



Bundesministerium
für Umwelt, Naturschutz
und Reaktorsicherheit

ANALYSE VON P53 ABHÄNGIGER UND P53 UNABHÄNGIGER REPARATUR STRAHLEN- INDUZIERTER DNA BRÜCHE WÄHREND VERSCHIEDENER STADIEN DES ZELLYKLUS

BMU - 2007 - 707



BMU – 2007-707

**„Analyse von p53 abhängiger und p53 unabhängiger Reparatur
strahleninduzierter DNA Brüche während verschiedener Stadien
des Zellzyklus“**

**Heinrich-Pette-Institut
für experimentelle Virologie und Immunologie,
Universität Hamburg**

Dr. Irene Dornreiter

IMPRESSUM

Dieser Band enthält einen Abschlussbericht über ein vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) gefördertes Vorhaben. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das BMU übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter. Der Eigentümer behält sich alle Rechte an der weiteren Nutzung oder Vervielfältigung des Berichts vor.

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der des BMU übereinstimmen.

Herausgeber:

Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit

Referat RS I 2

Postfach 12 06 29

53048 Bonn

ISSN 1612-6386

Erscheinungsjahr: 2007

Kurzfassung

Bislang galt der archetypische Tumorsuppressor p53 auf Grund seiner Transaktivierungseigenschaften als einzigartig. Grund dieser Annahme war, dass alle anderen identifizierten humanen p53 Isoformen transkriptionell inaktiv sind. Allerdings wurde im Rahmen dieser Arbeit, die die Koordination von Zellzyklusprogression und Reparatur geschädigter Zellen in Abhängigkeit des p53 Status zum Thema hatte, eine neue p53 Spleißvariante (Δ p53) entdeckt, deren Transaktivierungsaktivität unabhängig von p53 reguliert wird. Im Gegensatz zu p53 transaktiviert Δ p53 die endogenen *p21* und *14-3-3 σ* aber nicht die *mdm2*, *bax* und *PIG3* Promotoren. Zellzyklusstudien zeigten, dass die differenzielle transkriptionelle Aktivität von Δ p53 S-Phasen spezifisch ist. Unmittelbar nach schadeninduzierter Aktivierung des ATM/ATR-intra-S-Phasen Kontrollpunkts transaktiviert ausschließlich Δ p53 den Cdk-Inhibitor p21, der mit der S-Phasen spezifischen Kinase Zyklin A-Cdk2 interagiert und deren Aktivität signifikant reduziert. Konsequenterweise führt die p21-vermittelte Reduktion der Zyklin A-Cdk2 Aktivität zur Attenuation der S-Phasen Progression. Die Daten zeigen, dass der ATR- Δ p53-p21-Zyklin A-Cdk2 Signalweg für die Entkopplung von Reparatur und Replikation unentbehrlich ist und indiziert, dass Δ p53 ein essenzieller Bestandteil sowohl des UV-induzierten ATR- als auch des γ -induzierten ATM-intra-S-Phasen Kontrollpunkts ist. Weitere Untersuchungen zeigten, dass in schwer geschädigten Zellen die genetische Konstellation mutp53/wt Δ p53 zur Endoreduplikation führt und somit die Entstehung von polyploiden Riesenzellen begünstigt. Anzunehmen ist, dass die koordinierte Aktivität von p53 und Δ p53 einen substanziellen Einfluss auf die zelluläre Reaktion nach DNA Schädigung hat, und der p53/ Δ p53 Status von großer Bedeutung für den Ausgang der zellulären Schadensreaktion ist.

Abstract

The archetypal human tumor suppressor p53 is considered to have unique transactivation properties. The assumption is based on the fact that additionally identified human p53 isoforms lack transcriptional activity. However, the evaluation of a correlation between p53 dependent attenuation of cell cycle progression and repair events upon DNA damage provided evidence for the existence of an alternatively spliced p53 isoform (Δ p53) that exerts its transcriptional activity independent from p53. In contrast to p53, Δ p53 transactivates the endogenous *p21* and *14-3-3 σ* but not the *mdm2*, *bax*, and *PIG3* promoter. Cell cycle studies showed that Δ p53 displays its differential transcriptional activity only in damaged S phase

cells. Upon damage induced activation of the ATR/ATM-intra-S-phase checkpoint, $\Delta p53$, but not p53, transactivates the Cdk inhibitor p21, induction of p21 results in down regulation of cyclin A-Cdk2 activity and accordingly attenuation of S phase progression. Data demonstrate that the ATR/ATM- $\Delta p53$ -p21-cyclin A-Cdk2 pathway is crucial to facilitate uncoupling of repair and replication events, indicating that $\Delta p53$ is an essential element of the UV-induced ATR- and γ -induced ATM-intra-S phase checkpoint. Furthermore, in severely damaged cells, the genetic constellation mutp53/wt $\Delta p53$ promotes endoreduplication leading to the formation of polyploid giant cells. Hence, it appears that the coordinated activity of p53 and $\Delta p53$ is essential for the cellular reaction provoked by DNA damage and thus determines the faith of the damaged cell.

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Übergeordnete Zielsetzung	8
2. Einzelzielsetzung	9
2.1 Induktion der schadeninduzierten Kontrollpunkte	9
2.2 Induktion der Reparaturereignisse in Abhängigkeit der Zellzyklusposition	10
3. Stand der Forschung	12
3.1 Signalwege in der zellulären Antwort auf DNA Schäden	12
3.2 Der Tumorsuppressor p53	14
3.3 Biologische Aktivität von p53	17
4. Wissenschaftliche Methoden	25
4.1 Zellkultur	25
4.1.1 Kultivierung von adhärent wachsenden Zellen	25
4.1.2 Kultivierung von Suspensionszellen	26
4.1.3 Kultivierung von Insektenzelllinien	27
4.1.4 Auftauen und Einfrieren von Zellen	27
4.2 Baculovirusinfektion	28
4.3 Herstellung induzierbarer TO-Zelllinien	28
4.4 Zellzyklussynchronisation	29
4.4.1 Gegenstromzentrifugation (Elutriation)	29
4.4.2 Isoleucinentzug	30
4.5 Bestrahlung von Zellen	30
4.5.1 γ -Bestrahlung	30
4.5.2 UV-Bestrahlung	30
4.6 Herstellung von Zellsedimenten	31
4.6.1 Suspensionskultur	31
4.6.2 Adhärenente Zellen	31
4.7 Zellbiologische Methoden	31
4.7.1 Bestimmung der Viabilität	31
4.7.2 Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusscytometrie (FACS)	32

4.7.3	Indirekte Immunfluoreszenz	32
4.7.4	Chromatin-Immunpräzipitation-PCR (ChIP-PCR)	33
4.7.4.1	Zellkernpräparation und Zellyse	33
4.7.4.2	Präzipitation	34
4.7.4.3	Elution der Immunkomplexe und Freisetzung der DNA	35
4.7.4.4	Phenol/Chloroform Extraktion und DNA-Präzipitation	35
4.7.4.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen	36
4.7.4.6	Neutrale Agarosegelelektrophorese (Sambroock <i>et al.</i> , 1989)	37
4.7.5	Comet-Analyse	37
4.7.6	[³ H]-Thymidin Einbau	39
4.8	Proteinanalytische Methoden	40
4.8.1	Gesamtzellextrakt (Lysat)	40
4.8.2	Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	41
4.8.3	Immunpräzipitation von Proteinen aus Gesamtzellextrakten	41
4.8.4	„Target-bound“-Histon-Kinaseaktivitätstest	41
4.8.5	Isolierung von humanen rekombinanten p53 aus Baculovirus infizierten Insektenzellen	42
4.8.6	GST-„pull-down“ und Oligomerisierung	43
4.8.7	Oligomerisierungsstatus von Δp53	44
4.8.8	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli <i>et al.</i> , 1970)	45
4.8.9	Nachweis von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen	46
4.8.9.1	Coomassiefärbung	46
4.8.9.2	Nachweis von Proteinen durch Autoradiographie	46
4.8.9.3	Western Blot (WB) und immunologische Detektion	46
4.8.9.4	MALDI-TOF/MS	49
4.9	Nukleinsäure-analytische Methoden	50
4.9.1	Isolierung von RNA	50
4.9.2	Reverse Transkription (RT)	50
4.9.3	PCR	51
4.9.4	Semiquantitative RT-PCR	52
4.9.5	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	53
4.9.6	Ethanol-fällung von DNA	54

4.9.7	Sequenzierung	54
4.9.8	Klonierung von $\Delta p53$, p53 und ATR ^{kd}	55
5.	Ergebnisse	56
5.1	Bestrahlungen mit 10 Gy führen zu unterschiedlichen zellulären Reaktionen, die nicht mit dem p53 Status korrelieren	57
5.2	Bestrahlung mit 10 Gy führt zur Hochregulation von anti-apoptotischen Zielgenen in „type II“ mutp53 Zellen	62
5.3	Primatenzellen generieren eine alternativ gespleißte p53-Isoform, die als $\Delta p53$ bezeichnet wird	65
5.4	$\Delta p53$ bildet Homo- aber keine Hetero-Oligomere und verfügt über differenzielle transkriptionelle Aktivität	71
5.5	Die differenzielle Transaktivierungsaktivität von $\Delta p53$ ist S-Phasen spezifisch	77
5.6	Die Aktivierung des $\Delta p53$ -vermittelten intra-S-Phasen Kontrollpunkts ist abhängig von der Position der Zelle im Zellzyklus zum Zeitpunkt der Bestrahlung	80
5.7	Sequenzielle Aktivierung und Inaktivierung von $\Delta p53$ und p53 in G1/S UV-bestrahlten wtp53 Zellen ist ATR-abhängig	87
5.8	$\Delta p53$ attenuiert die S-Phasen Progression durch Reduktion der S-Phasen spezifischen Zyklin A-Cdk2 Aktivität	94
5.9	Die $\Delta p53$ -vermittelte Attenuation der S-Phasen Progression ermöglicht die Entkopplung von Reparatur- und Replikationsereignissen UV-geschädigter Zellen	99
5.10	γ -Bestrahlung am G1/S-Übergang führt zur sequenziellen Aktivierung des intra-S und G2 Kontrollpunkts	109
5.11	Die $\Delta p53$ -vermittelte Attenuation der S-Phasen Progression ermöglicht die Entkopplung von NHEJ Reparatur- und Replikationsereignissen γ -geschädigter Zellen	113
6.	Diskussion	121
6.1	Funktion von $\Delta p53$ im UV-induzierten intra-S-Phasen Kontrollpunkt	122
6.2	Funktion von $\Delta p53$ im γ -induzierten intra-S-Phasen Kontrollpunkt	127

6.3	Polyploidisierung und die p53/ Δ p53 Konstellation	130
7.	Literatur	133

1. Übergeordnete Zielsetzung

Schadeninduzierte Kontrollpunkte wurden lange Zeit als nichtessenzielle regulatorische Signalwege betrachtet, die die Zellzyklusprogression zu Gunsten der Reparatur des geschädigten Genoms temporär unterbrechen. Allerdings weisen neuere Untersuchungen darauf hin, dass diese durch DNA Schaden induzierten Kontrollpunkte nicht nur den Zellzyklus beeinflussen, sondern auch Signalwege, die Einfluss auf die Chromatinstruktur, DNA Reparatur, DNA Replikation, Transkription und Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) nehmen. Auf Grund dessen wird postuliert, dass die Attenuation der Zellzyklusprogression ein essenzieller integraler Bestandteil der durch DNA Schaden induzierten vielschichtigen Reaktionskaskade in höheren Eukaryonten ist. Nur durch koordiniertes Zusammenspiel der Einzelfunktionen kann die genetische Stabilität bewahrt werden.

Schadeninduzierte Signalwege setzen die Integration des Schadenssignals und dessen anschließende Weitergabe an die Zellzyklus- Replikation- und Reparaturkontrollpunkte voraus. Die Übermittler der Schadensmeldung, zu denen die Phosphoinositid 3-Kinase-verwandten Kinase (PIKK) ATM (*Ataxia telangiectasia mutiert*) und ATR (ATM-und-Rad3-verwandtes Protein) zählen, übertragen und verstärken das von den Sensoren (z.B. MRN Komplex) aufgenommene Schadenssignal mittels einer Phosphorylierungskaskade an so genannte Effektorproteine, die wichtige Komponenten der Zellzyklus- und Reparaturkontrollpunkte sind. Effektorproteine wie z.B. der Tumorsuppressor p53, die Checkpoint-Kinasen Chk1 und 2 oder die Cdk-aktivierenden Cdc25-Phosphatasen greifen schließlich kontrollierend in die Zellzyklusprogression, Restrukturierung des Chromatins, die DNA Replikation und DNA Reparatur ein. Bereits gut untersucht ist die Funktion der Schadensübermittler ATM und ATR, jedoch sind die von diesen PIK Kinase ausgesendeten Signale, die eine Vernetzung der Kommunikation zwischen der Position der Zelle im Zellzyklus, der aktuellen Chromatinstruktur, der DNA Replikation und den Reparaturprozessen ermöglichen, weitgehend unbekannt. Deshalb soll die Aufklärung der molekularen Mechanismen dieses schadeninduzierten und durch ATM/ATR-vermittelten Netzwerkes in Hinblick auf die Funktion des Tumorsuppressors p53 Gegenstand des hier vorgeschlagenen Projektes sein.

2. Einzelzielsetzung

Durch Bestrahlung mit ionisierender γ -Strahlung sollten in etablierten humanen bzw. Primaten-Zelllinien, die sich in ihrem *p53* Status unterscheiden, zu definierten Zeiten im Zellzyklus DNA Schäden induziert werden. Zusätzlich sollen die geplanten Untersuchungen auch mit UV-Strahlung durchgeführt werden, um Aufschlüsse über eventuelle Unterschiede in der zellulären Reaktion in Abhängigkeit von der Art und Schwere des induzierten Schadens während der einzelnen Zellzyklusphasen zu erhalten. In weitergehenden Analysen sollte versucht werden, die molekularen Mechanismen aufzudecken, über die die *p53*-vermittelten Signale Einfluss auf die Zellzyklusprogression und Reparatur nehmen. Durch vergleichende Untersuchungen mit Zellen, in denen *p53* durch Mutation verändert ist, sollte darüber hinaus untersucht werden, inwieweit das Fehlen von funktionellem wildtyp *p53* (wtp53) bzw. die Expression von mutiertem *p53* (mutp53) einen substanziellen Einfluss auf den Zellzyklus und die Reparatur hat. Insgesamt sollen die vorgesehenen Experimente eine mögliche Korrelation zwischen *p53* Status und Reparaturfähigkeit der Zelle zu verschiedenen Stadien im Zellzyklus in Abhängigkeit der Art des applizierten Schadens erfassen. Die Charakterisierung einer solchen Korrelation könnte durchaus eine Prognose bezüglich des Ausgangs einer Strahlentherapie ermöglichen.

2.1 Induktion der schadeninduzierten Kontrollpunkte

Säugerzellen verfügen über Zellzyklus Kontrollpunkte an den Übergängen der G1- zur replikativen S-Phase sowie von G2 nach M (Mitose), die durch DNA Schäden aktiviert werden und durch Inhibierung der entsprechenden zellzyklustreibenden Zyklin-abhängigen Kinasen (Cdk) den Übergang in die nachfolgende Zellzyklusphase verhindern können. Die resultierende Attenuation der Zellzyklusprogression bezeichnet man je nach Position im Zellzyklus als G1- bzw. G2-Kontrollpunkt. Darüber hinaus ist ein intra-S-Phasen Kontrollpunkt bekannt, der, ebenfalls schadensaktiviert, die Progression durch die S-Phase unmittelbar vor dem Beginn der DNA Replikation verlangsamt.

Aus Bestrahlungsexperimenten, die mit wtp53 und mutp53 Zellen durchgeführt wurden ging hervor, dass nur wtp53 Zellen alle Zellzyklus Kontrollpunkte aktivieren, dagegen können mutp53 Zellen nach erfolgter DNA Schädigung lediglich die Progression durch die G2-Phase attenuieren. Hilfreich bei der Aufklärung dieser unterschiedlichen, durch schadeninduzierten zellulären Vorgänge ist zunächst die Identifizierung der Signale, die in bestrahlten wtp53 Zellen zur Attenuation der Phasen Progression und in bestrahlten mutp53 Zellen zur

Auslösung des G2-Kontrollpunkts führen. Zur Klärung dieser Vorgänge sollten synchronisierte wtp53 und mutp53 Zellen am G1/S-Übergang mittels γ -Strahlung (2 Gy) sowie UV-Strahlung (10 J/m^2) geschädigt und im Hinblick auf die Aktivierung des jeweiligen Kontrollpunkts durch Überprüfung der schadeninduzierten ATM/ATR-Reaktionskaskade untersucht werden. Darüber hinaus sollte festgestellt werden, welche Funktion p53 bei der Attenuation des intra-S-Phasen Kontrollpunkts und bei der Induktion des G2-Kontrollpunkts ausübt. Ein weiteres, für die S-Phasen Attenuation und den G2-Kontrollpunkt wichtiges Kriterium ist die Regulation der Aktivität der zellzyklustreibenden Zyklin-abhängigen Kinasen und Cdc25 Phosphatasen, die durch posttranslationale Modifikation, Proteolyse und Komplexierung mit p53-induzierbaren Genprodukten wie dem Cdk-Inhibitor p21 bzw. dem Adaptorprotein 14-3-3- σ erfolgen kann. Durch vergleichende Untersuchungen mit bestrahlten wtp53 und mutp53 Zellen sollten biochemische Analysen Aufschluss darüber geben, inwieweit der p53 Status Einfluss auf die Regulation dieser zellzyklusregulierenden Enzymaktivitäten und Aktivierung der schadeninduzierten Zellzykluskontrollpunkte nimmt.

2.2 Induktion der Reparaturereignisse in Abhängigkeit der Zellzyklusposition

Erzeugung von DNA Schäden führt unmittelbar zur Aktivierung der ATM/ATR-vermittelten Kontrollpunkte, die wiederum in Abhängigkeit der Schwere des Schadens zur Attenuation der Zellzyklusprogression oder zum Zellzyklusarrest führen. Anzunehmen ist, dass während der Attenuation der Zellzyklusprogression die Reparatur des geschädigten Genoms erfolgt, dessen qualitative Instandsetzung wiederum Einfluss auf die Schadensreaktion nimmt. Unbekannt ist, inwieweit p53 Einfluss auf zellzyklusabhängige Reparaturereignisse nehmen kann, zumal in γ - bzw. UV-geschädigten Zellen unterschiedliche Reparaturprozesse stattfinden. UV-Strahlung aktiviert den „nucleotide excision repair“ (NER) Mechanismus, während durch γ -Strahlung verursachte DNA Doppelstrangbrüche die schadeninduzierten Signalkaskade mobilisieren, die zur Aktivierung der Reparaturwege NHEJ (non homologous end joining) und HDR (homology-dependent recombination) führen. Die Art und Weise wie die DNA Reparatur von Doppelstrangbrüchen erfolgt ist abhängig vom DNA Gehalt und somit von der Position der geschädigten Zelle im Zellzyklus. Plausibel ist, dass geschädigte Zellen mit einem DNA Gehalt von 2N ihre Schäden nur über den NHEJ Reparaturweg beheben können, während die akkuratere HDR erst während bzw. nach Duplikation des Genoms ermöglicht werden kann. Jedoch ist hinsichtlich der molekularen Mechanismen, die in Abhängigkeit der Schadensart und Position der Zelle im Zellzyklus zum Zeitpunkt der Schädigung diese

unterschiedlichen Schadensreaktionen induzieren und regulieren, nur wenig bekannt. Völlig unbekannt ist, ob Zellen, die unmittelbar vor Beginn der DNA Replikation geschädigt werden ihr Genom noch vor dem Beginn der Replikation reparieren können oder erst nach Initiation der DNA Replikation DNA Schäden beheben können. Auf Grund dessen sollten vor allem die Reparaturvorgänge γ - und UV-bestrahlter Zellen, die unmittelbar vor dem Beginn der DNA Replikation geschädigt werden, in Abhängigkeit des *p53* Status untersucht werden. Insbesondere sollte auch geklärt werden, ob nach Erzeugung von Doppelstrangbrüchen *p53* bei der Entscheidung der verwendeten Reparaturart (NHEJ, HDR) überhaupt eine Rolle spielt, da sowohl *wtp53* als auch *mutp53* Zellen Doppelstrangbrüche reparieren.

3. Stand der Forschung

Schadeninduzierte Kontrollpunkte wurden lange Zeit als nichtessenzielle regulatorische Signalwege betrachtet, die die Zellzyklusprogression zu Gunsten der Reparatur des geschädigten Genoms temporär unterbrechen. Allerdings weisen neuere Untersuchungen darauf hin, dass diese durch DNA Schaden induzierten Kontrollpunkte nicht nur den Zellzyklus beeinflussen, sondern auch Signalwege, die Einfluss auf die Chromatinstruktur, DNA Reparatur, DNA Replikation, Transkription und Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) nehmen. Auf Grund dessen wird postuliert, dass die Attenuation der Zellzyklusprogression ein essenzieller integraler Bestandteil der durch DNA Schaden induzierten vielschichtigen Reaktionskaskade in höheren Eukaryonten ist. Nur durch ein koordiniertes Zusammenspiel der Einzelfunktionen kann die genetische Stabilität bewahrt werden.

Im Zentrum dieses Projektes steht die Analyse, wie die Signale der p53-abhängigen Reaktionen auf genotoxischen Stress integriert werden und somit die Selektivität der p53-abhängigen Schadensantwort erreicht wird. Hauptziel dabei ist die Identifizierung möglicher Mechanismen, auf denen die Entscheidung zwischen p53-abhängiger Attenuation der Zellzyklusprogression und Initiation der DNA Reparatur beruht.

3.1 Signalwege in der zellulären Antwort auf DNA Schäden

Die Signalwege, die nach dem Eintreten von DNA Schäden das zelluläre Kontrollsystem aktivieren, sind komplex und Gegenstand intensivster Forschung. Die Komplexität beruht auf der Vielzahl der Parameter, die bei einer effektiven und adäquaten Schadensantwort Berücksichtigung finden müssen (**Abb. 1-1**). Die wichtigsten Faktoren dabei sind sicherlich Art und Ausmaß des Schadens.

Die Art des Schadens wird dadurch bestimmt, wie und durch welches Agens der Schaden induziert wurde. So führt Bestrahlung mit ultraviolettem (UV) Licht zu Photodimeren und Modifikation von Basen (Thoma, 1999), während ionisierende Strahlung überwiegend Doppelstrangbrüche verursacht (Übersichtsartikel: Fei und El-Deiry, 2003; Iliakis *et al.*, 2003). Chemikalien führen zur Vernetzung der DNA mit Proteinen, Basenmodifikation oder -abspaltung und Strangbrüchen oder verändert durch Einlagerung die Topologie der DNA. Die Erkennung und Behebung der verschiedenen Schadensarten geschieht über zahlreiche miteinander vernetzte Signalwege, an denen eine Vielzahl

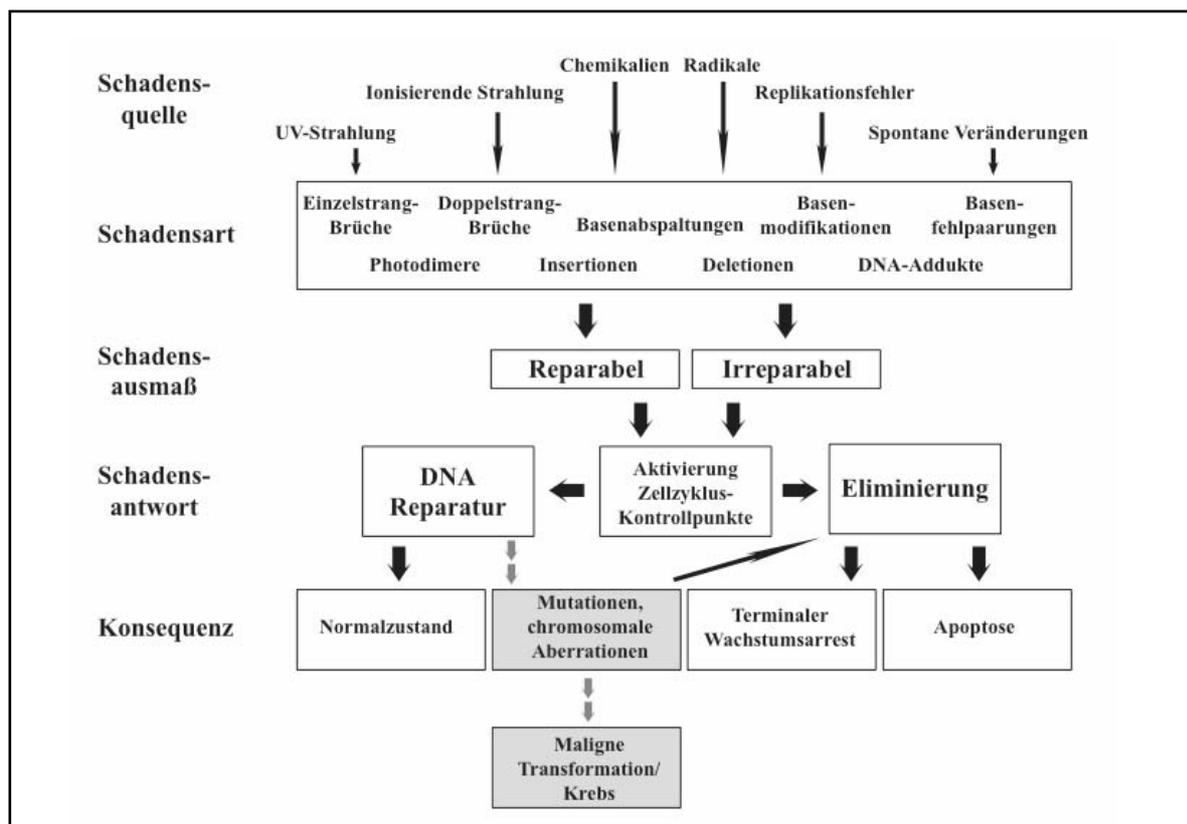


Abb. 3-1: Die zelluläre Antwort auf genotoxischen Stress. Verschiedene Schadensquellen induzieren verschieden Arten von DNA Schäden. Je nach Ausmaß des Schadens wird das Schicksal der geschädigten Zelle durch die entsprechende Schadensantwort bestimmt. Eine vorübergehende Aktivierung der Zellzyklus Kontrollpunkte verbunden mit DNA Reparatur beseitigt die Schäden, und die Zelle wird nach Beenden der Schadensantwort wieder in den Normalzustand versetzt. Bei irreparablen Schäden werden Eliminierungsprogramme, wie Apoptose oder terminaler Wachstumsarrest aktiviert. Werden irreparabel geschädigte Zellen nicht eliminiert oder erfolgt die Reparatur nur unvollständig oder fehlerhaft, manifestieren sich Mutationen und chromosomale Aberrationen im Genom, die zu einer malignen Transformation und Krebs führen können.

spezifischer Komponenten beteiligt sind (Übersichtsartikel: Cline und Hanawalt, 2003). Dabei ermöglichen die schadenaktivierten Signalwege zwei gegensätzliche, zelluläre Reaktionen, die vom Ausmaß des Schadens und genetischem Hintergrund bestimmt werden:

1. Der Schaden ist reparabel und die genomische Integrität kann durch Reparaturprozesse wiederhergestellt werden. In diesem Fall wird durch Aktivierung der Zellzyklus Kontrollpunkte eine temporäre Verzögerung der Zellteilung induziert, um durch Reparatur eine Amplifikation des Schadens zu verhindern.
2. Das Ausmaß des Schadens ist so groß, dass eine vollständige Reparatur nicht möglich ist. Um die genomische Integrität des Gesamtorganismus sicherzustellen,

wird die geschädigte Zelle in diesem Fall durch Apoptose eliminiert bzw. Durch einen terminalen Wachstumsarrest dauerhaft von weiteren Zellteilungen, durch die Mutationen und chromosomale Aberrationen auf Tochterzellen weitergegeben werden könnten, ausgeschlossen.

Die molekularen Mechanismen, welche die Entscheidung für eines der beiden Szenarien herbeiführen, sind bislang weitgehend unklar. Unmittelbar einleuchtend ist hingegen, dass Defekte in der Entscheidungskompetenz bezüglich Überleben oder Eliminierung auf Einzelzellebene dramatische Folgen für das Fortleben des Gesamtorganismus haben: Werden Zellen mit nur geringen und im Normalfall reparablen Schäden nicht am Leben erhalten, sondern eliminiert, wird der Organismus unter normalen Umwelteinflüssen seine Gewebesubstanz aufrechterhalten können. Werden im anderen Fall geschädigte Zellen nicht eliminiert oder ihre Teilung verhindert, manifestieren sich die Schäden dauerhaft im Genom.

3.2 Der Tumorsuppressor p53

Wichtige Erkenntnisse in die Signalwege der zellulären Schadensantwort wurden anhand von Zellen mit einem Phänotyp gewonnen, der mit einem Krankheitsbild und Defekten in der Schadensantwort in Zusammenhang gebracht werden konnte. Neben relativ seltenen Krankheiten, die auf eine begrenzte Anzahl von veränderten Genen zurückgeführt werden konnten (Übersichtsartikel: Shiloh, 2003; Andrea und Grompe, 2003), stellen die Krebserkrankungen die zahlenmäßig größte und, in Hinblick auf die genetischen Veränderungen, die heterogenste Gruppe dar. Trotz Heterogenität von Krebszellen bezüglich ihrer genetischen Defekte gibt es einige Gene, die auffallend häufig in ihrer Funktionalität betroffen sind und somit von besonderem Interesse für die Krebsforschung sind. Zu ihnen gehört das Tumorsuppressorgen *p53*, das in 50-60% aller menschlichen Tumore Mutationen aufweist oder dessen Genprodukt durch virale Proteine inaktiviert ist (Hainaut und Hollstein, 2000) (**Abb. 3-2**).

Das humane *p53* Gen kodiert ein 393 Aminosäure großes Protein, das seine biologische Funktionalität als Tetramer entfaltet (Übersichtsartikel: Ko und Prives, 1996; Albrechtsen *et al.*, 1999; Vousden und Lu, 2002; Oren, 2003). Die meisten der *p53*-vermittelten zellulären Prozesse beruhen auf der transkriptionellen Aktivität des Tumorsuppressors, der die Expression einer großen Zahl von Zielgenen induziert. Andere Gene werden von *p53* möglicherweise reprimiert (Zhao *et al.*, 2000). Die durch *p53* transaktivierten Zielgene können ihrer Funktion entsprechend in Gruppen eingeteilt werden,

zu denen zahlenmäßig und in ihrer Bedeutung innerhalb der p53-vermittelten Signalwege am besten charakterisiert folgende zwei Gruppen gehören: Gruppe I beinhaltet Gene, die Zellzyklusarreste einleiten, wie *p21*, *14-3-3 σ* oder *gadd45*, während Gruppe II Gene enthält, deren Produkte zur Induktion des programmierten Zelltods führen, wie *Bax*, *PIG-3*, *NOXA*, *PUMA* sowie *Fas/APO-1* und *KILLER/DR5*.

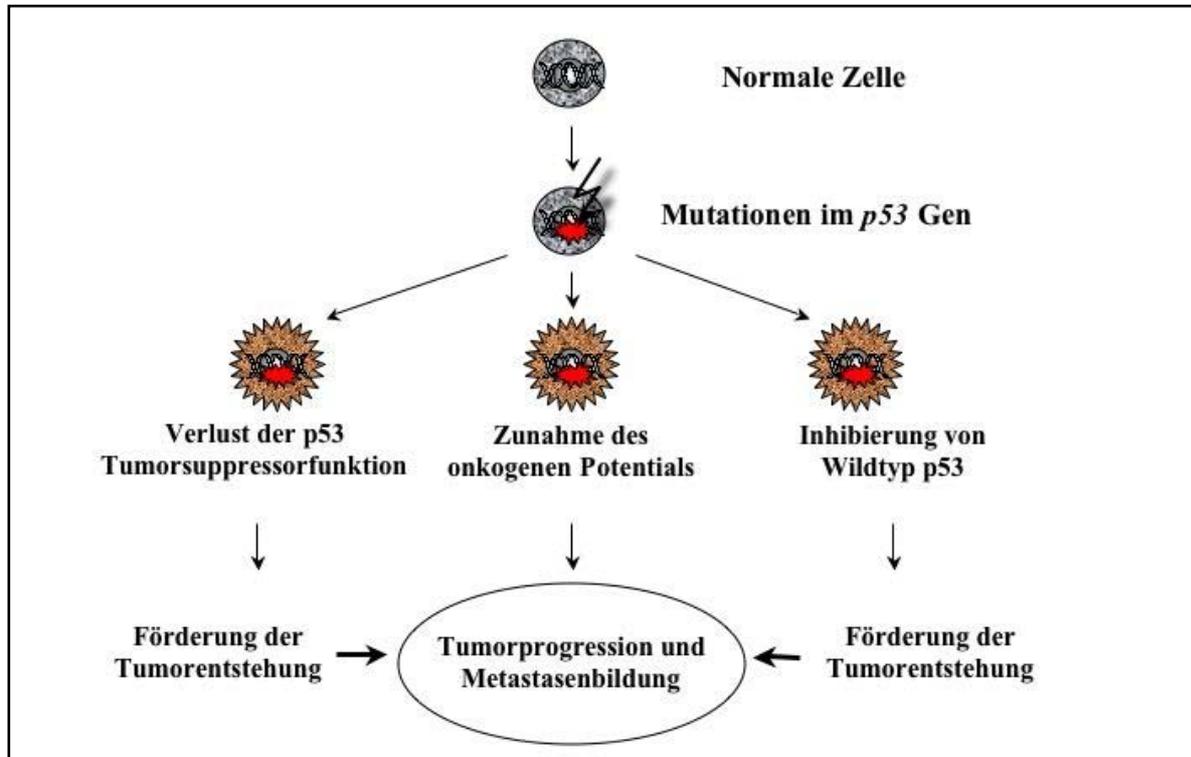


Abb. 3-2: Auswirkungen von Mutationen im p53 Gen.

Neben der Aktivität eines Transkriptionsfaktors wurden Protein-Protein-Interaktionen von p53 mit einer Vielzahl von zellulären und viralen Proteinen beschrieben, über die der Tumorsuppressor transaktivierungsunabhängig zelluläre Prozesse beeinflusst (Übersichtsartikel: Ko und Prives, 1996; Janus *et al.*, 1999). Zu den Bindungspartnern von p53 zählen auch Faktoren der Replikation wie RPA und DNA Polymerase α -Primase (Dutta *et al.*, 1993; Li und Botchan, 1993; Abramova *et al.*, 1997; Kühn *et al.*, 1999; Wolter, 2001; Melle und Nasheuer, 2002; Chemnitz, 2003; Dornreiter unveröffentlichte Daten). Faktoren des Reparatursystems wie CSB, Ref-1 und DNA Polymerase β (Wang *et al.*, 1995; Gaiddon *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2001) sowie Apoptose regulierende Proteine wie Bcl-2 und Bcl-x1 (Mihara *et al.*, 2003). Essenziell für die transaktivierende Wirkung von p53 ist die Rekrutierung von basalen Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel TFIID, TBP und TAF 31 (Xiao *et al.*, 1994; Horikoshi *et al.*, 1995; Lu und Levine, 1995), die ebenfalls durch Protein-Protein Interaktion vermittelt wird.

In einer normalen Zelle liegt p53 als Protein mit kurzer Halbwertszeit in sehr geringen Mengen als „latentes“ Protein vor, dessen Funktionalität weitgehend unklar ist. Durch Stress-Signale, wie Bestrahlung mit UV-Licht oder ionisierender Strahlung, zahlreiche chemotherapeutische Chemikalien, erhöhte Mengen von reaktiven Sauerstoffverbindungen, Infektion mit Viren, Aktivierung von Onkogenen, Hypoxie oder Depletion von Nukleotiden wird der Tumorsuppressor stabilisiert (Jin und Levine, 2001). Die resultierenden großen Mengen von p53 akkumulieren überwiegend im Zellkern (Fritsche *et al.*, 1993) und induzieren die Transaktivierung der p53-abhängigen Zielgene, deren Produkte folglich Zellzyklusarrest bzw. Apoptose einleiten. Voraussetzung für Stabilisierung und Aktivierung sowie eine Regulation der vielfältigen biologischen Aktivitäten des Tumorsuppressors scheint die Modifikation von p53 durch Phosphorylierung, Acetylierung, Ribosylierung, O-Glycosylierung oder Sumoylierung zu sein (Übersichtsartikel: Jayaraman und Prives, 1999; Appella und Anderson, 2000; Melchior und Hengst, 2002). Eine besondere Rolle in der Aktivierung haben dabei die durch DNA Schaden induzierten Phosphoinositid 3-Kinase-verwandten Kinasen (PIKK) ATM (*Ataxia telangiectasia mutiert*) und ATR (ATM- und Rad3-verwandtes Protein) sowie die durch ATM bzw. ATR aktivierten „checkpoint“ Kinasen Chk2 und Chk1 (Bartek und Lukas, 2001). Diese durch Schaden aktivierten Kinasen phosphorylieren p53 am Serinrest 15 direkt und durch die „checkpoint“ Kinasen Chk2 bzw. Chk1 am Serinrest 20 indirekt und bewirken, dass einerseits für den proteolytischen Abbau von p53 notwendige Bindung der Ubiquitinligase Mdm2 verhindert wird und andererseits die transkriptionelle Eigenschaft des Tumorsuppressors aktiviert wird (Übersichtsartikel: Abraham, 2001; Shiloh, 2003).

Die Deaktivierung von p53 erfolgt im Wesentlichen Mdm2-gesteuert durch proteasomalen Abbau des Tumorsuppressors (Haupt *et al.*, 1997; Kubbutat, *et al.*, 1997). Mdm2 bindet an p53 und bewirkt dessen Inaktivierung sowohl durch Export aus dem Zellkern wie auch durch Konjugation mit Ubiquitin, dem Signalpeptid für proteasomalen Abbau (Übersichtsartikel: Kubbutat und Vousden, 1998; Chène, 2003). Da *Mdm2* zur Gruppe der p53-abhängigen Zielgene gehört (Barak *et al.*, 1993) unterliegt das Verhältnis der p53 und Mdm2 Proteinmengen einem autoregulatorischen Rückkopplungsmechanismus, dessen Kontrolle wesentlich für die Steuerung der p53-vermittelten Signalwege ist (Wu *et al.*, 1993; Picksley und Lane, 1993). Dementsprechend beeinflussen Modifikationen von beiden Proteinen die Interaktion (Übersichtsartikel: Ashcroft und Vousden, 1999; Chène, 2003; Shiloh; 2003).

3.3 Biologische Aktivitäten von p53

Die zentrale Funktion von p53 besteht darin, die genomische Integrität zu bewahren (Lane, 1992; Janus *et al.*, 1999). Dies erfolgt in der Reaktion auf genotoxischen Stress auf zwei verschiedene Arten. Durch Einleitung eines Zellzyklusarrests wird eine Amplifizierung des Schadens verhindert, die geschädigte Zelle jedoch am Leben erhalten, während sie durch den kontrollierten Zelltod eliminiert wird. Der Tumorsuppressor beeinflusst Signalwege der Zellzyklusregulation wie die der Apoptose auf verschieden Weisen und spielt daher eine wichtige Rolle in der Regulation und Koordination von Zellwachstum und Zelltod.

