53 mit den Mitochondrien zu assoziieren, und auch nur während der Apoptose (Marchenko *et al.*, 2000; Mihara *et al.*, 2003; Erster *et al.*, 2004). In ungestressten Zellen sind die mitochondrialen p53-Level noch viel niedriger (Mahyar-Roemer *et al.*, 2004). Der erste Hinweis, dass p53 in die Regulation der mitochondrialen Transkription/Replikation involviert sein könnte, kam von Donahue und Mitarbeitern aus dem Jahre 2001. Sie fanden, dass p53-defiziente Mausembryonen eine Reduktion der mitochondrialen 16S-RNA-Transkriptlevel aufweisen (Donahue *et al.*, 2001) in einem Stadium der Entwicklung, in dem der Embryo normalerweise vom anaeroben (glykolytischen) in den aeroben (oxidativen) Metabolismus umschaltet (Ibrahim *et al.*, 1998).

In unseren Studien haben wir die mitochondrialen Transkriptlevel von humanen p53-defizienten und p53-kompetenten Kolonkarzinom-Zelllinien miteinander verglichen. Wir haben dafür zwei verschiedene Arten von Zellschädigungen eingesetzt. Zum einen wurden die Zellen mit Adriamycin behandelt, das Doppelstrangbrüche und somit einen Zellzyklus-Arrest induziert. Andererseits wurde das Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil benutzt, das primär über 5-Fluoro-Desoxy-Uracil-Mono-Phosphat mit dem RNA-Metabolismus interferiert und dadurch Apoptose auslöst. Mit Hilfe der Northern Blot-Analysen konnten wir jedoch keine eindeutigen Änderungen der Transkriptlevel in Abhängigkeit vom p53-Status nachweisen. Dies bedeutet jedoch nicht, dass p53 gar keinen Einfluß auf die mitochondriale Transkription oder Replikation hat. So ist zum Beispiel denkbar, dass p53 nach einer anderen Form von Zellstress wie zum Beispiel Hypoxie die mitochondriale Transkription beeinflusst.

Könnte p53 außer in seiner klassischen Rolle als Transkriptionsfaktor innerhalb der mitochondrialen Matrix zu finden sein? p53 könnte an die mitochondriale DNA binden, um deren genomische Stabilität zu gewährleisten, denn das mitochondriale Genom ist sehr sensitiv für Mutationen (zusammengefasst in Tom Strachan und Andrew P. Read, Lehrbuch für „Molekulare Humangenetik“). Es wäre demnach denkbar, dass p53 mittels seiner zentralen sequenzspezifischen DNA-Bindedomäne an die geschädigte mitochondriale DNA bindet, um die Mutation mit Hilfe seiner in dieser Domäne lokalisierten 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (Mummenbrauer *et al.*, 1996) zu reparieren.

Insgesamt lässt sich konstatieren, dass p53 unter zellschädigenden Substanzen wie Adriamycin oder 5-Fluorouracil die mitochondriale Transkription nicht nachweislich beeinflusst. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, dass nach anderen Formen von Zellstress Effekte zu beobachten wären.

#### 5.4 Transkriptionelle Regulierung von p53 durch NIR

Durch BLAST-Analysen und Screening mit der INHAT-Domäne des Set/TAF1 $\beta$ -Onkoproteins (Seo *et al.*, 2001) gelang es, einen neuen INHAT-Repressor, NIR, zu identifizieren. NIR besitzt zwei verschiedene funktionelle INHAT-Domänen. Es wird, im Gegensatz zu anderen bekannten Repressoren, nicht durch HDAC-Inhibitoren gehemmt. Darüberhinaus ist NIR nicht mit anderen HDACs assoziiert. Dies ist ein Hinweis darauf, dass NIR ein neuer HDAC-unabhängiger Repressor ist. Volllängen-NIR, sowie die beiden INHAT-Domänen sind dazu in der Lage, mit Nukleosomen und Kern-Histonen zu assoziieren, wodurch diese in einem nicht-acetylierten Zustand gehalten werden. ChIP-Analysen unterstrichen die *in vivo*-Funktion von NIR als INHAT, da die Reduktion von endogenem NIR über RNA-Interferenz die Histon-Acetylierung an p53-Ziel promotoren drastisch herabsetzt (Hublitz *et al.*, 2005).

Über eine Tandem-Affinitäts-Aufreinigung wurde p53 als NIR-interagierender Partner identifiziert. Die C-terminale p53-Domäne, mit der NIR interagiert, stimmt mit der beschriebenen Repressiondomäne im C-Terminus von p53 überein (Hong *et al.*, 2001). Andere Gruppen zeigten, dass die Repression der p53-regulierten *stathmin*- und *Map4*-Promotoren die Rekrutierung von HDACs durch den p53-Bindungspartner Sin3 erfordert (Murphy *et al.*, 1999). Rekrutierung des Co-Repressors CtBP2 wird allerdings nur in Anwesenheit der E3/E4-Ubiquitin-Ligase Mdm2 erreicht (Mirnezami *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu konnten wir zeigen, dass NIR der erste INHAT ist, der mit p53 direkt interagiert und die p53-vermittelte transkriptionelle Aktivierung moduliert. Ob NIR auch in p53-vermittelte Repression von Genen involviert ist, ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Der Tumorsuppressor p53 wirkt vorwiegend als Transkriptionsfaktor, der als Antwort auf Zellstress an die Promotoren von Zielgenen bindet (Harris und Levine, 2005). Es haben jedoch kürzlich zwei Veröffentlichungen aufgezeigt, dass p53 an einen Teil seiner Ziel promotoren selbst in Abwesenheit von genotoxischem Stress bindet

(Espinosa und Emerson, 2001; Kaeser und Iggo, 2002). Diese Beobachtung zeigt, dass es andere Mechanismen außer der Kontrolle der DNA-Bindung geben muß, die in die Regulation der transkriptionellen Aktivität von p53 involviert sind. Die Inhibition der Histon-Acetylierung nach Assoziation von NIR mit Promotor-gebundenem p53 könnte einen solchen Mechanismus darstellen. Man mag daher spekulieren, dass das bereits in Abwesenheit von genotoxischem Stress an den Promotoren vorliegende p53 als Plattform für negative Regulatoren wirkt, um die Transkription ruhen zu lassen. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese resultiert ein NIR-Knockdown in ungestressten Zellen in der Stimulation der p21-RNA- und -Protein-Expression. Demgegenüber wurden die p53-regulierten Gene *pig3*, *bax* und *noxa* nur als Antwort auf genotoxischen Stress durch Doxorubicin, aber nicht durch NIR-Knockdown signifikant stimuliert. Dieser Unterschied könnte die kürzlich gemachte Entdeckung widerspiegeln, dass *p21* ein Promotor mit hoher Affinität für p53 darstellt, während *pig3* und *bax* zu einer Gruppe von Promotoren mit sehr viel niedrigerer Affinität gehören (Kaeser und Iggo, 2002).

Überexpression von NIR inhibierte die Stimulation der p53-Zielgene *p21*, *noxa* und *pig3* in p53-kompetenten Zellen nach genotoxischem Stress erheblich, wohingegen die basale Expression dieser Gene in Abwesenheit von Stress unbeeinflusst blieb. Dies zeigt, dass der p53-Aktivierung in gestressten Zellen zumindest teilweise durch NIR entgegengewirkt wird. NIR-Knockdown hat lediglich in p53-kompetenten HCT116-Zellen eine robuste Apoptose hervorgerufen. Dagegen zeigten HCT116 p53<sup>-/-</sup> Zellen keinen signifikanten Zelltod nach einer Repression der NIR-Expression durch RNA-Interferenz, was die physiologische Bedeutung von NIR bei der Regulation der p53-vermittelten Funktionen hervorhebt. NIR-Depletion stimulierte jedoch nicht die Expression der proapoptotischen Gene *pig3*, *noxa* und *bax*. Dies weist darauf hin, dass diese Gene die Apoptose-Induktion nach NIR-Knockdown nicht vermitteln. Wie aber kommt die p53-abhängige Apoptose zustande, wenn nicht über die Aktivierung von pro-apoptotischen Genen? Es ist bekannt, dass p53-Apoptose ebenso mit der Fähigkeit von p53 korreliert, Gene aktiv zu reprimieren (Ryan und Vousden, 1998). So wurde vor kurzem gezeigt, dass die transkriptionelle Repression durch p53 von der effizienten Acetylierung von Histonschwänzen durch HATs abhängen könnte (Imbriano *et al.*, 2005). Da NIR ein INHAT ist, könnte ein

---

NIR-Knockdown, der in erhöhter Histon-Acetylierung resultiert, somit zur Apoptose über eine Erleichterung der p53-abhängigen Genrepression beitragen.