Einfluss auf Zellzyklus und Reparatur

Die Vermehrung eukaryontischer Zellen durch Teilung kann durch das Modell des vierphasigen Zellzyklus beschrieben werden (Übersichtsartikel: Iliakis, 1997; Lundberg und Weinberg, 1999). Darin werden die Phasen der replikativen DNA Synthese Aktivität (S-Phase sowie der mitotischen Zellteilung (M-Phase) durch zwei „gap“-Phasen (G1- sowie G2-Phase) voneinander getrennt, in denen ein Größenwachstum sowie die Vorbereitung der nachfolgenden Zellzyklusphase erfolgt. Ruhende, das heißt nicht proliferierende Zellen befinden sich im so genannten G0-Stadium.

Der Eintritt in den Zellzyklus wie auch die Progression durch die verschiedenen Phasen erfolgt durch ubiquitäre Zyklin-abhängige Protein Kinasen (Cdk), die sich aus einer katalytischen Serin/Threonin-Kinase Untereinheit und einer regulatorischen Untereinheit, dem Zyklin, zusammensetzen (Nigg, 1995). In höheren Eukaryonten bilden sich zellzyklusabhängig verschiedene Cdk-Komplexe, die sich in ihrer Aktivität und Substratspezifität voneinander unterscheiden (Horton und Templeton, 1997) (**Abb. 3-3**). Neben der kontrollierten Assoziation von Zyklinen und Cdks wird die Aktivität der zellzyklusregulierenden Kinasen außerdem durch aktivierende und inhibierende Phosphorylierungen sowie durch Interaktion mit Cdk-Inhibitoren (CKIs) wie p16, p21 oder p27 reguliert (Nigg, 1995; Obaya und Sedivy, 2002). Insgesamt ergibt sich so ein hocheffektives Regulationssystem zur Steuerung des Zellwachstums.

Die Erkennung von DNA Schäden gehört zu den Phänomenen, die eine Attenuation des Zellzyklus in Hinblick auf die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität erforderlich macht. Eukaryontische Zellen aktivieren als Antwort auf einen DNA Schaden eine Vielzahl von Mechanismen, die die Zellzyklusprogression unterbrechen, um so mehr Zeit für die Reparatur des geschädigten Genoms zu gewinnen. Diese Mechanismen sind Kontrollpunkte,

die während drei verschiedenen Zellzyklusphasen aktiviert werden können. Einer dieser drei Kontrollpunkte befindet sich in der G1-Phase (G1-Kontrollpunkt oder START), ein weiterer arbeitet am G1/S-Übergang (intra-S-Phase Kontrollpunkt) und ein dritter liegt in der G2-Phase (G2-Kontrollpunkt). Nach dem Durchlaufen eines Kontrollpunktes kann erst wieder am nächsten Kontrollpunkt die Progression der Zellen durch den Zellzyklus angehalten bzw. attenuiert werden (Zhou und Elledge, 2000). Der Tumorsuppressor p53 ist an der Induktion von Zellzyklus-Kontrollpunkten in G1 und G2 über verschiedene, durch ihn transaktivierte und reprimierte Zielgene sowie über Protein-Protein Interaktionen beteiligt. Am klarsten erwiesen hinsichtlich einer physiologischen Relevanz bei der Auslösung eines p53-vermittelten Wachstumsarrests ist der Beitrag der p53-abhängigen Zielgene *p21*, *14-3-3 σ* und *Gadd45* (El-Deiry et al., 1993; Hermeking et al., 1997; Kastan et al., 1992). Durch

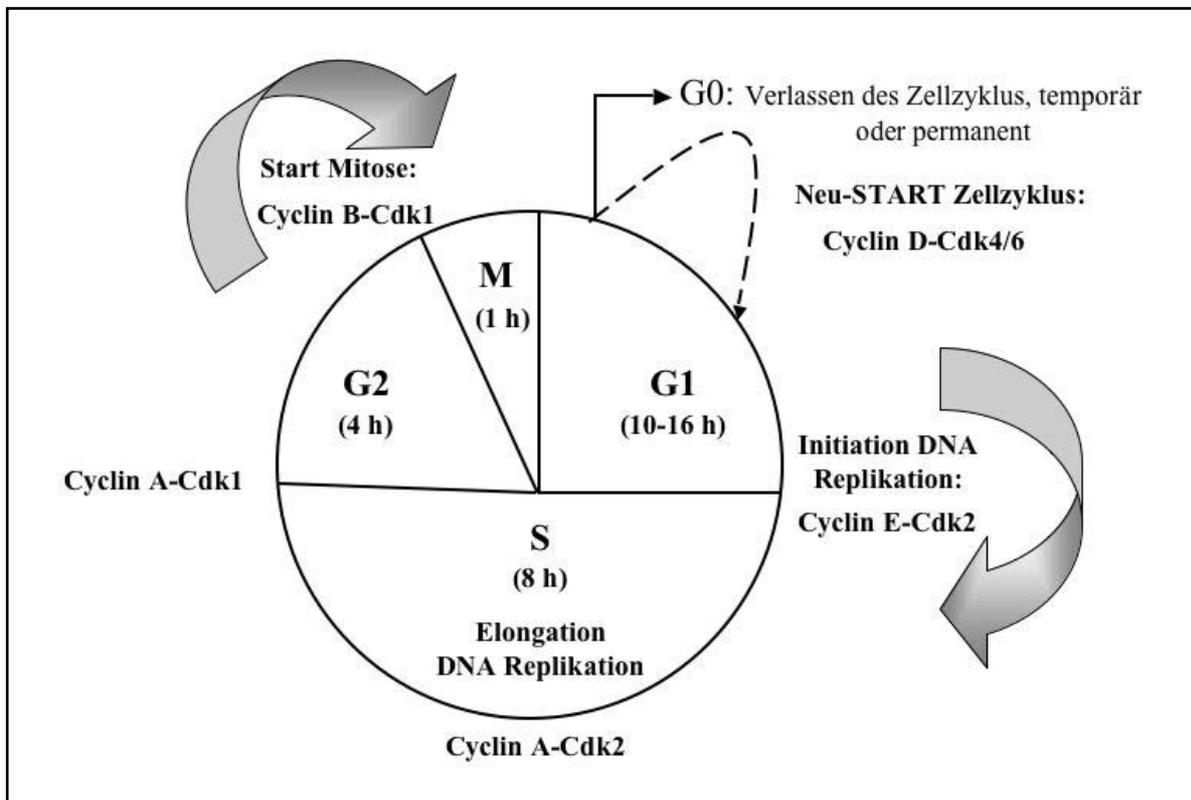


Abb. 3-3: Der Zellzyklus. Der Zellzyklus stellt ein Modell zur Beschreibung der Prozesse während des Zellwachstums dar. Er ist in vier Abschnitte, untergliedert: 1. in die G1-Phase, in der die Vorbereitung für die DNA Replikation stattfinden; 2. in die S-Phase, in der die DNA dupliziert wird; 3. in die anschließende G2-Phase, in der die Integrität des Genoms kontrolliert und die Zellteilung vorbereitet wird; 4. in die abschließende mitotische (M) Phase, in der das duplizierte Genom gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt wird. Vor Beginn der nächsten G1-Phase können die Zellen den Zellzyklus verlassen und in die sog. Ruhephase G0 eintreten, in der sie durch Differenzierung aus dem Zellzyklus entfernt werden. Die Regulation der Zellzyklus Progression erfolgt durch die Zyklin-abhängigen Kinasen (Cdks). Verschiedene Zykline assoziieren zu definierten Zeiten im Zellzyklus mit verschiedenen Kinaseuntereinheiten, wodurch ein Netzwerk aus Kinaseaktivitäten entsteht, das durch kontrollierte Phosphorylierung von Zielproteinen den Verlauf des Zellzyklus reguliert.

genotoxischen Stress aktiviert, induziert p53 unter anderem die Expression dieser drei Faktoren, die auf unterschiedliche Weise in die Zellzyklus-Regulation eingreifen.

Nach Schädigung der DNA wird während der frühen G1-Phase die Progression durch den Zellzyklus auf zweierlei Art und Weise unterbrochen. In einer sehr schnellen und p53-unabhängigen Schadensantwort erfolgt die Freisetzung des Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitors p21 aus den Zyklin D-Cdk4 Komplexen. Parallel dazu findet in einem langsameren Schritt die Stabilisierung und Aktivierung von p53 statt, der letztendlich zur p53-abhängigen Transaktivierung von p21 führt. Bei diesem Schritt wird p53 zuerst von verschiedenen schadensspezifischen Kinasen phosphoryliert zu denen die PIK Kinasen ATM und ATR sowie die durch ATR/ATM aktivierten „checkpoint“ Kinasen Chk1 und Chk2 zählen. Diese

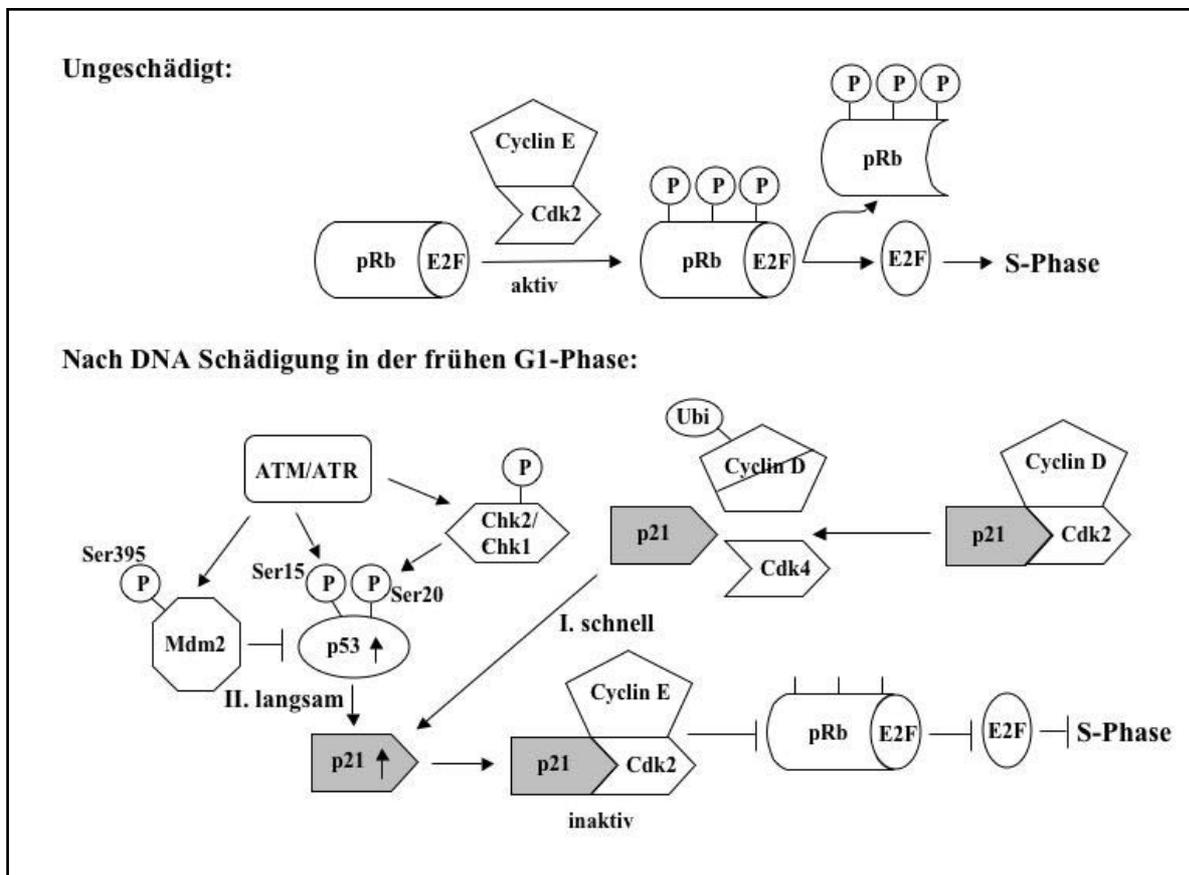


Abb. 3-4: Aktivierung des G1-Kontrollpunkts. Während der G1-Phase ist Rb hypophosphoryliert und interagiert mit Proteinen der Transkriptionsfaktorfamilie E2F. Rb wird am G1/S Übergang durch Zyklin E-Cdk2 phosphoryliert, wodurch die Bindungsaktivität zu E2F aufgehoben wird. Freies E2F transaktiviert S-Phasen-spezifische Gene. Nach Schädigung der DNA in der frühen G1-Phase wird der Cdk-Inhibitor p21 sehr schnell aus Zyklin D-Cdk4 Komplexen freigesetzt. Zusätzlich erfolgt durch ATM/ATR- und Chk1/Chk2-abhängige Phosphorylierung von p53 und Mdm2 die Stabilisierung des Transaktivators p53 und ermöglicht die p53-abhängige Induktion von p21. Der Cdk-Inhibitor inhibiert durch direkte Interaktion die Aktivität von Zyklin E-Cdk2, wodurch die Phosphorylierung von Rb und folglich die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F unterbunden wird. Die Progression des Zellzyklus wird gestoppt und die Zellen arretieren in der G1-Phase.

schadeninduzierte Phosphorylierung von p53 an den Serinresten 15 und 20 bewirkt, dass einerseits die für den proteolytischen Abbau von p53 notwendige Bindung der Ubiquitinligase Mdm2 verhindert wird (Bartek und Lukas, 2001; Abraham, 2001) und andererseits die transkriptionelle Eigenschaft des Tumorsuppressors aktiviert wird. Die aus den Zyklin D-Cdk4-Komplexen sehr schnell freigesetzten und die in einem langsameren p53-abhängigen Schritt erzeugten p21 Moleküle binden und inhibieren die für die Progression durch die G1-Phase essenzielle Zyklin E-Cdk2 Aktivität. Konsequenterweise wird der Übergang von der G1- in die replikative S-Phase inhibiert und somit die Duplikation von geschädigter DNA unterbunden (Bartek und Lukas, 2001) (**Abb. 3-4**).

Während der replikativen S-Phase ist das Gefährdungspotential durch eintreffenden DNA Schaden besonders groß. Zum einen liegt die DNA in Teilbereichen aufgewunden und sogar einzelsträngig vor und zum anderen werden durch Replikationsvorgänge *per se* schon DNA Schäden induziert. Das Eintreffen zusätzlicher exogener DNA Schäden hat während der S-Phase somit ein beträchtlich höheres Gefährdungspotential als während anderer Phasen im Zellzyklus. Dies gilt umso mehr, als exogen hervorgerufene Mutationen oder andere Schäden durch eine aktive Replikationsmaschinerie amplifiziert und fixiert werden können. Es scheint daher unmittelbar plausibel, dass Zellen über Schutzmechanismen verfügen, die bei exogen zugeführten DNA Schäden die Replikationsaktivität vorübergehend inhibieren. Bis vor kurzem wurde noch angenommen, dass Zellen, die sich in der replikativen Phase befinden, nicht arretieren bzw. attenuieren können. Jedoch ist in der Tat eine solche, als S-Phasen bzw. intra-S-Phasen Kontrollpunkt bezeichnete Schadensantwort als Folge von UV- oder ionisierender Strahlung beobachtet worden. Die physiologische Relevanz dieser Schadensantwort, die eine temporäre Inhibition der DNA Synthese Aktivität zur Folge hat, ergab sich aus dem Befund, dass bei Patienten mit der genetisch bedingten Krankheit *Ataxia telangiectasia mutiert* auch bei sehr hoher DNA Schädigung kein Replikationsarrest auslösbar ist und folglich bei diesen Patienten auf Grund einer erhöhten Mutationsrate die Tumorentstehung signifikant erhöht ist. In Zellen, die zu Beginn der frühen replikativen S-Phase geschädigt werden, erfolgt innerhalb kürzester Zeit die Aktivierung des p53-unabhängigen ATM/ATR-vermittelten intra-S-Phasen Kontrollpunkts. Dieser Kontrollpunkt beinhaltet bei ionisierender Bestrahlung die sequentielle Aktivierung der Kinasen ATM und Chk2 bzw. bei UV-Bestrahlung die sequentielle Aktivierung der Kinasen ATR und Chk1 (Zhou *et al.*, 2002; Bartek und Lukas, 2001). Die mittels ATR bzw. ATM aktivierten Chk1/Chk2-Kinasen phosphorylieren die G1/S-Phase spezifische Phosphatase Cdc25A und veranlassen somit die schnelle Degradation dieser Zyklin E-Cdk2-aktivierenden Phosphatase.

Inaktives Zyklin E-Cdk2 unterbricht einerseits die G1/S-Phasen Progression und andererseits unterbindet es auch die Rekrutierung des DNA Polymerase α -Primase Ladungsfaktors Cdc45 an den lizenzierten Replikationsursprung und folglich die Initiation der bidirektionalen DNA Replikation (Bartek und Lukas, 2001) (**Abb. 3-5**). Die schadeninduzierte Aktivierung des ATM/ATR-vermittelten intra-S-Phasen Kontrollpunkts führt demnach nicht nur zur Attenuation der S-Phasen Progression und Inhibition der DNA Replikation sondern ermöglicht auch die Reparatur des geschädigten Genoms vor dem Eintritt der Zelle in die nächste Zellzyklusphase.

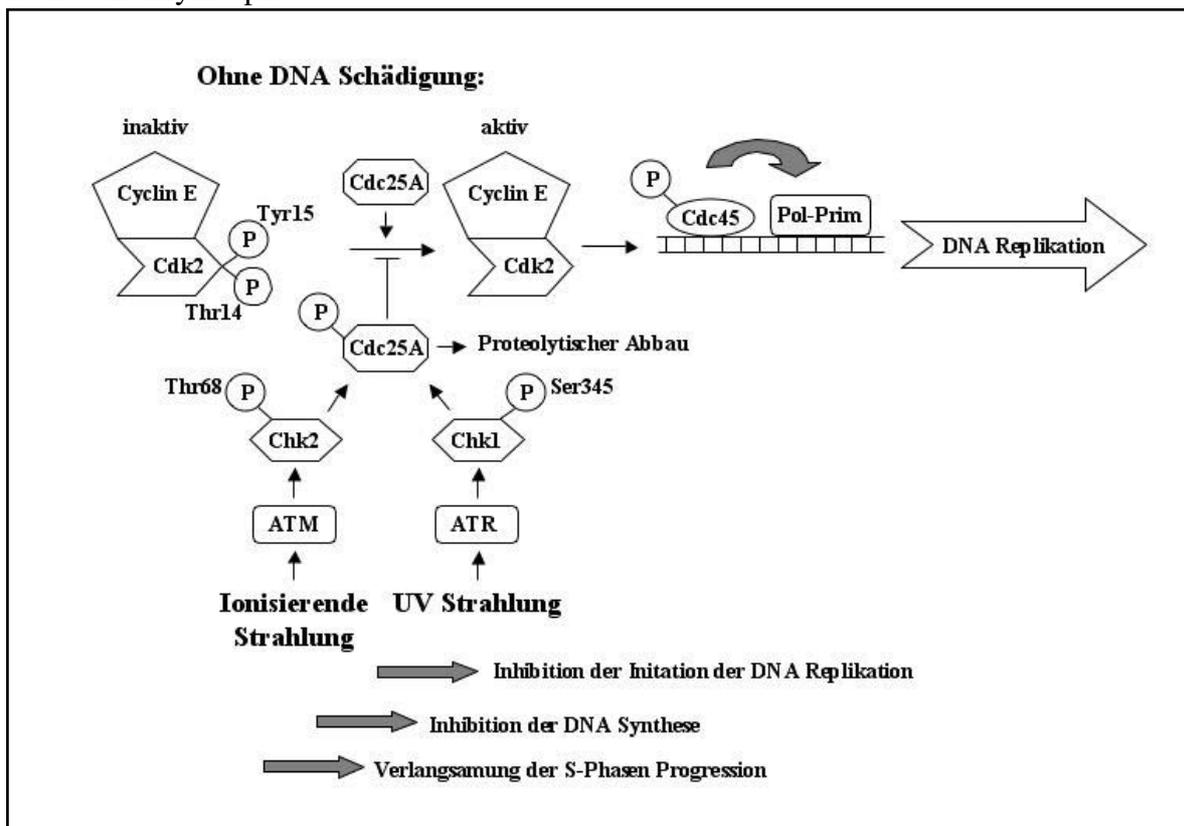


Abb. 3-5: Der intra-S-Phasen Kontrollpunkt. Am Übergang von der G1- in die S-Phase wird der Zyklin E-Cdk2 Komplex aus seiner phosphorylierten, inaktiven Form durch Cdc25A-katalysierte Dephosphorylierung der Kinaseuntereinheit in die aktive Form konvertiert. Nach Schädigung der DNA am G1/S Übergang führt die ATM/ATR-vermittelte Aktivierung von Chk2/Chk1 zur Phosphorylierung der Phosphatase Cdc25A, die anschließend durch die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse abgebaut wird. Konsequenterweise bleibt Zyklin E-Cdk2 im inaktiven Zustand, wodurch die Rekrutierung des Polymerase α -Primase Ladungsfaktors Cdc45 in den Replikationsursprung unterbunden und die Initiation der DNA Replikation inhibiert wird.

Zellen, die nach Beendigung der DNA Replikation geschädigt werden, aktivieren den G2-Kontrollpunkt, der ebenfalls durch die ATM/Chk2- bzw. ATR/Chk1-Kinasen ausgelöst wird. ATR-aktiviertes Chk1 und ATM-aktiviertes Chk2 phosphorylieren die Protein-Phosphatase Cdc25C an Serin 216, wodurch die enzymatische Aktivität von Cdc25C sehr schnell inhibiert

wird (Abraham, 2001). In einer verhältnismäßig langsamen, aber nachhaltigen Reaktion bindet das p53-transaktivierte Protein 14-3-3 σ an phosphoryliertes Cdc25C und bewirkt die Sequestrierung der Phosphatase im Zytoplasma (Abraham, 2001; Peng *et al.*, 1997; Hermeking *et al.*, 1997). Phosphorylierung und zytoplasmatische Sequestrierung von Cdc25C verschiebt das enzymatische Gleichgewicht zwischen der Wee-Kinase-katalysierten Phosphorylierung und der Cdc25C-katalysierten Dephosphorylierung der kernständigen Cdk1 in Richtung inhibitorische Phosphorylierung. Konsequenterweise bleibt die G2-Phase spezifische Cdk1-Untereinheit des MPF („mitosis promoting factor“) länger inhibitorisch phosphoryliert und der Eintritt der Zelle in die mitotische Phase verzögert sich (**Abb. 3-6**).

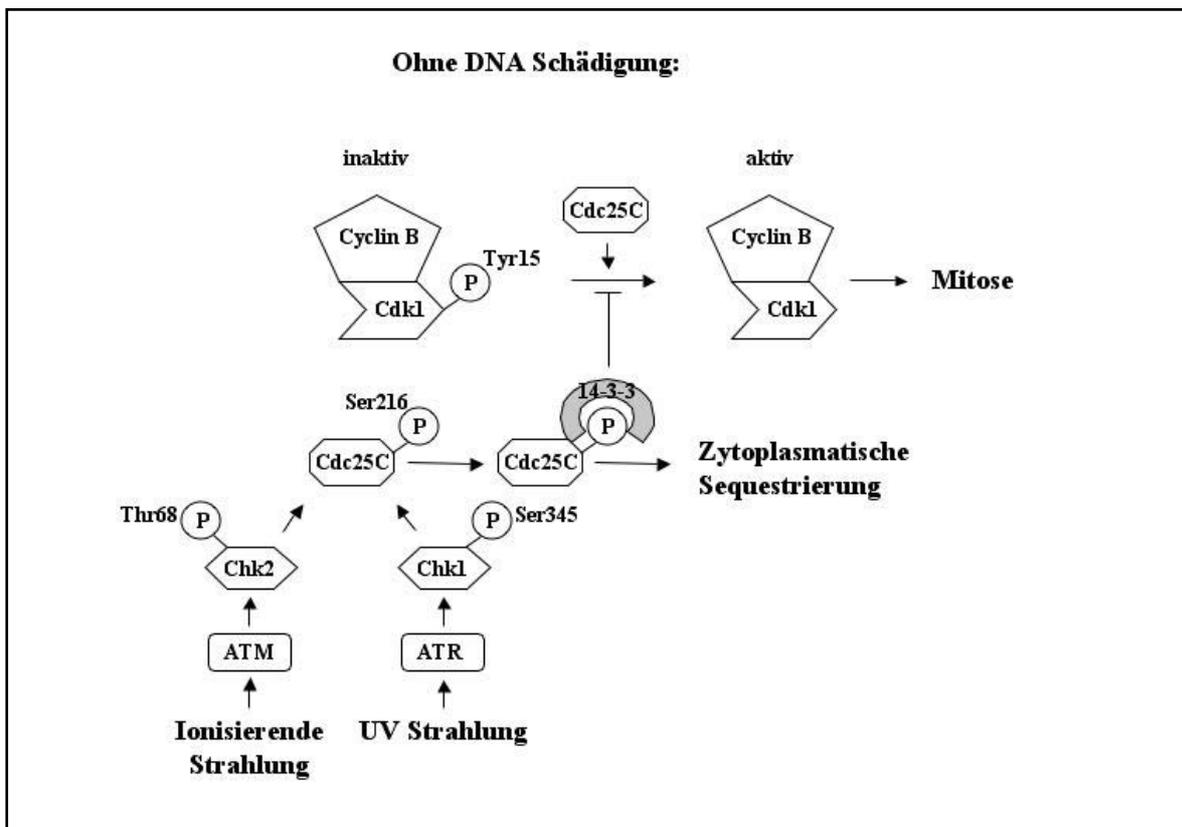


Abb. 3-6: Der G2/M Kontrollpunkt. In der G2-Phase erfolgt die Aktivierung der M-Phasen Kinase Zyclin B-Cdk1 durch Cdc25C-katalysierte Dephosphorylierung der Kinaseuntereinheit an Tyrosin-15. Nach erfolgter DNA Schädigung in der G1-, S- oder frühen G2-Phase führt die ATM/ATR-vermittelten Phosphorylierungskaskade zur Phosphorylierung von Cdc25C. Die Phosphorylierung bewirkt zum Einem die Inhibition der Phosphatase Aktivität und zum anderen bindet 14.3.3 σ an phosphoryliertes Cdc25C. Der daraus resultierende Proteinkomplex wird im Zytoplasma sequestriert und der kernständige Zyclin B-Cdk1 Komplex bleibt inhibitorisch phosphoryliert, wodurch die Progression in die Mitose unterbunden wird.

Der Übertritt in die Mitose wird auch von *Gadd45*, einem weiteren von p53 transaktivierten Zielgen, unterbunden (Wang *et al.*, 1999). Seine Wirkung übt das *Gadd45* Protein vermutlich

durch direkte Wechselwirkung mit Cdk1 aus (Zhan *et al.*, 1999). Durch diese Interaktion bewirkt Gadd45 eine Dissoziation des Zyklin B1-Cdk1 Komplex und inaktiviert auf diese Weise die den G2/M Übergang katalysierende Kinase (Zhan *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999). Neben der Transaktivierung von Genen, deren Produkte dann die Zellzyklus Progression inhibieren, gibt es zunehmende Hinweise, dass p53 auch durch Repression proliferationsstimulierende Faktoren zu einem Wachstumsarrest beiträgt. (Taylor und Stark, 2001). Wenngleich die Wirkungsmechanismen der p53 induzierten Repression weitgehend unklar sind, zeigen verschiedene Studien eine Repression der Promotoren von *cdk1* und *Zyklin B1*, die nur in Zellen mit funktionellem wildtyp p53 (wtp53) zu beobachten ist (Azzam *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 1999; Passalaris *et al.*, 1999; Taylor und Stark, 2001). Unabhängig davon könnte p53 durch Repression von *Topoisomerase II* zu einem p53-vermittelten G2-Arrest beitragen (Sandri *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997; Clifford *et al.*, 2003). Zusätzlich zu Transaktivierung oder Transrepression wurde auch eine direkte Protein-Protein Interaktion von p53 als möglicher Mechanismus für einen p53 vermittelten Wachstumsarrest beschrieben. So inhibiert p53 durch Bindung an die Cdk-aktivierende Kinase CAK deren Aktivität, die wiederum für die Aktivierung von Zyklin A-Cdk2/Cdk1 und Zyklin B-Cdk1 erforderlich ist (Schneider *et al.*, 1998; Taylor und Stark, 2001).

Neben der unmittelbaren Attenuation der Zellzyklus Progression ist die Funktion der schadeninduzierten Kontrollpunkte eng mit DNA Reparatur gekoppelt. Gemäß gängigen Modellvorstellungen wird die Zeit eines durch genotoxischen Stress verursachten temporären Zellzyklusarrests dafür verwendet, vorhandene DNA Schäden durch Reparatur zu beseitigen. Abgesehen von den bereits beschriebenen Funktionen in der Induktion des Arrests an sich, ist p53 darüber hinaus auch direkt an DNA Reparaturvorgängen beteiligt (Smith *et al.*, 1995; Therrien *et al.*, 1999; Rubbi und Milner, 2003). Die Mechanismen, über die p53 in DNA Reparatur involviert ist, sind nur unvollständig aufgeklärt. Es gibt jedoch gute Hinweise, dass der Tumorsuppressor Reparatur einerseits durch die Transaktivierung von Reparaturfaktoren wie z.B. *DDB2* oder *p53R2* (Hwang *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 2000) fördert, andererseits auch über transkriptionsunabhängige Mechanismen wie etwa die Interaktion mit weiteren Reparaturfaktoren Einfluss auf die Erkennung und Beseitigung von DNA Schäden ausübt (Übersichtsartikel: Janus *et al.*, 1999; McKay *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2001; Smith und Seo, 2002).

Die Vielzahl der von p53 transaktivierten Gene mit jeweils verschiedenen Funktionen sowie die bekannten nicht-transkriptionellen Aktivitäten von p53 machten es bisher unmöglich, das Netzwerk, das nach genotoxischem Stress aktiviert wird und in dessen Zentrum der

Tumorsuppressor sitzt, vollständig zu verstehen. Da p53, wie oben beschrieben, nach DNA Schaden sowohl einen temporären Zellzyklusarrest zu definierten Zeiten im Zellzyklus induzieren und damit das Überleben der geschädigten Zelle ermöglichen kann als auch eine Eliminierung durch Apoptose einleiten kann, ist die Frage nach den Mechanismen, welche die Selektivität der p53-abhängigen Schadensantwort in Abhängigkeit des Schadensausmaß bestimmen, eines der zentralen Themen für das Verständnis der biologischen Funktion von p53.

Darüber hinaus wird die vollständige Aufklärung der biologischen Funktion von p53 komplizierter durch die Tatsache, dass in Primatenzellen eine neue Spleißvariante von p53 identifiziert wurde, deren differenzielle Transaktivierungsaktivität eine essenzielle Funktion im UV-induzierten intra-S-Phasen Kontrollpunkt ausübt. Die Entdeckung der p53-Isoform $\Delta p53$ erfolgte bei der Durchführung der hier vorgestellten Arbeit. Die Identifizierung, biochemische Charakterisierung sowie Aufklärung der Funktion von $\Delta p53$ im schadeninduzierten intra-S-Phasen Kontrollpunkt und die Bedeutung von $\Delta p53$ für die Reparatur sowie Replikation wurden bereits publiziert (Rohaly et al., 2005) und sind im folgenden Abschlussbericht für BMU StSch4463 im Detail dargestellt.

4. Wissenschaftliche Methoden

4.1. Zellkultur

4.1.1 Kultivierung von adhärent wachsenden Zellen

Die adhärent wachsenden Zelllinien CV-1, LLC-MK2, und NIH3T3 und Ref1 sowie die primären Affennierenzelle PRK (primary Rhesus monkey kidney) wurden in Gewebekulturschalen bei 37°C, 10% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) mit 5% Fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert. Die Zelllinien SW480, A431 und H1299 wurde analog in RPMI-Medium mit 5% FCS kultiviert. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90% 1:3 bis maximal 1:8 umgesetzt. Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsinlösung 5 min bei 37 °C bis zum sichtbaren Ablösen der Zellen inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in vorgelegtem Medium suspendiert und anschließend auf neue Gewebekulturschalen verteilt.

Zelllinien:

A431:	humane epidermoide Carcinom-Zelllinie mit mutiertem p53 Gen (Exon 8, Codon 273 (Arg zu His)), (Giard <i>et al.</i> , 1973); (DSMZ #ACC 91).
CV-1:	SV40 permissive Affennierenzelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>), Epithelzelle mit pseudodiploiden Chromosomensatz (Manteuil <i>et al.</i> , 1973), wurde freundlicherweise von Prof. E. Fanning (Department of Molecular Biology Vanderbilt University, Nashville, USA) zur Verfügung gestellt: Status wildtyp p53.
H1299	humane epitheliale Lungenkarzinom Zelllinie mit deletiertem p53 (Gazdar <i>et al.</i> , 1990, Takahashi <i>et al.</i> , 1992); (ATCC #CRL-5803)
LLC-MK2	SV40 permissive Nierenzelllinie des Rhesusaffen (<i>Macaca mulatta</i>), mit einer Deletion in p53 (Δ 237-239) und epithelähnliche Morphologie (Hull <i>et al.</i> , 1956), (ATTC #CCL7).
NIH 3T3	Aus Swiss Mausembryo-Fibroblasten gewonnene, spontan immortalisierte Zelllinie mit intaktem wildtyp p53 (Jainchill <i>et al.</i> , 1969; Aaronson und Torado, 1968), (ATCC #CRL1658).
PRK	Primäre Nierenzelle aus dem Rhesusaffen (<i>Macaca mulatta</i>) mit wt p53 (von der Weth und Deppert, 1992).
Ref1	Primäre Ratten Embryo Zelllinie.
SW480	humane epitheliale Dickdarm Adenocarcinom Zelllinie mit zwei Mutationen im p53 Gen (Exon 8, Codon 273: Arg zu His und Codon 309: Pro zu Ser); (Leibovitz <i>et al.</i> , 1976); (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen #ACC 313).

Lösungen:

RPMI:	10,43 g/l RPMI-1640 Pulver (Gibco BRL) 2,0 g/l NaHCO ₃ in Viapurex H ₂ O pH 7,35 Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert.
DMEM:	13,38 g/l DMEM-Pulver (Gibco BRL) 3,7 g/l NaHCO ₃ in Viapurex H ₂ O pH 7,35 Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert.
Trypsinlösung:	2% (v/v) Trypsin-Stammlösung (Gibco BRL) 5 mM EDTA (pH 8,0) in 1 x PBS Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert.
PBS:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O 1,4 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 Die Lösung wurde anschließend autokaliviert.

4.1.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Die humane, in Suspension wachsende Lymphom-Zelllinien HL-60, HSC93, CA46, CCRF-CEM und Karpas 299 wurde bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% in RPMI-1640 Medium mit 10% FCS und 2 mM L-Glutamin ohne Zusatz von Antibiotika in Kultur gehalten. Die Zellen wurden für exponentielles Wachstum alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:5 verdünnt. Die Kultivierung erfolgte in 80 cm² Gewebekulturflaschen oder in 1 l Spinnergefäßen.

Zelllinien:

CA46	Zelllinie von humanen T-Lymphoblasten von einer Patientin mit Burkitt Lymphom; die Zellen sind Epstein-Barr Virus Kernantigen negativ; exprimieren Oberflächen IgM kappa, sezernieren IgM, das sich nicht an Protein A bindet; Karyotyp: 46, X0, XY, dup1 (q21-32), t(8;14) mit mutiertem p53 (Codon 248); (Magrath, <i>et al.</i> , 1980); (ATCC#CRL-1648).
CCRF-CEM	Zelllinie von humanen T-Lymphoblasten von einer Frau mit akuter lymphatischer Leukämie mit mutiertem p53 (Codon 175 und 248); (Foley, <i>et al.</i> , 1965) (ATCC #CCL-119).

HL-60:	Humane promyelocytische Zelllinie mit Deletionen auf beiden p53 Allelen (p53-null), (Collins <i>et al.</i> , 1977), (ATCC #CCL 240).
HSC93:	humane wildtyp p53 B-Lymphoblasten Zelllinie, die durch künstliche EBV-Transformation immortalisiert wurde; freundlicherweise von Prof. F. Grosse (IMB, Jena) zur Verfügung gestellt.
Karpas-299	Humane T-Zell Lymphom-Zelllinie gewonnen aus einem Non-Hodgkin's Lymphom mit mutiertem p53 (Codon 273 Arg zu His); (Fischer <i>et al.</i> , 1988). (DSMZ #ACC 31).

4.1.3 Kultivierung von Insektenzelllinien

Die Insektenzelllinien Sf9 und High FiveTM wurden in TC100-Medium (Biochrom) mit 10 % FCS und 2 mM Glutamin in geschlossenen Zellkulturflaschen bei 27 °C, ohne CO₂-Begasung kultiviert. Die Zellen wurden ca. alle drei Tage durch leichtes Abschlagen vom Flaschenboden abgelöst und in einem Verhältnis von 1:3 umgesetzt. Die Sf9 Zelllinie wurde zur Virusamplifikation, die High FiveTM zur Proteinexpression verwendet.

Zelllinien:

Sf9	Insektenzelllinie aus den Eierstöcken von <i>Spodoptera frugiperda</i> (Vaughn <i>et al.</i> , 1977), zur Amplifikation von Baculoviren (ATCC #CRL1711).
High Five TM	Insektenzelllinie aus <i>Trichoplusia ni</i> (Wickham <i>et al.</i> , 1992), zur Proteinexpression (Invitrogen, Groningen).

4.1.4 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Suspensionszellen bzw. trypsinierte adhärenente Zellen wurden in einer Zellzentrifuge sedimentiert (200 g, 10 min, 4°C), der Überstand abgesaugt und das Zellsediment in einem entsprechenden Volumen Einfriermedium (0°C) resuspendiert. Jeweils 1 ml der Suspension (0,5–1 x 10⁷ Zellen) wurde in ein vorgekühltes Kryoröhrchen überführt und langsam innerhalb von 30 min in einem Styroporbehälter bei -20°C abgekühlt (-1°C/min). Anschließend erfolgte eine 24 h-Inkubation bei -70°C. Die eingefrorenen Zellen wurden in Flüssigstickstoff gelagert. Eingefrorene Zellen wurden schnell im 37°C Wasserbad aufgetaut und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Medium überführt. Die Suspension wurde sedimentiert (200 g, 5 min, Raumtemperatur [RT]), in entsprechendem Nährmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche bzw. Gewebekulturschale überführt. Zur Entfernung des restlichen toxischen DMSO und toter Zellen wurde 24 h später das Medium vollständig durch neues ersetzt.

Lösung:

Einfríermedium: 90% FCS
10% DMSO
wurde bei -20°C gelagert

4.2 Baculovirusinfektion

High FiveTM Zellen wurden bei einer Dichte von 2×10^7 Zellen pro 80 cm² Zellkulturflaschen mit jeweils 1 ml von einem hochtitrigen Baculovirusstock infiziert. Nach einer Inkubation von 48h bei 27°C wurden die infizierten Zellen durch leichtes Abschlagen vom Flaschenboden gelöst, im Anschluss daran durch eine zehnmínütige Zentrifugation bei 130 g und 4°C sedimentiert, mit PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Baculoviren:

wtp53 Rekombinanter Baculovirus, enthält die cDNA für humanes p53. Das Virus wurde freundlicherweise von Dr. C. Prives (UCSF, USA) zur Verfügung gestellt.