Zusammengefasst konnten wir also NIR als neuen transkriptionellen INHAT, der direkt mit p53 interagiert, identifizieren. NIR inhibiert p53-aktivierte Genexpression und reguliert p53-abhängige Apoptose.

## 6 Zusammenfassung

p53 ist der wichtigste humane Tumorsuppressor, der die Tumorbildung hauptsächlich über Wachstumsarrest oder Apoptoseinduktion verhindert. Die proapoptotische Funktion läuft über einen transkriptionsabhängigen Weg im Nukleus oder einen transkriptionsunabhängigen Weg an den Mitochondrien. Die nukleären Aufgaben von p53 als Transkriptionsfaktor können von dominant-inhibitorisch wirkenden Varianten der p53-Genfamilie blockiert werden. Wir konnten Hinweise beibringen, dass diese dominanten Inhibitoren keinen Einfluß auf die extra-nukleären p53-Funktionen an den Mitochondrien aufweisen, weil p53 hier als Monomer vorliegt und nicht wie im Zellkern als Tetramer.

Weiterhin fanden wir Evidenzen, dass p53 nach seiner Translation zunächst in den Zellkern transportiert und erst nach Stressstimulus durch Mdm2 aus dem Zellkern exportiert wird, um an die Mitochondrien zu translozieren. Die mitochondriale Biogenese wurde durch p53 nicht nachweislich beeinflusst.

Neuere Daten haben gezeigt, dass p53 auch ohne Zellstress an den Promotoren einiger seiner Zielgene gebunden vorliegt, ohne diese zu transaktivieren. Es stellte sich daher die Frage, wie die Regulation des bereits Promotor-gebundenem p53 erfolgt. Mit NIR, einem Inhibitor von Acetyltransferasen, konnte ein neuer negativer Regulator von p53 identifiziert werden, der die Transkription p53-responsiver Gene und die Apoptose in Abhängigkeit von p53 beeinflussen kann.

## 7 Summary

p53 is the most important human tumor suppressor which inhibits tumor formation primarily by growth arrest or apoptosis induction. The proapoptotic function is mediated either by transcription-dependent pathways in the nucleus or by transcription-independent pathways at mitochondria. The nuclear tasks of p53 as transcription factor can be inhibited by dominant-negatively acting variants of the p53 gene family. We found indications that these dominant inhibitors spare the extra-nuclear functions of p53 at mitochondria because mitochondrial p53 is present as a monomer and not as a tetramer as in the nucleus.

Furthermore, we found evidence that p53 has to be exported out of the nucleus by Mdm2 after a stress stimulus in order to translocate to mitochondria. Mitochondrial biogenesis was not demonstrably influenced by p53.

Recent studies have shown that p53 is bound to a subset of promoters of its target genes without cell stress and without transactivating them. This raises the question how promoter-bound p53 is regulated. A new negative regulator of p53, NIR, an inhibitor of acetyltransferases, was identified which is able to influence transcription of p53 responsive genes and apoptosis in dependence of p53.

## 8 Literaturverzeichnis

- An, W., J. Kim and R. G. Roeder** (2004). "Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53." Cell **117**(6): 735-48.
- Arima, Y., M. Nitta, S. Kuninaka, D. Zhang, T. Fujiwara, Y. Taya, M. Nakao and H. Saya** (2005). "Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria." J Biol Chem **280**(19): 19166-76.
- Atz, J., P. Wagner and K. Roemer** (2000). "Function, oligomerization, and conformation of tumor-associated p53 proteins with mutated C-terminus." J Cell Biochem **76**(4): 572-84.
- Avantaggiati, M. L., V. Ogryzko, K. Gardner, A. Giordano, A. S. Levine and K. Kelly** (1997). "Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways." Cell **89**(7): 1175-84.
- Balint, E., S. Bates and K. H. Vousden** (1999). "Mdm2 binds p73 alpha without targeting degradation." Oncogene **18**(27): 3923-9.
- Balint, E. E. and K. H. Vousden** (2001). "Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein." Br J Cancer **85**(12): 1813-23.
- Banin, S., L. Moyal, S. Shieh, Y. Taya, C. W. Anderson, L. Chessa, N. I. Smorodinsky, C. Prives, Y. Reiss, Y. Shiloh and Y. Ziv** (1998). "Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage." Science **281**(5383): 1674-7.
- Barak, Y., T. Juven, R. Haffner and M. Oren** (1993). "mdm2 expression is induced by wild type p53 activity." Embo J **12**(2): 461-8.
- Barlev, N. A., L. Liu, N. H. Chehab, K. Mansfield, K. G. Harris, T. D. Halazonetis and S. L. Berger** (2001). "Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases." Mol Cell **8**(6): 1243-54.
- Bensaad, K., A. Tsuruta, M. A. Selak, M. N. Vidal, K. Nakano, R. Bartrons, E. Gottlieb and K. H. Vousden** (2006). "TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis." Cell **126**(1): 107-20.
- Bensaad, K. and K. H. Vousden** (2005). "Savior and slayer: the two faces of p53." Nat Med **11**(12): 1278-9.

- Bhat, K. P. L., J. W. Kosmeder and J. M. Pezzuto** (2001). "Biological effects of resveratrol." Antioxid Redox Signal **3**(6): 1041-64.
- Birch, J. M., V. Blair, A. M. Kelsey, D. G. Evans, M. Harris, K. J. Tricker and J. M. Varley** (1998). "Cancer phenotype correlates with constitutional TP53 genotype in families with the Li-Fraumeni syndrome." Oncogene **17**(9): 1061-8.
- Blagosklonny, M. V.** (2000). "p53 from complexity to simplicity: mutant p53 stabilization, gain-of-function, and dominant-negative effect." Faseb J **14**(13): 1901-7.
- Blandino, G. and M. Dobbstein** (2004). "p73 and p63: why do we still need them?" Cell Cycle **3**(7): 886-94.
- Bode, A. M. and Z. Dong** (2004). "Post-translational modification of p53 in tumorigenesis." Nat Rev Cancer **4**(10): 793-805.
- Bonafe, M., S. Salvioli, C. Barbi, C. Trapassi, F. Tocco, G. Storci, L. Invidia, I. Vannini, M. Rossi, E. Marzi, M. Mishto, M. Capri, F. Olivieri, R. Antonicelli, M. Memo, D. Uberti, B. Nacmias, S. Sorbi, D. Monti and C. Franceschi** (2004). "The different apoptotic potential of the p53 codon 72 alleles increases with age and modulates in vivo ischaemia-induced cell death." Cell Death Differ **11**(9): 962-73.
- Bourdon, J. C., K. Fernandes, F. Murray-Zmijewski, G. Liu, A. Diot, D. P. Xirodimas, M. K. Saville and D. P. Lane** (2005). "p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity." Genes Dev **19**(18): 2122-37.
- Boyd, S. D., K. Y. Tsai and T. Jacks** (2000). "An intact HDM2 RING-finger domain is required for nuclear exclusion of p53." Nat Cell Biol **2**(9): 563-8.
- Brodsky, M. H., W. Nordstrom, G. Tsang, E. Kwan, G. M. Rubin and J. M. Abrams** (2000). "Drosophila p53 binds a damage response element at the reaper locus." Cell **101**(1): 103-13.
- Buckbinder, L., R. Talbott, S. Velasco-Miguel, I. Takenaka, B. Faha, B. R. Seizinger and N. Kley** (1995). "Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53." Nature **377**(6550): 646-9.
- Bunz, F., A. Dutriaux, C. Lengauer, T. Waldman, S. Zhou, J. P. Brown, J. M. Sedivy, K. W. Kinzler and B. Vogelstein** (1998). "Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage." Science **282**(5393): 1497-501.

- Bunz, F., P. M. Hwang, C. Torrance, T. Waldman, Y. Zhang, L. Dillehay, J. Williams, C. Lengauer, K. W. Kinzler and B. Vogelstein** (1999). "Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents." J Clin Invest **104**(3): 263-9.
- Casas, F., L. Daury, S. Grandemange, M. Busson, P. Seyer, R. Hatier, A. Carazo, G. Cabello and C. Wrutniak-Cabello** (2003). "Endocrine regulation of mitochondrial activity: involvement of truncated RXRalpha and c-Erb Aalpha1 proteins." Faseb J **17**(3): 426-36.
- Casas, F., P. Rochard, A. Rodier, I. Cassar-Malek, S. Marchal-Victorion, R. J. Wiesner, G. Cabello and C. Wrutniak** (1999). "A variant form of the nuclear triiodothyronine receptor c-ErbAalpha1 plays a direct role in regulation of mitochondrial RNA synthesis." Mol Cell Biol **19**(12): 7913-24.
- Casciano, I., K. Mazzocco, L. Boni, G. Pagnan, B. Banelli, G. Allemanni, M. Ponzoni, G. P. Tonini and M. Romani** (2002). "Expression of DeltaNp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients." Cell Death Differ **9**(3): 246-51.
- Chan, H. M. and N. B. La Thangue** (2001). "p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds." J Cell Sci **114**(Pt 13): 2363-73.
- Chan, W. M., W. Y. Siu, A. Lau and R. Y. Poon** (2004). "How many mutant p53 molecules are needed to inactivate a tetramer?" Mol Cell Biol **24**(8): 3536-51.
- Chattopadhyay, A., C. W. Chiang and E. Yang** (2001). "BAD/BCL-[X(L)] heterodimerization leads to bypass of G0/G1 arrest." Oncogene **20**(33): 4507-18.
- Chen, J., V. Marechal and A. J. Levine** (1993). "Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains." Mol Cell Biol **13**(7): 4107-14.
- Chen, J. Q., M. Delannoy, C. Cooke and J. D. Yager** (2004). "Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells." Am J Physiol Endocrinol Metab **286**(6): E1011-22.
- Chen, J. Q., M. Eshete, W. L. Alworth and J. D. Yager** (2004). "Binding of MCF-7 cell mitochondrial proteins and recombinant human estrogen receptors alpha and beta to human mitochondrial DNA estrogen response elements." J Cell Biochem **93**(2): 358-73.
- Chene, P.** (1998). "In vitro analysis of the dominant negative effect of p53 mutants." J Mol Biol **281**(2): 205-9.

- Cheung, P., C. D. Allis and P. Sassone-Corsi** (2000). "Signaling to chromatin through histone modifications." Cell **103**(2): 263-71.
- Chin, K. V., K. Ueda, I. Pastan and M. M. Gottesman** (1992). "Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53." Science **255**(5043): 459-62.
- Chipuk, J. E., L. Bouchier-Hayes, T. Kuwana, D. D. Newmeyer and D. R. Green** (2005). "PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53." Science **309**(5741): 1732-5.
- Chipuk, J. E., T. Kuwana, L. Bouchier-Hayes, N. M. Droin, D. D. Newmeyer, M. Schuler and D. R. Green** (2004). "Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis." Science **303**(5660): 1010-4.
- Cho, Y., S. Gorina, P. D. Jeffrey and N. P. Pavletich** (1994). "Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations." Science **265**(5170): 346-55.
- Choi, Y. B., J. K. Ko and J. Shin** (2004). "The transcriptional corepressor, PELP1, recruits HDAC2 and masks histones using two separate domains." J Biol Chem **279**(49): 50930-41.
- Chuikov, S., J. K. Kurash, J. R. Wilson, B. Xiao, N. Justin, G. S. Ivanov, K. McKinney, P. Tempst, C. Prives, S. J. Gamblin, N. A. Barlev and D. Reinberg** (2004). "Regulation of p53 activity through lysine methylation." Nature **432**(7015): 353-60.
- Clayton, D. A.** (2000). "Transcription and replication of mitochondrial DNA." Hum Reprod **15 Suppl 2**: 11-7.
- Concin, N., K. Becker, N. Slade, S. Erster, E. Mueller-Holzner, H. Ulmer, G. Daxenbichler, A. Zeimet, R. Zeillinger, C. Marth and U. M. Moll** (2004). "Transdominant DeltaTAp73 isoforms are frequently up-regulated in ovarian cancer. Evidence for their role as epigenetic p53 inhibitors in vivo." Cancer Res **64**(7): 2449-60.
- Craig, A. L., L. Burch, B. Vojtesek, J. Mikutowska, A. Thompson and T. R. Hupp** (1999). "Novel phosphorylation sites of human tumour suppressor protein p53 at Ser20 and Thr18 that disrupt the binding of mdm2 (mouse double minute 2) protein are modified in human cancers." Biochem J **342 ( Pt 1)**: 133-41.

- Crichton, D., S. Wilkinson, J. O'Prey, N. Syed, P. Smith, P. R. Harrison, M. Gasco, O. Garrone, T. Crook and K. M. Ryan** (2006). "DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis." Cell **126**(1): 121-34.
- Cui, R., H. R. Widlund, E. Feige, J. Y. Lin, D. L. Wilensky, V. E. Igras, J. D'Orazio, C. Y. Fung, C. F. Schanbacher, S. R. Granter and D. E. Fisher** (2007). "Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation." Cell **128**(5): 853-64.
- Dameron, K. M., O. V. Volpert, M. A. Tainsky and N. Bouck** (1994). "Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1." Science **265**(5178): 1582-4.
- de Ruijter, A. J., A. H. van Gennip, H. N. Caron, S. Kemp and A. B. van Kuilenburg** (2003). "Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family." Biochem J **370**(Pt 3): 737-49.
- Dearth, L. R., H. Qian, T. Wang, T. E. Baroni, J. Zeng, S. W. Chen, S. Y. Yi and R. K. Brachmann** (2007). "Inactive full-length p53 mutants lacking dominant wild-type p53 inhibition highlight loss of heterozygosity as an important aspect of p53 status in human cancers." Carcinogenesis **28**(2): 289-98.
- DeLeo, A. B., G. Jay, E. Appella, G. C. Dubois, L. W. Law and L. J. Old** (1979). "Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(5): 2420-4.
- Derry, W. B., A. P. Putzke and J. H. Rothman** (2001). "Caenorhabditis elegans p53: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance." Science **294**(5542): 591-5.
- Dittmer, D., S. Pati, G. Zambetti, S. Chu, A. K. Teresky, M. Moore, C. Finlay and A. J. Levine** (1993). "Gain of function mutations in p53." Nat Genet **4**(1): 42-6.
- Donahue, R. J., M. Razmara, J. B. Hoek and T. B. Knudsen** (2001). "Direct influence of the p53 tumor suppressor on mitochondrial biogenesis and function." Faseb J **15**(3): 635-44.
- Donehower, L. A. and A. Bradley** (1993). "The tumor suppressor p53." Biochim Biophys Acta **1155**(2): 181-205.
- Dornan, D., I. Wertz, H. Shimizu, D. Arnott, G. D. Frantz, P. Dowd, K. O'Rourke, H. Koeppen and V. M. Dixit** (2004). "The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53." Nature **429**(6987): 86-92.

- Douc-Rasy, S., M. Barrois, M. Echeynne, M. Kaghad, E. Blanc, G. Raguenez, D. Goldschneider, M. J. Terrier-Lacombe, O. Hartmann, U. Moll, D. Caput and J. Benard** (2002). "DeltaN-p73alpha accumulates in human neuroblastic tumors." Am J Pathol **160**(2): 631-9.
- Dumont, P., J. I. Leu, A. C. Della Pietra, 3rd, D. L. George and M. Murphy** (2003). "The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential." Nat Genet **33**(3): 357-65.
- el-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler and B. Vogelstein** (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." Cell **75**(4): 817-25.
- Emerson, B. M.** (2002). "Specificity of gene regulation." Cell **109**(3): 267-70.
- Enriquez, J. A., P. Fernandez-Silva, N. Garrido-Perez, M. J. Lopez-Perez, A. Perez-Martos and J. Montoya** (1999). "Direct regulation of mitochondrial RNA synthesis by thyroid hormone." Mol Cell Biol **19**(1): 657-70.
- Erster, S., M. Mihara, R. H. Kim, O. Petrenko and U. M. Moll** (2004). "In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation." Mol Cell Biol **24**(15): 6728-41.
- Espinosa, J. M. and B. M. Emerson** (2001). "Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment." Mol Cell **8**(1): 57-69.
- Falkenberg, M., M. Gaspari, A. Rantanen, A. Trifunovic, N. G. Larsson and C. M. Gustafsson** (2002). "Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA." Nat Genet **31**(3): 289-94.
- Fang, S., J. P. Jensen, R. L. Ludwig, K. H. Vousden and A. M. Weissman** (2000). "Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53." J Biol Chem **275**(12): 8945-51.
- Featherstone, M.** (2002). "Coactivators in transcription initiation: here are your orders." Curr Opin Genet Dev **12**(2): 149-55.
- Fields, S. and S. K. Jang** (1990). "Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein." Science **249**(4972): 1046-9.