4.3 Herstellung induzierbarer TO-Zelllinien

Das T-Rex System (Invitrogen) ist ein Tetracyclin induzierbares Expressionssystem für Säugerzellen. Die Induktion des entsprechenden Gens erfolgt nach Zugabe von Tetracyclin, das an den Tet-Repressor (TR) bindet und diesen vom Promoter verdrängt. Für die Herstellung stabiler, induzierbarer CV-1 und H1299 Zelllinien wurden am Vorabend der Transfektion die Zellen so ausgesät, dass sie am nächsten Tag in subkonfluenter Dichte vorlagen (5×10^5 Zellen / 10 cm-Gewebekulturschale). 1 µg pcDNA6/TR (kodiert für TR) und 6 µg pcDNA4/TO (kodiert für wtp53, mutp53-273H, wtΔp53, mutΔp53-175D oder der leere Vektor) wurden mit einem 2,5x Volumen Ethanol und 0,1x Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,5 bei -20°C präzipitiert, durch Zentrifugation (Eppendorf-5415C, 14000 rpm, 30 min, 4°C) sedimentiert, mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, 30 min unter der Sterilwerkbank getrocknet, in 438 µl 10 mM Tris-HCl pH 7,6 gelöst und mit 62 µl 2M CaCl₂ versetzt. Die Lösung wurde in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und mit einer Pasteurpipette belüftet, während langsam 500 µl 2x HEBS zugetropft wurden. Um die Ausformung von Kalziumphosphat-DNA-Kristallen zu erlauben, wurde die Lösung für 15 min bei RT inkubiert und anschließend dem Kulturmedium zugefügt. Nach einer vierstündigen Inkubationszeit unter normalen Kulturbedingungen wurde das Medium erneuert. Am Folgetag wurden die

Zellen 1:5 bis maximal 1:8 umgesetzt und im Selektionsmedium (für CV-1: Zeozin [300 µg/ml] und Blastizidin [1,8 µg/ml] bzw. für H1299: Zeozin [250 µg/ml] und Blastizidin [3,0 µg/ml]) weiter kultiviert, das alle drei bis vier Tage bis zur Entstehung von Zellkolonien erneuert wurde. Die Isolierung der Einzelzellkolonien erfolgte mit Hilfe von Klonierungsringen. Dazu wurden diese in Silikon-Fett getunkt und über den Zellklon gestülpt. Die Zellen wurden durch ein bis zwei Tropfen Trypsin von der Kulturschale gelöst und in 24-Lochschalen umgesetzt. Für jede induzierbare TO-Zelllinie wurden zwischen vierzig und achtzig Klone getestet. Es wurden Klone verwendet, die nur nach Zugabe des Tetracyclin-Analogons Doxycyclin (Dox; 1 µg/ml) das entsprechende p53 Protein exprimierten. Die stabilen Zelllinien wurden für die weitere Kultivierung in Selektionsmedium gehalten.

Lösung:

2x HEBS:	274 mM NaCl
	10 mM KCl
	1,4 mM Na ₂ HPO ₄
	12 mM Glukose
	42 mM HEPES (pH mit HCl auf 7,04); frisch angesetzt und sterilfiltriert.

4.4 Zellzyklussynchronisation

4.4.1 Gegenstromzentrifugation (Elutriation)

Die Trennung und Isolierung verschiedener Zellpopulationen aus einem Gemisch mittels Elutriation beruht auf dem Prinzip der Gegenstromzentrifugation. Dabei sind zwei gegeneinander wirkende Kräfte von Bedeutung: Zum einen die nach außen gerichtete Zentrifugalkraft, die durch die Rotationsgeschwindigkeit des Elutriatorrotors bestimmt wird und zum anderen die Zentripetalkraft, die durch die Strömungsgeschwindigkeit des Mediums in Richtung der Rotationsachse mittels einer geeigneten Pumpe bestimmt wird. Befinden sich beide Kräfte im Gleichgewicht, können Partikel bestimmter Größe und Dichte in der Elutriationskammer konzentriert werden, während die übrigen ausgewaschen werden. Dieser Vorgang wird sowohl von der eingesetzten Fließgeschwindigkeit der Zellsuspension, der Dichte, der Temperatur, der Viskosität des Mediums und der Rotorgeschwindigkeit beeinflusst. So ist es möglich, durch Variation des Faktors Fließgeschwindigkeit bei gleichzeitiger Konstanz der übrigen Faktoren verschiedene Zellpopulationen entsprechend ihres Sedimentationskoeffizienten zu elutriieren.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (200 g, 10 min, RT) gesammelt und in Elutriationsmedium aufgenommen. Die Elutriation erfolgte mit der J6-MC Zentrifuge (Beckmann). Es wurden folgende Parameter für die Elutriation gewählt: Die HSC Zellen wurden mit einer konstanten Rotorgeschwindigkeit (Rotor: JE-5.0) von 3000 rpm und mit einer zunehmenden Fließgeschwindigkeit von 17 bis 61 ml/min fraktioniert (Fraktionen G1-G2).

Lösung:

Elutriationsmedium: 500 ml 10x PBS
 3 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
 12,5 ml 40% Glukose
 50 ml FCS
 mit H₂O auf 5 l auffüllen

4.4.2 Isoleucinentzug

Um adhärent wachsende CV-1, TO-CV-1 und SW480 Zellen im Zellzyklus zu synchronisieren, wurden die nahezu konfluenten Zellen einen Tag vor dem Isoleucinentzug 1:3 umgesetzt. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und Isoleucin-freies Medium (5% FCS [gegen PBS dialysiert] + 1mM Glutamin) zugegeben. Nach 38 h Inkubation bei 37°C (SW480-Zellen: 24 h) wurde der Isoleucinblock durch Zugabe von DMEM bzw. RPMI (5% FCS) aufgehoben. Nach ca. 9 h befanden sich die CV-1-, TO-CV-1, SW480- bzw. LLC-MK2-Zellen synchron am G1/S Übergang.

4.5 Bestrahlung von Zellen

4.5.1 Gamma-Bestrahlung

Für die γ -Bestrahlung wurde eine ¹³⁷Cs-Quelle verwendet. Unterschiedliche Strahlendosen wurden dabei über verschiedene Expositionszeiten erzielt. Unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität der Strahlenquelle entsprach eine Expositionszeit von 45 sec einer Strahlendosis von 1 Gy. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte ohne Entfernung des Mediums. Die Zellen wurden bis zu ihrer Aufarbeitung unter Standard-Bedingungen in Kultur gehalten.

4.5.2 UV-Bestrahlung

Zur UV-Bestrahlung adhärent wachsender Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Waschflüssigkeit wurde entfernt und die Zellen in den Gewebekulturschalen ohne Deckel mit der entsprechenden Dosis UV-Licht (10 J/m²) im UV-

„Crosslinker“ (Stratagene) bestrahlt. Anschließend wurde frisches Medium zugefügt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen unter normalen Bedingungen im Brutschrank inkubiert und nach verschiedenen Zeiten aufbereitet.

4.6 Herstellung von Zellsedimenten

4.6.1 Suspensionskultur

Die Suspensionskulturen wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 g für 6 min bei 4°C in einer Kühlzentrifuge (Eppendorf 5810 R) sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment anschließend mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen. Die geernteten Zellen wurden sofort weiterverarbeitet oder bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.6.2 Adhärenente Zellen

Konfluente Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und abgeschabt. Während dieser Vorgänge lagen die Gewebekulturschalen auf Eis. Die Zellsuspension wurde bei 300 g für 6 min in einer Kühlzentrifuge (Eppendorf 5810 R) bei 4°C sedimentiert. Das resultierende Zellsediment wurde sofort weiterverarbeitet oder bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.7 Zellbiologische Methoden

4.7.1 Bestimmung der Viabilität

Für die Überprüfung der Lebensfähigkeit wurde der einfach und schnell anzuwendende Routinetest der Trypanblaufärbung eingesetzt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anionen an Zellproteine binden. Das Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Cytosol und färbt diese Zellen tiefblau. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell. Bei zu langer Einwirkzeit des Trypanblaus ist ein Anstieg von toten Zellen zu beobachten, da dieser Farbstoff cytotoxisch wirkt. Zur Zellzahlbestimmung wurde ein Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer) benutzt. Die Zellen wurden dafür 1:1 mit Trypanblau-Lösung gemischt, gut suspendiert und an den Rand des Deckglases pipettiert. Das Deckglas wurde zuvor leicht befeuchtet und auf die Zählkammer aufgesetzt, so dass die so genannten Newton-Ringe zu sehen waren. Durch die Kapillarkräfte wurden die Zellen unter das Deckglas gezogen. Für die Auswertung wurden die vier großen Eckquadrate ausgezählt. Das Volumen dieser Felder betrug 4×10^{-4} ml, somit beträgt die Gesamtzellzahl bei n ausgezählten Zellen unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors 2:

$$n \times 2 \times (4 \times 10^{-4})^{-1} \text{ ml} = n \times 5000 \text{ Zellen/ml.}$$

Lösung:

Trypanblau-Lösung: 0,4% in PBS

4.7.2 Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusszytometrie (FACS, Robinson *et al.*, 1997)

Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung mit Trypsin abgelöst (4.1.1). Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und einmal mit 10 ml 5 mM EDTA in PBS (4°C) gewaschen. Das Zellsediment wurde nach Zentrifugation (200 g, 10 min, 4°C) in 0,5 ml eiskaltem PBS aufgenommen und unter ständigem Mischen mit 5 ml Fixierlösung versetzt. Die fixierten Zellen wurden zunächst für ca. 1 h auf Eis inkubiert und anschließend bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Proben aus den fixierten Zellen (5×10^5 Zellen) wurden zentrifugiert (300 g, 5 min, 4°C) und einmal mit 5 ml sterilem PBS (4°C) gewaschen. Zur quantitativen DNA-Färbung wurde das Zellsediment in 1 ml Propidiumiodid-Lösung aufgenommen und für 30 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Der DNA-Gehalt pro Zelle wurde im Coulter Epics (Beckman) gemessen, und die Auswertung erfolgte mit dem Programm MultiCycle (Phoenix).

Lösungen:

Fixierlösung: Ethanol (80%)
-20°C

Propidiumiodid-Lösung: 40 µg/ml Propidiumiodid
250 µg/ml DNase freie RNase A in PBS

4.7.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden wie unter 4.1.1 beschrieben, auf sterilen Deckgläschen kultiviert und am G1/S Übergang mit 2 Gy bestrahlt. Zu den angegebenen Zeiten wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS (4 °C) gewaschen. Das Fixieren erfolgte durch Inkubation mit Paraformaldehyd (3,7 % in PBS) für 30 min bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,1 % Triton[®] X-100 in PBS 10 min bei RT permeabilisiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Freie Bindungsstellen wurden mit Ziegen Serum (10 % in PBS) für 15 min bei RT abgesättigt. Für die Inkubation mit dem primären Antikörper wurden 100 µl anti-γ-H2AX (Upstate: Klon JBW301 1:100 in PBS) auf Parafilm aufgetragen und die Deckgläser mit der Zelleseite nach unten für 1 h aufgelegt. Nicht-gebundener erster Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen (5 min, RT) mit PBS

entfernt, 100 µl Alexa Fluor[®] 488 konjugierter Ziege anti-Maus Antikörper (1:800 in PBS) auf Parafilm aufgetragen und die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Inkubation wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS beendet. Der Zellkern wurde mit dem DNA-Farbstoff DAPI (0,1 µg/ml, 10 min, RT, im Dunkeln) blau angefärbt. Zur Konservierung wurde die Restflüssigkeit von den Deckgläschen abgetupft. Um ein Ausbleichen der Präparate zu verringern, wurde auf einen Objektträger 10 µl Mounting-Medium (Johnson und Nogueira Araujo, 1981) aufgetragen, das Deckgläschen mit der Zellseite nach unten eingebettet, 1 h bei 37 °C getrocknet und im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt. Die γ -H2AX-Focis wurden in jeweils 50 Zellkernen pro Zeitwert ausgezählt. Dazu wurde das Fluoreszenzmikroskop Leica DM-IRB mit dem Immersionsölobjektive 63x/1,4 der Firma Leica verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel.

Lösungen:

Mounting Medium: 10 % para-Phenylendiamin pH 8,0
 90 % Glycerin

4.7.4 Chromatin-Immunpräzipitation-PCR (ChIP-PCR)

4.7.4.1 Zellkernpräparation und Zellyse

Die Chromatin-Immunpräzipitation dient dem Nachweis von spezifischen Protein-DNA Interaktionen. Für die kovalente Kopplung von DNA-gebundenen Proteinen wurden die Zellen 10 min mit 1% Formaldehyd (Endkonzentration) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS und zweimal mit hypotonischem Puffer (+ Proteaseinhibitoren) gewaschen. Die Zellen wurden dann mit einem Gummischaber von der Zellkulturschalenoberfläche gelöst und anschließend 8-10x durch eine Kanüle (Braun Sterican Gr.18) gezogen. Die dadurch isolierten Zellkerne wurden durch Zentrifugation (10 min, 1000 g, 0°C) sedimentiert. Nachdem die Zellkerne in 100 µl SDS-Lysispuffer (+ Proteaseinhibitoren) resuspendiert wurden, erfolgte die Spaltung der genomischen DNA in 500 bis 1000 bp große Fragmente. Dazu wurden die Proben 6x 5 sec bei 30 W (Branson Sonifier B-12) beschallt. Zwischen den einzelnen Beschallungen wurden die Proben in einem Ethanol-Eis Gemisch gekühlt. Durch Zentrifugation (25 min, 21000 g, 0°C) wurde das Lysat geklärt.

Lösungen:

Hypotonischer Puffer:	20 mM Hepes/KOH (pH 7.5) 5 mM KCl 1,5 mM MgCl ₂ 0,1 mM DTT (frisch zugesetzt)
SDS-Lysispuffer:	1% SDS 10 mM EDTA 50 mM Tris-HCl pH (8,1)
Proteaseinhibitoren:	unmittelbar vor Verwendung wurden folgende Proteaseinhibitoren zugegeben: 5 µg/ml Aprotinin 5 µg/ml Leupeptin 5 µg/ml Pepstatin A 125 µg/ml Pefabloc [®] SC

4.7.4.2 Präzipitation

Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit zehnfachem Volumen EIA-Puffer (+ Proteaseinhibitoren) versetzt. Anschließend wurde die Probe für 45 min bei 4°C unter Schwenken mit 40 µl Lachssperma-präabsorbierter Protein A Sepharose (ssPAS, Upstate) inkubiert. Das präabsorbierte Lysat wurde auf mehrere Reaktionsgefäße verteilt, mit jeweils 2 µg Antikörper versetzt und über Nacht bei 4°C auf dem Rolltisch inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Immunkomplexe für 1 h bei 4°C mit 30 µl ssPAS präzipitiert. Anschließend wurde die ssPAS mit jeweils 1 ml Waschpuffer (a-e) für 3-5 min bei 4°C auf dem Rolltisch gewaschen:

Immunologische Reagenzien:

DO-1	anti-p53 muriner monoklonaler Antikörper; erkennt die Aminosäuren 21-25 von humanem p53 (# OP43L Oncogene, Darmstadt)
DO12	anti-p53 muriner monoklonaler Antikörper; erkennt die Aminosäuren 250-270 von humanem p53 (#MCA1705 Serotec, Düsseldorf)
ICA9	anti-p53 muriner monoklonaler Antikörper; erkennt die Aminosäuren 383 bis 393 (# MCA1708 Serotec, Düsseldorf)
M2	anti-Flag muriner monoklonaler Antikörper (# F1804 Sigma; St.Louis USA)
PAb101	anti-SV40 T Ag muriner monoklonaler Antikörper (# MS-1832-P1ABX Lab Vision; Fermont USA)

Lösungen:

Waschpuffer:

- a) 0,1% SDS; 1% TritonX-100; 2 mM EDTA (pH 8.0); 20 mM Tris (pH 8.0); 150 mM NaCl
- b) 0,1% SDS; 1% TritonX-100; 2 mM EDTA (pH 8.0); 20 mM Tris (pH 8.0); 500 mM NaCl
- c) 250 mM LiCl; 1% NP40; 1% Natriumdeoxycholat; 1 mM EDTA; 10 mM Tris (pH 8.0)
- d) TE (pH 8.0)
- e) TE (pH 8.0)

Zwischen den Waschschritten wurde die ssPAS durch Zentrifugation (1 min, 100 g, 4°C) sedimentiert und der Überstand verworfen.

E1A + PI:

50 mM HEPES

150 mM NaOH

0,1% NP-40

pH mit KOH zwischen 7,0 und 7,5 einstellen und anschließend die Lösung steril filtrieren

unmittelbar vor Verwendung wurden folgende Proteaseinhibitoren (PI) zum Lysispuffer E1A zugegeben:

5 µg/ml Aprotinin

5 µg/ml Leupeptin

5 µg/ml Pepstatin A

125 µg/ml Pefabloc[®] SC

4.7.4.3 Elution der Immunkomplexe und Freisetzung der DNA

Die Elution der Immunkomplexe erfolgte durch Zugabe von 250 µl 1% SDS/0,1 M NaHCO₃ für 15 min bei RT. Das Eluat wurde abgenommen und der Vorgang wiederholt. Die beiden Eluate wurden anschließend vereint. Durch Zugabe von 20 µl 5 M NaCl und Inkubation der Proben für 5 h bei 65°C wurde die kovalente Bindung zwischen Proteinen und DNA aufgehoben. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 10 µl 0,5 M EDTA, 20 µl 1 M Tris/HCl pH 6.5 und 5 µl Proteinase K (5 mg/ml) für 1 h bei 45°C verdaut.

4.7.4.4 Phenol/Chloroform Extraktion und DNA-Präparation

Um Proteine und Peptide aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion durchgeführt. Dazu wurden 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Biomol) zum Ansatz gemischt, zentrifugiert (2 min, 18000 g, RT), die obere, wässrige Phase abgenommen und in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Diese Prozedur wurde nochmals wiederholt. Nach Überführung des wässrigen Überstands in ein neues Reaktionsgefäß, wurde 1 µl Glycogen (20 µg/µl; Sigma) als Fällungshilfe zur Probe gegeben und die Probe mit 1,3 ml Ethanol versetzt. Die Präzipitation der DNA-Fragmente erfolgte bei -70°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die DNA durch Zentrifugation (30

min, 21000 g, 0°C) sedimentiert. Das Sediment wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut für 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Ethanols, wurde der DNA-Niederschlag an der Luft unter sterilen Bedingungen getrocknet und anschließend in 30 µl TE-Puffer (pH 8,0) gelöst.

4.7.4.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen

Für den Nachweis p53 assoziierten Promotor-Elementen, wurde eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) durchgeführt. Dazu wurden 3 µl der DNA-Probe mit 4 µl zehnfach Reaktionspuffer (Eppendorf AG), 1 µl 10 mM dNTPs, je 1 µl vom vorwärts- und rückwärtsgerichteten Oligonukleotid (100 nM), spezifisch für die entsprechende Promotor-Sequenz, 0,3 µl Taq-Polymerase (0,025 U/µl; Eppendorf AG) und 30 µl Wasser unter sterilen Bedingungen zusammengemischt. Das Zyklusprogramm (30 Zyklen) wurde ausgehend von folgenden Starteinstellungen für die Reaktionen optimiert: Initiale Denaturierung (3 min, 94°C), Denaturierung (50 sec, 94°C), Annealing (40 sec, 56°C), Elongation (40 sec, 72°C), finale Elongation (5 min, 72°C). Zur Kontrolle wurde eine PCR ohne DNA und eine mit genomischer Gesamt-DNA durchgeführt.

Oligonukleotide für die PCR:

<i>p21</i> -Promotor:	5'-AGAGTAACAGGCTAAGGCTTACCT-3' 5'-TGTGGCTCTGATTGGCTTTCTGGCCAT-3'
<i>14-3-3σ</i> -Promotor	5'-GAGCTGTGATCATAACCACTGTA-3' 5'-GGACATGTCTGTGCTAATGCT-3'
<i>mdm2</i> -Promotor:	5'-AGCTTTTCCTCTTGAGCTGGTCA-3' 5'-TTCAATCGCCACTGAACACAGCT-3'
<i>bax</i> -Promotor:	5'-AGGTTCTGGCTCTCTGATC-3' 5'-TCTTCATGATCTGCTCAGAGC-3'
<i>PIG3</i> -Promotor:	5'-GGGCGCTGCGGTGCCAGCCTGAG-3' 5'-ACCTTCAGGAGGACTTCACC-3'.

4.7.4.6 Neutrale Agarosegelelektrophorese (Sambroock *et al.*, 1989)

Die PCR amplifizierte DNA wurde in einem 1,2%igem Agarosegel in TAE Puffer überprüft. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V für 40 min in TAE Puffer durchgeführt. Nach Anfärbung der DNA mit dem DNA Interkalator Ethidiumbromid

wurden die fluoreszierenden DNA Banden im Durchlicht bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht und mit einer Intas Kamera fotografiert.

Lösungen:

TAE Puffer:	40 mM Tris-Acetat pH 7,5 1 mM EDTA (pH 8,0)
10x DNA-Ladungspuffer	30% Glycerin 25 mM EDTA (pH 8,0) 0,1% Bromphenolblau
Ethidiumbromid-Stammlösung:	10 mg/ml in H ₂ O (10000x konzentriert)

4.7.5 Comet-Analyse (Olive und Banath, 1993)

Die Comet-Analyse ist eine Einzelzell-gelelektrophoretische Anwendung zur Bestimmung des Gehalts von Einzelstrang- (ssDNA) und Doppelstrang- (dsDNA) Brüchen. Die Elektrophorese kann entweder unter neutralen Bedingungen für den Nachweis von dsDNA-Brüchen oder unter alkalischen Bedingungen für den Nachweis von dsDNA und ssDNA-Brüchen durchgeführt werden.

Auf einen Objektträger, der auf einer Seite aufgeraut ist, wurden 100 µl 1%ige Agarose Typ II (Sigma) gelöst in 0,5x PBS (50°C) mit einem Plastikspatel gleichmäßig auf die aufgeraute Seite aufgetragen. Anschließend ließ man die Agarose auf dem Objektträger eintrocknen. Die so präparierten Objektträger können bei RT mehrere Monate bis zur Verwendung aufbewahrt werden. Auf die erste Agaroseschicht wurde eine zweite Agaroseschicht aufgetragen. Dazu wurden 400 µl 1%ige Agarose Typ II gelöst in PBS (50°C) auf den vorgewärmten Objektträger (ca. 30°C) aufgetragen und anschließend wurde ein Deckglas auf die warme Agarose gelegt, so dass sich die Agarose gleichmäßig verteilte. Der Einschluss von Luftblasen wurde vermieden. Anschließend wurde der Objektträger sofort auf eine 4°C kalte Aluminiumplatte gelegt, so dass die Agarose innerhalb von 10 min gelierte. Die so präparierten Objektträger konnten in einer „feuchten Kammer“ bis zu 3 Tagen bei 4°C aufbewahrt werden.

Für die Comet-Analyse wurden 5×10^5 Ethanol-fixierte Zellen (4.7.2) wurden durch Zentrifugation (5 min, 300 g, 4°C) sedimentiert, der Zellschlag in 1 ml PBS (+ 1% EDTA pH 8.0) resuspendiert und für die Rehydrierung 5 min auf Eis stehen gelassen. 100 µl dieser Zellsuspension wurden mit 400 µl 1%iger Agarose Typ VII gelöst in Wasser (40°C) gemischt, so dass eine Agaroseendkonzentration von 0,8% resultierte. Das Deckglas wurde von der zweiten Agaroseschicht auf dem Objektträger abgezogen und der Objektträger vorgewärmt. Auf die zweite Agaroseschicht wurden dann 100 µl der Agarose-Zellsuspension aufgetragen und ein neues Deckglas unter Vermeidung des Einschlusses von Luftblasen aufgelegt. Der Objektträger wurde auf eine 4°C kalte Aluminiumplatte gelegt, bis die

Agarose-Zellsuspension gelierte. Zur Lyse der Zellen wurden zuerst das Deckglas entfernt und die Objektträger für 30 min in 4°C kalten TICE-Lysispuffer gelegt. Anschließend wurden die Objektträger für 15 min in 330 mM NaOH/1mM EDTA (4°C) gelegt, um störende ssDNA/dsDNA-Sekundärstrukturen aufzulösen. Dieser und die folgenden Schritte wurden unter Lichtausschluss durchgeführt, um zusätzliche DNA-Strangbrüche zu vermeiden. Für den Nachweis von ssDNA- oder dsDNA-Strangbrüchen wurden die eingebetteten Zellen einer neutralen bzw. alkalischen Elektrophorese unterzogen. Die neutrale Elektrophorese erfolgte für 10 min bei einer Spannung von 1V/cm mit TBE als Laufpuffer. Die alkalischen Elektrophorese wurde bei gleicher Spannung für 30 min mit 330 mM NaOH/1 mM EDTA (pH 8,0) als Laufpuffer durchgeführt und anschließend wurden die Proben mit 400 mM Tris-HCl pH 7.5 (15 min, 4°C, dunkel) neutralisiert. Zur Färbung der DNA wurde auf die abgetropften Objektträger 30 µl SYBR[®]-Green II-Lösung (1:10 mit Antifade DABCO) zugegeben und mit einem Deckglas zugedeckt. Da während der Elektrophorese die ssDNA- oder dsDNA-Fragmente aus dem Zellkern heraus ins Gel liefen und ihrer Größe nach aufgetrennt wurden, aber die kompakte, ungeschädigte DNA zu groß war, um unter diesen Bedingungen aus dem Zellkern zu gelangen, ergab sich ein Bild, das einem Kometen ähnelt.

Die Proben wurden anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop und dem Computerprogramm VisComet 4.0 (Impuls Bildanalyse GmbH) ausgewertet. Es wurde jeweils das relative „Olive-Tail-Moment“ bei 50 einzelnen Zellen bestimmt und der Durchschnitt ermittelt. Das relative „Olive-Tail-Moment“ definiert das Verhältnis der DNA im „Kometenschweif“ zur DNA im Zellkern und stellt ein Maß für den DNA-Schaden der untersuchten Zellen dar.

Lösungen:

TICE-Lysispuffer:	1% Natrium-N-Lauryl-Sarcosinat
	10 mM Tris (pH 10,0)
	100 mM EDTA (pH 10,0)
	2,4 M NaCl
	10% DMSO (frisch dazugeben)
	1% Triton X-100 (frisch dazugeben)
TBE	108g Tris-Base
	40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
	55 g Borsäure (H ₃ BO ₃)
	mit H ₂ O auf 1 l auffüllen

Antifade DABCO: 223 mg DABCO in 0,8 ml H₂O lösen
 + 0,2 ml 1 M Tris/HCl (pH 8.0)
 + 9 ml Glycerol

4.7.6 [³H]-Thymidin Einbau

Die DNA-Synthese wurde durch den Einbau von [³H]-Thymidin quantifiziert. Dazu wurden die Zellen subkonfluent auf 5 cm Schalen ausgesät und am G1/S Übergang bestrahlt bzw. nicht bestrahlt. Die Markierung der DNA erfolgte durch Zugabe von 7 µCi [³H]-Thymidin (77 Ci/mmol; ICN Biomedicals) pro ml Kulturmedium für 1 h zu den jeweils angegebenen Zeitwerten. Der ³H-Einbau wurde durch zweimaliges Waschen mit eiskaltem PBS gestoppt, die Zellen mit einem Gummischaber gelöst und in 1 ml eiskaltes PBS überführt. Die Zellsuspension wurde bei 300 g für 6 min in einer Kühlzentrifuge (Eppendorf 5810 R) bei 4°C sedimentiert. Das resultierende Zellpräzipitat wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die genomische DNA wurde mit dem „NucleoSpin Tissue Kit“ (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Konzentration der DNA Lösung wurde photometrisch (Shimadzu BioSpec-1601E) bestimmt ($62,9 \times OD_{260} - 36,0 \times OD_{280} = \mu\text{g DNA/ml}$; Faktoren von Warburg und Christian) und der ³H-Einbau im Szintillationszähler (Beckman) gemessen. Die DNA-Syntheserate ergibt sich aus dem Verhältnis von ³H cpm zu µg DNA.

4.8 Proteinanalytische Methoden

4.8.1 Gesamtzellextrakt (Lysat)

Zellpräzipitate wurden auf Eis aufgetaut und mit etwa dem doppelten Volumen an E1A + PI versetzt. Die Probe wurde 25 min auf Eis lysiert. Die Lysate wurden durch Zentrifugation (14000 rpm, 25 min, 0°C, Eppendorf 5810 R) geklärt und der Überstand in vorgekühlte Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford (4.8.2) ermittelt.

Lösungen:

E1A 50 mM HEPES
 150 mM NaOH
 0,1% NP-40

pH mit KOH zwischen 7,0 und 7,5 einstellen und anschließend die Lösung steril filtrieren

PI: unmittelbar vor Verwendung wurden folgende Proteaseinhibitoren (PI) zum Lysispuffer E1A zugegeben:

- 5 µg/ml Aprotinin
- 5 µg/ml Leupeptin
- 5 µg/ml Pepstatin A
- 125 µg/ml Pefabloc® SC

4.8.2 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Je 2 µl des Gesamtzellextraktes wurden mit ddH₂O auf 800 µl ergänzt und mit 200 µl BioRad Reagenz versetzt. Nach einer 10 minütigen Inkubation wurde die Extinktion bei 595 nm gegen eine Referenz, die keinen Zellextrakt enthielt, gemessen (Photometer Bio Spec-1601E, Shimadzu). Die Ermittlung der Proteinkonzentrationen aus der gemessenen Absorption bei 595 nm erfolgt dabei mit Hilfe einer zuvor angefertigten BSA Standard-Eichreihe.

4.8.3 Immunpräzipitation von Proteinen aus Gesamtzellextrakten

Für die Immunpräzipitation wurde ausschließlich Protein G-Sepharose (PGS) verwendet. Das Säulenmaterial wurde für die Äquilibration mit dem zehnfachen Säulenvolumen an H₂O (4°C) versetzt. Die Suspension wurde bis zum Absetzen der PGS auf Eis stehen gelassen. Dieser Vorgang wurde 4-5x mit jeweils frischem Wasser und anschließend 2x mit E1A wiederholt. Zur Herstellung einer 10%igen Suspension wurde der Überstand abgesaugt und ein entsprechendes Volumen E1A zugefügt. Für die Bindung der Immunglobuline an die Trägermatrix wurden je 100 µl der 10%igen PGS-Suspension mit 500 µl E1A + PI (4.8.1) gewaschen. Die PGS wurde mit 2 µg Immunglobulin in 300 µl E1A + PI für 1 h auf einem Horizontalschüttler bei 4°C inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit je 500 µl E1A entfernt. Zu den PGS gebundenen Antikörpern wurde 0,5-1,5 mg Zelllysat (4.8.1) in 300 µl E1A + PI gegeben und 1-2 h auf einem Horizontalschüttler bei 4°C inkubiert. Nicht gebundenes Antigen wurde durch dreimaliges Waschen mit je 500 µl E1A entfernt. Die Immunpräzipitate wurden wie unter (4.8.4, 4.8.7) beschrieben weiterverarbeitet.

Immunologische Reagenzien:

anti-p53 (DO-1) muriner monoklonaler Antikörper; erkennt die Aminosäuren 21-25 von humanem p53 (# OP43L Oncogene, Darmstadt)

anti-p53 (DO12)	muriner monoklonaler Antikörper; erkennt die Aminosäuren 250-270 von humanem p53 (#MCA1705 Serotec, Düsseldorf)
anti-p53 (ICA9)	muriner monoklonaler Antikörper; erkennt die Aminosäuren 383 bis 393 (# MCA1708 Serotec, Düsseldorf)
anti-Flag (M2)	muriner monoklonaler Antikörper (# F1804 Sigma; St.Louis, USA)
anti-SV40 T Ag (PAb101)	muriner monoklonaler Antikörper (# MS-1832-P1ABX Lab Vision; Fermont, USA)
anti-p21 (H-164)	polyklonales Kaninchenserum (# sc-756 Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA)
anti-Cyclin A (H432)	polyklonales Kaninchenserum (# sc-751 Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA)
anti-Cyclin E (HE67)	muriner monoklonaler Antikörper (# 554193 BD Bioscience; San Diego, USA)
anti-Cyclin B (GSN-1)	muriner monoklonaler Antikörper (# 554177 BD Bioscience; San Diego, USA)

4.8.4 „Target-bound“-Histon- Kinaseaktivitätstest

Die Zelllyse (4.8.1) und Immunpräzipitation (4.8.3) von Zyklin-Kinase Komplexen erfolgte in E1A + PI unter Zusatz von Phosphataseinhibitoren. Die immunpräzipitierten, über Antikörper an PGS gebundenen Komplexe wurden im Kinasepuffer äquilibriert. Als Substrat dienten 1-2 µg Histon H1 (Biomol). Die Phosphorylierung der Substrate erfolgte in 20 µl Kinasepuffer mit 4 µCi [³²P]- γATP für 30 min bei 37°C unter leichtem Schwenken. Die Kinasereaktion wurde durch Zugabe von 20 µl 2x SB (4.8.8) gestoppt; es folgte eine Inkubation für 10 min bei 65°C zur Denaturierung. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE (4.8.8) getrennt, durch Coomassie Lösung gefärbt und die markierten Proteine durch Autoradiographie detektiert.

Immunologische Reagenzien:

anti-Cyclin A (H432)	polyklonales Kaninchenserum (# sc-751 Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA)
anti-Cyclin E (HE67)	muriner monoklonaler Antikörper (# 554193 BD Bioscience; San Diego, USA)
anti-Cyclin B (GSN-1)	muriner monoklonaler Antikörper (# 554177 BD Bioscience; San Diego, USA)

Lösungen:

Phosphataseinhibitoren:	1 mM EDTA (pH 8,0)
	4 mM EGTA (pH 7,5)
	5 mM NaF
Kinasepuffer:	20 mM HEPES (pH 7,5)
	1 mM DDT
	10 mM MgCl ₂
	5 mM NaF
	1 mM EDTA (pH 8,0)
	4 mM EGTA (pH 7,5)
	0,1 mg/ml BSA
	10 μM ATP

4.8.5 Isolierung von humanem rekombinanten p53 aus Baculovirus infizierten Insektenzellen

Rekombinantes humanes wtp53 und Δp53 wurden aus 3×10^8 Baculovirus infizierten Insektenzellen gereinigt (Bessard *et al.*, 1998). Dazu wurden die Zellen 48 h nach der Infektion geerntet, anschließend 4x mit PBS (4°C) gewaschen, in 10 ml Puffer A resuspendiert und für 60 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde in einen Dounce-Glasschliff-Homogenisator überführt und mit dem Pistill 30x auf- und abgezogen. Der Homogenisator wurde dabei auf Eis gekühlt. Das Zellextrakt wurde danach für 45 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C bei 5000 x g für 10 min sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und als Fraktion A auf Eis gekühlt. Der verbleibende Zellrückstand wurde in 10 ml Puffer B resuspendiert und für 45 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (4°C, 5000 x g, 10 min) wurde der Überstand als Fraktion B auf Eis gekühlt. Der Zellrückstand wurden in 10 ml Puffer C resuspendiert und für 45 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation der Suspension (4°C, 5000 x g, 10 min) wurde der Überstand als Fraktion C auf Eis gekühlt. Abschließend wurde der Rückstand in 10 ml Puffer D resuspendiert und für 45 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde abschließend erneut zentrifugiert (4°C, 5000 x g, 10 min) und der Überstand als Fraktion D auf Eis gekühlt. Die Fraktionen A-D abschließend für 30 min in der Ultrazentrifuge (50.000 x g, 4°C) geklärt und bei -70°C eingefroren. Mittels Western Blot Analyse und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließender Coomassie-Färbung wurden die einzelnen Fraktionen auf ihren Gehalt an p53 analysiert. Der Hauptteil von p53 befand sich in Fraktion C.

Lösungen:

Puffer A :	10 mM HEPES pH 7,4, 1,5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 5 mM KCl
Puffer B:	10 mM HEPES pH 9,0, 1,5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 5 mM KCl
Puffer C:	10 mM HEPES pH 9,0, 1,5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 200 mM KCl
Puffer D:	10 mM HEPES pH 9,0, 1,5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 500mM KCl

PI: unmittelbar vor Verwendung wurden folgende Proteaseinhibitoren (PI) zu den Puffern (A-D) zugegeben:

- 5 µg/ml Aprotinin
- 5 µg/ml Leupeptin
- 5 µg/ml Pepstatin A
- 125 µg/ml Pefabloc[®] SC

4.8.6 GST-„pull-down“ und Oligomerisierung

Die Glutathion-Agarose wurde 5x in ddH₂O (200 ml ddH₂O pro g Agarose) und 3x in E1A-Puffer äquilibriert. Es wurde anschließend eine 50 %ige Suspension mit E1A hergestellt. Das Baculovirus infizierten Zellsedimente (4.2) wurden mit 300 µl E1A + PI (4 °C) versetzt, für 20 min auf Eis lysiert und anschließend durch Zentrifugation (14000 rpm, 25 min, 0°C, Eppendorf 5810 R) geklärt und der Überstand in vorgekühlte Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden 100µl der 50 %igen Glutathion-Agarose Suspension dem Lysat zugefügt und unter stetiger Bewegung für 30 min bei 4 °C inkubiert. Die an die Glutathion-Agarose gebundenen GST-Proteine wurden viermal mit je 500 µl E1A Puffer gewaschen (Eppendorfkühlzentrifuge, 1000 rpm, 1 min, 4 °C) und in 500 µl EIA aufgenommen, so dass eine 50 %ige Suspension entstand. Die Suspension wurde bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Für die Oligomerisierung wurden jeweils 5 µl GST-p53-Agarose mit 0,5 – 1 µg rekombinanten p53 bzw. Δp53 in einem totalen Volumen von 300 µl (E1A + 10% BSA + PI) bei 4°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Proteinkomplexe 3x mit E1A gewaschen. Gebundene Proteine wurden in 10% SDS-Gelen getrennt und durch Westerblot-Analyse detektiert.

Lösungen:

E1A	50 mM HEPES 150 mM NaOH 0,1% NP-40 pH mit KOH zwischen 7,0 und 7,5 einstellen und anschließend die Lösung steril filtrieren
PI:	unmittelbar vor Verwendung wurden folgende Proteaseinhibitoren (PI) zum Lysispuffer E1A zugegeben: 5 µg/ml Aprotinin 5 µg/ml Leupeptin 5 µg/ml Pepstatin A 125 µg/ml Pefabloc® SC

4.8.7 Oligomerisierungsstatus von $\Delta p53$

Der Oligomerisierungsstatus (Dimere bzw. Tetramere) von $\Delta p53$ wurde mit Hilfe von gereinigten rekombinanten humanen wt $\Delta p53$ (4.8.5) untersucht. Als Positivkontrolle diente rekombinantes humanes wtp53. In 200 µl E1A + PI wurden 1 µg $\Delta p53$ bzw. p53 mit 20 mM Diamide (Sigma) versetzt und für 20 min bei RT unter schütteln inkubiert. Die Komplexe wurden durch 10%ige SDS-Gele getrennt und durch Westerblot-Analyse detektiert.