- Fillippovich, I., N. Sorokina, M. Gatei, Y. Haupt, K. Hobson, E. Moallem, K. Spring, M. Mould, M. A. McGuckin, M. F. Lavin and K. K. Khanna** (2001). "Transactivation-deficient p73alpha (p73Deltaexon2) inhibits apoptosis and competes with p53." Oncogene **20**(4): 514-22.
- Flores, E. R., S. Sengupta, J. B. Miller, J. J. Newman, R. Bronson, D. Crowley, A. Yang, F. McKeon and T. Jacks** (2005). "Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family." Cancer Cell **7**(4): 363-73.
- Flores, E. R., K. Y. Tsai, D. Crowley, S. Sengupta, A. Yang, F. McKeon and T. Jacks** (2002). "p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage." Nature **416**(6880): 560-4.
- Flores-Rozas, H., D. Clark and R. D. Kolodner** (2000). "Proliferating cell nuclear antigen and Msh2p-Msh6p interact to form an active mismatch recognition complex." Nat Genet **26**(3): 375-8.
- Fortin, A., S. P. Cregan, J. G. MacLaurin, N. Kushwaha, E. S. Hickman, C. S. Thompson, A. Hakim, P. R. Albert, F. Cecconi, K. Helin, D. S. Park and R. S. Slack** (2001). "APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death." J Cell Biol **155**(2): 207-16.
- Freedman, D. A., C. B. Epstein, J. C. Roth and A. J. Levine** (1997). "A genetic approach to mapping the p53 binding site in the MDM2 protein." Mol Med **3**(4): 248-59.
- Friedlander, P., Y. Legros, T. Soussi and C. Prives** (1996). "Regulation of mutant p53 temperature-sensitive DNA binding." J Biol Chem **271**(41): 25468-78.
- Friedler, A., D. B. Veprintsev, S. M. Freund, K. I. von Glos and A. R. Fersht** (2005). "Modulation of binding of DNA to the C-terminal domain of p53 by acetylation." Structure **13**(4): 629-36.
- Friedman, P. N., X. Chen, J. Bargonetti and C. Prives** (1993). "The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3319-23.
- Fukazawa, T., T. Fujiwara, Y. Morimoto, J. Shao, M. Nishizaki, Y. Kadowaki, A. Hizuta, L. B. Owen-Schaub, J. A. Roth and N. Tanaka** (1999). "Differential involvement of the CD95 (Fas/APO-1) receptor/ligand system on apoptosis induced by the wild-type p53 gene transfer in human cancer cells." Oncogene **18**(13): 2189-99.

- Gallagher, W. M., M. Argentini, V. Sierra, L. Bracco, L. Debussche and E. Conseiller** (1999). "MBP1: a novel mutant p53-specific protein partner with oncogenic properties." Oncogene **18**(24): 3608-16.
- Gatz, S. A. and L. Wiesmuller** (2006). "p53 in recombination and repair." Cell Death Differ **13**(6): 1003-16.
- Gautam, S. C., Y. X. Xu, M. Dumaguin, N. Janakiraman and R. A. Chapman** (2000). "Resveratrol selectively inhibits leukemia cells: a prospective agent for ex vivo bone marrow purging." Bone Marrow Transplant **25**(6): 639-45.
- Glass, C. K. and M. G. Rosenfeld** (2000). "The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors." Genes Dev **14**(2): 121-41.
- Gostissa, M., A. Hengstermann, V. Fogal, P. Sandy, S. E. Schwarz, M. Scheffner and G. Del Sal** (1999). "Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1." Embo J **18**(22): 6462-71.
- Gottlieb, E., R. Haffner, T. von Ruden, E. F. Wagner and M. Oren** (1994). "Down-regulation of wild-type p53 activity interferes with apoptosis of IL-3-dependent hematopoietic cells following IL-3 withdrawal." Embo J **13**(6): 1368-74.
- Griffiths, G. J., B. M. Corfe, P. Savory, S. Leech, M. D. Esposti, J. A. Hickman and C. Dive** (2001). "Cellular damage signals promote sequential changes at the N-terminus and BH-1 domain of the pro-apoptotic protein Bak." Oncogene **20**(52): 7668-76.
- Griffiths, G. J., L. Dubrez, C. P. Morgan, N. A. Jones, J. Whitehouse, B. M. Corfe, C. Dive and J. A. Hickman** (1999). "Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis." J Cell Biol **144**(5): 903-14.
- Grob, T. J., U. Novak, C. Maise, D. Barcaroli, A. U. Luthi, F. Pirnia, B. Hugli, H. U. Graber, V. De Laurenzi, M. F. Fey, G. Melino and A. Tobler** (2001). "Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53." Cell Death Differ **8**(12): 1213-23.
- Grossman, S. R., M. E. Deato, C. Brignone, H. M. Chan, A. L. Kung, H. Tagami, Y. Nakatani and D. M. Livingston** (2003). "Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300." Science **300**(5617): 342-4.
- Gu, W., J. Luo, C. L. Brooks, A. Y. Nikolaev and M. Li** (2004). "Dynamics of the p53 acetylation pathway." Novartis Found Symp **259**: 197-205; discussion 205-7, 223-5.

- Gu, W. and R. G. Roeder** (1997). "Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain." Cell **90**(4): 595-606.
- Halazonetis, T. D. and A. N. Kandil** (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**(13): 5057-64.
- Harms, K., S. Nozell and X. Chen** (2004). "The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors." Cell Mol Life Sci **61**(7-8): 822-42.
- Harris, S. L., G. Gil, H. Robins, W. Hu, K. Hirshfield, E. Bond, G. Bond and A. J. Levine** (2005). "Detection of functional single-nucleotide polymorphisms that affect apoptosis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(45): 16297-302.
- Harris, S. L. and A. J. Levine** (2005). "The p53 pathway: positive and negative feedback loops." Oncogene **24**(17): 2899-908.
- Haupt, Y., R. Maya, A. Kazaz and M. Oren** (1997). "Mdm2 promotes the rapid degradation of p53." Nature **387**(6630): 296-9.
- Helt, C. E., W. A. Cliby, P. C. Keng, R. A. Bambara and M. A. O'Reilly** (2005). "Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage." J Biol Chem **280**(2): 1186-92.
- Hermeking, H., C. Lengauer, K. Polyak, T. C. He, L. Zhang, S. Thiagalingam, K. W. Kinzler and B. Vogelstein** (1997). "14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression." Mol Cell **1**(1): 3-11.
- Herskowitz, I.** (1987). "Functional inactivation of genes by dominant negative mutations." Nature **329**(6136): 219-22.
- Heyne, K., S. Mannebach, E. Wuertz, K. X. Knaup, M. Mahyar-Roemer and K. Roemer** (2004). "Identification of a putative p53 binding sequence within the human mitochondrial genome." FEBS Lett **578**(1-2): 198-202.
- Hinds, P. W., C. A. Finlay, R. S. Quartin, S. J. Baker, E. R. Fearon, B. Vogelstein and A. J. Levine** (1990). "Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the "hot spot" mutant phenotypes." Cell Growth Differ **1**(12): 571-80.
- Ho, J. S., W. Ma, D. Y. Mao and S. Benchimol** (2005). "p53-Dependent transcriptional repression of c-myc is required for G1 cell cycle arrest." Mol Cell Biol **25**(17): 7423-31.

- Hoffman, W. H., S. Biade, J. T. Zilfou, J. Chen and M. Murphy** (2002). "Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53." J Biol Chem **277**(5): 3247-57.
- Hong, T. M., J. J. Chen, K. Peck, P. C. Yang and C. W. Wu** (2001). "p53 amino acids 339-346 represent the minimal p53 repression domain." J Biol Chem **276**(2): 1510-5.
- Hsu, S. Y., R. J. Lai, M. Finegold and A. J. Hsueh** (1996). "Targeted overexpression of Bcl-2 in ovaries of transgenic mice leads to decreased follicle apoptosis, enhanced folliculogenesis, and increased germ cell tumorigenesis." Endocrinology **137**(11): 4837-43.
- Huang, C., W. Y. Ma, A. Goranson and Z. Dong** (1999). "Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway." Carcinogenesis **20**(2): 237-42.
- Hublitz, P., N. Kunowska, U. P. Mayer, J. M. Muller, K. Heyne, N. Yin, C. Fritzsche, C. Poli, L. Miguet, I. W. Schupp, L. A. van Grunsvan, N. Potiers, A. van Dorsselaer, E. Metzger, K. Roemer and R. Schule** (2005). "NIR is a novel INHAT repressor that modulates the transcriptional activity of p53." Genes Dev **19**(23): 2912-24.
- Hupp, T. R. and D. P. Lane** (1994). "Regulation of the cryptic sequence-specific DNA-binding function of p53 by protein kinases." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **59**: 195-206.
- Hupp, T. R., D. W. Meek, C. A. Midgley and D. P. Lane** (1992). "Regulation of the specific DNA binding function of p53." Cell **71**(5): 875-86.
- Hussain, S. P. and C. C. Harris** (1998). "Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes." Cancer Res **58**(18): 4023-37.
- Ibrahim, M. M., M. Razmara, D. Nguyen, R. J. Donahue, J. A. Wubah and T. B. Knudsen** (1998). "Altered expression of mitochondrial 16S ribosomal RNA in p53-deficient mouse embryos revealed by differential display." Biochim Biophys Acta **1403**(3): 254-64.
- Imbriano, C., A. Gurtner, F. Cocchiarella, S. Di Agostino, V. Basile, M. Gostissa, M. Dobbstein, G. Del Sal, G. Piaggio and R. Mantovani** (2005). "Direct p53 transcriptional repression: in vivo analysis of CCAAT-containing G2/M promoters." Mol Cell Biol **25**(9): 3737-51.