Lösungen:

E1A	50 mM HEPES 150 mM NaOH 0,1% NP-40 pH mit KOH zwischen 7,0 und 7,5 einstellen und anschließend die Lösung steril filtrieren
PI:	unmittelbar vor Verwendung wurden folgende Proteaseinhibitoren (PI) zum Lysispuffer E1A zugegeben: 5 µg/ml Aprotinin 5 µg/ml Leupeptin 5 µg/ml Pepstatin A 125 µg/ml Pefabloc® SC

4.8.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli *et al.*, 1970)

Zur Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurden die Zellen wie unter 4.8.1 beschrieben lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt (4.8.2). Gesamtzellextrakte wurden

mit dem 0,2 fachen Volumen an 6x SB versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die aus Gesamtzellextrakten immunpräzipitierten Antigen-Antikörperkomplexe wurden durch die Zugabe des doppelten Volumens von 2x SB von der PGS-Matrix eluiert und für 5 min bei 95°C denaturiert. Durch Zentrifugation (10000 g, RT, 20 sec) wurde die PGS abgetrennt. Anschließend wurden die Proben entweder bei -20°C gelagert oder direkt auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Zur Auftrennung der Proteine wurde die Minigelapparatur Hoefer Mighty Small II (Gelgröße 100 mm x 80 mm x 1 mm) und je nach Proteingröße Trenngele verschiedener Polyacrylamid-Konzentrationen (8, 10, 12,5 oder 15%) verwendet. Als Größenmarker wurde ein „prestained marker“ (SDS-7B; Sigma) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei konstanten 20-25 mA/Gel für 1-2 h durchgeführt.

Lösungen:

2x Auftragspuffer (2x SB):	125 mM Tris-HCl pH 6,8 4% (w/v) SDS 20% (w/v) Glycerin 0,2 M DDT 0,001% Bromphenolblau
6x Auftragspuffer (6x SB):	350 mM Tris-HCl pH 6,8 30% Glycerin 10% (w/v) SDS 0,6 M DTT 0,012% Bromphenolblau
4x Gel-Puffer 1:	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
4x Gel-Puffer 2:	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4% (w/v) SDS
Sammelgel:	4% Acrylamid 1x Gel-Puffer 1
Trenngel:	8, 10, 12,5 oder 15% Acrylamid 1x Gel-Puffer 2
5x Laufpuffer	0,125 M Tris Base 0,96 M Glyzin 0,5% (w/v) SDS

Die Polymerisierung des Acrylamids wurde durch Zugabe von 0,0005% Ammoniumpersulfat und 0,001% TEMED gestartet.

4.8.9 Nachweis von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen

4.8.9.1 Coomassiefärbung

Polyacrylamid Gele wurden 10-15 min in Coomassie Färbelösung und anschließend im Schnellentfärber bei RT geschwenkt, bis der Hintergrund sich entfärbt hatte und die Proteinbanden sichtbar wurden.

Lösungen:

Färbelösung:	0,15% (w/v) Coomassiebrillantblue R250 45% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure
Schnellentfärber:	10% (v/v) Isopropanol 10% (v/v) Essigsäure

4.8.9.2 Nachweis von Proteinen durch Autoradiographie

Für die Analyse ³²P-markierter Proteine (4.8.4) wurde nach Coomassiebrillantblue-Färbung (zur Fixierung der Proteine und zur optischen Analyse der Banden) und dem Trocknen des Gels die Histon H1-Phosphorylierung autoradiographisch nachgewiesen und mittels Phosphoimager (Fujifilm, BAS-2500) quantifiziert.

4.8.9.3 Western Blot (WB) und immunologische Detektion

Die PVDF-Membran (Immobilon™-P; Millipore) wurde 2 min mit Methanol inkubiert, 5x mit ddH₂O gewaschen und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Im Nassblotverfahren wurden die durch SDS-PAGE (4.8.8) aufgetrennten Proteine auf die Membran transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Der Transfer erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Elektroblo-Apparatur (BioRad) für 1 h bei 100 V unter Kühlung (Power Supply: Power Pac 200, BioRad). Die auf die Membran transferierten Proteine wurden immunologisch detektiert. Vor der eigentlichen Detektion erfolgte zuerst die Absättigung freier Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in Blocklösung auf einem Schwenktisch für 1 h bei RT. Überschüssige Blocklösung wurde durch eine 5 minütigen Inkubation in Waschlösung entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem spezifischen Antikörper (jeweils verdünnt in Blocklösung) über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken. Nicht gebundener Antikörper wurde durch viermalige Inkubation in Waschlösung bei RT für je 15 min entfernt. Die Inkubation mit einem in Blocklösung verdünnten Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper, der spezifisch gegen das Fc-Fragment des ersten Antikörpers gerichtet ist,

erfolgte für 1 h bei RT unter leichtem Schwenken. Nicht gebundener Zweitantikörper wurde ebenfalls durch viermaliges Waschen entfernt. Der Nachweis des Peroxidase-konjugierten Zweitantikörpers erfolgte mit einem ECL-Detektionssystem über eine Chemilumineszenz-Reaktion. Die Membran wurde mit 10 ml der ECL Detektionslösung bedeckt. Die Reaktion erfolgte in der Dunkelkammer für genau 1 min bei RT. Die feuchte Membran wurde in eine Filmkassette überführt, mit Folie bedeckt und auf Röntgenfilme (Biomax, Kodak) bei RT exponiert. Zur Weiterverwendung wurden die Membranen kurz mit TBS-Tween gewaschen und getrocknet oder erneut für 30-45 min in Blocklösung inkubiert, um in eine neue Immunreaktion eingesetzt zu werden. Getrocknete Membranen wurden vor dem Einsatz in einer weiteren Immunreaktion zunächst mit Methanol benetzt, unter fließendem Wasser (deionisiert) abgespült und für 30-45 min in Blocklösung inkubiert.

Immunologische Reagenzien:

Primäre Antikörper:

anti-14-3-3 σ	polyklonales Ziegen Serum, das im WB in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt wurde (# sc-7683 Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA)
anti-14-3-3 β	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# SC-629 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
anti-bax	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# 06-499 Upstate; Virginia, USA)
anti-Cdc25A	muriner monoklonaler Antikörper, der im WB in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt wurde (# sc-7389 Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA)
anti-P-Cdc25C (S216)	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt wurde (# 9528 Cell Signaling, Frankfurt)
anti-Cdk1	muriner monoklonaler Antikörper, der im WB in einer Verdünnung von 1:2500 eingesetzt wurde (# C82320 BD Bioscience; San Diego, USA)
anti-P-Cdk1 (Y15)	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# 21944 BD Bioscience; San Diego, USA)
anti-Cdk2	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# 06-505 Upstate; Virginia, USA)
anti-P-Chk2 (T68)	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# 2661 Cell Signaling, Frankfurt)
anti-Flag (M2)	muriner monoklonaler Antikörper, der im WB in einer Verdünnung von 1:4000 eingesetzt wurde (# F1804 Sigma; St. Louis, USA)
anti-Geminin	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt wurde (# sc-13015 Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA)

anti-p21 (H-164)	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# sc-756 Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA)
anti-p53 (SAPU)	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt wurde (S238-120; Scottish Antibody Production Unit, Lanarkshire, Scotland)
anti-p53 (DO-1)	muriner monoklonaler Antikörper, der im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde; erkennt die Aminosäuren 21-25 von humanem p53 (# OP43L Oncogene, Darmstadt)
anti-P-p53 (S15)	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# 9284 Cell Signaling, Frankfurt)
anti-PIG3	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt wurde (# PC268 Oncogene, Darmstadt)
anti-Cyclin A (H-432)	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# sc-751 Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA)
anti-Cyclin E (HE12)	muriner monoklonaler Antikörper, der im WB in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt wurde (# 554182 BD Bioscience; San Diego, USA)
anti-Cyclin B (GSN-1)	muriner monoklonaler Antikörper, der im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# 554177 BD Bioscience; San Diego, USA)

Sekundäre Antikörper:

Ziege anti-Maus IgG (H + L)	konjugiert mit Peroxidase, wurde im WB in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt (Biomol, Hamburg)
Ziege anti-Kaninchen IgG (H + L)	konjugiert mit Peroxidase, wurde im WB in einer Verdünnung von 1:10'000 eingesetzt (Biomol, Hamburg)
Esel anti-Ziege IgG (H + L)	konjugiert mit Peroxidase, wurde im WB in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt (Dianova, Hamburg)

Lösungen:

Transferpuffer:	50 mM Tris 192 mM Glyzin pH 8,3
Waschlösung:	TBS: 20 mM Tris-HCl (pH 7,6) 137 mM NaCl 0,2% Tween [®] 20
Blocklösung	5% Magermilchpulver in Waschlösung

ECL-Detektion:

Lösung 1:	2,5 mM Luminol (3-Aminophthalhydrazid) 400 mM 4-Cumarsäure (p-Hydroxycumarsäure) 100 mM Tris-HCl pH 8,5
Lösung 2:	0,1% H ₂ O ₂ 100 mM Tris-HCl pH 8,5
ECL-Reaktionslösung	5 ml Lösung 1 und 5 ml Lösung 2 unmittelbar vor Verwendung in der Dunkelkammer vermischt.

Im Falle schwer zu detektierender Proteine wurde an Stelle der selbst hergestellten ECL-Reaktionslösung das käufliche „SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate“ Pierce-Reagenz (Perbio Science) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

4.8.9.4 MALDI-TOF/MS

Die Coomassie gefärbten Proteinbanden aus dem Polyacrylamidgelen wurden ausgeschnitten, entfärbt und mit Acetonitril dehydriert. Nach Entfernung von Acetonitril wurden die Gelstücke getrocknet und mit Trypsin (20 µg/ml) in 50 mM Ammoniumbicarbonat (pH 8,0) für 16 h bei 37°C verdaut. Nach sequentieller Inkubation in 0,1% Trifluoroacetic-Säure (TFA), 0,1% TFA/10% Acetonitril und 0,1% TFA/20% Acetonitril wurden die extrahierten Peptide getrocknet und in 3 µl 0,1% TFA gelöst. Anschließend wurde als Matrix 3 µl DHB/Diammoniumcitrat (2% Dihydroxy Benzoic Säure, 1% Diammoniumcitrat/50% Acetonitril, 0,1% TFA) zu den gelösten Peptiden beigefügt. Für die MALDI-TOF/MS Analyse (Axima CRF, Shimadzu) wurde jeweils 1 µl der Mischung eingesetzt. Als interne Kontrolle für die Massen dienten die Peptide, die durch die Autolyse von Trypsin entstanden. Die Abweichungen der Messgenauigkeit war geringer als 100 ppm. Die Interpretation der Daten bzw. der Datenbankabgleich erfolgte mittels der Software „Mascot-Peptide Mass Fingerprint“ (Matrix Sciences Ltd.). Die Gegenüberstellung von humanen p53 und Δp53 Aminosäuren Sequenz erfolgte mit Hilfe der Software „Clustalw“ (Thompson *et al.*, 1994).

4.9 Nukleinsäure-analytische Methoden**4.9.1 Isolierung von RNA**

Die Gewinnung und Isolierung von RNA aus Zellsedimenten (4.6) verschiedener Zelllinien erfolgte mit Hilfe der Kits *QIAshredder™* und *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers. Die gesamtzelluläre RNA wurde in *DEPC-Wasser* gelöst und bei –

20 °C gelagert.

Zur Abschätzung der RNA-Konzentration in der resultierenden Lösung wurde photometrisch die Absorption bei 260 nm (Abs₂₆₀) ermittelt. Dabei entspricht eine Absorption von 1,0 ungefähr einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

Lösungen:

DEPC-Wasser: 0,1 % (w/v) Diethylpyrocarbonat (Sigma) in deionisiertem Wasser. Nach mehrstündiger Inkubation wurde die Lösung autoklaviert.

4.9.2 Reverse Transkription (RT)

Zur Übersetzung der zellulären RNA-Transkripte in cDNA wurde die isolierte RNA (4.9.1) in eine Reverse-Transkriptase (RT)-Reaktion eingesetzt. In Parallelansätzen wurden jeweils Random-Hexamer oder Oligo-dT Primer (Amersham Pharmacia) verwendet.

Zunächst wurden 2 µg gesamtzelluläre RNA mit DEPC-Wasser (4.9.1) auf ein Volumen von 11 µl aufgefüllt, für 15 min bei 65°C erwärmt und anschließend in Eiswasser denaturiert.

Nach ca. 5-10 min Lagerung in Eiswasser wurden je Ansatz 12,5 µl eines Reaktions-Premixes zugefügt. Die RT-Reaktion erfolgte bei 42°C für 90 min und wurde durch 10 min Erhitzen bei 75°C beendet. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und bis zur Verwendung in der PCR (4.9.3) bei -20°C gelagert.

Lösungen:

Reaktions-Premix: 5 µl 5x AMV Puffer (Promega)
2,5 µl dNTP-Mix (je 10 mM) (MBI Fermentas)
1 µl RNAsin (Promega)
2 µl Primer (1 µg/µl) oligo-dT oder random-Hexamer (Amersham)
2 µl AMV Reverse Transcriptase (9 u/µl) (Promega)

4.9.3 PCR

Zum Nachweis der Expression von Volllänge-p53 und alternativer p53-Spleißvarianten wurde die aus der RNA verschiedener Zelllinien gewonnene cDNA (4.9.2) mit Hilfe spezifischer Primer in zwei sukzessiven Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) amplifiziert. Die gewählten Primer-Paare umfassten dabei einen Bereich des p53-Gens, der mehrere Exon-Intron Grenzen

beinhaltete. Dadurch wurde sichergestellt, dass alle PCR-Produkte ausschließlich aus der Amplifikation von cDNA und nicht von etwaigen Verunreinigungen mit genomischer DNA stammen.

In der ersten PCR (PCR 1) wurde von der cDNA ein Fragment zwischen Exon 4 und Exon 11 der p53 cDNA amplifiziert. Das entstehende Produkt wurde im weiteren als Ausgangsmaterial in eine zweite „nested“ PCR (PCR 2) eingesetzt, wobei ein kürzeres Fragment (Übergang Exon 6 zu Exon 7 bis Exon 11) amplifiziert wurde. Wie unten aufgelistet wurde die PCR-Reaktion durch Zugabe von je 37 μ l eines Reaktions-Premix zu je 3 μ l template gestartet und mit dem entsprechenden Programm in einem Primus 96 plus Thermocycler (MWG-Biotech) durchgeführt. Die Produkte der PCR 2 wurden durch neutrale Agarosegelelektrophorese (4.7.4.6) aufgetrennt.

Lösungen:

Pre-Mix	4 μ l 10x Puffer (Eppendorf) 1 μ l dNTP-Mix (je 10 mM) (MBI Fermentas) 1 μ l Vorwärts-Primer (E4F oder E6/7F), je 10 μ M (MWG) 1 μ l Rückwärts-Primer (E11R oder E11bR), je 10 μ M (MWG) 30 μ l Wasser (autoklaviert) 0,3 μ l Taq DNA-Polymerase 5 u/ μ l (Eppendorf)
PCR 1: (30 Zyklen):	3 μ l cDNA aus RT-Reaktion + 37 μ l Pre-Mix 3 min 94°C 45 sec 94°C 60 sec 61°C 60 sec 72°C 7 min 72°C Abkühlung auf 4°C
PCR 2 (30 Zyklen):	3 μ l Produkt aus PCR 1 + 37 μ l Pre-Mix 3 min 94°C 45 sec 94°C 60 sec 58°C 20 sec 72°C 7 min 72°C Abkühlung auf 4°C

Primaten spezifische Oligonukleotide für die PCR:

PCR1:

E4F 5'-CTC CTG GCC CCT GTC ATC GT-3'

E11R 5'-GCT CAG TGG GGG AAC AAG AAC-3'

PCR2:

E6/7F 5'-TGA GGT TGG CTC TGA CTG TA-3'

E11bR 5'-AGA ATG TCA GTC TGA GTC AGG-3'

Nager spezifische Oligonukleotide für die PCR:

PCR1:

mE5F 5'-AGA ATG TCA GTC TGA GTC AGG-3' and

mE11R 5'-GTCAGGCCCCACTTTCTTGACCA-3'

PCR2:

mE6F 5'-GGGTGGAAGGAAATTTGTATCCCG-3'

mE11Rb 5'-CGAAGCGTTTACGCCCGCGG-3'

4.9.4 Semiquantitative RT-PCR

Inwieweit $\Delta p53$ auch p53 spezifische Zielgene *in vivo* transaktiviert, wurde mit Hilfe von p53 bzw. $\Delta p53$ exprimierenden TO-H1299 Zelllinien untersucht. Nach Zugabe von Dox (16h) wurden die Zellen mit ionisierender Strahlung behandelt und zwei Stunden später deren RNA extrahiert (4.9.1). Anschließend erfolgte die cDNA-Synthese (4.9.2), gefolgt von einer PCR (4.9.3) mit spezifischen Primern gegen *p21*, *bax*, *14-3-3 σ* , *mdm2* und *PIG3*. Die „primer“ gegen *GAPDH* und *β -actin* dienten als interne Kontrolle für die semiquantitative RT-PCR. Die Zellzyklus abhängige Transaktivierung von p21 wurde in wtp53 exprimierenden CV-1 Zellen wie oben beschrieben durchgeführt. Die PCR Produkte wurden in 8%igen TBE-Gelen aufgetrennt und mit Ethidium Bromide gefärbt.

TBE-Gele:

8 %ige Lösung für 2 Gele: 2,7 ml Acrylamid (30% Acrylamid / 1% Bisacrylamid)
1 ml 10xTBE
5,3 ml H₂O

	70 µl 10% APS
	10 µl TEMED
10xTBE	108 g Tris-Base 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) 55 g Borsäure (H ₃ BO ₃) mit H ₂ O auf 1 l auffüllen
DNA-Auftragspuffer (6x):	125 mg Brom-Phenol-Blau 125 mg Xylencyanol 25 g Sucrose 0,5 g SDS mit H ₂ O auf 50 ml auffüllen

Oligonukleotide für die PCR:

<i>p21</i> :	5'-GGGGGCATCATCAAAAATT-3' 5'-ACTGAAGGGAAAGGACAAGG-3';
<i>bax</i> :	5'-CCCTGGACCCGGTGCCTCAGG-3' 5'-TCACGGTCTGCCACGTGGGCG-3';
<i>14-3-3σ</i> :	5'-ACAGGGGAAC TTTATTGAGAG-3' 5'-AAGGGCTCCGTGGAGAGGG-3';
<i>mdm2</i> :	5'-AATCATCGGACTCATCAGGTACA-3' 5'-GTCAGCTAAGGAAATTCAGG-3';
<i>PIG3</i> :	5'-TATGTTAGCCGTGCACTTTGA-3' 5'-GTCCAGATGCCTCAAGTCCCA-3'.
<i>GAPDH</i> :	5'-GTGAAGGTCGGAGTCAAC-3' 5'-TGGAATTTGCCATGGGTG-3'
<i>β-actin</i> :	5'-CAGGGCGTGATGGTGGGC-3' 5'-CAAACATCATCTGGGTCATCTTCTC-3'

4.9.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur näheren Charakterisierung der verschiedenen, in der PCR amplifizierten Produkte wurden entsprechende Banden mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarose-Gel (4.7.4.6) ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die Aufreinigung der DNA aus diesen Gelstückchen erfolgte unter Verwendung des QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen) gemäß dem Protokoll des Herstellers. Die aufgereinigte DNA wurde je nach Qualität der ursprünglichen Bande direkt für die Sequenzierung eingesetzt (4.9.7) oder nochmals durch

eine erneute PCR (4.9.3) amplifiziert, elektrophoretisch aufgetrennt (4.7.4.6) und aus dem Gel aufgereinigt.

4.9.6 Ethanolfällung von DNA

Zur Anreicherung und Reinigung von DNA aus einer verdünnten Lösung wurde die Methode der Ethanolfällung eingesetzt. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 1/10 Volumen 3M Kaliumacetat pH 5,4 versetzt. Durch Zugabe des 2,5-fachen Volumens an absoluten Ethanol und 30 min Inkubation bei -20°C erfolgte die DNA-Präzipitation. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (30 min; 14 000 rpm; 4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde für ca. 30 min bei RT getrocknet

4.9.7 Sequenzierung

Eine Variante der Didesoxy-Sequenzierung nach Sanger (1977) stellt das „cycle sequencing“ (Sears *et al.*, 1992) dar. Die Reaktion wurde mit dem ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Biosystems) durchgeführt. In diesem System dienen fluoreszenzmarkierte ddNTPs als Reaktionsterminatoren. Der Ansatz bestand aus folgenden Komponenten (20 µl Gesamtvolumen): 1 µg DNA, 15 pmol Primer E6/7F (4.9.3), 3 µl BigDye (Kit). Die Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen im Thermocycler.

Anzahl der Zyklen	Temp.	Zeit
1x	96°C	1 min
	96°C	10 sec
25x	50°C	5 sec
	60°C	4 min

Anschließend wurde die DNA gefällt (4.9.6) und getrocknet. Die Analyse erfolgte durch den Sequenzierservice (Institut für Zellbiochemie und klinische Neurologie der Universität Hamburg) in einem ABI-Sequenator 377.

4.9.8 Klonierung von $\Delta p53$, p53 und ATR^{kd}

Die cDNA (4.9.2) von humanen wt $\Delta p53$ (HSC93) wurde durch PCR mit den spezifischen Primern (p53F-Eco, p53R-Eco) amplifiziert und in die EcoRI Stelle des pCDNA3-Vektors

(Invitrogen) eingefügt. Die 175D Mutation in humanen wt Δ p53 wurde durch „site directed mutagenesis“ (Quick Change Kit, Stratagene) nach den Angaben des Herstellers in pCDNA3-wt Δ p53 eingefügt.

Mutp53-273H wurde durch EcoRI aus dem pC53.273 Plasmid ausgeschnitten und in die EcoRI Stelle von pCDNA3 eingefügt.

p53 Proteine wurden mit dem FLAG-Peptid markiert, indem deren cDNAs in die BamHI/ApaI Stelle des Expressionsvektors pCMV-Tag2B (Stratagene) eingefügt wurden. Für die Herstellung Doxycyclin (Dox)-induzierbarer Plasmide, wurden die cDNAs von wt Δ /mut Δ p53, wt/mutp53 und Flag-ATR^{kd} durch BamHI/XhoI aus dem pCDNA3 ausgeschnitten und in den pCDNA4/TO-Vektor (T-Rex System, Invitrogen) eingefügt. Die Flag markierten Δ p53 bzw. p53 cDNAs wurden durch NotI/ApaI aus pCMV-Tag2B ausgeschnitten und in den pCDNA4/TO-Vektor eingefügt. Die DNA-Sequenz wurde bei allen Konstrukten mittels Sequenzierung (4.9.7) überprüft.

Primer:

p53F-Eco:	5'-TATATGAATTCGGGATCCCATGGAGGAGCCGCAGTCAGA-3'
p53R-Eco:	5'-TATATGAATTCGGTCAGTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTCT-3'

5. Ergebnisse

Eine zentrale Rolle bei der DNA Schadensantwort übt der Tumorsuppressor p53 dadurch aus, in dem er nach Aktivierung als Reaktion auf Stress einerseits als Transaktivator die Expression wachstumsregulierender Faktoren bewirkt und andererseits in seiner Eigenschaft als nicht-transkriptionell aktiver Tumorsuppressor Reparaturprozesse unterstützt. Darüber hinaus ergeben sich Fragen nach den molekularen Mechanismen, die in Abhängigkeit des *p53* Status sowie der Position der Zelle im Zellzyklus zum Zeitpunkt der Schädigung einerseits zur Manifestation ATM/ATR-induzierter Kontrollpunkte und andererseits zur Aktivierung von Reparaturereignissen führen. Gleichermäßen unverstanden bleibt auch die Frage, wie die Koordination der nicht-transkriptionellen mit den auf Transaktivierung beruhenden Aktivitäten von p53 erfolgt und inwieweit erstere überhaupt von Bedeutung für die Reparatur strahleninduzierter Schäden ist.

Zur Überprüfung der oben gemachten Annahmen sollte zunächst untersucht werden, wie Primatenzelllinien in Abhängigkeit des *p53* Status auf γ - und UV-Strahlung reagieren. Für die diese Untersuchungen wurden verschiedene Primatenzelllinien verwendet, die entweder endogenes *wtp53*, *mutp53* oder kein *p53* exprimieren. Um einen ersten Eindruck zu erhalten, wie Zellen mit unterschiedlichem *p53* Status auf strahleninduzierte Schäden reagieren, wurden asynchrone Zellen mit je einer subletalen und einer letalen Dosis ionisierender γ -Strahlung geschädigt. Die dabei verwendeten Gy wurden in Hinblick auf den gewünschten Ausgang empirisch ermittelt, wobei 2 Gy für subletale und 10 Gy für letale Schäden appliziert wurden. In Hinblick auf die Evaluierung der Reparaturfähigkeit geschädigter Zellen erfolgte zusätzlich die Bestrahlung mit 10 J/m², wobei auf eine Bestrahlung mit höherer Energie verzichtet wurde, da diese eine vernetzende Auswirkung auf Proteine und Nukleinsäuren hat und eine präzise bzw. aussagekräftige Erfassung von strahleninduzierten Vorgängen auf molekularer Ebene erschweren würde.

Für die detaillierte Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen dem Zellzyklusverhalten und der Reparaturfähigkeit von bestrahlten Zellen mit unterschiedlichem *p53* Status sowie die Analyse strahleninduzierter molekularer Vorgänge sollte eine diploide, nicht transformierte Primatenzelllinie eingesetzt werden, die folgende Kriterien erfüllt:

- Synchronisierbar ohne vorzeitige Stabilisierung und Aktivierung von p53
- Keine Defekte im schadeninduzierten Signal- und Reparaturweg
- Geeignet für die Herstellung eines induzierbaren isogenen Zellsystems

Ausgewählt wurde die nicht transformierte, immortalisierte, diploide wtp53 Epithelzelllinie CV-1 der afrikanischen Grünen Meerkatze, mit der ein isogenes Zellsystem etabliert werden konnte und mit dem die meisten der hier vorgestellten Ergebnisse erzielt werden konnte.

5.1 Bestrahlungen mit 10 Gy führen zu unterschiedlichen zellulären Reaktionen, die nicht mit dem *p53* Status korrelieren

Die Schadensantwort von bestrahlten Zellen mit unterschiedlichem *p53* Status wurde zunächst durch eine durchflusscytometrische Analyse (FACS-Analyse) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung untersucht. Bei dieser Methode wird die Verteilung einer Zellpopulation auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus über die Fluoreszenzintensität des DNA-Interkalators Propidiumiodid erfasst, die wiederum direkt proportional zum DNA-Gehalt der Zelle ist. Neben G1, S und G2/M-Zellen können daher auch DNA-haltige Zellfragmente, wie sie bei der Apoptose entstehen, erfasst und unterschieden werden. Veränderungen des FACS-Profiles geben wichtige Hinweise auf die Aktivierung der schadeninduzierten Kontrollpunkte und Eliminierungsprozesse und somit einen ersten Eindruck inwieweit der *p53* Status Einfluss auf den Ausgang der schadeninduzierten Ereignisse nimmt. Ausgewählt für dieses Experiment wurden humane B- und T-Zell Lymphom-Zelllinien, die sich in ihrem *p53* Status unterschieden und besonders empfindlich auf ionisierende Strahlen reagieren. Neben der wildtyp *p53* (wtp53)-exprimierenden Zelllinie HSC93 sowie der *p53*-null Zelllinie HL-60 wurden zwei Zelllinien mit unterschiedlichen Mutationen im *p53* Gen verwendet. Die Zelllinie CCRF-CEM (im Folgenden als CEM bezeichnet) exprimiert *p53*, das an zwei Positionen (Codon 175 sowie Codon 248) durch Punktmutationen verändert ist. Bei der Zelllinie Karpas-299 ist *p53* an Codon 273 durch Mutation verändert und exprimiert demnach mutp53 und wtp53, wobei jedoch wtp53 durch Komplexierung mit mutp53 dominant-negativ inaktiviert vorliegt.

Wie aus **Abb. 5-1A** ersichtlich ist, reagieren die humanen Lymphom-Zelllinien auf Bestrahlung mit 10 Gy sehr verschieden. Ausgehend von einem für proliferierende Zellkulturen normalen FACS-Profil bei unbestrahlten Zellen mit ca. 65 % G1-Phase Zellen (DNA-Gehalt: 2N), 15 % S-Phase Zellen (DNA Gehalt zwischen 2 und 4N) und 20 % G2/M-Phase Zellen (DNA Gehalt 4N) führen 10 Gy zu signifikanten Änderungen in der Verteilung der Zellpopulation auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus. In allen Zellen erscheint nach Bestrahlung mit 10 Gy 24 h nach Schadensinduktion ein deutlicher „peak“ im FACS-Profil links von der Position der G1-Zellen. Dieser „peak“ repräsentiert DNA-haltige Fragmente mit einem sub-G1 DNA-Gehalt, wie sie im Zuge des apoptotischen Prozesses gebildet werden.

Die sub-G1 Fraktion beinhaltet 24 h nach Bestrahlung ca. 25 % aller Zellen der Zelllinien HSC93, HL60 und CEM. Die stetige Zunahme solcher Zelltrümmer während des Beobachtungszeitraums spricht stark dafür, dass die Bestrahlung mit 10 Gy in wtp53 HSC93, p53-null HL60 und mutp53 CEM Zellen das apoptotische Programm aktiviert und eine derart bestrahlte Zellpopulation durch den Prozess des programmierten Zelltods vollständig eliminiert wird. Im Unterschied dazu induziert die 10 Gy-Bestrahlung in Karpas-299 Zellen

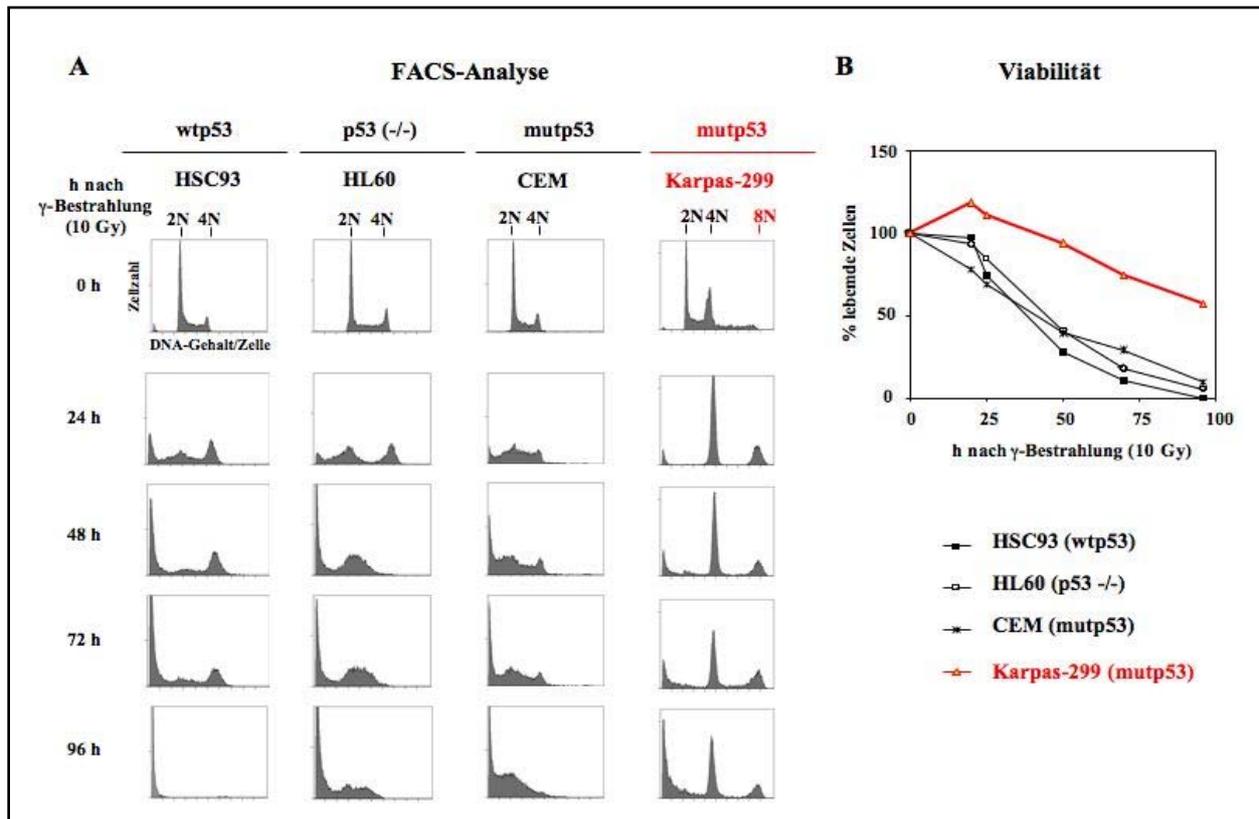


Abb. 5-1: 10 Gy γ -Bestrahlung führt in humanen Lymphom-Zelllinien zu unterschiedlichen Reaktionen, die nicht mit dem p53 Status korrelieren. (A) Zellzyklusprofile bestrahlter humaner Lymphom-Zellen mit verschiedenem p53 Status. Asynchron wachsende Zellen der Linien HSC93 (wtp53), HL60 (p53 -/-), CEM (mutp53) sowie Karpas-299 (mutp53) wurden mit 10 Gy bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit Ethanol fixiert. Für die durchflusscytometrische Analyse wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und jeweils 10.000 Zellen erfasst. 10 Gy γ -Bestrahlung führt in Karpas-299 Zellen zur Bildung polyploider Zellen, während alle anderen Zellen vollständig fragmentiert werden. (B) Überlebensrate 10 Gy γ -bestrahlter humaner Lymphom-Zellen mit verschiedenem p53 Status. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung wurde ein Aliquotes der bestrahlten Zellen mit Trypanblau gefärbt und in einer Neubauer-Kammer ausgezählt. Der Anteil lebender Zellen (% lebender Zellen) wurde durch Auszählung Typanblau-negativer Zellen/ml Zellsuspension in Bezug auf die entsprechende Zahl vor Bestrahlung ermittelt. Im Diagramm dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei Auszähl-Ergebnissen. Die abgebildete Kurve stellt das typische Verhalten der untersuchten Zelllinien dar und wurde in unabhängigen Experimenten reproduziert.

die Entstehung von polyploiden Zellen, die über einen 8N Chromosomensatz verfügen (**Abb. 5-1A**). Bereits in unbestrahlten Karpas-299 Zellen ist im FACS-Profil ein geringer Prozentsatz an Zellen mit einem DNA Gehalt erkennbar, der größer ist als der von G2-Phase Zellen (4N). Dieser geringe Anteil polyploider Zellen entspricht den bekannten Eigenschaften dieser Zelllinie (Datenblatt-Angaben DSMZ). Nach 10 Gy γ -Bestrahlung nimmt der Anteil polyploider Karpas-299 Zellen wie auch der von Zellen mit einem 4N DNA Gehalt sehr stark zu, während diploide G1-Phase Zellen bereits 24 h nach Bestrahlung vollständig verschwunden sind (**Abb. 5-1A**). Zellen mit einem 8N DNA Gehalt sind eindeutig als polyploid identifizierbar, jedoch erlaubt die FACS-Analyse keine Diskriminierung zwischen „normalen“ G2 Zellen (DNA Gehalt: 4N) und polyploiden G1 Zellen (DNA Gehalt: $2 \times 2N = 4N$). Es muss daher davon ausgegangen werden, dass der nach 10 Gy γ -Bestrahlung von Karpas-299 Zellen die Hauptpopulation repräsentierende 4N-„peak“ im FACS-Profil eine Mischpopulation aus Zellen mit „normalem“ und polyploidem Chromosomensatz darstellt.

Die unterschiedliche Sensitivität der verschiedenen Lymphom-Zelllinien bezüglich 10 Gy γ -Bestrahlung zeigt sich auch bei der Analyse der mit Trypanblaufärbung ermittelten Überlebensrate dieser Zellen. Durch Auszählen lebender und toter Zellen, die über den Ausschluss bzw. die Aufnahme des Farbstoffs Trypanblau unterschieden werden konnten, wurde die Auswirkung der Bestrahlung auf die Lebensfähigkeit der Zellen über mehrere Tage hinweg beobachtet. Wie **Abb. 5-1B** zeigt führt die γ -Bestrahlung mit 10 Gy zu einer vollständigen Eliminierung der wtp53 HSC93 Zellen, der p53-null HL60 Zellen sowie Zellen der Linie mutp53 CEM. Für alle dieser Zelllinien zeigte sich reproduzierbar, dass bereits zwei Tage nach Bestrahlung über 50 % der Zellen nicht mehr lebten. Vier Tage nach Bestrahlung fanden sich nur noch vereinzelt Zellen (weniger als 10 %), die bei der Färbung mit Trypanblau noch zu einem Ausschluss des Farbstoffs in der Lage waren (**Abb. 5-1B**).

Im Gegensatz dazu beeinträchtigt 10 Gy γ -Bestrahlung die Lebensfähigkeit von mutp53 Karpas-299 Zellen in weit geringerem Ausmaß. Bei Auszählung der Zellen 24 h nach Bestrahlung ist sogar eine Zunahme lebender Zellen im Vergleich zum Zeitpunkt der Bestrahlung zu verzeichnen (**Abb. 5-1B**). Dies zeigt, dass die starke γ -Strahlung Proliferation und weitere Zellteilungen von Karpas-299 zunächst nicht inhibiert. Zu späteren Zeitpunkten reduziert sich die Zahl lebender Zellen, jedoch bei weitem nicht so stark wie bei den anderen Lymphom-Zelllinien. Am Ende des Beobachtungszeitraums, vier Tage nach Bestrahlung, sind noch ca. 60 % der bestrahlten Karpas-299 Zellen vital (**Abb. 5-1B**).

Um zu überprüfen inwieweit die Generierung von polyploiden Zellen infolge 10 Gy γ -Bestrahlung lediglich eine Zelllinien-spezifische Besonderheit von Karpas-299 Zellen darstellt, wurden weitere mutp53 Zelllinien mit 10 Gy geschädigt und durchflusscytometrisch untersucht. Für dieses Experiment wurde die Rhesusaffen Nieren-Zelllinie LLC-MK2 (*p53* deletiert von Codon 237-239), die humane Lymphom-Zelllinie CA46 (*p53* mutiert an Codon 248) sowie die humane epidermoide Carcinom-Zelllinie A431 (*p53* mutiert an Codon 273) und die humane Colon-Adenocarcinom-Zelllinie SW480, bei der *p53* an Codon 273 und Codon 309 durch Mutation verändert ist, verwendet. Wie aus den Zellzyklusprofilen in **Abb. 5-2** ersichtlich wird, induziert die Bestrahlung mit 10 Gy sowohl in A431 als auch in SW480 aber nicht in CA46 sowie LLC-MK2 die Generierung polyploider Zellen (Daten für LLC-MK2 nicht gezeigt).