- Innocente, S. A., J. L. Abrahamson, J. P. Cogswell and J. M. Lee** (1999). "p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2147-52.
- Irwin, M. S., K. Kondo, M. C. Marin, L. S. Cheng, W. C. Hahn and W. G. Kaelin, Jr.** (2003). "Chemosensitivity linked to p73 function." Cancer Cell **3**(4): 403-10.
- Iwakuma, T. and G. Lozano** (2007). "Crippling p53 activities via knock-in mutations in mouse models." Oncogene **26**(15): 2177-84.
- Jang, M., L. Cai, G. O. Udeani, K. V. Slowing, C. F. Thomas, C. W. Beecher, H. H. Fong, N. R. Farnsworth, A. D. Kinghorn, R. G. Mehta, R. C. Moon and J. M. Pezzuto** (1997). "Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes." Science **275**(5297): 218-20.
- Jesenberger, V. and S. Jentsch** (2002). "Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(2): 112-21.
- Jiang, P., W. Du, K. Heese and M. Wu** (2006). "The Bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis." Mol Cell Biol **26**(23): 9071-82.
- Juven-Gershon, T. and M. Oren** (1999). "Mdm2: the ups and downs." Mol Med **5**(2): 71-83.
- Kaesler, M. D. and R. D. Iggo** (2002). "Chromatin immunoprecipitation analysis fails to support the latency model for regulation of p53 DNA binding activity in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 95-100.
- Kaesler, M. D., S. Pebernard and R. D. Iggo** (2004). "Regulation of p53 stability and function in HCT116 colon cancer cells." J Biol Chem **279**(9): 7598-605.
- Kaghad, M., H. Bonnet, A. Yang, L. Creancier, J. C. Biscan, A. Valent, A. Minty, P. Chalon, J. M. Lelias, X. Dumont, P. Ferrara, F. McKeon and D. Caput** (1997). "Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers." Cell **90**(4): 809-19.
- Kitayner, M., H. Rozenberg, N. Kessler, D. Rabinovich, L. Shaulov, T. E. Haran and Z. Shaked** (2006). "Structural basis of DNA recognition by p53 tetramers." Mol Cell **22**(6): 741-53.
- Knudson, A. G., Jr.** (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(4): 820-3.

- Kortlever, R. M., P. J. Higgins and R. Bernards** (2006). "Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence." Nat Cell Biol **8**(8): 877-84.
- Kress, M., E. May, R. Cassingena and P. May** (1979). "Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum." J Virol **31**(2): 472-83.
- Kubbutat, M. H. and K. H. Vousden** (1998). "Keeping an old friend under control: regulation of p53 stability." Mol Med Today **4**(6): 250-6.
- Kunz, C., S. Pebler, J. Otte and D. von der Ahe** (1995). "Differential regulation of plasminogen activator and inhibitor gene transcription by the tumor suppressor p53." Nucleic Acids Res **23**(18): 3710-7.
- Kutney, S. N., R. Hong, T. Macfarlan and D. Chakravarti** (2004). "A signaling role of histone-binding proteins and INHAT subunits pp32 and Set/TAF-Ibeta in integrating chromatin hypoacetylation and transcriptional repression." J Biol Chem **279**(29): 30850-5.
- Lane, D. P. and L. V. Crawford** (1979). "T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells." Nature **278**(5701): 261-3.
- Lang, G. A., T. Iwakuma, Y. A. Suh, G. Liu, V. A. Rao, J. M. Parant, Y. A. Valentin-Vega, T. Terzian, L. C. Caldwell, L. C. Strong, A. K. El-Naggar and G. Lozano** (2004). "Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome." Cell **119**(6): 861-72.
- Lanyi, A., D. Deb, R. C. Seymour, J. H. Ludes-Meyers, M. A. Subler and S. Deb** (1998). "'Gain of function' phenotype of tumor-derived mutant p53 requires the oligomerization/nonsequence-specific nucleic acid-binding domain." Oncogene **16**(24): 3169-76.
- Leng, R. P., Y. Lin, W. Ma, H. Wu, B. Lemmers, S. Chung, J. M. Parant, G. Lozano, R. Hakem and S. Benchimol** (2003). "Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation." Cell **112**(6): 779-91.
- Leu, J. I., P. Dumont, M. Hafey, M. E. Murphy and D. L. George** (2004). "Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex." Nat Cell Biol **6**(5): 443-50.
- Levine, A. J.** (1997). "p53, the cellular gatekeeper for growth and division." Cell **88**(3): 323-31.

- Li, F., T. Macfarlan, R. N. Pittman and D. Chakravarti** (2002). "Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities." J Biol Chem **277**(47): 45004-12.
- Li, M., C. L. Brooks, F. Wu-Baer, D. Chen, R. Baer and W. Gu** (2003). "Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2." Science **302**(5652): 1972-5.
- Li, P. F., R. Dietz and R. von Harsdorf** (1999). "p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2." Embo J **18**(21): 6027-36.
- Li, Y. and C. Prives** (2007). "Are interactions with p63 and p73 involved in mutant p53 gain of oncogenic function?" Oncogene **26**(15): 2220-5.
- Lill, N. L., S. R. Grossman, D. Ginsberg, J. DeCaprio and D. M. Livingston** (1997). "Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators." Nature **387**(6635): 823-7.
- Lin, T., C. Chao, S. Saito, S. J. Mazur, M. E. Murphy, E. Appella and Y. Xu** (2005). "p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression." Nat Cell Biol **7**(2): 165-71.
- Linzer, D. I. and A. J. Levine** (1979). "Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells." Cell **17**(1): 43-52.
- Liu, G., T. Xia and X. Chen** (2003). "The activation domains, the proline-rich domain, and the C-terminal basic domain in p53 are necessary for acetylation of histones on the proximal p21 promoter and interaction with p300/CREB-binding protein." J Biol Chem **278**(19): 17557-65.
- Lomax, M. E., D. M. Barnes, T. R. Hupp, S. M. Picksley and R. S. Camplejohn** (1998). "Characterization of p53 oligomerization domain mutations isolated from Li-Fraumeni and Li-Fraumeni like family members." Oncogene **17**(5): 643-9.
- Lu, H. and A. J. Levine** (1995). "Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(11): 5154-8.
- Lu, X. and D. P. Lane** (1993). "Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes?" Cell **75**(4): 765-78.

- Luo, J., M. Li, Y. Tang, M. Laszkowska, R. G. Roeder and W. Gu** (2004). "Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(8): 2259-64.
- Luo, J., A. Y. Nikolaev, S. Imai, D. Chen, F. Su, A. Shiloh, L. Guarente and W. Gu** (2001). "Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress." Cell **107**(2): 137-48.
- Luo, J., F. Su, D. Chen, A. Shiloh and W. Gu** (2000). "Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis." Nature **408**(6810): 377-81.
- Maeda, T., A. N. Hanna, A. B. Sim, P. P. Chua, M. T. Chong and V. A. Tron** (2002). "GADD45 regulates G2/M arrest, DNA repair, and cell death in keratinocytes following ultraviolet exposure." J Invest Dermatol **119**(1): 22-6.
- Mahyar-Roemer, M., C. Fritzsche, S. Wagner, M. Laue and K. Roemer** (2004). "Mitochondrial p53 levels parallel total p53 levels independent of stress response in human colorectal carcinoma and glioblastoma cells." Oncogene **23**(37): 6226-36.
- Mahyar-Roemer, M. and K. Roemer** (2001). "p21 Waf1/Cip1 can protect human colon carcinoma cells against p53-dependent and p53-independent apoptosis induced by natural chemopreventive and therapeutic agents." Oncogene **20**(26): 3387-98.
- Maisse, C., P. Guerrieri and G. Melino** (2003). "p73 and p63 protein stability: the way to regulate function?" Biochem Pharmacol **66**(8): 1555-61.
- Marchenko, N. D., S. Wolff, S. Erster, K. Becker and U. M. Moll** (2007). "Monoubiquitylation promotes mitochondrial p53 translocation." Embo J **26**(4): 923-34.
- Marchenko, N. D., A. Zaika and U. M. Moll** (2000). "Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling." J Biol Chem **275**(21): 16202-12.
- Marston, N. J., J. R. Jenkins and K. H. Vousden** (1995). "Oligomerisation of full length p53 contributes to the interaction with mdm2 but not HPV E6." Oncogene **10**(9): 1709-15.
- Martinez-Balbas, M. A., U. M. Bauer, S. J. Nielsen, A. Brehm and T. Kouzarides** (2000). "Regulation of E2F1 activity by acetylation." Embo J **19**(4): 662-71.