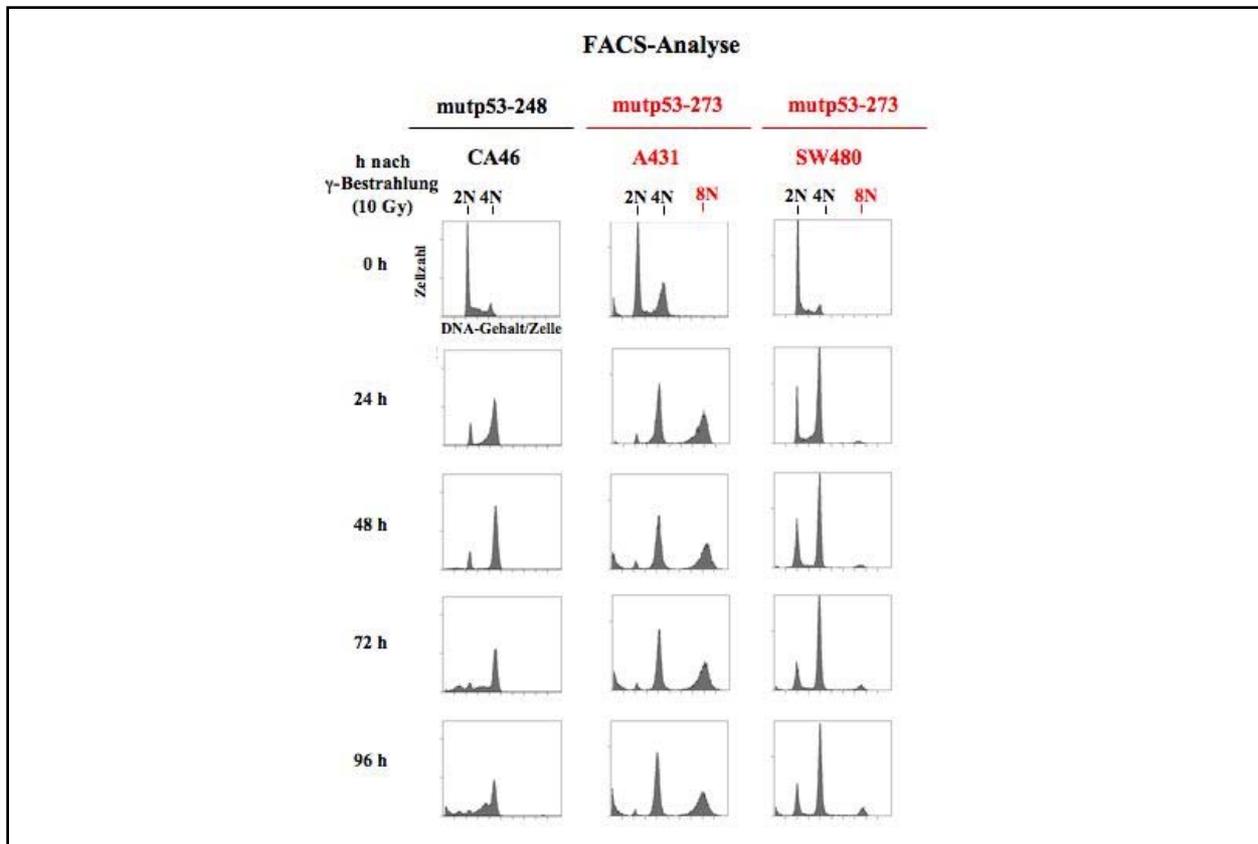


Abb. 5-2: 10 Gy γ -Bestrahlung führt in Zellen, bei denen *p53* an Codon 273 mutiert ist, zur Generierung polyploider Zellen. Zellzyklusprofile bestrahlter humaner Tumorzellen mit verschiedenem *p53* Status. Asynchron wachsende Zellen der Linien CA46 (mutp53-248), A431 (mutp53-273) sowie SW480 (mutp53-273) wurden mit 10 Gy bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit Ethanol fixiert. Für die durchflusscytometrische Analyse wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und jeweils 10.000 Zellen erfasst. 10 Gy γ -Bestrahlung führt in mutp53-273 exprimierenden Zellen zur Bildung polyploider Zellen.

Auf Grund der unterschiedlichen Reaktion von mutp53 Zellen nach einer γ -Bestrahlung mit 10 Gy erfolgte die Einteilung dieser Zellen in zwei verschiedene mutp53 Typen. Zellen, die infolge 10 Gy γ -Bestrahlung mit der Generierung von polyploiden Zellen reagieren werden dem „type II“ zugeordnet, während mutp53 Zellen, die nicht das Phänomen der strahleninduzierten Polyploidisierung zeigen, als „type I“ bezeichnet werden. Bei Betrachtung der Zuordnung der mutp53 Zellen in die Kategorien „type I“ und „type II“ (Abb. 5-3) fällt auf, dass die Polyploidisierung immer in Zellen induziert wird, bei denen p53 an Codon 273 mutiert ist.

„type I“ mutp53 Zelllinien		
Zelllinie	Zelltyp	Mutation p53 Codon
CEM	Humanes T-Zell Lymphom	175 + 248
CA46	Humanes Burkitt Lymphom	248
LLC-MK2	Rhesusaffen Nierenzelle	Δ 237-239

„type II“ mutp53 Zelllinien		
Zelllinie	Zelltyp	Mutation p53 Codon
A431	Humanes epidermoides Carcinom	273
SW480	Humanes Colon-Adenocarcinom	273 + 309
Karpas-299	Humanes T-Zell Lymphom	273

Abb. 5-3: Einteilung der mutp53 Zelllinien in „type I“ und „type II“. Zellen, bei denen eine γ -Bestrahlung mit 10 Gy zur Polyploidisierung führt wurden dem „type II“ zugeordnet Zellen, bei denen eine γ -Bestrahlung mit 10 Gy zur Fragmentierung der DNA führt wurden dem „type I“ zugeordnet.

Die Beobachtung, dass „type I“ und „type II“ mutp53 unterschiedlich auf die γ -Bestrahlung mit 10 Gy reagieren impliziert in Hinblick auf den je unterschiedlichen Ausgang der Schadensreaktion zwei mögliche Erklärungen:

Im ersten Fall werden, wie bereits beschrieben, die Zellen mittels der transaktivierungs-inaktiven Mutanten von p53 eliminiert (Haupt et al., 1995; Chen et al., 1996; Kokontis et al., 2001; Mihara et al., 2003; Chipuk et al., 2003, 2004). Im anderen Fall könnten die von mutp53 ausgehenden Signale eine anti-apoptotische Wirkung ausüben, wobei mutp53 hier

dem Konzept des „gain of function“ entsprechen könnte, das über eine „Restaktivität“ des Transaktivators p53 vermittelt wird, wodurch es schwer geschädigten Zellen ermöglicht wird sich der Kontrolle der schadeninduzierten Reaktionskaskade zu entziehen.

5.2 Bestrahlung mit 10 Gy Gamma führt zur Hochregulation von anti-apoptotischen Zielgenen in „type II“ mutp53 Zellen

Die Beobachtung, dass „type II“ mutp53 Zellen nach γ -Bestrahlung mit 10 Gy anders reagieren als die „type I“ mutp53, wtp53 und p53-null Zellen impliziert die unterschiedliche Integration der schadeninduzierten Signale in Hinblick auf den p53 Status der geschädigten Zelle. Bekannt ist, dass die zentrale Aktivität von p53 in der Transaktivierung von Zielgenen besteht, deren Genprodukte zu den sowohl pro- als auch anti-apoptotischen Faktoren gehören. In wtp53 Primatenzellen transaktiviert p53 in Abhängigkeit des applizierten Schadens pro- und anti-apoptotische Faktoren, deren Expression entscheidend für den Ausgang der Schadensreaktion ist. Deshalb war es nahe liegend zu untersuchen, inwieweit in „type I“ und „type II“ mutp53 Zellen eine differenzielle Induktion p53-abhängiger pro- bzw. anti-apoptotischer Faktoren zu beobachten ist, die mit dem unterschiedlichen Ausgang der Schadensreaktion korreliert und damit als mögliche Ursache für den unterschiedlichen Ausgang der Schadensantwort in Frage kommt.

Zu der Vielzahl der bislang bekannten Zielgene von p53 gehören neben dem Ubiquitin-Ligase kodierenden *mdm2* auch *Bax* (Miyashita und Reed, 1995) und *PIG3* (Polyak et al., 1997), deren Genprodukte eine pro-apoptotische Wirkung haben, sowie *p21* (El-Deiry et al., 1993) und *14-3-3 σ* (Hermeking et al., 1997), deren Genprodukte eine anti-apoptotische Wirkung haben. Western Blot Analysen, in denen die Expression dieser fünf genannten p53-regulierten Zielgene auf Proteinebene untersucht wurde, zeigen klar, dass in den wtp53 Zellen HSC93, CV-1 eine γ -Bestrahlung von 10 Gy zu einer Induktion von allen fünf p53-regulierten Genen führt (**Abb. 5-4**; Daten nicht gezeigt für HSC93). Auffällig ist, dass die Induktion wachstumsregulierender Faktoren sehr schnell erfolgt, während die Aktivierung der pro-apoptotischen Faktoren erst zu einem späteren Zeitpunkt zu beobachten ist. Im Gegensatz dazu sind wie erwartet in den Lysaten, hergestellt aus den „type I“ mutp53 Zellen CEM, CA46, LLC-MK2, keine p53-transaktivierten Genprodukte detektierbar (**Abb. 5-4**; Daten nicht gezeigt für CEM und CA46). Umso erstaunlicher ist der Befund, dass in den „type II“ mutp53 Zelllysaten Proteine nachweisbar sind, deren strahlendinduzierte Expression abhängig von transkriptionell aktiven p53 ist (**Abb. 5-4**; Daten nicht gezeigt für Karpas-299 und SW480).

Auffallend ist, dass in 10 Gy bestrahlten „type II“ mutp53 Zellen nur Gene aktiviert werden, dessen Produkte eine anti-apoptotische Wirkung haben. Diese Befunde lassen vermuten, dass in „type II“ mutp53 Zellen die Mutation an Codon 273 die transkriptionelle Aktivität von p53 nur partiell inaktiviert, wobei Promotoren wie *mdm2*, *bax* und *PIG3* von der Transaktivierung ausgeschlossen sind. Allerdings sind diese Resultate nur ein Hinweis darauf, dass mutp53-273 über eine gewisse differenzielle Transaktivierungseigenschaft verfügen könnte, die zur Hochregulation von p21 und 14-3-3 σ führen könnte.

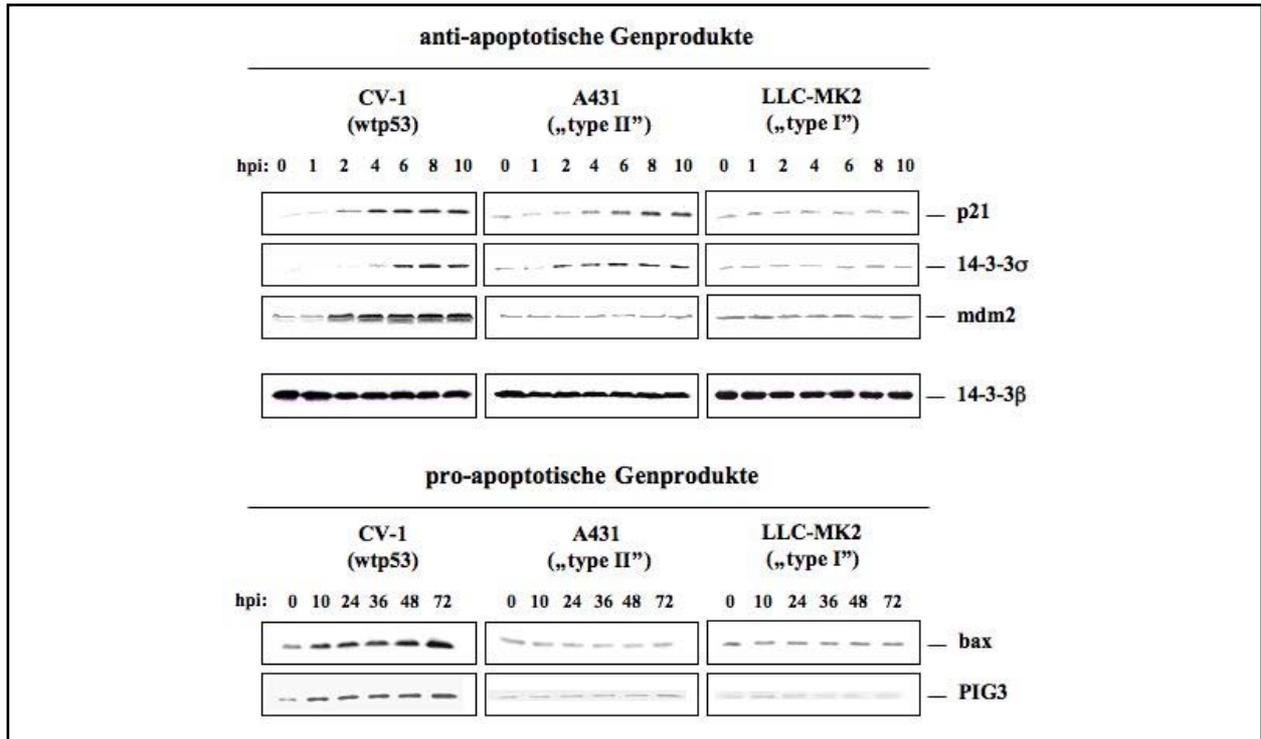


Abb. 5-4: Analyse p53-induzierbarer Genprodukte in wtp53, „type I“ mutp53 und „type II“ mutp53 Zellen. Exponentiell wachsende wtp53 CV-1, mutp53 SW480, mutp53 LLC-MK2 Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und zu den angegebenen Zeiten nach Bestrahlung (hpi) für die Western Blot Analyse aufbereitet. Der Nachweis p53-induzierbarer Genprodukte erfolgte mit spezifischen Antikörpern. Als Auftragskontrolle diente 14-3-3 β , das unabhängig von der Schadensstärke sowie Position der Zelle im Zellzyklus exprimiert wird.

Die Western Blot Analyse zeigt, dass in „type II“ mutp53 Zellen ausschließlich die p53-regulierten Genprodukte p21, 14-3-3 σ aber nicht mdm2, bax und pig3 nach Bestrahlung mit 10 Gy hochreguliert werden. Dieser Befund weist auf eine selektive Transaktivierung von p53-regulierten Promotoren in „type II“ mutp53 Zellen hin, die vermutlich auf eine „Restaktivität“ von mutp53-273 beruht. Der direkte Nachweis, dass mutp53-273 tatsächlich verantwortlich für die Transaktivierung der anti-apoptotischen Faktoren ist kann durch die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) erbracht werden. ChIP ist eine Technik die es ermöglicht, die Interaktion von p53 mit den Promotoren p53-induzierbarer Zielgene *in vivo*

nachzuweisen. Die Chromatin-Immunpräzipitation wurde mit drei verschiedenen monoklonalen anti-p53 Antikörpern durchgeführt, die spezifisch unterschiedliche Epitope ihres Antigens erkennen. Der Antikörper DO1 erkennt ein Amino-terminales Epitop von p53 (Aminosäuren 21-25), während der Antikörper ICA9 an den äußersten Carboxy-Terminus (Aminosäuren 383-393) und der Antikörper DO12 an eine zentrale Region (Aminosäuren 256-270) des Tumorsuppressors bindet. Zusätzlich wurde für die negativ Kontrolle der anti-T-Antigen (T-Ag) Antikörper PAb101, der mit p53 nicht kreuzreagiert, verwendet. Die Assoziation von p53 koimmunpräzipitierter Promoter DNA wurde durch PCR-Amplifikation unter Verwendung von Promoter-spezifischen „primern“ analysiert. In der Chromatin-Immunpräzipitation wurde die Promoterbindungsfähigkeit von p53 der Zelllinien wtp53 CV-1, „type I“ mutp53 LLC-MK2 und „type II“ mutp53 A431 analysiert. Vor der Chromatin-Immunpräzipitation wurden für die Evaluierung der endogenen Transaktivierungsaktivität von p53 alle verwendeten Zellen mit 10 Gy γ -bestrahlt. Die Western Blot Analyse der anti-p53 Immunpräzipitate, die mit den drei Epitop-spezifischen anti-p53 Antikörper durchgeführt wurde, ergab einen erstaunlichen Befund: Während das DO12-Immunpräzipitat nur eine p53-reaktive Bande im Western Blot ergibt, enthalten die DO1- und ICA9-Immunpräzipitaten zwei p53-reaktive Banden (**Abb. 5-5A**).

Die PCR-Analyse der ChIP assoziierten Promotoren ergab, dass in wtp53 CV-1 Zellen p53 mit allen Promotoren interagiert und zwar unabhängig von dem für die Chromatin-Immunpräzipitation verwendeten anti-p53 Antikörper (**Abb. 5-5B**, erste Spalte). Wie erwartet bindet in den mutp53 LLC-MK2 Zellen das endogene p53 an keinen der untersuchten Promotoren (**Abb. 5-5B**, dritte Spalte). Im Gegensatz dazu ergibt sich für die mutp53 A431 Zelllinie ein völlig anderes Bild. Die PCR-Analyse zeigt im Falle der DO1- und ICA9-Chromatin-Immunpräzipitationen ein positives Signal für die Promotoren *p21* und *14-3-3 σ* , während mit dem anti-p53 Antikörper DO12 präzipitiertes p53 überhaupt keine assoziierte Promoter-Sequenz enthält (**Abb. 5-5B**, zweite Spalte). Diese Ergebnisse konnten mit den „type II“ mutp53 Zelllinien SW480 und Karpas-299 reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

Ergebnisse aus der Western Blot Analyse (**Ab. 5-4**) und der Chromatin-Immunpräzipitation (**Abb. 5-5B**) zeigen eindeutig, dass in wtp53 CV-1 Zellen p53 alle fünf der getesteten Promotoren bindet und transaktiviert, während in „type I“ mutp53 LLC-MK2 Zellen p53 wie erwartet diese Promotoren weder binden noch transaktivieren kann. Die Korrelation zwischen der Hochregulation von *p21* und *14-3-3 σ* in γ -bestrahlten mutp53 A431

Zellen mit der positiven ChIP-PCR Analyse für die *p21*- und *14-3-3σ*-Promotoren unterstützt die Vermutung, dass in „type II“ mutp53 Zellen p53 über eine transkriptionelle „Restaktivität“ bezüglich bestimmter Promotoren verfügen könnte.

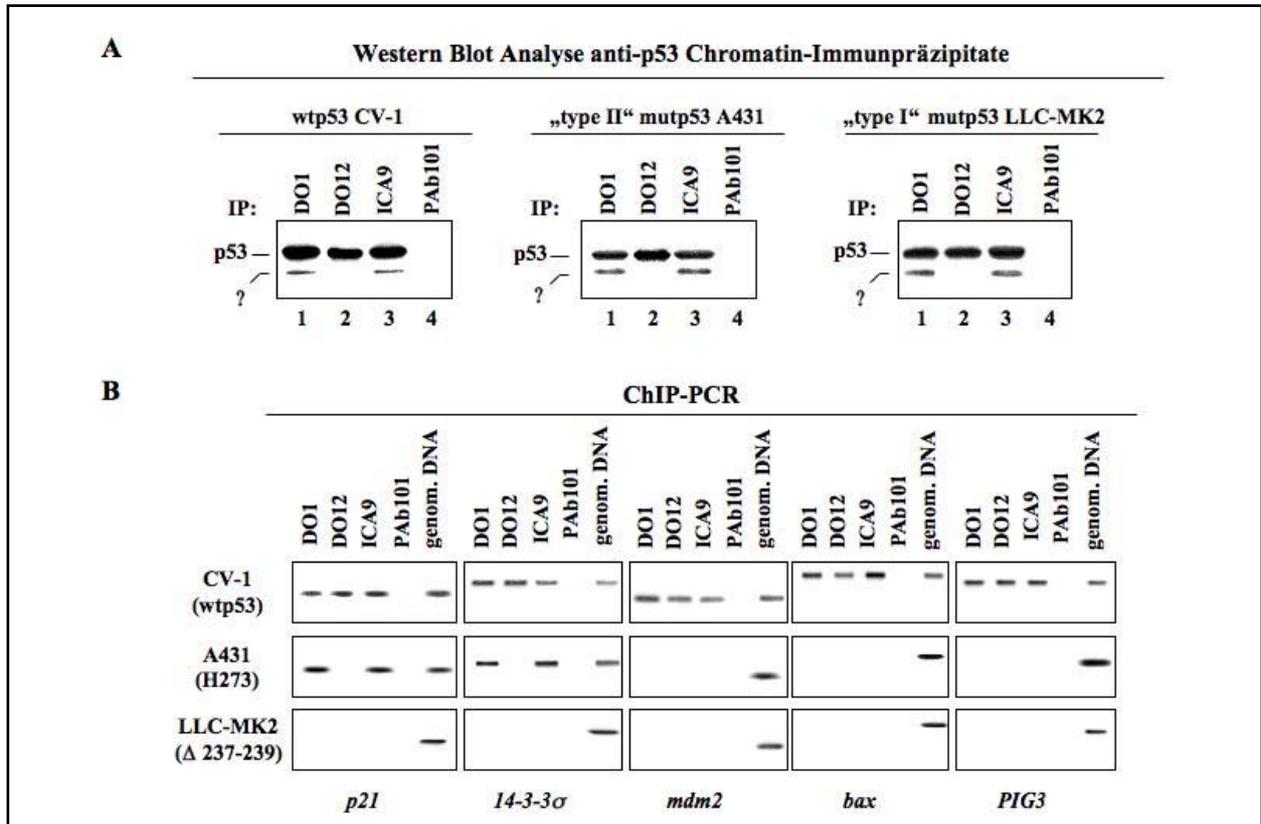


Abb. 5-5: ChIP-PCR von 10 Gy γ -bestrahlten Zellen zeigen in Abhängigkeit des p53 Status selektive Promoterbindung von p53. Asynchron wachsende wtp53 CV-1, „type II“ mutp53 A431 und „type I“ mutp53 LLC-MK2 Zellen wurden nach Bestrahlung mit 10 Gy mit Formaldehyd behandelt und einer ChIP-PCR Analyse unterzogen. Für die Chromatin-Immunpräzipitation wurden die folgenden monoklonalen Antikörper verwendet: DO1, erkennt N-Terminus von p53, ICA9, erkennt C-Terminus von p53, DO12 erkennt Core-Domäne von p53, PAb101 ist T-Ag spezifisch und erkennt kein p53. (A) Chromatin-Immunpräzipitation-Western Blot bestrahlter Zellen. p53 wurde mit den angegebenen monoklonalen Antikörpern aus den Zelllysaten mit einer Proteinmenge von jeweils 500 μ g präzipitiert und in einer nachfolgenden Western Blot Analyse das Präzipitat auf p53 mit dem polyklonalen anti-p53 Antikörper SAPU untersucht. (B) Die p53 assoziierten Promotoren *p21*, *14-3-3σ*, *mdm2*, *bax* und *PIG3* wurden mit spezifischen „primern“ durch PCR amplifiziert und im Agarosegel mit Ethidium Bromid gefärbt. Genomische DNA wurde als Größenmarker eingesetzt.

Der Befund, dass die selektive Promoteraktivierung 10 Gy γ -bestrahlter humaner „type II“ mutp53 Zellen eventuell auf der Mutation von p53 an Codon 273 beruht erklärt allerdings nicht die Ergebnisse, die mit den Epitop-spezifischen anti-p53 Antikörpern im Immunpräzipitationsexperiment erzielt wurden. Offen bleibt die Frage warum mit den anti-

p53 Antikörpern DO1 und ICA9 zwei reaktive p53 Banden und mit dem DO12 Antikörper nur eine reaktive p53 Bande immunpräzipitiert wird und vor allem warum in „type II“ mutp53 Zellen die p53-assoziierten *p21*- und *14-3-3* σ -Promotoren nur mit DO1 und ICA9 aber nicht mit DO12 detektierbar sind, obwohl dieser Antikörper p53 präzipitiert (**Abb. 5-5**).

5.3 Primatenzellen generieren eine alternativ gespleißte p53-Isoform, die als Δ p53 bezeichnet wird

Nachdem die Resultate der Immunpräzipitation aus mit Formaldehyd behandelten Zellen erhalten wurden und sich bei diesem Verfahren auf Grund der erfolgten Vernetzung von Proteinen die Kreuzreaktivität der verwendeten anti-p53 Antikörper erhöhen könnte, wurde im Western Blot die p53-Reaktivität dieser Antikörper mit Lysaten, hergestellt aus den Zellen wtp53 PRK, wtp53 CV-1, wtp53 HSC93, „type II“ mutp53 SW480 und „type I“ mutp53 LLC-MK2, überprüft. Wie **Abb. 5-6A** zeigt, erscheint in den Lysaten, gewonnen aus den primären Rhesusaffen Nierenzellen PRK, den immortalisierten wtp53 CV-1 und den wtp53 HSC93 Zellen, bei Verwendung der anti-p53 Antikörper DO1 und ICA9 zusätzlich zu dem auf p53-Laufhöhe nachweisbaren Protein nach Bestrahlung eine weitere Bande, die ein in der Gelelektrophorese ein schneller laufendes Protein repräsentiert. Die Induktion dieses Proteins kann auch in nach UV-Bestrahlung sowie Cisplatin-Behandlung in diesen Zelllinien beobachtet werden (Daten nicht gezeigt) und ist somit nicht spezifisch für γ -Bestrahlung. In Zellen mit mutiertem p53 ist das kleinere DO1- und ICA9-reaktive Protein wie auch mutp53 stabilisiert und zeigt bezüglich der Menge keine Änderungen nach Bestrahlung (**Abb. 5-6B**). Wie bereits in der Chromatin-Immunpräzipitation Western Blot Analyse (**Abb. 5-5A**) kann das unbekannte, in der Gelelektrophorese bei ca. 45 kDa laufende Protein auch in der direkten Western Blot Analyse mit dem monoklonalen Antikörper DO12 nicht detektiert werden (**Abb. 5-6 A, B**). Dies zeigt zum einen, dass die Erkennung dieses Proteins nicht auf einer unspezifischen Kreuzreaktion der monoklonalen anti-p53 Antikörper DO1 und ICA9 beruht, zum anderen deutet die Reaktivität von N- und C-terminal gerichteten p53 Antikörpern darauf hin, dass es sich vermutlich nicht um ein proteolytisches Abbauprodukt von p53 handelt, sondern vielmehr um eine andere generierte, kleinere Isoform des Tumorsuppressors, die im folgenden als Δ p53 bezeichnet wird. Nachdem Δ p53 nicht mit dem gegen eine zentrale Region von p53 gerichteten Antikörper DO12 reagiert ist es nahe liegend, dass es sich bei Δ p53 um ein Protein handelt, dem das DO12-reaktive Epitop fehlt und folglich das Produkt alternativen Spleißens des *p53* RNA-Transkripts sein muss.

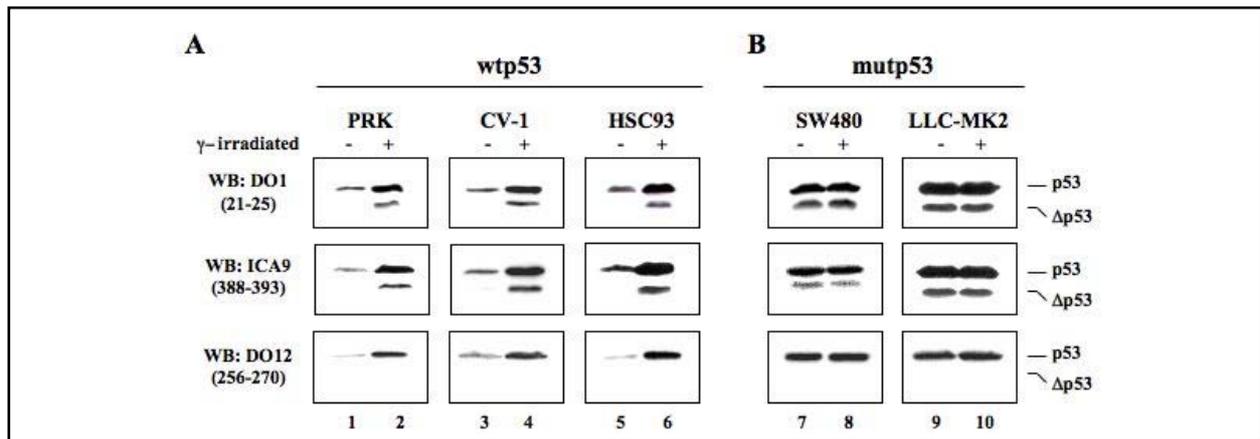


Abb. 5-6: Primatenzellen exprimieren ein ca. 45 kDa Protein, das von den N- und C-terminal bindenden anti-p53 Antikörpern erkannt wird. Exponentiell wachsend wtp53 (A) und mutp53 (B) Zellen der angegebenen Linien wurden γ -bestrahlt (+) bzw. unbestrahlt (-) belassen und für die Western Blot Analyse aufbereitet. Sowohl der gegen den N-Terminus von p53 gerichtet monoklonale Antikörper DO1 als auch der C-terminal bindende monoklonale Antikörper ICA9 erkennen außer p53 zusätzlich ein bei ca. 45 kDa laufendes Protein, das als Δ p53 bezeichnet wird. Der an eine zentrale Region von p53 bindende Antikörper DO12 erkennt nur p53, aber nicht Δ p53.

Der Mechanismus des alternativen Spleißens bietet die Möglichkeit, die Generierung eines Proteins mit den bisher beschriebenen Eigenschaften von Δ p53 zu erklären. Zur Überprüfung, ob es sich bei Δ p53 in der Tat um eine durch alternatives Spleißen generierte p53-Variante handelt, wurde untersucht, ob sich auf mRNA-Ebene p53-Transkripte unterschiedlicher Länge nachweisen lassen.

Über eine reverse Transkriptase-Reaktion wurde mRNA, gewonnen aus verschiedenem humanen wtp53 primären Zellen (Plazenta, Knochenmark), humanen Zelllinien (wtp53 HSC93, mutp53 A431, mutp53 SW480, p53-null H1299) und der primären Rhesus Affen Nierenzelle (wtp53 PRK) sowie einer Affen-Zelllinie (wtp53 CV-1), in cDNA umgeschrieben und in zwei sukzessiven PCR-Reaktionen mit jeweils p53-spezifischen „primern“ eingesetzt. In der ersten PCR wurde ein Fragment der p53 cDNA amplifiziert, das den Bereich zwischen Exon 4 und Exon 11 des Tumorsuppressors repräsentiert. Das Produkt dieser PCR wurde dann als „template“ in eine zweite, so genannte „nested“ PCR eingesetzt, wobei „primer“ verwendet wurden, die ein kürzeres Fragment, korrespondierend zu einem Abschnitt zwischen dem Übergang von Exon 6 zu Exon 7 sowie Exon 11, amplifizieren. Zur Analyse wurde das Produkt dieser zweiten PCR in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidium Bromid-Färbung visualisiert.

Wie **Abb. 5-7A** zeigt, können in allen Proben bis auf p53-null H1299 zwei PCR-Produkte verschiedener Länge nachgewiesen werden. Während das Hauptprodukt mit einer Laufhöhe von ca. 500 Basenpaaren die für „Volllänge“ p53 zu erwartende Größe (520 bp)

zeigt, ist das zweite detektierte PCR-Produkt um ca. 200 Basen kleiner. Wie die Sequenzierung des aus HSC93 amplifizierten PCR-Hauptprodukts ergab, repräsentiert das größere Fragment in der Tat „Volllänge“ p53 (Daten nicht gezeigt). Bei Sequenz-Analyse des zweiten kleineren 325 bp großen PCR-Produkts zeigte sich, dass die äußeren Bereiche des amplifizierten DNA Fragments der p53 Sequenz entsprechen. Allerdings fehlen diesem Transkript im Vergleich zum „Volllänge“ p53-Transkript 198 Nukleotide, die Teile von Exon 7 und 9 sowie das gesamte Exon 8 darstellen. Exon 7 und Exon 9 treffen somit in einem neu generierten Übergang direkt aufeinander. Exon 7 und Exon 9 treffen somit in einem neu generierten Übergang aufeinander (**Abb. 5-7B**). Dies zeigt, dass es sich bei dem detektierten

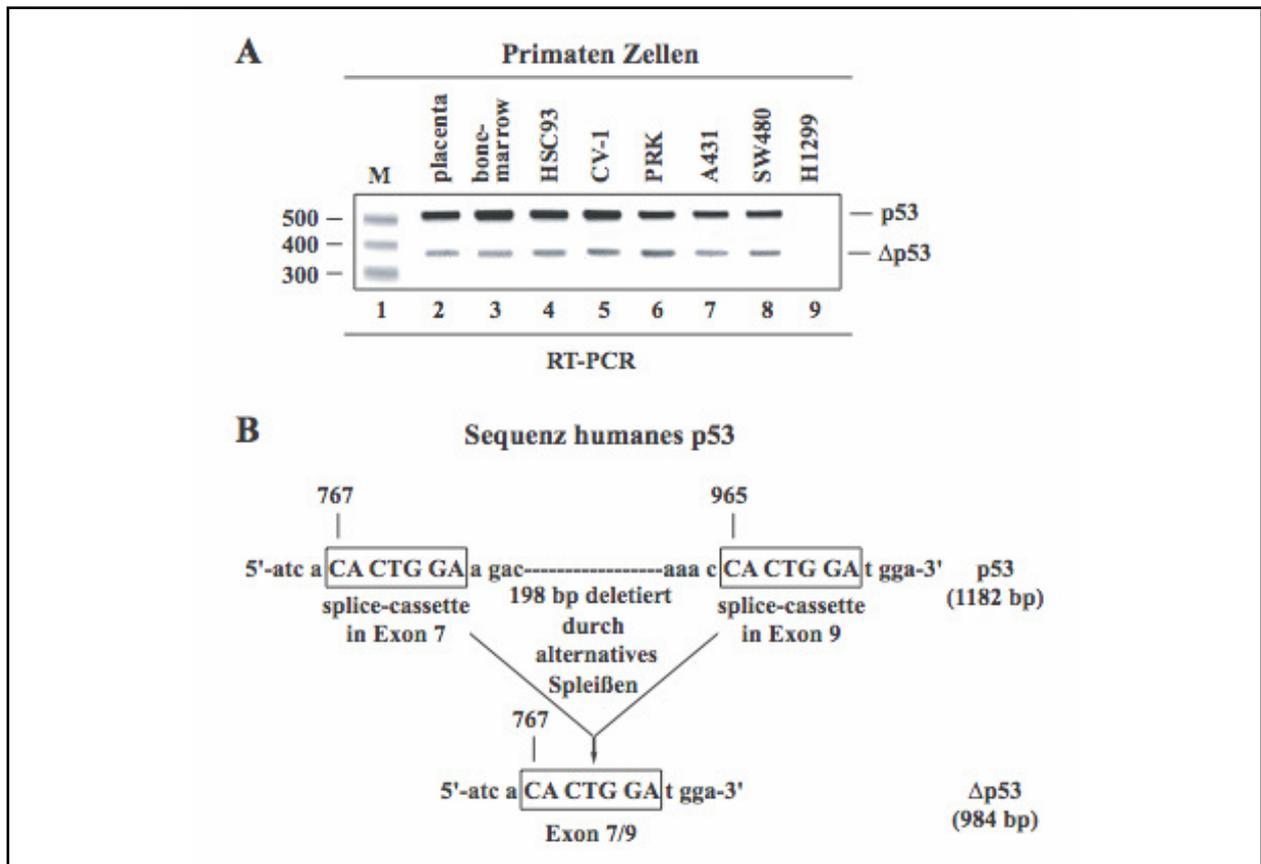


Abb. 5-7: Primaten Zellen exprimieren zwei unterschiedlich große p53 Transkripte. (A) RT-PCR Analyse von RNA isoliert aus humaner Plazenta (Spur 2), Knochenmark (Spur 3), einer humanen (Spur 4) und Affen Zelllinie (Spur 5), primären Rhesus Nierenzellen (Spur 6), mutp53 exprimierenden humanen Zelllinien (Spur 7 und 8) und einer humanen p53-null Zelllinie (Spur 9). Die amplifizierten PCR Produkte wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidium Bromid Färbung visualisiert. Zur Größenabschätzung der PCR Produkte wurde ein DNA Standard Marker (M) mitgeführt. In allen Proben, bis auf Spur 9 sind zwei PCR Produkte erkennbar, die dem Transkript von „Volllänge“ p53 (520 bp) und dem von Δp53 (325 bp) entsprechen. (B) Schema der Basenabfolge von humanem p53. Zwei identische Sequenz-Kassetten in Exon 7 und Exon 9 markieren den während des alternativen Spleißprozesses deletierten Bereich und werden bei der Generierung von Δp53 in eine Sequenz-Kassette zusammengeführt, die den neu generierten Exon-Exon Übergang kennzeichnet.

Transkript um eine Spleißvariante von p53 handelt, bei der ein Teil der kodierenden Sequenz fehlt. Die Sequenzierung des entsprechenden 325 bp großen PCR Produkts aus der Affen-Zelllinie CV-1 ergab dasselbe Resultat. Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass wtp53 und mutp53 Primatenzellen eine p53-Spleißvariante exprimieren, die sowohl in primären Primaten Zellen als auch in etablierten Primaten Zelllinien (Mensch und Affe) generiert wird.

Wie weitere Analysen ergaben, wird der bei der Generierung von Δ p53 durch das alternative Spleißen entfernte Sequenzabschnitt markiert durch zwei je identische Sequenz-Kassetten mit der Basenabfolge CACTGGA, die in Exon 7 (Nukleotid 767) und Exon 9 (Nukleotid 965) lokalisiert sind (**Abb. 5-7B**). Im alternativ gespleißten Δ p53-Transkript werden diese zwei identischen Sequenz-Kassetten zu einer Kasette zusammengeführt, die den neu generierten Übergang zwischen Exon 7 und Exon 9 kennzeichnet (**Abb. 5-7B**). Dabei wird der Leserahmen jedoch nicht verschoben. Die Bedeutung der CACTGGA-Sequenz-Kassetten für die Generierung des Δ p53 Transkripts zeigt sich bei der Analyse der murinen p53-Sequenz, in der die Kasette in Exon 9 ein verändertes Nukleotid (G->T) aufweist (**Abb. 5-8C**). Die Veränderung eines einzelnen Nukleotids innerhalb dieser Sequenz-Kasette in Exon 9 führt dazu, dass der alternative Spleißvorgang nicht stattfindet und das Δ p53-Transkript in murinen Zellen nicht gebildet werden kann (**Abb. 5-8A**). Auch Ratten Zellen können Δ p53 auf Grund einer einzig veränderten Base in Exon 7 nicht generieren (**Abb. 5-8A**), demzufolge ist die Existenz der CACTGGA-Sequenz in Exon 7 und 9 eine Voraussetzung für den alternativen Spleißvorgang, der schließlich zur Expression von Δ p53 führt. Tatsächlich zeigt die Western Blot Analyse der wtp53 Maus Zelllinie NIH3T3 und der wtp53 Ratten Zelllinie Ref1, die auch für die RT-PCR verwendet wurden, nur eine einzelne Bande bei einer Laufhöhe von 53 kDa (**Abb. 5-8B**). Der Zusammenhang zwischen vollständiger Erhaltung der beiden Sequenz-Kassetten und der Bildung des Δ p53-Transkripts konnte auch durch RT-PCR Analyse spezifischer humaner Mamacarcinome bestätigt werden, in denen eine der zwei Kassetten durch Mutation modifiziert ist und das Δ p53-Transkript nicht nachweisbar ist (Baumbusch et al., 2006).

Diese Befunde zeigen, dass in humanen und Affen Zellen, nicht jedoch in Nager Zellen, ein p53-Transkript exprimiert wird, das als translatiertes Produkt in wtp53 und mutp53 Zellen detektierbar ist, aber dessen Menge vom p53 Status abhängt und in wtp53 Zellen nach genotoxischem Stress wie p53 stabilisiert oder hoch reguliert wird. Die Betrachtung der

Sequenz von $\Delta p53$ erklärt auch, warum das Protein von dem anti-p53 Antikörper DO12 nicht erkannt wird. Das DO12-reaktive Epitop befindet sich innerhalb der Spleißregion, das bei der Generierung von $\Delta p53$ entfernt wird. Demnach erkennt der monoklonale anti-p53 Antikörper DO12 nur „Volllänge“ p53 aber nicht $\Delta p53$.

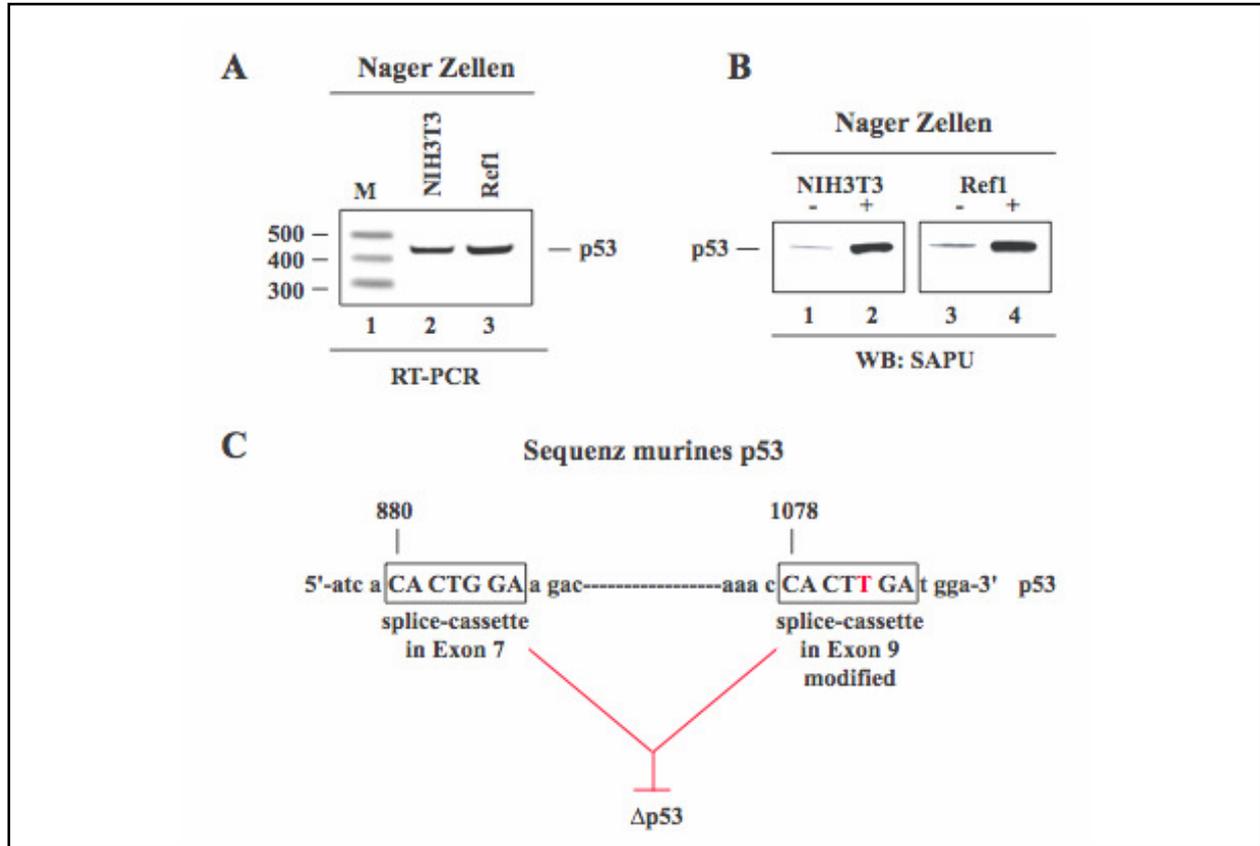


Abb. 5-8: Nager Zellen exprimieren kein $\Delta p53$ auf RNA- und Proteinebene. (A) RT-PCR Analyse von RNA isoliert aus wtp53 Maus- (Spur 2) und Rattenzellen (Spur 3). Die amplifizierte PCR Produkte wurden in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidium Bromid Färbung visualisiert. Zur Größenabschätzung der PCR Produkte wurde ein DNA Standard Marker (M) mitgeführt. In den Proben ist nur ein PCR Produkt erkennbar, das dem 428 bp Transkripts von p53 entspricht. (B) Western Blot von Nager Zelllinien. Zellen der angegebenen Linien wurden γ -bestrahlt bzw. unbestrahlt belassen und für die Western Blot Analyse aufbereitet. Zum Nachweis von p53 wurde der polyklonale anti-p53 Antikörper SAPU eingesetzt. In Nager Zellen wird nur p53 exprimiert. (C) Schema der Basenabfolge von murinem p53. Die Sequenz-Kassette in Exon 9 hat in Mauszellen eine andere Basenabfolge (Position der Base in Rot dargestellt). Dies führt dazu, dass das alternative p53-Spleißprodukt $\Delta p53$ in Mauszellen nicht generiert werden kann.

Die Daten, die aus der RT-PCR Analyse und aus den mit unterschiedlichen Epitop-spezifischen anti-p53 monoklonalen Antikörper durchgeführten Western Blots erhalten wurden, sprechen dafür, dass das 984 bp $\Delta p53$ Transkript und das $\Delta p53$ Protein identisch sind. Um sicher zu gehen, dass dies tatsächlich der Fall ist, wurde endogenes $\Delta p53$ aus humanen wtp53 HSC93 Zellen in großen Mengen immunpräzipitiert (Abb. 5-9A) und einer

massenspektrometrischen Proteinsequenzierung (MALDI-TOF/MS) unterzogen. Die Identifizierung der tryptischen Fragmente erfolgte durch Identifizierung der entsprechenden Peptidmassen mit dem „database-matching“ Verfahren. Das Peptid, das die Aminosäurereste

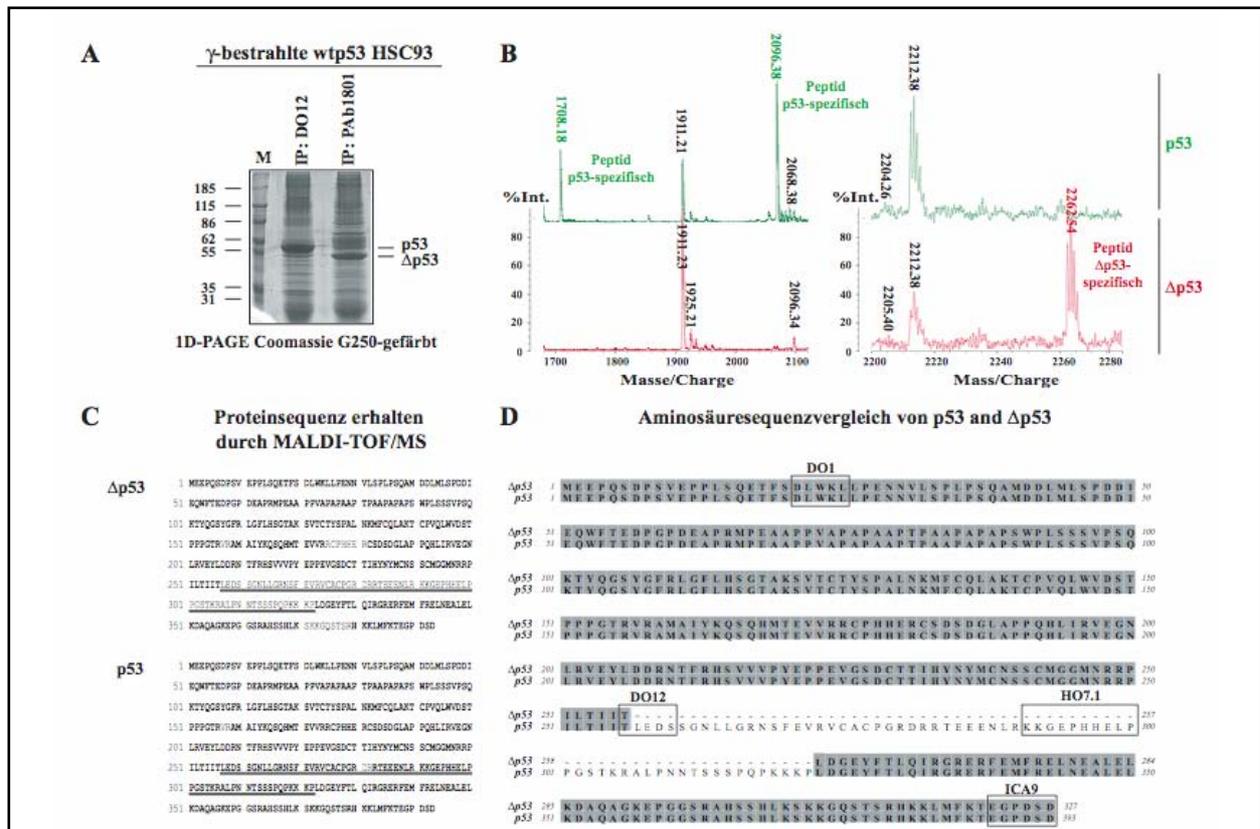


Abb. 5-9: Identifizierung der Aminosäuresequenz von humanen Δ p53, isoliert aus wtp53 HSC93 Zellen. (A) Endogenes p53 und Δ p53 wurden aus dem nuklearen Extrakt γ -bestrahlter humaner wtp53 HSC93 immunpräzipitiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt anschließend durch Färben des Gels mit Coomassie G250 visualisiert. Zur Größenabschätzung der Proteine wurde ein Protein-Standard (M) mitgeführt. Für die Immunpräzipitation von wtp53 sowie für die p53 Depletion des nuklearen Extrakts wurde der anti-p53 Antikörper DO12, der nur „Volllänge“ p53 erkennt, verwendet. Aus dem p53 depletierten Extrakt wurde mit dem N-terminalen spezifischen anti-p53 Antikörper PAb1801 Δ p53 immunpräzipitiert. Die beiden Hauptproteinbanden (p53 und Δ p53) wurden aus dem Proteingel ausgeschnitten und mit der MALDI-TOF/MS analysiert. (B) Ergebnis der MALDI-TOF/MS Analyse der tryptischen p53 und Δ p53 Fragmente. Das Peptid mit der Masseneinheit 1708,18 entspricht der Aminosäuresequenz 320-333, während das Peptid mit der Masseneinheit 2068,38 der Aminosäuresequenz 240-267 zugeordnet werden kann. Beide Peptide befinden sich in der Spleißregion und können deshalb in Δ p53 nicht detektiert werden. Das Peptid mit der Masseneinheit 2262,54 entspricht den Aminosäuresequenzen 249-256 und 322-335 und enthält somit den Übergang von Exon 7 nach Exon 9 (RPILTITLDGEYFTLQIR) de nur in Δ p53 vorhanden ist. Das Peptid mit der Masseneinheit 2212,38 entspricht der Aminosäuresequenz 343-363 und ist sowohl in Δ p53 als auch in p53 vorhanden. (C) Zusammenstellung der aus der MALDI-TOF/MS Analyse erhaltenen Aminosäuresequenz von Δ p53 und p53, wobei die identifizierten Aminosäurereste fett gedruckt sind und die in Δ p53 fehlende Aminosäuresequenz 257-322 unterstrichen ist. (D) Aminosäuresequenzvergleich, durchgeführt mit dem Programm Clustalw, von Δ p53 und p53 sowie Kennzeichnung der Epitope, die von den anti-p53 monoklonalen Antikörpern DOI1, DOI2 sowie ICA9 erkannt werden.

von 257-322 enthält und der durch alternatives Spleißen entfernten Region entspricht, ist nur in p53 aber nicht in Δ p53 detektierbar (**Abb. 5-9B**). Ein Vergleich der aus MALDI-TOF erhaltenen tryptischen Kartierung von p53 und Δ p53 mit der bekannten Aminosäuresequenz von humanem p53 zeigt, dass durch die tryptische Fragmentierung von p53 und Δ p53 insgesamt 98 % der Aminosäuresequenz von p53 und 88 % der von Δ p53 mit diesem Verfahren identifiziert werden konnten (**Abb. 5-9C**). Ein Vergleich der Δ p53 Aminosäuresequenzen mit der von p53 zeigt zum einen die Position der fehlenden 66 Aminosäuren, die exakt der durch alternatives Spleißen entfernten Region entsprechen, und zum anderen die Lokalisation der anti-p53 Antikörper Epitope, die in Δ p53 erhalten bzw. deletiert sind (**Abb. 5-9D**).

5.4 Δ p53 bildet Homo- aber keine Hetero-Oligomere und verfügt über differenzielle transkriptionelle Aktivität

Die 66 Aminosäure lange Region, die durch das alternative Spleißen zwischen Exon 7 und Exon 9 entfernt wird, enthält die Information für die gesamte „hinge“-Region sowie die „box V“ Region, die ein Teil der DNA Bindungsdomäne ist. Der Leserahmen wird durch den Spleißvorgang nicht verändert, wodurch die im C-Terminus lokalisierte Tetramerisierungsdomäne erhalten und funktionsfähig bleibt (**Abb. 5-10**). Auf Grund dessen ist es nahe liegend, dass Δ p53 wie auch „Volllänge“ p53 oligomerisieren und somit transkriptionell aktiv sein könnte.

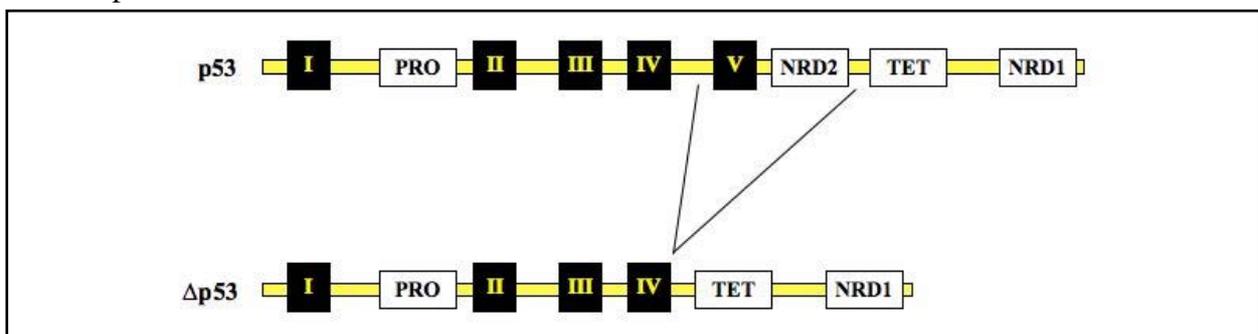


Abb. 5-10: Übersichtsstruktur und Konservierte Domänen von p53 und Δ p53. Internes Exon-Exon Spleißen entfernt die „box V“ Domäne der zentralen Region sowie die „hinge“-Region aber nicht die Tetramerisierungsdomäne.

Zunächst wurde mit rekombinanten Δ p53 und p53 Proteinen, die mit bzw. ohne einem GST-„tag“ in Baculovirus-infizierten Insektenzellen exprimiert wurden, überprüft, inwieweit Δ p53 mit sich selbst und/oder mit p53 oligomerisieren kann. Gereinigtes Δ p53 wurde (**Abb. 5-11A**) mit dem Vernetzungsreagens Diamid inkubiert und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Wie **Abb. 5-11B** zeigt bildet Δ p53, wie auch das im Kontrollexperiment

verwendete p53, sowohl Dimere als auch Tetramere. Der GST-„pull-down“ Test, der mit den gereinigten rekombinant erzeugten p53 Proteinen durchgeführt wurde zeigt, dass Δ p53 nur mit sich selber aber nicht mit p53 komplexieren kann (Abb. 5-11C). Zusätzlich wurde diese Eigenschaft von Δ p53 *in vivo* überprüft und zwar mit der Immunpräzipitation-Western Blot Analyse unter Verwendung des anti-p53 monoklonalen Antikörpers DO12, dessen Epitop sich in der Spleißregion befindet und deshalb nur „Volllänge“ p53 erkennen kann. Die Analyse der DO12-Präzipitate, die aus Lysaten von wtp53 PRK, wtp53 CV-1, mutp53 SW480 und mutp53 LLC-MK2 Zellen stammen, zeigt deutlich, dass Δ p53 nicht mit endogenem wtp53 oder mutp53 interagiert (Abb. 5-11D).

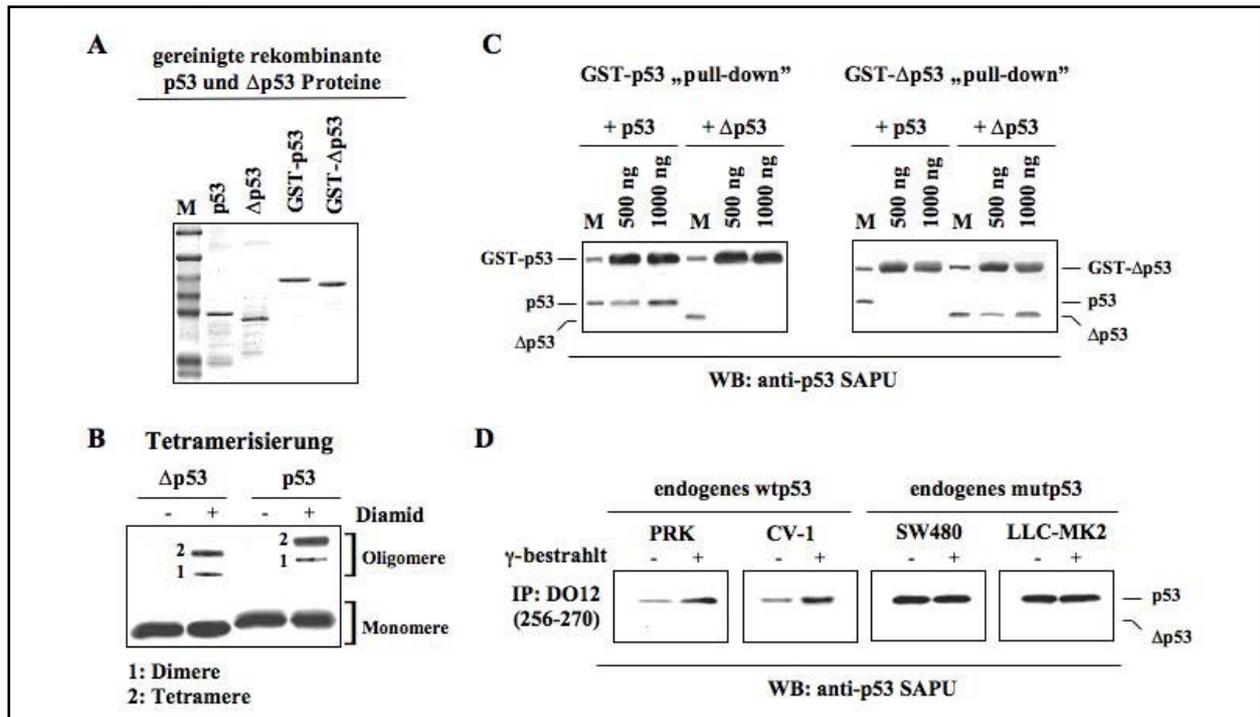


Abb. 5-11: Δ p53 bildet Homo- aber keine Hetero-Oligomere *in vitro* und *in vivo*. (A) Analyse gereinigter Baculovirus exprimierter rekombinanter humaner wtp53 und wt Δ p53 Proteine, die ohne oder mit einem GST-„tag“ exprimiert wurden. Die Proteine wurden in einem 10 % SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung visualisiert. Zur Größenabschätzung der Proteine wurde ein Protein-Standard (M) mitgeführt. (B) Analyse der Tetramerisierungsfähigkeit von Δ p53. Gereinigtes, rekombinantes Δ p53 sowie p53 (Kontrollversuch) wurde mit dem vernetzenden Reagens Diamid inkubiert und in einem 10 % SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis der p53 Proteine erfolgte im Western Blot mit dem polyklonalen anti-p53 Antikörper SAPU. (C) Analyse der Interaktionsfähigkeit von Δ p53 im GST-„pull-down“ Test. Gereinigtes GST-p53 und - Δ p53 wurden mit aufsteigenden Mengen an rekombinanten wtp53 und wt Δ p53 inkubiert. Die Proteinbindung wurde im Western Blot mit dem polyklonalen anti-p53 Antikörper SAPU überprüft. (D) *In vivo* Komplexierung von Δ p53 mit p53 wurde in den angegebenen Zellen durch Immunpräzipitation mit dem p53-spezifischen Antikörper DO12 und anschließender Western Blot Analyse mit dem anti-p53 Antikörper SAPU überprüft.

Insgesamt zeigen die Oligomerisierungsstudien, die sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durchgeführt wurden, dass $\Delta p53$ nicht mit p53 komplexiert sondern Homo-Dimere und -Tetramere bildet. Dieser Befund weist darauf hin, dass $\Delta p53$ transkriptionell aktiv sein könnte und vor allem eine Funktion unabhängig von p53 ausüben könnte. Unterstützt wird diese Annahme durch die Ergebnisse der Chromatin-Immunpräzipitationsexperimente die mit Primaten Zellen, die sich in ihrem p53 Status unterscheiden, erhalten wurden (Abb. 5-5). Die ChIP-PCR Analyse zeigt, dass in „type II“ mutp53 Zellen, bei denen p53 an Codon 273 mutiert ist, γ -Bestrahlung zur Bindung von p53 an die p21- und 14-3-3 σ -Promotoren führt. Auffallend ist, dass die Assoziation von immunpräzipitierten p53 mit diesen Promotoren nur mit den anti-p53 Antikörpern DO1 und ICA9 detektierbar ist und nicht mit DO12, dessen Epitop in $\Delta p53$ deletiert ist. Zusätzlich fällt auf, dass in „type II“ mutp53 Zellen die Mutation an Codon 273 in der Region lokalisiert ist, die bei der Generierung von $\Delta p53$ durch das alternative Spleißen entfernt wird (Abb. 5-12).

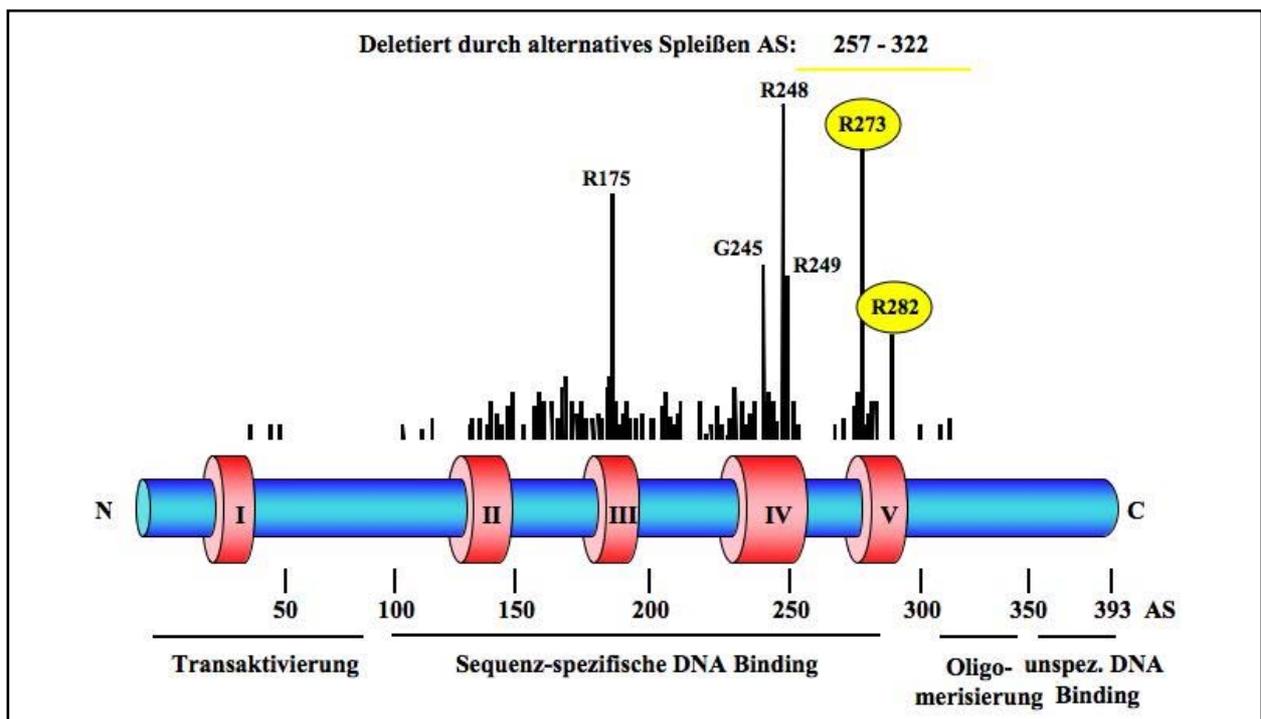


Abb. 5-12: Lokalisation der „hot spot“ Mutationen in p53. Gezeigt sind die Positionen der häufigsten Punktmutationen, die sich außerhalb (in schwarz) sowie innerhalb der Spleißregion (in gelb) befinden. In „type I“ mutp53 Zellen befindet sich die Mutation außerhalb der Spleißregion, während in „type II“ mutp53 Zellen sich die Mutation innerhalb der Spleißregion befindet.

Demzufolge exprimieren „type II“ mutp53 Zellen mutiertes „Volllänge“ p53 und mutationsfreies $\Delta p53$. Im Gegensatz dazu exprimieren „type I“ mutp53 Zellen, bei denen sich die Mutation im p53 Gen außerhalb der Spleißregion befindet, sowohl mutp53 als auch

mut Δ p53 (**Abb. 5-13**). Nachdem Δ p53 nur Homo- aber keine Hetero-Oligomere bildet, wird ihre Funktion durch mutp53 nicht beeinträchtigt. Bei Betrachtung dieser Gegebenheiten lassen sich jetzt auch die unterschiedlich erzielten Ergebnisse γ -bestrahlter „type I“ und „type II“ mutp53 Zellen erklären (s. **Abb. 5-5**): In „type II“ mutp53 Zellen ist nicht wie ursprünglich vermutet die „Restaktivität“ von mutp53 sondern wt Δ p53 für die Transaktivierung von *p21* und *14-3-3 σ* verantwortlich.

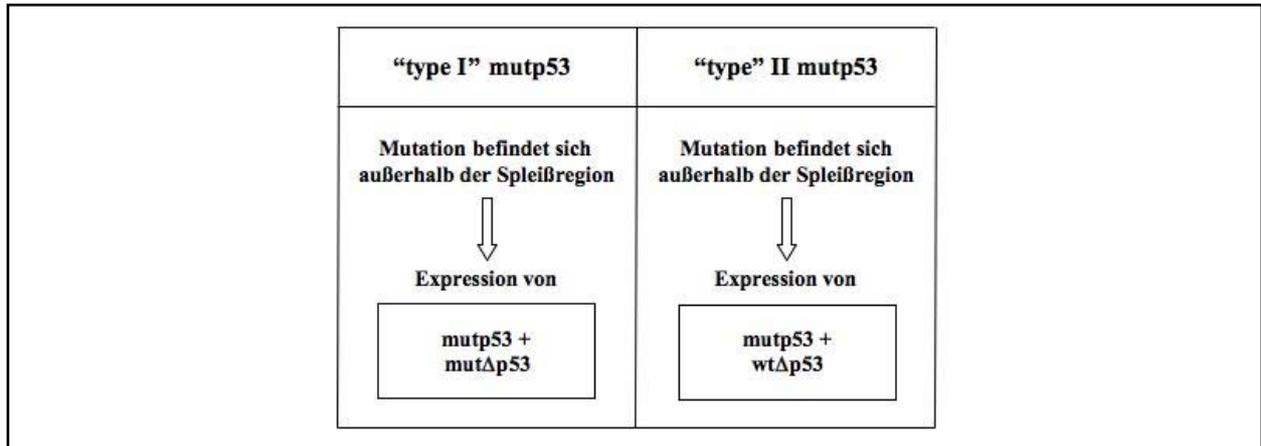


Abb. 5-13: Unterschied in der Expression von p53 und Δ p53 zwischen „type I“ und „type II“ mutp53 Zellen. In „type II“ mutp53 Zellen wird bei der Generierung von Δ p53 die Mutation durch den alternativen Spleißvorgang entfernt und es entsteht wt Δ p53, während in „type I“ mutp53 Zellen die Mutation, da sie sich außerhalb der Spleißregion befindet, erhalten bleibt und es entsteht mut Δ p53.

Der Befund, dass in γ -bestrahlten „type II“ mutp53 Zellen wt Δ p53 nicht nur transkriptionell aktiv ist sondern darüber hinaus auch *p53*-regulierte Gene selektiv transaktiviert, wurde genauer untersucht. Für diese Untersuchungen wurde mit der humanen *p53*-null Zelllinie H1299 ein induzierbares Zellsystem etabliert, das nach Zugabe des Tetracyclin-Analogons Doxycyclin (Dox) die konditionale Expression von wtp53, mutp53-273H, wt Δ p53, mut Δ p53-175D erlaubt (**Abb. 5-14A**). In diesem Zellsystem wurde zunächst getestet inwieweit die endogenen *p21*-, *14-3-3 σ* -, *mdm2*-, *bax*- und *PIG3*-Promotoren in Abhängigkeit des Dox-induzierten p53 Proteins nach γ -Bestrahlung mit 10 Gy transaktiviert werden können. Wie erwartet, kommt es in den induzierten TO-H1299-wtp53 Zellen zur Hochregulation von allen getesteten *p53*-regulierter Genprodukte, während in induzierten TO-H1299-mutp53 sowie TO-H1299-null Zellen diese Genprodukte in der Western Blot Analyse nicht detektierbar sind (**Abb. 5-14A**, Spuren 2, 6 und 10). Auch die Expression von mut Δ p53 führte nicht zur Hochregulation von endogenem *p21*, *14-3-3 σ* , *mdm2*, *bax* oder *pig3* (Spur 8). Im Gegensatz dazu bestätigte die Induktion von wt Δ p53 die mit γ -bestrahlten „type II“ mutp53 Zellen erhaltenen Resultate (s. **Abb. 5-4**) und unterstreicht somit die differenzielle

Transaktivierungseigenschaft von $\Delta p53$, die zur Hochregulation von *p21*, *14-3-3 σ* aber nicht *mdm2*, *bax* und *pig3* führt (**Abb. 5-14A**, Spur 4).

Des Weiteren wurde mit dem induzierbaren TO-H1299 isogenen Zellsystem Promoterbindungsstudien für einen zusätzlichen Beweis der selektiven Promoterbindungsfähigkeit von $\Delta p53$ durchgeführt. Nach γ -Bestrahlung mit 10 Gy wurden die Dox-induzierten TO-H1299-wtp53, -wt $\Delta p53$, -mutp53, -mut $\Delta p53$ und -null Zellen für die Vernetzung des Chromatins mit den daran gebundenen Proteinen mit Formaldehyd behandelt. Die Immunpräzipitation von Chromatin-gebundenem p53 und $\Delta p53$ erfolgte mit den monoklonalen anti-p53 Antikörpern DO1, DO12, ICA9 und für die negativ Kontrolle wurde der T-Ag spezifische Antikörper PAb101 verwendet. Auch bei diesem Experiment zeigt die Western Blot Analyse, dass der Antikörper DO12 nur „Volllänge“ p53 aber nicht $\Delta p53$ erkennen kann, während DO1 und ICA9 beide p53 Proteine immunpräzipitiert (**Abb. 5-14B**). Die Assoziation von p53 bzw. $\Delta p53$ koimmunpräzipitierter Promoter-DNA wurde durch PCR-Amplifikation unter Verwendung von Promoter-spezifischen „primern“ analysiert. Wie aus der ChIP-PCR Analyse hervorgeht, interagiert DO1-, DO12- und ICA9-immunpräzipitiertes wtp53 sowohl mit *p21*, *14-3-3 σ* als auch mit *mdm2*, *bax* und *PIG3*, während mutp53 mit keinem dieser Promotoren interagiert (**Abb. 5-14C**, 1. und 3. Spalte). Die Analyse der $\Delta p53$ assoziierten Promotoren bestätigte sowohl die selektive Promoterbindung von wt $\Delta p53$ als auch die Transaktivierungsinaktivität von mut $\Delta p53$ (**Abb. 5-14C**, 2. und 4. Spalte). Eine RT-PCR Analyse für den Nachweis dass die Promoterbindung tatsächlich zur Transaktivierung der entsprechenden Gene führt, bestätigte, dass die Induktion der *p21*-, *14-3-3 σ* -, *mdm2*-, *bax*- und *PIG3*-mRNA ausschließlich in TO-H1299-wtp53 Zellen zu sehen ist, während in TO-H1299-wt $\Delta p53$ nur der mRNA Gehalt von *p21* und *14-3-3 σ* ansteigt (**Abb. 5-14D**).

Insgesamt zeigen die durchgeführten Experimente, dass in Primaten Zellen eine alternative Spleißform von p53, die als $\Delta p53$ bezeichnet wird, generiert wird, die im Gegensatz zu p53 über eine intrinsische differenzielle Transaktivierungsaktivität verfügt. Im Gegensatz zu p53, das sowohl anti-apoptotische Gene als auch pro-apoptotische Gene anschaltet, transaktiviert $\Delta p53$ ausschließlich die anti-apoptotischen Gene. Nachdem $\Delta p53$ nur Homo- aber keine Hetero-Oligomere bildet, wird ihre Funktion durch mutanten p53 nicht beeinträchtigt. In der Tat konnte gezeigt werden, dass in „type II“ mutp53 Zellen, bei denen p53 in dem Bereich

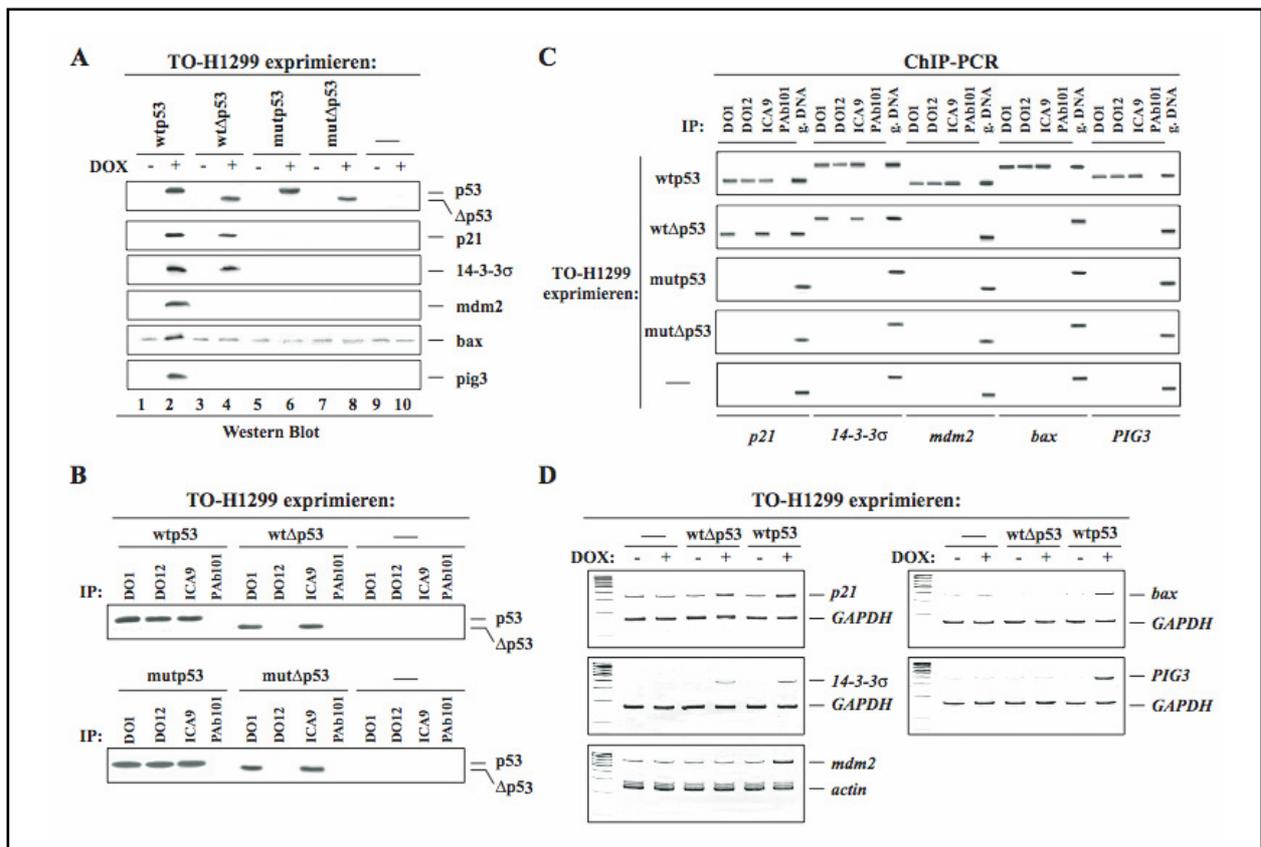


Abb. 5-14: $\Delta p53$ transaktiviert endogene p53-regulierte Promotoren selektiv. (A) Dox-induzierbare $p53$ -null TO-H1299 Zellen, wurden nach Zugabe von Dox auf die ektopische Expression von $wtp53$, $wt\Delta p53$, $mutp53$, $mut\Delta p53$ oder leeren Vektor im Western Blot getestet. Die Detektion von $p53$ und $\Delta p53$ erfolgte mit dem anti- $p53$ Antikörper DO1 (erste Spalte). Die Dox-induzierten TO-H1299 Zellen wurden 2 h nach γ -Bestrahlung mit 10 Gy geerntet und die Expression von $p21$, $14-3-3\sigma$, $mdm2$, bax und $pig3$ in einer Western Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern untersucht. (B) Dox-induzierte $p53$ -null TO-H1299 Zellen wie unter (A) beschrieben wurden 2 h nach γ -Bestrahlung mit 10 Gy mit Formaldehyd behandelt und die vernetzten $\Delta p53/p53$ -DNA Komplexe mit den anti- $p53$ monoklonalen Antikörpern DO1, DO12, ICA9 sowie für die negativ Kontrolle mit dem anti-T-Ag Antikörper PAb101 immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden im Western Blot mit dem polyklonalen anti- $p53$ Antikörper SAPU analysiert. (C) Die $p53$ bzw. $\Delta p53$ assoziierten Promotoren $p21$, $14-3-3\sigma$, $mdm2$, bax und $PIG3$ wurden mit spezifischen „primern“ durch PCR amplifiziert und im Agarosegel durch Ethidium Bromid-Färbung visualisiert. Genomische DNA wurde als Größenmarker eingesetzt. (D) Gesamt-RNA wurde aus den Dox-induzierten $p53$ -null TO-H1299 Zellen 2 h nach γ -Bestrahlung mit 10 Gy isoliert und die Expression der endogenen mRNA von $p21$, $14-3-3\sigma$, $mdm2$, bax und $PIG3$ durch semiquantitative RT-PCR evaluiert. Als interner Standard für die semiquantitative Analyse wurde $GAPDH$ oder $actin$ bei jeder RT-PCR mitgeführt.

mutiert ist, der durch das alternative Spleißen entfernt wird und folglich $mutp53$ und $wt\Delta p53$ exprimieren, die differenzielle Transaktivierungseigenschaft von $wt\Delta p53$ durch genotoxischen Stress aktiviert wird. Im Gegensatz dazu ist in „type I“ $mutp53$ Zellen, bei denen die Mutation außerhalb der Spleißregion liegt und folglich beide $p53$ -Formen mutiert sind, $\Delta p53$ transkriptionell inaktiv.