- Matoba, S., J. G. Kang, W. D. Patino, A. Wragg, M. Boehm, O. Gavrilova, P. J. Hurley, F. Bunz and P. M. Hwang** (2006). "p53 regulates mitochondrial respiration." Science **312**(5780): 1650-3.
- May, P. and E. May** (1999). "Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein." Oncogene **18**(53): 7621-36.
- McCoy, M. A., J. J. Gesell, M. M. Senior and D. F. Wyss** (2003). "Flexible lid to the p53-binding domain of human Mdm2: implications for p53 regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 1645-8.
- McLure, K. G. and P. W. Lee** (1998). "How p53 binds DNA as a tetramer." Embo J **17**(12): 3342-50.
- Melchior, F. and L. Hengst** (2002). "SUMO-1 and p53." Cell Cycle **1**(4): 245-9.
- Melino, G., X. Lu, M. Gasco, T. Crook and R. A. Knight** (2003). "Functional regulation of p73 and p63: development and cancer." Trends Biochem Sci **28**(12): 663-70.
- Mihara, M., S. Erster, A. Zaika, O. Petrenko, T. Chittenden, P. Pancoska and U. M. Moll** (2003). "p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria." Mol Cell **11**(3): 577-90.
- Miller, F. D. and D. R. Kaplan** (2007). "To die or not to die: neurons and p63." Cell Cycle **6**(3): 312-7.
- Mills, A. A., B. Zheng, X. J. Wang, H. Vogel, D. R. Roop and A. Bradley** (1999). "p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis." Nature **398**(6729): 708-13.
- Milner, J. and E. A. Medcalf** (1991). "Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation." Cell **65**(5): 765-74.
- Mirnezami, A. H., S. J. Campbell, M. Darley, J. N. Primrose, P. W. Johnson and J. P. Blaydes** (2003). "Hdm2 recruits a hypoxia-sensitive corepressor to negatively regulate p53-dependent transcription." Curr Biol **13**(14): 1234-9.
- Miyashita, T., S. Krajewski, M. Krajewska, H. G. Wang, H. K. Lin, D. A. Liebermann, B. Hoffman and J. C. Reed** (1994). "Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo." Oncogene **9**(6): 1799-805.
- Miyashita, T. and J. C. Reed** (1995). "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene." Cell **80**(2): 293-9.

- Moll, U. M., S. Erster and A. Zaika** (2001). "p53, p63 and p73--solos, alliances and feuds among family members." Biochim Biophys Acta **1552**(2): 47-59.
- Moll, U. M. and N. Slade** (2004). "p63 and p73: roles in development and tumor formation." Mol Cancer Res **2**(7): 371-86.
- Moll, U. M., S. Wolff, D. Speidel and W. Deppert** (2005). "Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53." Curr Opin Cell Biol **17**(6): 631-6.
- Mondal, N. and J. D. Parvin** (2005). "The tumor suppressor protein p53 functions similarly to p63 and p73 in activating transcription in vitro." Cancer Biol Ther **4**(4): 414-8.
- Mummenbrauer, T., F. Janus, B. Muller, L. Wiesmuller, W. Deppert and F. Grosse** (1996). "p53 Protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity." Cell **85**(7): 1089-99.
- Murphy, M., J. Ahn, K. K. Walker, W. H. Hoffman, R. M. Evans, A. J. Levine and D. L. George** (1999). "Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a." Genes Dev **13**(19): 2490-501.
- Murphy, M., A. Hinman and A. J. Levine** (1996). "Wild-type p53 negatively regulates the expression of a microtubule-associated protein." Genes Dev **10**(23): 2971-80.
- Murray-Zmijewski, F., D. P. Lane and J. C. Bourdon** (2006). "p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress." Cell Death Differ **13**(6): 962-72.
- Nakagawa, K., Y. Taya, K. Tamai and M. Yamaizumi** (1999). "Requirement of ATM in phosphorylation of the human p53 protein at serine 15 following DNA double-strand breaks." Mol Cell Biol **19**(4): 2828-34.
- Nakano, K. and K. H. Vousden** (2001). "PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53." Mol Cell **7**(3): 683-94.
- Nemajerova, A., S. Erster and U. M. Moll** (2005). "The post-translational phosphorylation and acetylation modification profile is not the determining factor in targeting endogenous stress-induced p53 to mitochondria." Cell Death Differ **12**(2): 197-200.
- Nemajerova, A., S. Wolff, O. Petrenko and U. M. Moll** (2005). "Viral and cellular oncogenes induce rapid mitochondrial translocation of p53 in primary epithelial and endothelial cells early in apoptosis." FEBS Lett **579**(27): 6079-83.

- Nicholls, C. D., K. G. McLure, M. A. Shields and P. W. Lee** (2002). "Biogenesis of p53 involves cotranslational dimerization of monomers and posttranslational dimerization of dimers. Implications on the dominant negative effect." J Biol Chem **277**(15): 12937-45.
- Oda, E., R. Ohki, H. Murasawa, J. Nemoto, T. Shibue, T. Yamashita, T. Tokino, T. Taniguchi and N. Tanaka** (2000). "Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis." Science **288**(5468): 1053-8.
- Oda, K., H. Arakawa, T. Tanaka, K. Matsuda, C. Tanikawa, T. Mori, H. Nishimori, K. Tamai, T. Tokino, Y. Nakamura and Y. Taya** (2000). "p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53." Cell **102**(6): 849-62.
- Okamura, S., H. Arakawa, T. Tanaka, H. Nakanishi, C. C. Ng, Y. Taya, M. Monden and Y. Nakamura** (2001). "p53DINP1, a p53-inducible gene, regulates p53-dependent apoptosis." Mol Cell **8**(1): 85-94.
- Olive, K. P., D. A. Tuveson, Z. C. Ruhe, B. Yin, N. A. Willis, R. T. Bronson, D. Crowley and T. Jacks** (2004). "Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome." Cell **119**(6): 847-60.
- Olivier, M. and P. Hainaut** (2001). "TP53 mutation patterns in breast cancers: searching for clues of environmental carcinogenesis." Semin Cancer Biol **11**(5): 353-60.
- Ollmann, M., L. M. Young, C. J. Di Como, F. Karim, M. Belvin, S. Robertson, K. Whittaker, M. Demsky, W. W. Fisher, A. Buchman, G. Duyk, L. Friedman, C. Prives and C. Kopczynski** (2000). "Drosophila p53 is a structural and functional homolog of the tumor suppressor p53." Cell **101**(1): 91-101.
- Owen-Schaub, L. B., W. Zhang, J. C. Cusack, L. S. Angelo, S. M. Santee, T. Fujiwara, J. A. Roth, A. B. Deisseroth, W. W. Zhang, E. Kruzel and *et al.*** (1995). "Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression." Mol Cell Biol **15**(6): 3032-40.
- Palacios, G. and U. M. Moll** (2006). "Mitochondrially targeted wild-type p53 suppresses growth of mutant p53 lymphomas in vivo." Oncogene **25**(45): 6133-9.