5.5 Die differenzielle Transaktivierungsaktivität von $\Delta p53$ ist S-Phasen spezifisch

Der Tumorsuppressor p53 gilt als einer der Schlüsselfaktoren in der zellulären Reaktion auf DNA Schäden (Jin und Levine, 2001), insbesondere in seiner Funktion als Transaktivator spielt er eine entscheidende Rolle bei der Schadensantwort, die über das Überleben oder die Eliminierung der geschädigten Zelle entscheidet (Vousden und Lu, 2002; Oren, 2003). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass in geschädigten S-Phase Zellen p53 auf transkriptioneller Ebene nicht aktiviert wird um die Induktion verfrühter apoptotischer Ereignisse während der DNA Replikation, die ebenfalls DNA Strangbrüche generiert, zu vermeiden (Gottifredi et al., 2001). Nachdem $\Delta p53$ nur p53-regulierte Gene aktiviert, die für anti-apoptotische Faktoren kodieren, stellte sich die Frage, inwieweit die differenzielle Transaktivierungsaktivität der neuen p53-Spleißvariante eine Funktion in der replikativen S-Phase haben könnte. Auf Grund dessen wurde zunächst untersucht, in welcher Phase des Zellzyklus $\Delta p53$ transkriptionell aktiviert wird und welche Rolle dieser Transaktivator bei der strahleninduzierten Schadensantwort spielt. Das induzierbare TO-H1299 Zellsystem kam für diese Untersuchungen nicht in Frage, da sich diese Zellen mit der schonenden Methode des Isoleucinentzugs nicht synchronisieren lassen. Deshalb wurden für diese Untersuchungen wtp53 CV-1 Zellen verwendet, die den Vorteil haben, dass sie sich mittels Isoleucinentzug in G0/G1 arretieren lassen und nach Zugabe von Isoleucin-haltigem Medium synchron in den mitotischen Zellzyklus eintreten. Auf diese Art und Weise synchronisierte wtp53 CV-1 Zellen wurden in der G1-, frühen S- und G2-Phase bestrahlt und die p53 Proteine im Western Blot analysiert. Als zentrale Kennzeichen einer Aktivierung von p53 gelten die Stabilisierung auf Proteinebene sowie die Phosphorylierung durch die PIK Kinasen ATM/ATR an Serin-15 (Jin und Levine, 2001). Wie **Abb. 5-15A** zeigt, werden sowohl p53 als auch $\Delta p53$ in allen Phasen des Zellzyklus stabilisiert und an Serin-15 phosphoryliert. Die Aktivierung von beiden p53 Proteinen führt auch zur Hochregulation von p21 auf der Protein- (**Abb. 5-15A**, 3. Spur) und mRNA-Ebene (**Abb. 5-15B**), jedoch gibt dieses Experiment keine Auskunft darüber, welches p53 Protein in welcher Zellzyklusphase verantwortlich für die Transaktivierung von *p21* ist. Für die Untersuchung dieser Fragestellung wurden synchronisierte wtp53 CV-1 Zellen in der G1-, frühen S- und G2-Phase bestrahlt und einer ChIP-PCR Analyse unterzogen. Die Chromatin-Immunpräzipitation wurde mit den monoklonalen anti-p53 Antikörpern DO1, DO12 und ICA9 durchgeführt, die spezifisch unterschiedliche Epitope ihres Antigens erkennen. Die Antikörper DO1 und ICA9 erkennen beide p53-Formen, während DO12, dessen Epitop in $\Delta p53$ auf Grund des alternativen Spleißens fehlt, nur mit p53 interagiert. **Abb. 5-15C** zeigt die Interaktion von p53 und $\Delta p53$ mit dem *p21*-Promoter in wtp53 CV-1

Zellen, die zu definierten Phasen im Zellzyklus mit 2 Gy bestrahlt wurden. Wie aus den Ergebnissen hervorgeht bindet zwei Stunden nach Bestrahlung DO12-Immunpräzipitiertes p53 ausschließlich in G1 und G2 an den *p21*-Promoter, während mit den DO1- sowie ICA9-Chromatin-Immunpräzipitaten der *p21*-Promoter in allen Zellzyklusphasen detektierbar ist. Dieselben Resultate wurden mit wtp53 CV-1 und wtp53 HSC93 Zellen erzielt, die in G1, früh-S und G2 mit 10 Gy oder 10 J/m² bestrahlt wurden (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund deutet darauf hin, dass in geschädigten S-Phase Zellen Δ p53 verantwortlich für die Transaktivierung von p21 ist, jedoch geht aus diesem experimentellen Ansatz nicht hervor, ob Δ p53 auch in G1 und G2 transkriptionell aktiv ist. Auf Grund dessen wurden adhären wachsende Zellen, die sich in ihrem p53 Status unterscheiden, mit der Isoleucinmethode synchronisiert und in G1, früh-S sowie G2 mit 2 Gy bestrahlt. Insbesondere die Verwendung der „type II“ mutp53 Zelllinie A431, die funktionelles wt Δ p53 exprimiert, erlaubt es festzustellen, ob Δ p53 auch in G1 und G2 transkriptionell aktiv ist.

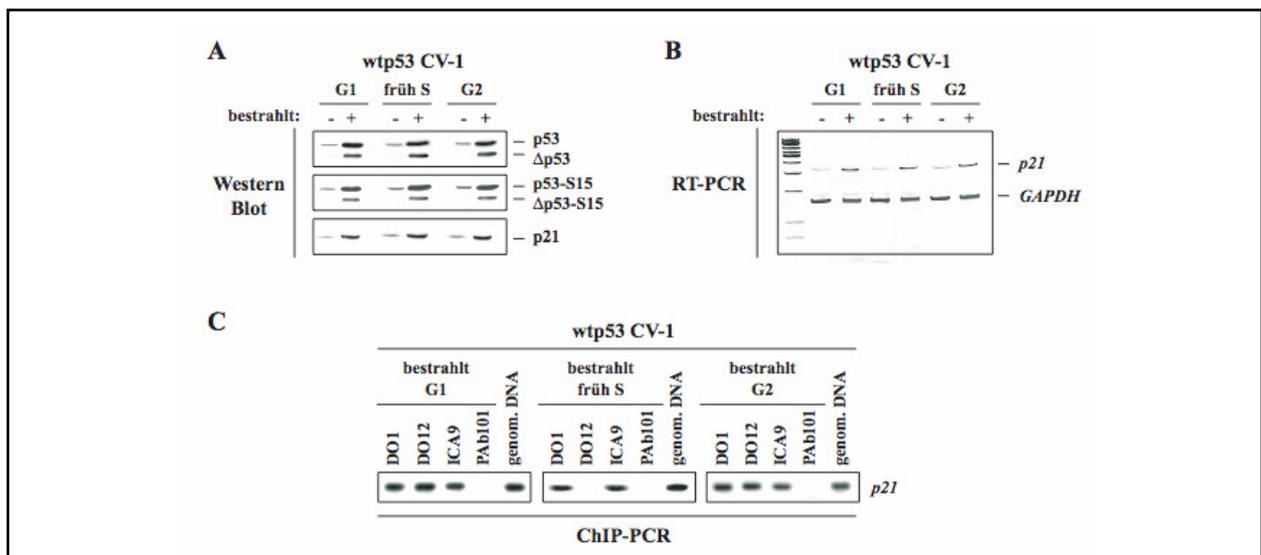


Abb. 5-15: Stabilisierung und Serin-15 Phosphorylierung von p53 und Δ p53 sind Zellzyklus-unabhängig, aber nur Δ p53 assoziiert mit dem *p21*-Promoter in der S-Phase. Synchronisierte wtp53 CV-1 Zellen wurden zu den angegebenen Zellzyklusphasen mit 2 Gy bestrahlt und 2 h nach Bestrahlung für die folgenden Untersuchungen verwendet. (A) Der Nachweis stabilisierter p53 Proteine und deren Serin-15 Phosphorylierung sowie die Expression von p21 erfolgte im Western Blot mit spezifischen Antikörpern. (B) Zellzyklus-abhängige Transaktivierung von endogenem *p21* wurde durch semiquantitative RT-PCR mit Gesamt-RNA durchgeführt. Die Gesamt-RNA wurde 2 h nach Bestrahlung isoliert. Als interner Standard für die semiquantitative Analyse wurde *GAPDH* bei jeder RT-PCR mitgeführt. (C) Wtp53 CV-1 Zellen wurden 2 h nach Bestrahlung mit Formaldehyd behandelt und einer ChIP-PCR Analyse unterzogen. Für die Chromatin-Immunpräzipitation wurden die anti-p53 Antikörper DO1, ICA9 sowie der für „Volllänge“ p53 spezifische Antikörper DO12 verwendet. Für die negative Kontrolle wurde der für T-Ag spezifische Antikörper PAb101 eingesetzt. Der p53 bzw. Δ p53 assoziierte *p21*-Promoter wurde mit spezifischen „primern“ durch PCR amplifiziert und im Agarosegel durch Ethidium Bromid-Färbung visualisiert. Genomische DNA wurde als Größenmarker eingesetzt.

Abb. 5-16 zeigt die Interaktion von $\Delta p53$ und p53 mit dem *p21*-Promoter in wtp53 CV-1, „type II“ mutp53 A431 und „type I“ mutp53 LLC-MK2 Zellen, die zu definierten Zeiten im Zellzyklus mit 2 Gy bestrahlt wurden. Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, bindet in wtp53 CV-1 Zellen p53 an den *p21*-Promoter in der G1- und G2-, aber nicht in der replikativen S-Phase (1. Spalte), während in „type I“ mutp53 LLC-MK2 Zellen mutp53 zu keiner Zeit mit diesem Promoter interagiert (3. Spalte). Die ChIP-PCR Analyse, durchgeführt mit den „type II“ mutp53 A431 Zellen zeigt deutlich, dass wt $\Delta p53$ in der replikativen Phase aber nicht in G1 und G2 den *p21*-Promoter aktiviert (2. Spalte). Experimente, die mit der „type II“ mutp53 Zelllinie SW480 durchgeführt wurden bestätigten diesen Befund (Daten nicht gezeigt). Demzufolge kann postuliert werden, dass die differenzielle Transaktivierungsaktivität von $\Delta p53$ S-Phasen spezifisch ist.

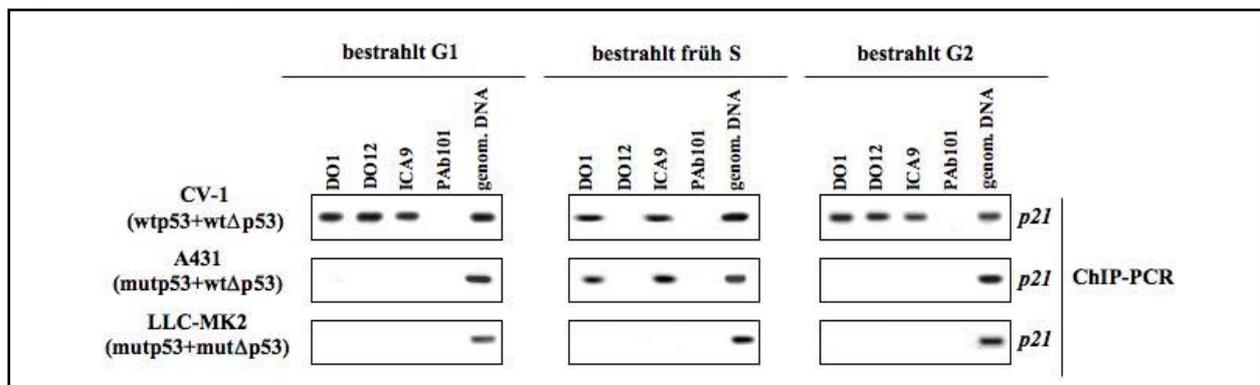


Abb. 5-16: Die differenzielle Transaktivierungsaktivität von $\Delta p53$ ist S-Phasen spezifisch. Synchronisierte wtp53 CV-1, „type II“ mutp53 A431 und „type I“ mutp53 LLC-MK2 Zellen wurden zu den angegebenen Zellzyklusphasen mit 2 Gy bestrahlt, 2 h nach Bestrahlung mit Formaldehyd behandelt und anschließend einer ChIP-PCR Analyse unterzogen. Für die Chromatin-Immunpräzipitation wurden die anti-p53 Antikörper DO1, ICA9 sowie der für „Volllänge“ p53 spezifische Antikörper DO12 verwendet. Für die negative Kontrolle wurde der für T-Ag spezifische Antikörper PAb101 eingesetzt. Der p53 bzw. $\Delta p53$ assoziierte *p21*-Promoter wurde mit spezifischen „primern“ durch PCR amplifiziert und im Agarosegel durch Ethidium Bromid-Färbung visualisiert. Genomische DNA wurde als Größenmarker eingesetzt.

Der erste Hinweis bezüglich einer möglichen Funktion der $\Delta p53$ -vermittelten Transaktivierung von *p21* in geschädigten S-Phase Zellen ergaben FACS-Analysen, die mit 10 Gy bestrahlten Zellen durchgeführt wurden. Exponentiell wachsende Lymphom-Zellen, die sich in ihrem p53 Status unterscheiden, wurden nach erfolgter Bestrahlung durchflusscytometrisch analysiert. Dabei viel auf, dass acht Stunden nach Bestrahlung sowohl die wtp53 HSC93 als auch die „type II“ mutp53 Karpas-299 Zellen zu diesem Zeitpunkt einen ungewöhnlich stark erhöhten S-Phasen Anteil aufweisen, während „type I“ mutp53 CA46 Zellen keine S-Phasen Akkumulation zeigen (**Abb. 5-17**). FACS-Analysen der 10 Gy

bestrahlten Lymphom-Zelllinie „type I“ mutp53 CEM, Epithel-Zelllinien „type I“ mutp53 LLC-MK2, „type II“ mutp53 A431, SW480 und wtp53 CV-1 zeigten, dass nur bestrahlte Zellen mit einem funktionellen wt Δ p53 in der S-Phase akkumulieren (Daten bis auf SW480 nicht gezeigt). Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass die strahleninduzierte S-Phasen Akkumulation nicht abhängig von der embryonalen Keimschicht ist, aus der sich die somatischen Zellen entwickelten sondern durch den *p53* Status determiniert wird.

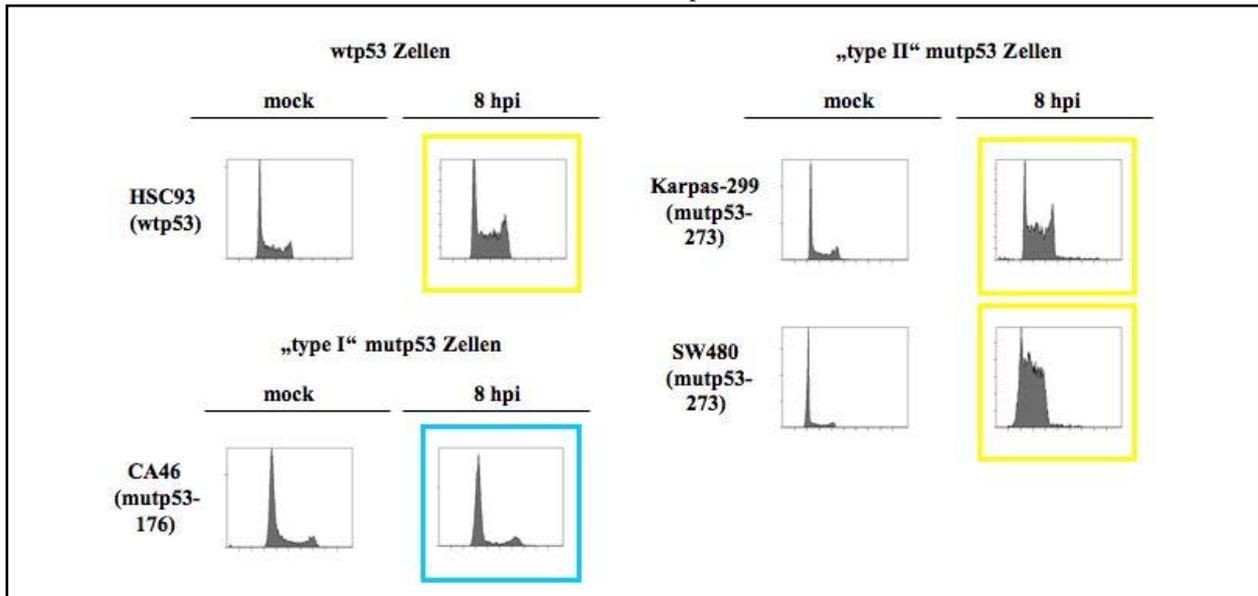


Abb. 5-17: γ -Bestrahlung mit 10 Gy führt zur S-Phasen Akkumulation in Abhängigkeit des *p53* Status der geschädigten Zelle. Exponentiell wachsende wtp53, „type I“ mutp53 und „type II“ mutp53 Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und 8 h später (hpi) mit Ethanol fixiert. Für die durchflusscytometrische Analyse wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und jeweils 10.000 Zellen erfasst. 10 Gy γ -Bestrahlung führt in wt Δ p53 exprimierenden Zellen zur S-Phasen Akkumulation.

5.6 Die Aktivierung des Δ p53-vermittelten intra-S-Phasen Kontrollpunkts ist abhängig von der Position der Zelle im Zellzyklus zum Zeitpunkt der Bestrahlung

Die Bestrahlung von exponentiell wachsenden Zellen mit 10 Gy führt in Abhängigkeit des *p53* Status zur Akkumulation der Zellen in der S-Phase (**Abb. 5-17**), und deutet auf eine strahleninduzierte Aktivierung des intra-S-Phasen Kontrollpunkts hin. Die Verwendung von asynchron wachsenden Zellpopulationen geben jedoch keinen Hinweis darauf, inwieweit die Aktivierung des schadeninduzierten intra-S-Phasen Kontrollpunkts abhängig von der Position der Zelle im Zellzyklus zum Zeitpunkt der Schädigung ist. Zur Klärung dieser Frage wurden exponentiell wachsende wtp53 HSC93 Zellen in die diskreten Phasen des Zellzyklus mittels Gegenstromzentrifugation (Elutriation) getrennt. Diese Trennungsmethode einer asynchron wachsenden Zellpopulation beruht auf den verschiedenen Sedimentationseigenschaften der G1-, S- und G2-Phase Zellen, die sich durch die unterschiedliche Größe und Dichte auf Grund

des zellzyklusabhängigen DNA Gehalts (2N-4N) ergeben. Für die Bestrahlungsexperimente zur Ermittlung inwieweit die Position der Zelle zum Zeitpunkt der Bestrahlung eine Rolle bei der Induktion des intra-S-Phasen Kontrollpunkts spielt, wurden die die Zellzyklusphasen G1 (Fraktion 1), G1/S (Fraktion 3), früh-S (Fraktion 4) und spät-S (Fraktion 6) verwendet. Um die Aktivierung von apoptotischen Ereignissen zu vermeiden, wurden die Zellen in den diskreten Zellzyklusphasen nur mit 2 Gy γ -bestrahlt und anschließend die Zellzyklusphasenverteilung vier und acht Stunden nach Bestrahlung durchflusscytometrisch bestimmt. Zur Ermittlung der ungestörten Progression durch den Zellzyklus wurden die entsprechenden unbestrahlten Fraktionen jeweils vier und acht Stunden nach Reaktivierung einer FACS-Analyse unterzogen und die erhaltenen Profile mit denen der entsprechenden bestrahlten Fraktionen verglichen (**Abb. 5-18**). Die Messung der Verteilung der Zellpopulation auf die verschiedenen Zellzyklusphasen zeigt, dass nur HSC93 Zellen, die am G1/S-Übergang und in der frühen S-Phase mit 2 Gy bestrahlt wurden, die S-Phasen Progression verlangsamen und auf Grund dessen auch später in die G2-Phase progressieren (**Abb. 5-18**, Fraktion 3 und 4). Darüber hinaus geht aus der FACS-Analyse hervor, dass unabhängig von der Position der Zelle im Zellzyklus zum Zeitpunkt der Bestrahlung, der G2-Kontrollpunkt immer ausgelöst wird, der deutlich am erhöhten G2-Phasen Anteil erkennbar ist und besonders in den bestrahlten spät-S-Phase Zellen ausgeprägt ist.

Zur genaueren Überprüfung der strahleninduzierten Attenuation der S-Phasen Progression, deren Auslösung den Ergebnissen nach nicht nur durch den *p53* Status sondern auch durch die Position der Zelle im Zellzyklus zum Zeitpunkt der DNA Schädigung definiert wird, wurden wtp53 HSC93 Zellen mittels einer präparativen Gegenstromzentrifugation am G1/S-Übergang angereichert, mit 2 Gy bestrahlt und die Zellzyklusprogression zu definierten Zeiten nach Bestrahlung durchflusscytometrisch analysiert. Die FACS-Analyse (**Abb. 5-19**) zeigt im Vergleich zu den unbestrahlten HSC93 Zellen, dass Bestrahlung am G1/S-Übergang zur Verlangsamung der S-Phasen Progression (sechs Stunden nach Bestrahlung) und somit zum verzögerten Eintritt in die G2-Phase führt (acht Stunden nach Bestrahlung). Darüber hinaus ist neben der Attenuation der S-Phasen Progression, die Aktivierung des G2-Kontrollpunkts zehn Stunden nach Bestrahlung deutlich zu erkennen.

Um auszuschließen, dass dieser Befund nur für die humane Zelllinie wtp53 HSC93 gilt, wurde das Experiment mit Isoleucin-synchronisierten wtp53 CV-1 Zellen wiederholt. **Abb. 5-20** zeigt den Verlauf der Zellzyklusprogression ausgehend vom G1/S-Übergang (0 h Wert) unbestrahlter CV-1 Zellen. Aus der FACS-Analyse geht hervor, dass in unbestrahlten CV-1

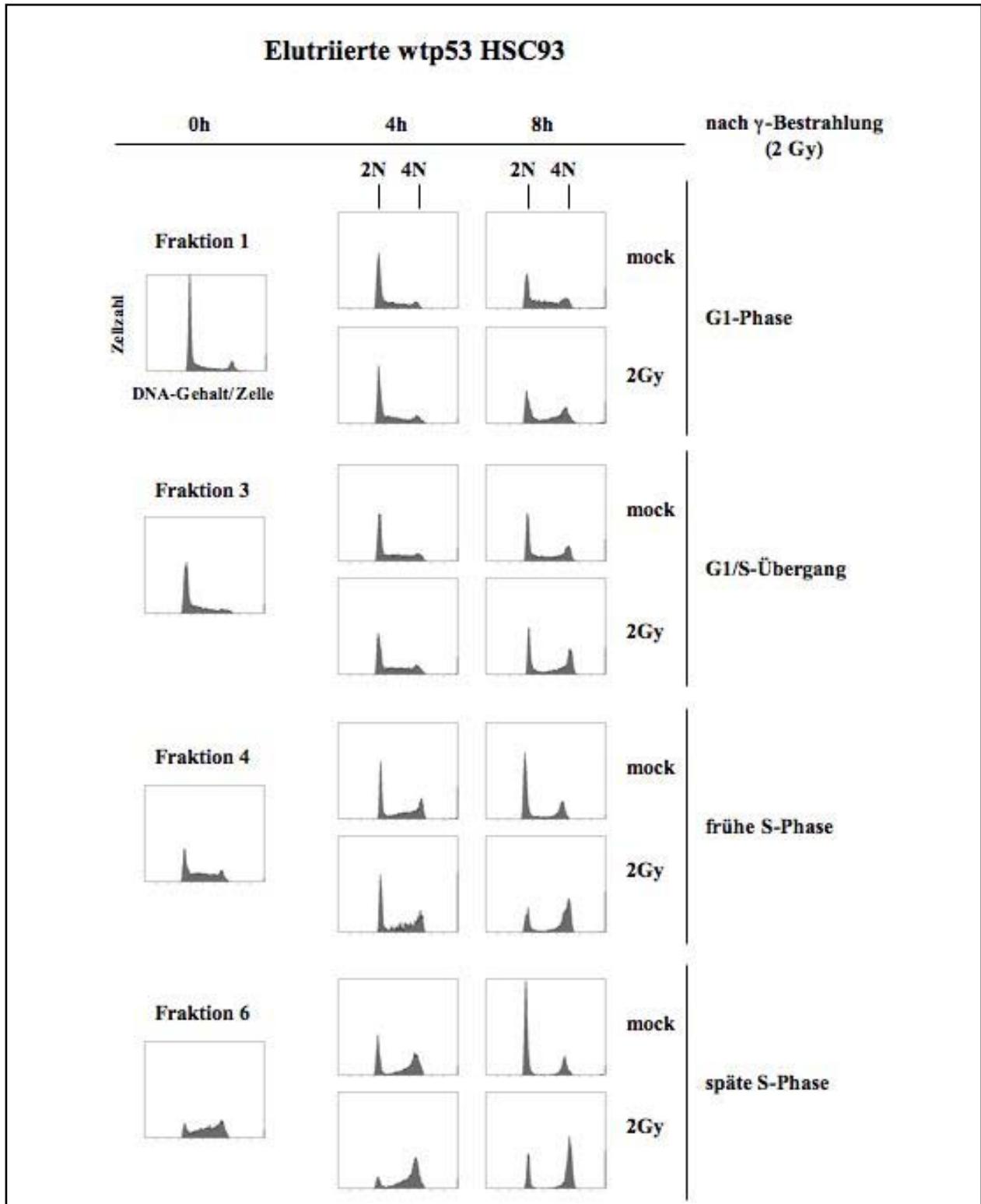


Abb. 5-18: Aktivierung des intra-S-Phasen Kontrollpunkts in Abhängigkeit der Position der Zelle zum Zeitpunkt der DNA Schädigung. Zellzyklusprofile unbestrahlter und bestrahlter wtp53 HSC93 Zellen zu definierten Zeiten im Zellzyklus. Die elutrierten zellen wurden zu den angegebenen Positionen im Zellzyklus mit 2 Gy bestrahlt bzw. für die Kontrolle nicht bestrahlt („mock“) und 4 h sowie 8 h später mit Ethanol fixiert. Für die durchflusscytometrische Analyse wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und jeweils 10.000 Zellen erfasst.

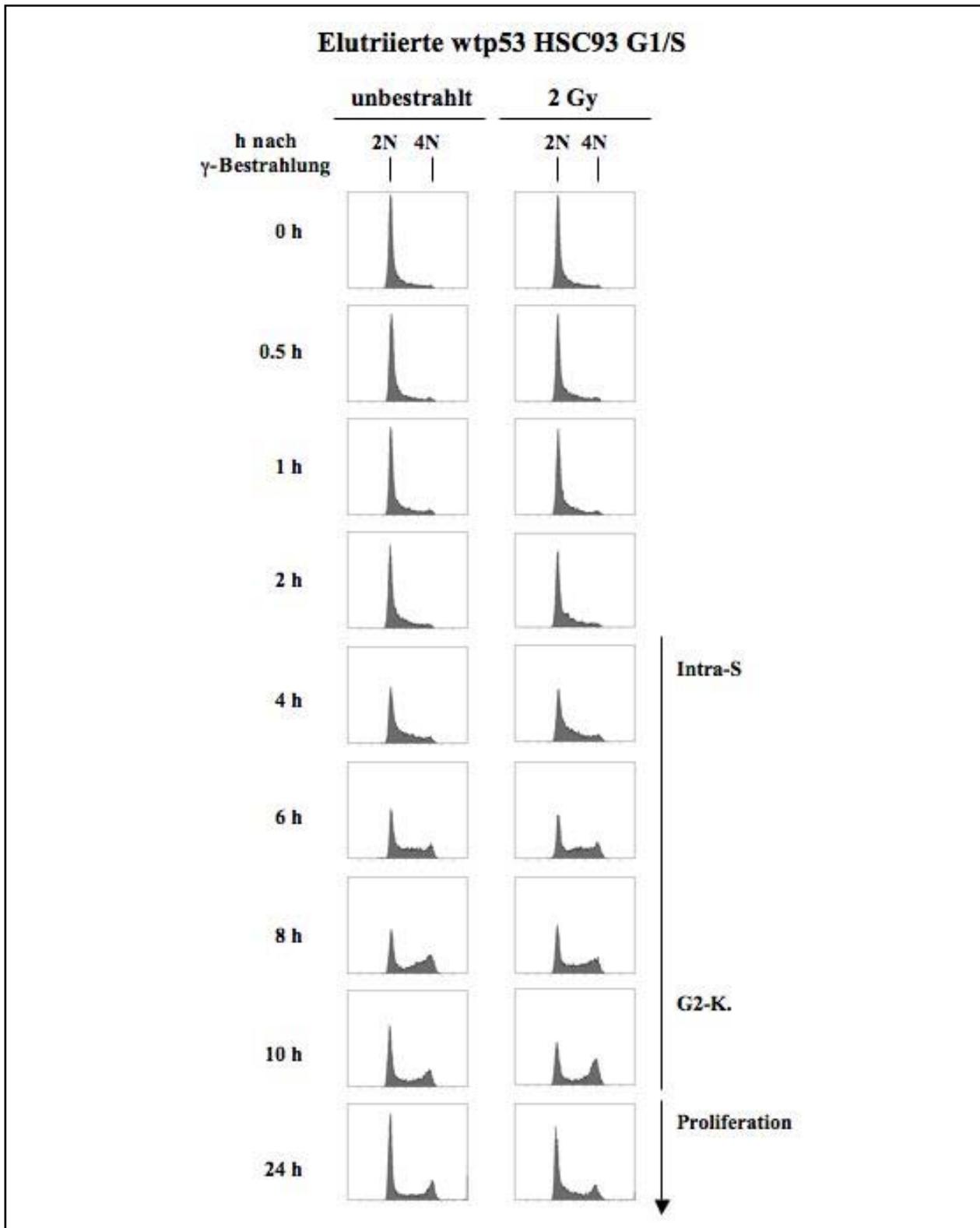


Abb. 5-19: FACS-Analyse elutrierter wtp53 HSC93 Zellen, unbestrahlt und mit 2 Gy am G1/S-Übergang γ -bestrahlt. Ausgehend vom G1/S-Übergang (0 h) wurden unbestrahlte sowie bestrahlte Zellen 24 h lang weiter kultiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen mit Ethanol fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Bei der durchflusscytometrischen Analyse zur Bestimmung des DNA Gehalts wurden je 10.000 Zellen erfasst. Bestrahlte Zellen zeigen temporäre Veränderungen in der S- und G2-Phasenverteilung, gekennzeichnet als intra-S und G2- Kontrollpunkt.

Zellen die replikative S-Phase nach acht Stunden beendet ist und nach dem Durchlauf der vierstündigen G2-Phase mit anschließender Mitose die nächste G1-Phase beginnt. Demnach brauchen Isoleucin-synchronisierte, unbestrahlte CV-1 Zellen beginnend vom G1/S-Übergang zwölf Stunden bis zum Eintritt in die nächste Proliferationsrunde. Im Gegensatz zu den unbestrahlten CV-1 Zellen zeigt die durchflusscytometrische Analyse der am G1/S-Übergang mit 2 Gy bestrahlten Zellen vier Stunden nach Bestrahlung eine attenuierte S-Phasen Progression, die sich zehn Stunden nach Bestrahlung in eine G2-Phasen Attenuation manifestiert, die schließlich zu Gunsten der Proliferation aufgehoben wird. Die FACS-Daten zeigen, dass bei γ -Bestrahlung mit 2 Gy im Gegensatz zu unbestrahlten G1/S-Zellen, die Zellzyklusprogression um ca. zwei Stunden verlängert ist, wodurch sich der Eintritt der Zellen in die nächste Proliferationsrunde dementsprechend verlängert.

Gravierender wirkt sich die Bestrahlung mit 10 Gy auf die Zellzyklusprogression aus. Die S-Phasen sowie die G2-Phasen Attenuation sind wesentlich stärker ausgeprägt und im Gegensatz zu den 2 Gy bestrahlten Zellen arretieren die 10 Gy bestrahlten Zellen 24 h nach Bestrahlung (**Abb. 5-20**, rechte Spalte). Zusätzlich zeigen die Zellen zu diesem Zeitpunkt einen breiter werdenden G2-„peak“ sowie eine kleine sub-G1 Fraktion, die 72 h nach Bestrahlung deutlich zunimmt. Beide Ereignisse sind eindeutige Anzeichen für den Abbau von DNA und somit den induzierten Eliminierungsprozess (Liu et al., 1997; Vaux, 2002). Aus diesem Experiment geht hervor, dass bei γ -Bestrahlung von wtp53 Zellen am G1/S-Übergang unabhängig vom Ausmaß des induzierten DNA Schadens immer die Kontrollpunkte intra-S und G2 aktiviert werden, jedoch entscheidet in wtp53 Zellen das Ausmaß des Schadens über Proliferation und Elimination.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die schadeninduzierten Kontrollpunkte intra-S und G2 spezifisch für γ -Strahlung sind oder auch durch Schädigung der DNA mit UV-Strahlung ausgelöst werden können. Nachdem festgestellt wurde, dass die Aktivierung des intra-S-Phasen Kontrollpunkts nur in Zellen mit funktionellem wt Δ p53 etabliert wird (s. **Abb. 5-17**), wurden für diese Untersuchung synchronisierte wtp53 CV-1, „type II“ mutp53 SW480 sowie „type I“ mutp53 LLC-MK2 Zellen am G1/S-Übergang mit 10 J/m² bestrahlt und die Zellzyklusprogression zu definierten Zeiten nach Bestrahlung durchflusscytometrisch gemessen. Wie **Abb. 5-21** zeigt, aktivieren am G1/S-Übergang mit UV-Licht geschädigte wtp53 CV-1 und „type II“ mutp53 SW480 aber nicht „type I“ mutp53 LLC-MK2 Zellen den intra-S-Phasen Kontrollpunkt. Im Gegensatz dazu aktivieren nur „type I“ mutp53 LLC-MK2

Synchronisierte CV-1 G1/S

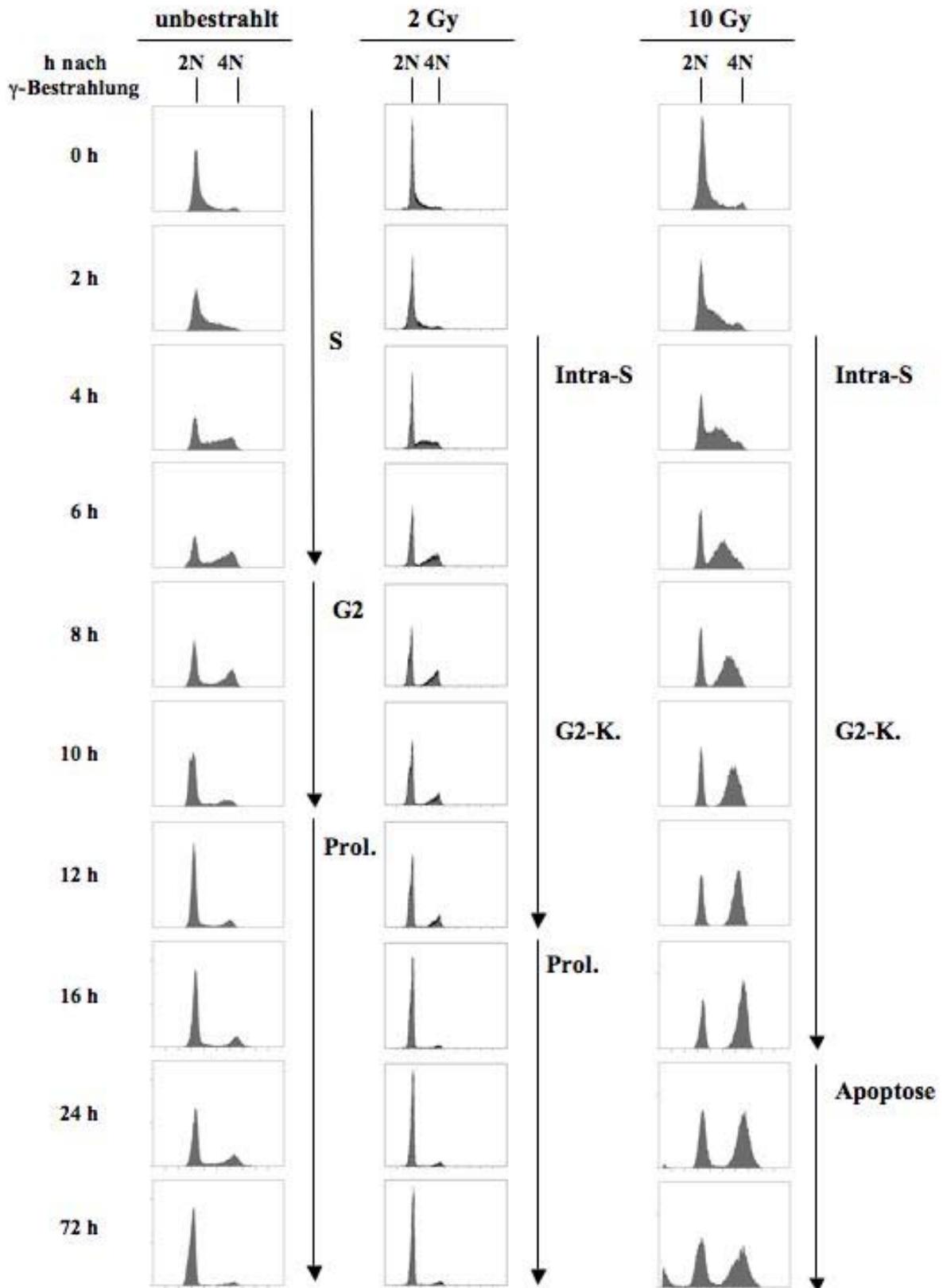


Abb. 5-20: FACS-Analyse Isoleucin-synchronisierter wtp53 CV-1 Zellen, unbestrahlt und mit 2 Gy, 10 Gy am G1/S-Übergang bestrahlt. Ausgehend vom G1/S-Übergang (0 h) wurden unbestrahlte sowie bestrahlte Zellen 72 h lang weiter kultiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen mit Ethanol fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Bei der durchflusscytometrischen Analyse zur Bestimmung des DNA Gehalts wurden je 10.000 Zellen erfasst. Zwei Gy bestrahlte Zellen zeigen temporäre Veränderungen in der S- und G2-Phasenverteilung. Bestrahlung mit 10 Gy aktiviert neben den intra-S und G2-Kontrollpunkten zusätzlich apoptotische Ereignisse, sichtbar als sub-G1 Fraktion.