- Picksley, S. M., B. Vojtesek, A. Sparks and D. P. Lane** (1994). "Immunochemical analysis of the interaction of p53 with MDM2;--fine mapping of the MDM2 binding site on p53 using synthetic peptides." Oncogene **9**(9): 2523-9.
- Pietenpol, J. A., T. Tokino, S. Thiagalingam, W. S. el-Deiry, K. W. Kinzler and B. Vogelstein** (1994). "Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(6): 1998-2002.
- Pohland, T., S. Wagner, M. Mahyar-Roemer and K. Roemer** (2006). "Bax and Bak are the critical complementary effectors of colorectal cancer cell apoptosis by chemopreventive resveratrol." Anticancer Drugs **17**(4): 471-8.
- Polyak, K., Y. Xia, J. L. Zweier, K. W. Kinzler and B. Vogelstein** (1997). "A model for p53-induced apoptosis." Nature **389**(6648): 300-5.
- Pozniak, C. D., S. Radinovic, A. Yang, F. McKeon, D. R. Kaplan and F. D. Miller** (2000). "An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death." Science **289**(5477): 304-6.
- Prives, C.** (1994). "How loops, beta sheets, and alpha helices help us to understand p53." Cell **78**(4): 543-6.
- Prives, C. and J. L. Manley** (2001). "Why is p53 acetylated?" Cell **107**(7): 815-8.
- Putzer, B. M., S. Tuve, A. Tannapfel and T. Stiewe** (2003). "Increased DeltaN-p73 expression in tumors by upregulation of the E2F1-regulated, TA-promoter-derived DeltaN'-p73 transcript." Cell Death Differ **10**(5): 612-4.
- Reichelt, M., K. D. Zang, M. Seifert, C. Welter and T. Ruffing** (1999). "The yeast two-hybrid system reveals no interaction between p73 alpha and SV40 large T-antigen." Arch Virol **144**(3): 621-6.
- Rodriguez, M. S., J. M. Desterro, S. Lain, D. P. Lane and R. T. Hay** (2000). "Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation." Mol Cell Biol **20**(22): 8458-67.
- Rodriguez, M. S., J. M. Desterro, S. Lain, C. A. Midgley, D. P. Lane and R. T. Hay** (1999). "SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53." Embo J **18**(22): 6455-61.
- Roemer, K.** (1999). "Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators." Biol Chem **380**(7-8): 879-87.

- Roth, J., M. Dobbelstein, D. A. Freedman, T. Shenk and A. J. Levine** (1998). "Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein." Embo J **17**(2): 554-64.
- Ryan, K. M. and K. H. Vousden** (1998). "Characterization of structural p53 mutants which show selective defects in apoptosis but not cell cycle arrest." Mol Cell Biol **18**(7): 3692-8.
- Sakaguchi, K., J. E. Herrera, S. Saito, T. Miki, M. Bustin, A. Vassilev, C. W. Anderson and E. Appella** (1998). "DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade." Genes Dev **12**(18): 2831-41.
- Sakaguchi, K., H. Sakamoto, M. S. Lewis, C. W. Anderson, J. W. Erickson, E. Appella and D. Xie** (1997). "Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53." Biochemistry **36**(33): 10117-24.
- Sakamuro, D., P. Sabbatini, E. White and G. C. Prendergast** (1997). "The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest." Oncogene **15**(8): 887-98.
- Sansome, C., A. Zaika, N. D. Marchenko and U. M. Moll** (2001). "Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells." FEBS Lett **488**(3): 110-5.
- Sartorelli, V., P. L. Puri, Y. Hamamori, V. Ogryzko, G. Chung, Y. Nakatani, J. Y. Wang and L. Kedes** (1999). "Acetylation of MyoD directed by PCAF is necessary for the execution of the muscle program." Mol Cell **4**(5): 725-34.
- Sax, J. K., P. Fei, M. E. Murphy, E. Bernhard, S. J. Korsmeyer and W. S. El-Deiry** (2002). "BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity." Nat Cell Biol **4**(11): 842-9.
- Sayan, A. E., B. S. Sayan, N. Findikli and M. Ozturk** (2001). "Acquired expression of transcriptionally active p73 in hepatocellular carcinoma cells." Oncogene **20**(37): 5111-7.
- Schneider, R., A. J. Bannister, C. Weise and T. Kouzarides** (2004). "Direct binding of INHAT to H3 tails disrupted by modifications." J Biol Chem **279**(23): 23859-62.
- Schuler, M. and D. R. Green** (2001). "Mechanisms of p53-dependent apoptosis." Biochem Soc Trans **29**(Pt 6): 684-8.

- Schuler, M., U. Maurer, J. C. Goldstein, F. Breitenbacher, S. Hoffarth, N. J. Waterhouse and D. R. Green** (2003). "p53 triggers apoptosis in oncogene-expressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial Bax translocation." Cell Death Differ **10**(4): 451-60.
- Schumacher, B., K. Hofmann, S. Boulton and A. Gartner** (2001). "The C. elegans homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis." Curr Biol **11**(21): 1722-7.
- Scolnick, D. M., N. H. Chehab, E. S. Stavridi, M. C. Lien, L. Caruso, E. Moran, S. L. Berger and T. D. Halazonetis** (1997). "CREB-binding protein and p300/CBP-associated factor are transcriptional coactivators of the p53 tumor suppressor protein." Cancer Res **57**(17): 3693-6.
- Sengupta, S., A. Shimamoto, M. Koshiji, R. Pedeux, M. Rusin, E. A. Spillare, J. C. Shen, L. E. Huang, N. M. Lindor, Y. Furuichi and C. C. Harris** (2005). "Tumor suppressor p53 represses transcription of RECQ4 helicase." Oncogene **24**(10): 1738-48.
- Seo, S. B., T. Macfarlan, P. McNamara, R. Hong, Y. Mukai, S. Heo and D. Chakravarti** (2002). "Regulation of histone acetylation and transcription by nuclear protein pp32, a subunit of the INHAT complex." J Biol Chem **277**(16): 14005-10.
- Seo, S. B., P. McNamara, S. Heo, A. Turner, W. S. Lane and D. Chakravarti** (2001). "Regulation of histone acetylation and transcription by INHAT, a human cellular complex containing the set oncoprotein." Cell **104**(1): 119-30.
- Shaulian, E., A. Zauberman, D. Ginsberg and M. Oren** (1992). "Identification of a minimal transforming domain of p53: negative dominance through abrogation of sequence-specific DNA binding." Mol Cell Biol **12**(12): 5581-92.
- Shaulsky, G., N. Goldfinger, A. Ben-Ze'ev and V. Rotter** (1990). "Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis." Mol Cell Biol **10**(12): 6565-77.
- Sheard, M. A., S. Uldrijan and B. Vojtesek** (2003). "Role of p53 in regulating constitutive and X-radiation-inducible CD95 expression and function in carcinoma cells." Cancer Res **63**(21): 7176-84.
- Shieh, S. Y., M. Ikeda, Y. Taya and C. Prives** (1997). "DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2." Cell **91**(3): 325-34.

- Sigal, A. and V. Rotter** (2000). "Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome." Cancer Res **60**(24): 6788-93.
- Slingerland, J. M., J. R. Jenkins and S. Benchimol** (1993). "The transforming and suppressor functions of p53 alleles: effects of mutations that disrupt phosphorylation, oligomerization and nuclear translocation." Embo J **12**(3): 1029-37.
- Song, H., M. Hollstein and Y. Xu** (2007). "p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM." Nat Cell Biol **9**(5): 573-80.
- Soussi, T., Y. Legros, R. Lubin, K. Ory and B. Schlichtholz** (1994). "Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review." Int J Cancer **57**(1): 1-9.
- Steegenga, W. T., A. J. van der Eb and A. G. Jochemsen** (1996). "How phosphorylation regulates the activity of p53." J Mol Biol **263**(2): 103-13.
- Stiewe, T., C. C. Theseling and B. M. Putzer** (2002). "Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis." J Biol Chem **277**(16): 14177-85.
- Stiewe, T., S. Zimmermann, A. Frilling, H. Esche and B. M. Putzer** (2002). "Transactivation-deficient DeltaTA-p73 acts as an oncogene." Cancer Res **62**(13): 3598-602.
- Strachan Tom und Read Andrew P., "Molekulare Humangenetik"** (1996), 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH
- Strahl, B. D. and C. D. Allis** (2000). "The language of covalent histone modifications." Nature **403**(6765): 41-5.
- Sykes, S. M., H. S. Mellert, M. A. Holbert, K. Li, R. Marmorstein, W. S. Lane and S. B. McMahon** (2006). "Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction." Mol Cell **24**(6): 841-51.
- Takimoto, R. and W. S. El-Deiry** (2000). "Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site." Oncogene **19**(14): 1735-43.
- Tang, Y., J. Luo, W. Zhang and W. Gu** (2006). "Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis." Mol Cell **24**(6): 827-39.
- Teodoro, J. G., A. E. Parker, X. Zhu and M. R. Green** (2006). "p53-mediated inhibition of angiogenesis through up-regulation of a collagen prolyl hydroxylase." Science **313**(5789): 968-71.

- Thiagalingam, S., K. H. Cheng, H. J. Lee, N. Mineva, A. Thiagalingam and J. F. Ponte** (2003). "Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code." Ann N Y Acad Sci **983**: 84-100.
- Thut, C. J., J. L. Chen, R. Klemm and R. Tjian** (1995). "p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60." Science **267**(5194): 100-4.
- Tomita, Y., N. Marchenko, S. Erster, A. Nemajerova, A. Dehner, C. Klein, H. Pan, H. Kessler, P. Pancoska and U. M. Moll** (2006). "WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization." J Biol Chem **281**(13): 8600-6.
- Trink, B., K. Okami, L. Wu, V. Sriuranpong, J. Jen and D. Sidransky** (1998). "A new human p53 homologue." Nat Med **4**(7): 747-8.
- Tyteca, S., G. Legube and D. Trouche** (2006). "To die or not to die: a HAT trick." Mol Cell **24**(6): 807-8.
- Uesugi, M. and G. L. Verdine** (1999). "The alpha-helical FXXPhiPhi motif in p53: TAF interaction and discrimination by MDM2." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 14801-6.
- Varley, J. M., M. Thorncroft, G. McGown, J. Appleby, A. M. Kelsey, K. J. Tricker, D. G. Evans and J. M. Birch** (1997). "A detailed study of loss of heterozygosity on chromosome 17 in tumours from Li-Fraumeni patients carrying a mutation to the TP53 gene." Oncogene **14**(7): 865-71.
- Vaziri, H., S. K. Dessain, E. Ng Eaton, S. I. Imai, R. A. Frye, T. K. Pandita, L. Guarente and R. A. Weinberg** (2001). "hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase." Cell **107**(2): 149-59.
- Venkatachalam, S., Y. P. Shi, S. N. Jones, H. Vogel, A. Bradley, D. Pinkel and L. A. Donehower** (1998). "Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation." Embo J **17**(16): 4657-67.
- Venot, C., M. Maratrat, C. Dureau, E. Conseiller, L. Bracco and L. Debussche** (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**(16): 4668-79.
- Vogelstein, B., D. Lane and A. J. Levine** (2000). "Surfing the p53 network." Nature **408**(6810): 307-10.

- Vousden, K. H. and D. P. Lane** (2007). "p53 in health and disease." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(4): 275-83.
- Vousden, K. H. and X. Lu** (2002). "Live or let die: the cell's response to p53." Nat Rev Cancer **2**(8): 594-604.
- Wang, P., M. Reed, Y. Wang, G. Mayr, J. E. Stenger, M. E. Anderson, J. F. Schwedes and P. Tegtmeier** (1994). "p53 domains: structure, oligomerization, and transformation." Mol Cell Biol **14**(8): 5182-91.
- Wang, X. W., Q. Zhan, J. D. Coursen, M. A. Khan, H. U. Kontny, L. Yu, M. C. Hollander, P. M. O'Connor, A. J. Fornace, Jr. and C. C. Harris** (1999). "GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3706-11.
- Wei, C. L., Q. Wu, V. B. Vega, K. P. Chiu, P. Ng, T. Zhang, A. Shahab, H. C. Yong, Y. Fu, Z. Weng, J. Liu, X. D. Zhao, J. L. Chew, Y. L. Lee, V. A. Kuznetsov, W. K. Sung, L. D. Miller, B. Lim, E. T. Liu, Q. Yu, H. H. Ng and Y. Ruan** (2006). "A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome." Cell **124**(1): 207-19.
- Wei, M. C., W. X. Zong, E. H. Cheng, T. Lindsten, V. Panoutsakopoulou, A. J. Ross, K. A. Roth, G. R. MacGregor, C. B. Thompson and S. J. Korsmeyer** (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death." Science **292**(5517): 727-30.
- Weinberg, R. L., D. B. Veprintsev, M. Bycroft and A. R. Fersht** (2005). "Comparative binding of p53 to its promoter and DNA recognition elements." J Mol Biol **348**(3): 589-96.
- Weisz, L., M. Oren and V. Rotter** (2007). "Transcription regulation by mutant p53." Oncogene **26**(15): 2202-11.
- Wienzek, S., J. Roth and M. Dobbstein** (2000). "E1B 55-kilodalton oncoproteins of adenovirus types 5 and 12 inactivate and relocalize p53, but not p51 or p73, and cooperate with E4orf6 proteins to destabilize p53." J Virol **74**(1): 193-202.
- Willis, A., E. J. Jung, T. Wakefield and X. Chen** (2004). "Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes." Oncogene **23**(13): 2330-8.

- Willis, S. N., L. Chen, G. Dewson, A. Wei, E. Naik, J. I. Fletcher, J. M. Adams and D. C. Huang** (2005). "Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins." Genes Dev **19**(11): 1294-305.
- Wu, G. S., T. F. Burns, E. R. McDonald, 3rd, W. Jiang, R. Meng, I. D. Krantz, G. Kao, D. D. Gan, J. Y. Zhou, R. Muschel, S. R. Hamilton, N. B. Spinner, S. Markowitz, G. Wu and W. S. el-Deiry** (1997). "KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene." Nat Genet **17**(2): 141-3.
- Xiong, Y., G. J. Hannon, H. Zhang, D. Casso, R. Kobayashi and D. Beach** (1993). "p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases." Nature **366**(6456): 701-4.
- Xirodimas, D. P., C. W. Stephen and D. P. Lane** (2001). "Cocompartmentalization of p53 and Mdm2 is a major determinant for Mdm2-mediated degradation of p53." Exp Cell Res **270**(1): 66-77.
- Xu, J. and G. F. Morris** (1999). "p53-mediated regulation of proliferating cell nuclear antigen expression in cells exposed to ionizing radiation." Mol Cell Biol **19**(1): 12-20.
- Yang, A., M. Kaghad, Y. Wang, E. Gillett, M. D. Fleming, V. Dotsch, N. C. Andrews, D. Caput and F. McKeon** (1998). "p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities." Mol Cell **2**(3): 305-16.
- Yang, A., R. Schweitzer, D. Sun, M. Kaghad, N. Walker, R. T. Bronson, C. Tabin, A. Sharpe, D. Caput, C. Crum and F. McKeon** (1999). "p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development." Nature **398**(6729): 714-8.
- Yang, A., N. Walker, R. Bronson, M. Kaghad, M. Oosterwegel, J. Bonnin, C. Vagner, H. Bonnet, P. Dikkes, A. Sharpe, F. McKeon and D. Caput** (2000). "p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours." Nature **404**(6773): 99-103.
- Yu, J., L. Zhang, P. M. Hwang, K. W. Kinzler and B. Vogelstein** (2001). "PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells." Mol Cell **7**(3): 673-82.
- Zaika, A. and U. M. Moll** (2000). "Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling." J Biol Chem **275**(21): 16202-12.

- Zaika, A. I., N. Slade, S. H. Erster, C. Sansome, T. W. Joseph, M. Pearl, E. Chalas and U. M. Moll** (2002). "DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors." J Exp Med **196**(6): 765-80.
- Zalcenstein, A., P. Stambolsky, L. Weisz, M. Muller, D. Wallach, T. M. Goncharov, P. H. Krammer, V. Rotter and M. Oren** (2003). "Mutant p53 gain of function: repression of CD95(Fas/APO-1) gene expression by tumor-associated p53 mutants." Oncogene **22**(36): 5667-76.
- Zhan, Q., M. J. Antinore, X. W. Wang, F. Carrier, M. L. Smith, C. C. Harris and A. J. Fornace, Jr.** (1999). "Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45." Oncogene **18**(18): 2892-900.
- Zhang, Y., J. S. Wang, L. L. Chen, X. K. Cheng, F. Y. Heng, N. H. Wu and Y. F. Shen** (2004). "Repression of hsp90beta gene by p53 in UV irradiation-induced apoptosis of Jurkat cells." J Biol Chem **279**(41): 42545-51.
- Zhao, Y., L. Chaiswing, J. M. Velez, I. Batinic-Haberle, N. H. Colburn, T. D. Oberley and D. K. St Clair** (2005). "p53 translocation to mitochondria precedes its nuclear translocation and targets mitochondrial oxidative defense protein-manganese superoxide dismutase." Cancer Res **65**(9): 3745-50.
- Zhong, Q., W. Gao, F. Du and X. Wang** (2005). "Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis." Cell **121**(7): 1085-95.

## 9 Anhang

Abkürzungen der Aminosäuren:

<b>Aminosäure</b>	<b>Abkürzungen 3 Buchstaben</b>	<b>Abkürzungen 1 Buchstabe</b>
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glycin	Gly	G
Glutamin	Gln	Q
Glutamat	Glu	E
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V