Zellen, die kein funktionelles p53 und $\Delta p53$ exprimieren, den G2- aber nicht den intra-S-Phasen Kontrollpunkt. Demnach induziert UV-Strahlung, wie auch γ -Strahlung, in Abhängigkeit des p53 Status den intra-S-Phasen Kontrollpunkt. Jeoch aktivieren am G1/S-Übergang mit UV-Licht geschädigte wt $\Delta p53$ exprimierende Primaten Zellen ausschließlich den intra-S aber nicht den G2-Kontrollpunkt. Dieser Befund ist ein erster Hinweis dafür, dass wt $\Delta p53$ exprimierende Zellen, die am G1/S-Übergang mit γ -Strahlung geschädigt werden anders reagieren als wt $\Delta p53$ exprimierende Zellen, die mit UV-Licht bestrahlt werden.

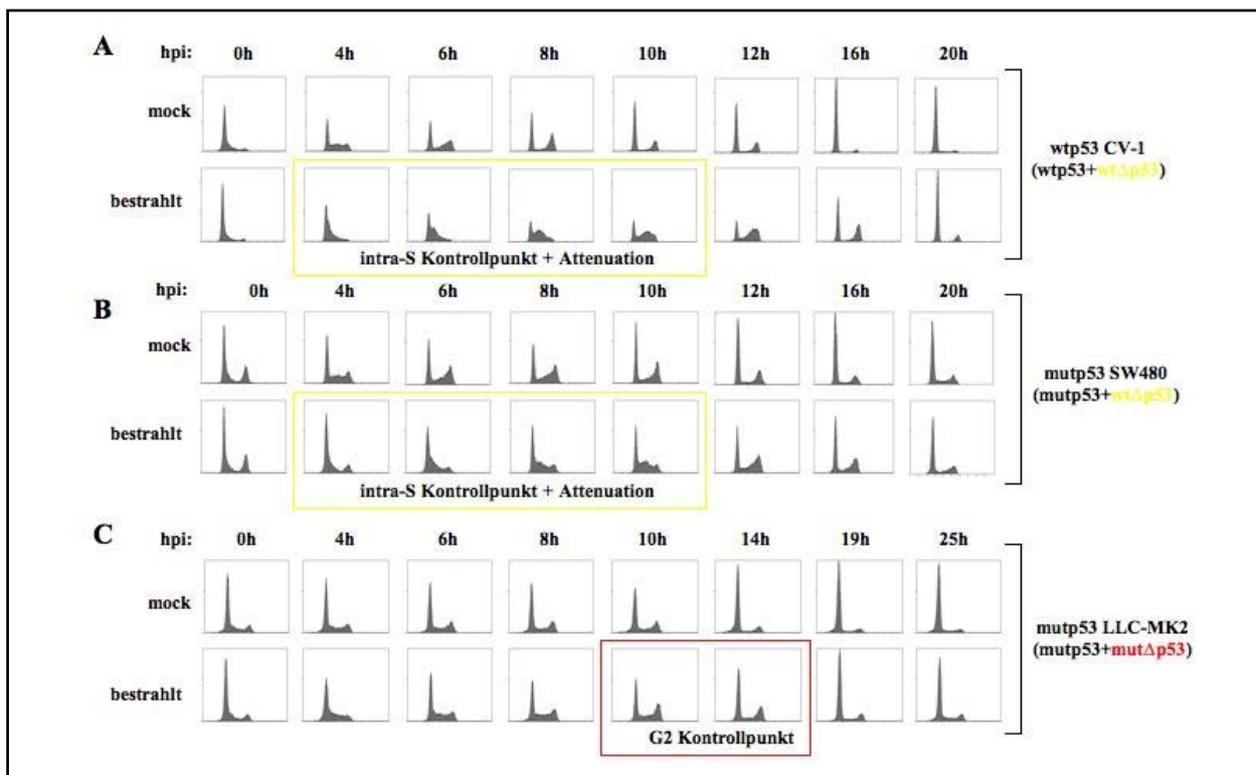


Abb. 5-21: FACS-Analyse Isoleucin-synchronisierter Zellen mit unterschiedlichem p53 Status, am G1/S-Übergang mit 10 J/m² bestrahlt. Ausgehend vom G1/S-Übergang (0 h) wurden unbestrahlte („mock“) sowie bestrahlte Zellen 20 h bzw. 25 h lang weiter kultiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen mit Ethanol fixiert und mit Propidium gefärbt. Bei der durchflusscytometrischen Analyse zur Bestimmung des DNA Gehalts wurden je 10.000 Zellen erfasst. (A, B) CV-1 und SW480 Zellen, die funktionelles wt $\Delta p53$ exprimieren aktivieren den intra-S-Phasen Kontrollpunkt. (C) LLCM-K2 Zellen, die mut $\Delta p53$ exprimieren aktivieren den G2-Kontrollpunkt.

Bei Betrachtung der FACS-Analysen γ - und UV-bestrahlter wtp53 CV-1 Zellen fällt auf, dass die UV-Strahlung zu einer wesentlich ausgeprägteren S-Phasen Attenuation führt als γ -Strahlung. Während in den 2 Gy bestrahlten G1/S Zellen die Attenuation der S-Phasen Progression bis zu vier bis maximal sechs Stunden nach Bestrahlung detektierbar ist, hält diese in UV-geschädigten Zellen bis zu zehn Stunden an. Obwohl sowohl die Dosis an ionisierender γ -Strahlung (2 Gy) als auch die Dosis an UV-Strahlung (10 J/m^2) nur subletale DNA Schäden verursacht, reagieren die geschädigten wtp53 Zellen sehr unterschiedlich. Anzunehmen ist, dass die γ -induzierten Strangbrüche mittels NHEJ wesentlich schneller repariert werden als die UV-induzierten Thymindimere und 6-4 Photoprodukte, die nur durch den komplexen „nucleotide excision“ Reparaturweg behoben werden können. Jedoch ist hinsichtlich der molekularen Mechanismen, die in Abhängigkeit der Schadensart und Position der Zelle im Zellzyklus zum Zeitpunkt der Schädigung diese unterschiedlichen Schadensreaktionen induzieren und regulieren, nur wenig bekannt.

Nachdem der UV-induzierte intra-S-Phasen Kontrollpunkt in wt Δ p53 exprimierenden Zellen bis zu zehn Stunden nach Bestrahlung am G1/S-Übergang anhält und darüber hinaus in diesen UV-geschädigten G1/S Zellen der G2-Kontrollpunkt nicht aktiviert wird, erfolgte auf Grund dessen die Aufklärung der Funktion von Δ p53 zuerst in UV-bestrahlten Primaten Zellen.

5.7 Sequenzielle Aktivierung und Inaktivierung von Δ p53 und p53 in G1/S UV-bestrahlten wtp53 Zellen ist ATR-abhängig

Die bislang erzielten Ergebnisse zeigen eine Korrelation zwischen der S-Phasen spezifischen transkriptionellen Aktivität von Δ p53 und der strahleninduzierten Attenuation der S-Phasen Progression, die sowohl in γ - als auch UV-bestrahlten wtp53 und „type II“ mutp53 G1/S Zellen zu beobachten ist. Allerdings konnten diese Resultate nicht mit einem isogenen Zellsystem erzielt werden, da existierende isogene Zellsystem wie z.B. das von B. Vogelstein etalbierte HCT116 System durch Isoleucinentzug nicht synchronisiert werden kann und darüber hinaus einen genetischen Defekt in der schadensvermittelten Signalkaskade aufweist. Zusätzlich erlauben die bislang verwendeten Zelllinien keinen direkten Nachweis von endogenem Δ p53 in der Immunpräzipitation, da spezifische anti- Δ p53 Antikörper bislang nicht existieren. Deshalb wurde mit der diploiden Zelllinie wtp53 CV-1 ein isogenes Zellsystem hergestellt, das alle Kriterien, die für die Untersuchung der Funktion von Δ p53 erforderlich sind, erfüllt. In den induzierbaren wtp53 TO-CV-1-Flag-wtp53, -Flag-mutp53-

273, Flag-wt Δ p53 und -Flag-mut Δ p53-175 Zellen erfolgt nach Zugabe von Dox die Expression des entsprechenden Flag-markierten p53 Proteins, mit dem einerseits endogenes wtp53 oder Δ wtp53 dominant-negativ inaktiviert und andererseits Flag-markiertes p53 sowie Δ p53 mit einem anti-Flag Antikörper immunpräzipitiert werden kann. **Abb. 5-22** zeigt die Expression der Flag-markierten p53 Proteine nach Induktion der entsprechenden wtp53 TO-CV-1 Zellen (**A**) sowie die Fähigkeit der ektopisch exprimierten p53 Proteine mit ihrem jeweiligen endogenen Bindungspartner zu komplexieren (**B**). Die Western Blot Analyse der mit einem anti-Flag Antikörper immunpräzipitierten Flag-p53-p53 bzw. Flag- Δ p53- Δ p53 Komplexe mit den Epitop spezifischen anti-p53 Antikörpern DO1 und DO12 bestätigt den Verlust des DO12-Epitops von Δ p53 und die Eigenschaft von Δ p53 nur mit sich selbst aber nicht mit p53 zu komplexieren. Nachdem das Ziel der ektopisch exprimierten Flag-markierten Mutanten die dominant-negative Inaktivierung der entsprechenden endogenen wildtyp p53 Proteine ist, wurde in der ChIP-PCR Analyse die Inaktivierung der transkriptionellen Aktivität von endogenem p53 und Δ p53 in den entsprechenden induzierten TO-CV-1 Zellen überprüft. Für die Chromatin-Immunpräzipitation wurden alle verwendeten TO-CV-1 Zelllinien mit der Isoleucinmethode synchronisiert und mit 10 J/m² in G1, früh-S und G2 bestrahlt. Eingesetzt für die ChIP wurde der für „Volllänge“ p53 spezifische anti-p53 Antikörper DO12, der anti-Flag Antikörper M2 für die Präzipitation von Flag-markierten p53 Proteinen, sowie der anti-T-Ag Antikörper PAb101 als negativ Kontrolle. Die PCR Ergebnisse zeigen, dass in Flag-wtp53 exprimierenden Zellen die DO12- und Flag-Immunpräzipitate mit dem *p21*-Promoter nur in der G1- und G2- aber nicht in der S-Phase assoziieren (**Abb. 5-22C**, Spalte 3), während in den Flag-wt Δ p53 exprimierenden Zellen der *p21*-Promoter nur mit dem Flag-Immunpräzipitat in der S-Phase nachweisbar ist und wie erwartet das DO12-Präzipitat mit dem *p21*-Promoter in G1 und G2 interagiert (Spalte 4). Die ChIP-PCR Analyse der Flag-mutp53 und -mut Δ p53 exprimierenden wtp53 TO-CV-1 Zellen zeigt, dass die Interaktion der Flag-markierten p53 Proteine mit dem korrespondierenden endogenen p53 Protein diese mittels dominant-negativer Effekte transkriptionell inaktiviert (**Abb. 5-22C**, Spalte 1 und 2).

Die beobachtete Zellzyklus-abhängige Interaktion von Δ p53 und p53 mit dem *p21*-Promoter deutet darauf hin, dass ihre transkriptionelle Aktivität unabhängig voneinander reguliert werden könnte. Die Überprüfung dieser Annahme erfolgte zunächst durch Evaluierung der *p21* Induktion nach UV-Bestrahlung synchronisierter G1/S wtp53 TO-CV-1 Zellen über einen Beobachtungszeitraum von 20 Stunden. In induzierten wtp53 TO-CV-1-null Zellen, die kein

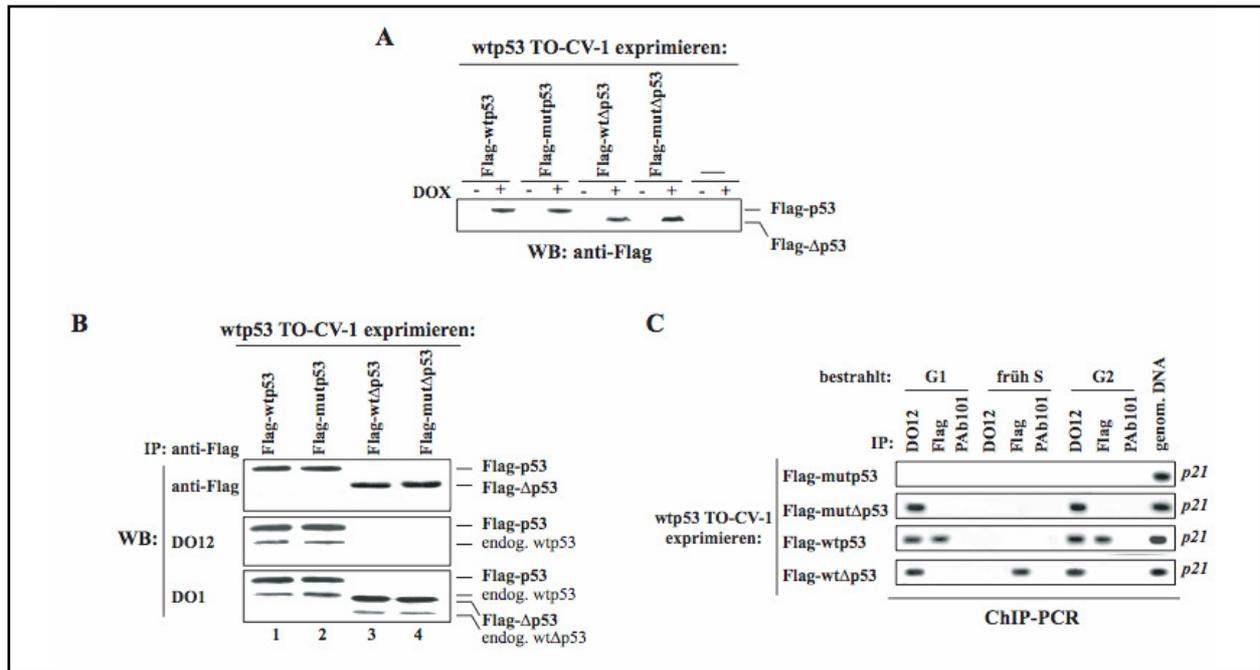


Abb. 5-22: Ektopische Expression von Flag-markierten Δ p53 und p53 in Dox-induzierten wtp53 TO-CV-1 Zellen. (A) Induzierbare wtp53 TO-CV-1 Zellen, die nach Zugabe von Dox den leeren Vektor (-), Flag-wtp53, -mutp53, -wt Δ p53 oder -mut Δ p53 exprimieren, wurden im Western Blot mit dem anti-Flag Antikörper M2 analysiert. (B) Immunpräzipitierte Flag-markierte p53 Proteine wurden auf ihre Interaktionsfähigkeit mit den endogenen wtp53 Proteinen in den entsprechenden Dox-induzierten wtp53 TO-CV-1 Zellen untersucht. Immunpräzipitierte Flag-markierte p53 Proteine wurden im Western Blot mit dem anti-Flag Antikörper M2 detektiert. Der Nachweis von assoziierten endogenen p53 und Δ p53 erfolgte mit dem anti-p53 Antikörper DO1, während der „Volllänge“ p53-spezifische Antikörper DO12 für die Detektion von p53 verwendet wurde. (C) Synchronisierte wtp53 TO-CV-1 Zellen, die nach Zugabe von Dox Flag-wtp53, -mutp53, -wt Δ p53 oder -mut Δ p53 exprimieren wurden zu den angegebenen Zeitpunkten im Zellzyklus UV-bestrahlt, 2 h nach Bestrahlung mit Formaldehyd behandelt und einer ChIP-PCR Analyse unterzogen. Für die Chromatin-Immünpräzipitation wurde der anti-Flag Antikörper M2, der nur Flag-markierte p53 Proteine erkennt, und der für „Volllänge“ p53 spezifische Antikörper DO12 verwendet. Für die negative Kontrolle wurde der für T-Ag spezifische Antikörper PAb101 eingesetzt. Der p53 bzw. Δ p53 assoziierte p21-Promoter wurde mit spezifischen „primern“ durch PCR amplifiziert und im Agarosegel durch Ethidium Bromid-Färbung visualisiert. Genomische DNA wurde als Größenmarker eingesetzt.

Flag-markiertes mutp53 oder mut Δ p53 exprimieren, zeigt die Western Blot Analyse eine erhöhte p21 Expression zwischen zwei und 16 Stunden nach Bestrahlung (Abb. 5-23A, Spalte 1). In Flag-mut Δ p53 exprimierenden TO-CV-1 Zellen ist p21 nur zwischen sechs und 16 Stunden nachweisbar, während in Flag-mutp53 exprimierenden TO-CV-1 Zellen die Expression des Cdk-Inhibitors zwischen zwei und zehn Stunden detektierbar ist (Abb. 5-23A, Spalte 2 und 3). Die Resultate der Western Blot Analyse zeigen, dass Δ p53 verantwortlich für die Hochregulation von p21 während der ersten zehn Stunden und p53 ab acht Stunden nach

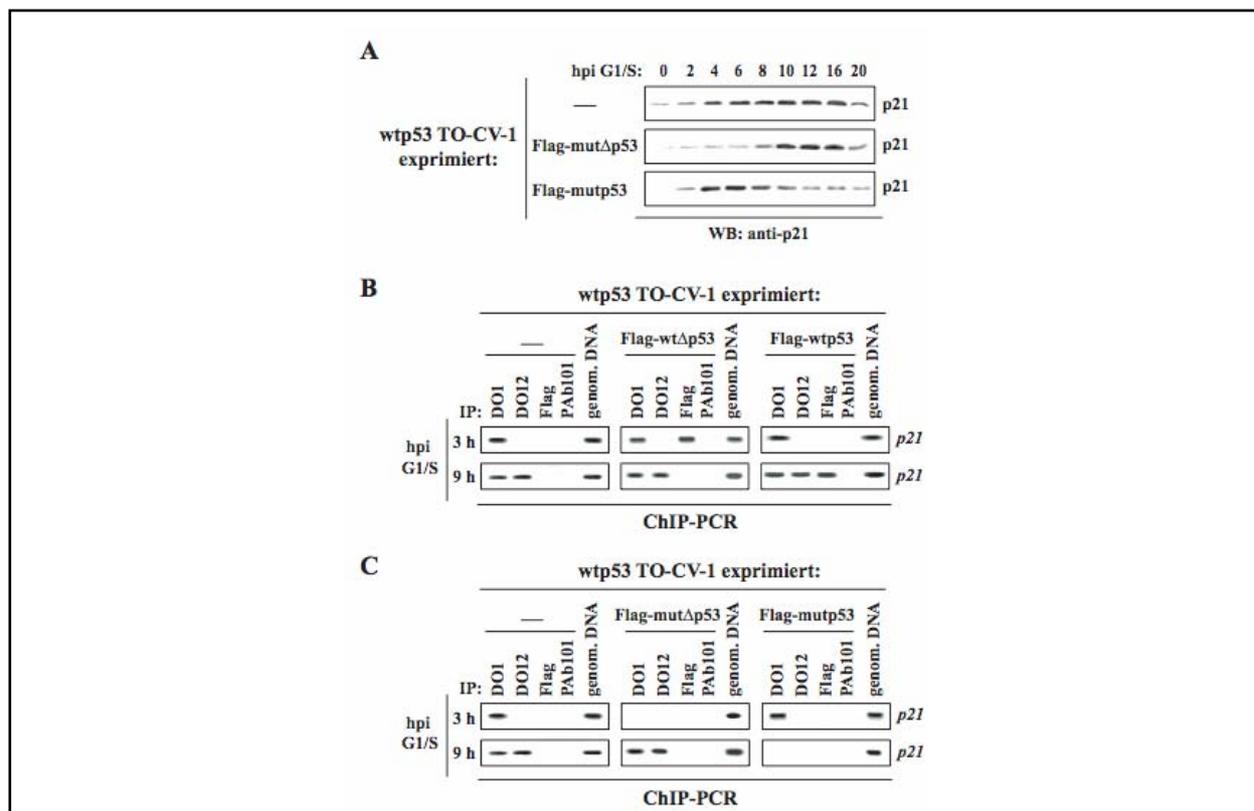


Abb. 5-23: Sequenzielle Aktivierung und Inaktivierung von $\Delta p53$ und p53. (A) Synchronisierte induzierbare wtp53 TO-CV-1 Zellen, die nach Zugabe von Dox den leeren Vektor, Flag-mut $\Delta p53$ oder Flag-mutp53 exprimieren, wurden nach UV-Bestrahlung am G1/S-Übergang zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die Expression von p21 in einer Western Blot Analyse mit einem anti-p21 Antikörper untersucht. Dominant-negative Inaktivierung von endogenem wt $\Delta p53$ oder wtp53 führt zu Veränderungen der p21 Expression. (B) Dox-induzierte wtp53 TO-CV-1-null, -Flag-wt $\Delta p53$ und -Flagwtp53 Zellen wurden am G1/S-Übergang UV-bestrahlt und zu den angegebenen Zeiten mit Formaldehyd behandelt und einer ChIP-PCR Analyse unterzogen. Für die ChIP-Immünpräzipitation wurden die folgenden monoklonalen Antikörper verwendet: anti-Flag M2, erkennt Flag-markierte p53 und $\Delta p53$ Proteine; anti-p53 DO1, erkennt p53 und $\Delta p53$; anti-p53 DO12, erkennt nur p53; PAb101 ist T-Ag spezifisch und erkennt keine p53 Proteine. Der p53 bzw. $\Delta p53$ assoziierte p21-Promoter wurde mit spezifischen „primern“ amplifiziert und im Agarosegel mit Ethidium Bromid gefärbt. Genomische DNA wurde als Größenmarker eingesetzt. (C) Die dominant-negativen Effekte Dox-induzierter Expression von Flag-mut $\Delta p53$ und -mutp53 wurde wie unter (B) beschrieben analysiert.

Bestrahlung am G1/S-Übergang ist. Zusätzlich wurde dieser Befund durch eine ChIP-PCR Analyse erhärtet, die mit den induzierten wtp53 TO-CV-1 Zelllinien drei und neun Stunden nach UV-Bestrahlung am G1/S-Übergang durchgeführt wurde. Die mit DNA vernetzten $\Delta p53$ und p53 Komplexe wurden mit den anti-p53 Antikörpern DO1, DO12 und dem anti-Flag Antikörper M2 präzipitiert und für die negativ Kontrolle wurde der anti-T-Ag Antikörper PAb101 eingesetzt. Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, bindet drei Stunden nach Bestrahlung ausschließlich wt $\Delta p53$ an den p21-Promoter, während wtp53 erst neun Stunden

nach Schädigung am G1/S-Übergang mit dem Promoter assoziiert (**Abb. 5-23B**). In den Flag-mut Δ p53 und Flag-mutp53 exprimierenden wtp53 TO-CV-1 Zellen führt der dominant-negative Inaktivierungseffekt zum Verlust der *p21*-Promoterbindungsfähigkeit des entsprechenden endogenen p53 Proteins (**Abb. 5-23C**). Die Befunde zeigen, dass Bestrahlung am G1/S-Übergang zur sequenziellen Aktivierung und Inaktivierung von Δ p53 und p53 führt, wobei der *p21*-Promoter zunächst von Δ p53 und anschließend von p53 transaktiviert wird. Der Zeitpunkt in dem Δ p53 als Transaktivator für *p21* arbeitet (2-8 h nach Bestrahlung) entspricht dem intra-S-Kontrollpunkt, während p53 den Cdk-Inhibitor erst am Ende dieses Kontrollpunkts induziert.

Ergebnisse aus der Western Blot Analyse und der Chromatin-Immunpräzipitation zeigen eindeutig, dass die transkriptionelle Aktivität von Δ p53 und p53 unabhängig voneinander arbeitet und demnach durch unterschiedliche Modifikationen so wie Protein-Protein Interaktionen reguliert werden muss. Nahe liegend ist, dass die UV-induzierte Schadensreaktion, die über die ATR-vermittelte Phosphorylierungskaskade erfolgt (Bartek et al., 2004), zur Aktivierung der „down-stream“ Effektoren wie z.B. Chk1 führt und zu denen unter anderen auch Δ p53 zählen könnte. Auf Grund dieser Annahme wurden synchronisierte wtp53 CV-1 Zellen am G1/S-Übergang mit UV bestrahlt und die Aktivierung von ATR durch den Nachweis der ATR-katalysierten Phosphorylierung von Chk1 festgestellt (**Abb. 5-24A**, Spalte 1). Gleichzeitig mit der Phosphorylierung von Chk1 erfolgt auch die Stabilisierung und ATR-katalysierte Serin-15 Phosphorylierung von Δ p53 und p53. Während phosphoryliertes Δ p53 von zwei bis acht Stunden nach Bestrahlung am G1/S-Übergang detektierbar ist, hält die Modifikation von p53 bis zu 20 Stunden nach Bestrahlung an (**Abb. 5-24A**, Spalte 2 und 3). Die Serin-15 Phosphorylierung von Δ p53 und p53 korreliert mit der Expression des Cdk-Inhibitors p21 (**Abb. 5-24A**, Spalte 4), wobei die Induktion des p53-Zielgens zuerst durch Δ p53 und anschließend durch p53 erfolgt (**Abb. 5-23**). Dieses Ergebnis zeigt auch, dass im Falle von p53 die ATR-vermittelte Stabilisierung und Serin-15 Phosphorylierung nicht unmittelbar zur Aktivierung der transaktivierenden Eigenschaft des Tumorsuppressors bezüglich des *p21*-Promoters führt. Um zu klären, inwieweit ATR überhaupt eine Rolle bei der Aktivierung von Δ p53 spielt, wurde die PIK Kinase einerseits durch dominant-negative Effekte und andererseits durch Zugabe des PIK Kinase Inhibitors Koffein inhibiert. Wie aus der Western Blot Analyse Dox-induzierter wtp53 TO-CV-1-Flag-ATR^{kd} Zellen, die am G1/S-Übergang mit UV-Licht bestrahlt wurden, hervorgeht, unterbindet die dominant-negative Inaktivierung von ATR nicht nur die Phosphorylierung von Chk1, p53 und Δ p53 sondern

auch die Transaktivierung von p21 (**Abb. 5-24B**). Allerdings ist zwölf Stunden nach Bestrahlung trotz inaktivierter ATR der Cdk-Inhibitor p21 detektierbar, dessen Expression zeitgleich mit der Phosphorylierung von p53 an Serin-15 auftritt (Spalte 3 und 4). Diese Ergebnisse wurden mit UV-bestrahlten wtp53 CV-1 Zellen reproduziert, die vor der Bestrahlung am G1/S-Übergang mit dem ATM/ATR-Inhibitor Koffein inkubiert wurden (**Abb. 5-24C**). Demnach führt in UV-geschädigten Zellen die Inaktivierung der PIK Kinase ATR zur Aktivierung eines alternativen Signalwegs, der allerdings zur Eliminierung der geschädigten Zellen führt (Daten nicht gezeigt).

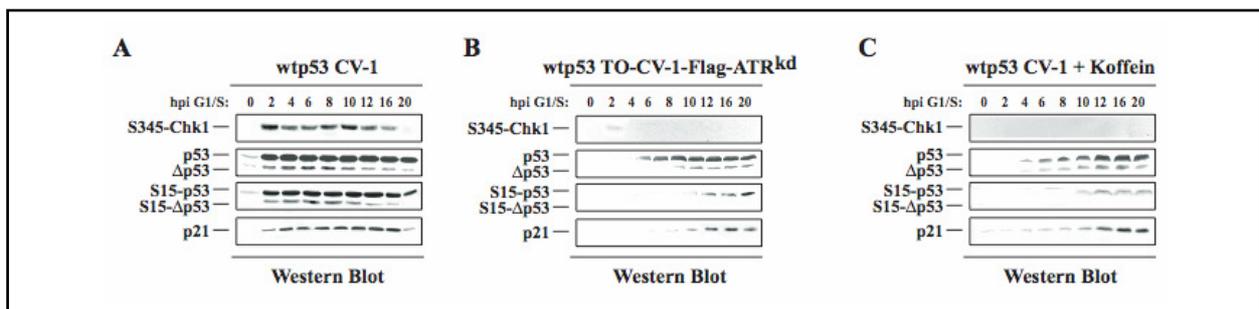


Abb. 5-24: Aktivierung der transaktivierenden Eigenschaft von Δ p53 ist abhängig vom schadeninduzierten ATR-Signalweg. (A) Synchronisierte wtp53 CV-1 Zellen wurden am G1/S-Übergang mit 10 J/m^2 bestrahlt, zu den angegebenen Zeitpunkten (hpi) geerntet und die Expression von p53, Δ p53, p21 sowie die Phosphorylierung des Serinrests 15 von p53, Δ p53 und des Serinrest 345 von Chk1 in einer Western Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern untersucht. (B) Synchronisierte induzierbare wtp53 TO-CV-1 Zellen, die nach Zugabe von Dox dominant-negative ATR^{kd} exprimieren, wurden nach UV-Bestrahlung am G1/S-Übergang zu den angegebenen Zeitpunkt (hpi) geerntet in die Expression sowie die Phosphorylierung der Proteine wie unter (A) beschrieben in einer Western Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern untersucht. (C) Die Auswirkung von Koffein auf die Expression sowie Phosphorylierung von Proteinen in UV-bestrahlten wtp53 CV-1 Zellen erfolgte wie unter (A) beschrieben.

Synchronisierte induzierbare wtp53 TO-CV-1 Zellen, die nach Zugabe von Dox den leeren Vektor, Flag-mut Δ p53 oder Flag-mutp53 exprimieren und am G1/S-Übergang mit 10 J/m^2 bestrahlt wurden, zeigen, dass die frühe p21 Expression von Δ p53 und die späte p53 abhängig ist (**Abb. 5-23**). Die Zuordnung des zeitlichen Ablaufs der Δ p53-vermittelten p21 Hochregulation mit der aus der FACS-Analyse erhaltenen Zellzyklusprogression indiziert eine Korrelation zwischen der Expression des Cdk-Inhibitors p21 und der Attenuation der S-Phasen Progression bestrahlter G1/S wtp53 und „type II“ mutp53 Zellen (**Abb. 5-21**). Jedoch wurden die Ergebnisse, die diese Korrelation aufzeigen, mit unterschiedlichen Primaten Zelllinien erhalten. Auf Grund dessen wurde der Effekt, den die ATR- Δ p53-vermittelte Induktion von p21 auf die Zellzyklusprogression ausübt mit dem induzierbaren TO-CV-1 Zellsystem unter isogenen Bedingungen durchflusscytometrisch analysiert.

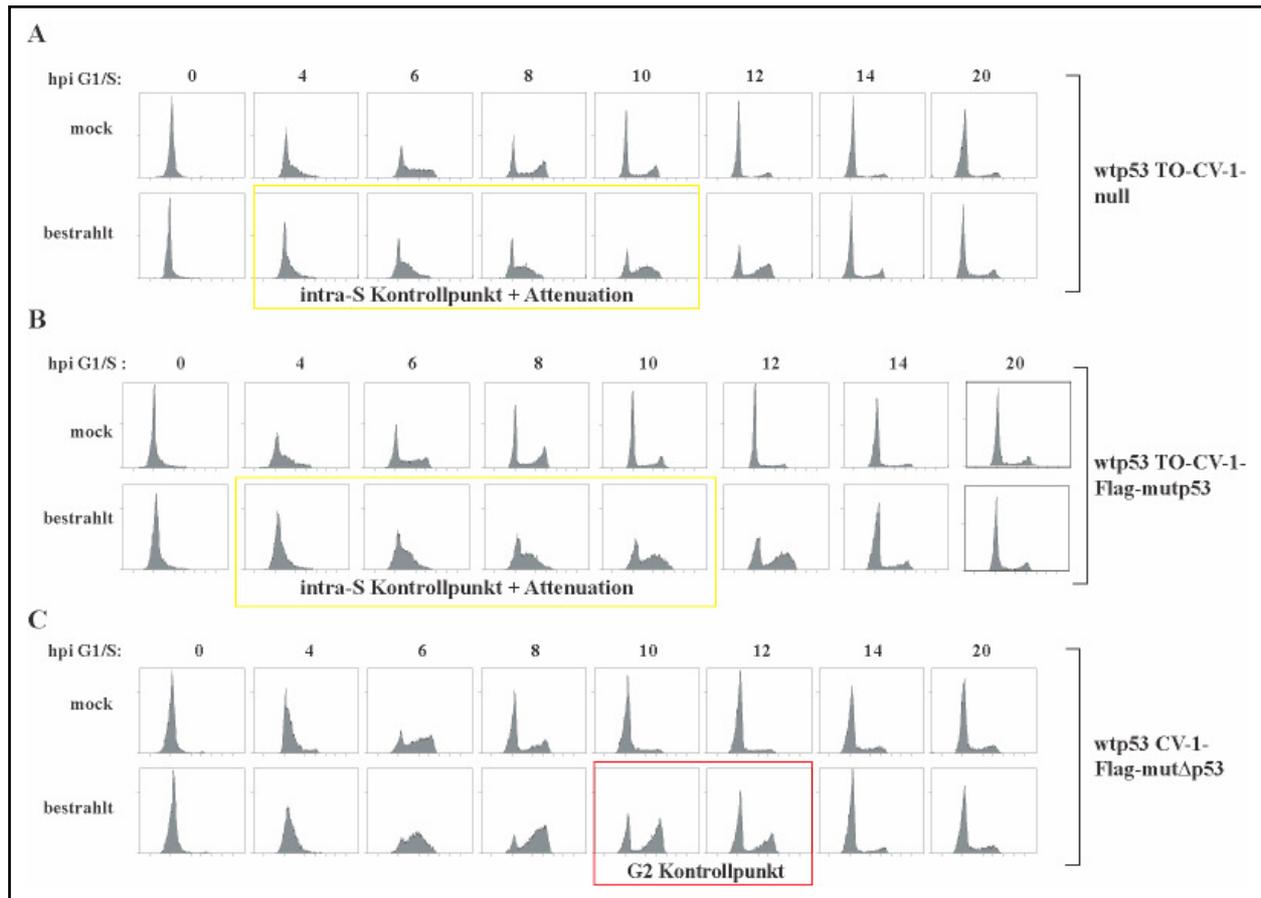


Abb. 5-25: FACS-Analyse Isoleucin-synchronisierter, Dox-induzierter wtp53 TO-CV-1 Zellen, die am G1/S-Übergang mit 10 J/m^2 bestrahlt wurden. Ausgehend vom G1/S-Übergang (0 h) wurden unbestrahlte („mock“) sowie bestrahlte Zellen 20 h lang weiter kultiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen mit Ethanol fixiert und mit Propidium gefärbt. Bei der durchflusscytometrischen Analyse zur Bestimmung des DNA Gehalts wurden je 10.000 Zellen erfasst. **(A)** TO-CV-1-null Zellen, die endogenes wtp53 und $\Delta p53$ exprimieren attenuieren die S-Phasen Progression. **(B)** TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen, die endogenes wtp53 dominant-negativ inaktivieren, attenuieren die S-Phasen Progression. **(C)** TO-CV-1-Flag-mut $\Delta p53$ Zellen, die endogenes wt $\Delta p53$ dominant-negativ inaktivieren können die S-Phase nicht attenuieren aber aktivieren den G2 Kontrollpunkt.

In allen unbestrahlten, Dox-induzierten wtp53 TO-CV-1 Zellen ist die replikative S-Phase ausgehend vom G1/S-Übergang acht Stunden später abgeschlossen und nach einer vierstündigen G2-Phasen Progression treten die Zellen in die mitotische Phase ein, die an dem für asynchron wachsende Zellen charakteristischen entsprechendem Zellzyklusprofil erkennbar ist (**Abb. 5-25**, Zeitpunkt 12 hpi). Demnach dauert in allen „mock“ behandelten wtp53 TO-CV-1 Zellen, ausgehend vom G1/S-Übergang, die Zellzyklusprogression bis zum Beginn der ca. dreißigminütigen Zellteilung zwölf Stunden. Im Gegensatz dazu, erreichen am G1/S-Übergang bestrahlte induzierte wtp53 CV-1-null und wtp53 CV-1-Flag-mutp53 Zellen die G2-Phase erst zwölf Stunden später und darüber hinaus zeigen diese Zellen in der FACS-

Analyse eine deutliche S-Phasen Attenuation (**Abb. 5-25A, B**). Anders verhalten sich bestrahlte wtp53 TO-CV-1-Flag-mut Δ p53 Zellen, in denen wt Δ p53 dominant-negativ inaktiviert ist; diese Zellen durchlaufen ungebremst die replikative S-Phase zeigen jedoch zehn Stunden nach Bestrahlung am G1/S-Übergang eine eindeutige Attenuation der G2-Phasen Progression (**Abb. 5-25C**). Aus diesen Experimenten geht hervor, dass die Δ p53-vermittelte Hochregulation von p21 zur Attenuation der S-Phasen Progression führt, während in Abwesenheit von funktionellem Δ p53 G1/S UV-geschädigte Zellen die fehlende S-Phasen Attenuation mit der Aktivierung des G2-Kontrollpunkts kompensieren.

5.8 Δ p53 attenuiert die S-Phasen Progression durch Reduktion der S-Phasen spezifischen Zyklin A-Cdk2 Aktivität

Die Aktivität der Kinase Zyklin E-Cdk2 steuert den Übergang der Zelle von G1 nach S, während die S-Phasen spezifische Kinase Zyklin A-Cdk2 nicht nur für die Progression durch die S-Phase sondern auch für die Initiation und Elongation der DNA Replikation notwendig ist. Nach erfolgter Replikation geht die Zelle in die Mitose vorbereitende G2-Phase über, ein Vorgang der die Aktivität der Kinase Zyklin A-Cdk1 erfordert (Baus et al., 2003). Auf Grund dessen ist nahe liegend, dass die beobachtete S-Phasen Attenuation durch Reduktion dieser Cdk-Aktivitäten verursacht werden könnte. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden synchronisierte, induzierte wtp53 TO-CV-1-null, -Flag-mut Δ p53 und -Flag-mutp53 Zellen am G1/S-Übergang bestrahlt und die Aktivität der Cdks im „target-bound“-Histon-Kinaseaktivitätstest gemessen. Für das Kontrollexperiment zur Bestimmung der Cdk-Aktivitäten wurden die entsprechenden am G1/S-Übergang synchronisierten, unbestrahlten Zellen verwendet. Die **Abb. 5-26** gibt einen Überblick der gemessenen Aktivitäten von Zyklin E-Cdk2 (**A**) und Zyklin A-Cdk2/1 (**C**) über einen Zeitraum von 25 Stunden. Die Messung der Zyklin E-Cdk2 Aktivität zeigt, dass in den unbestrahlten, induzierten wtp53 TO-CV-1 Zellen sechs Stunden nach dem G1/S-Übergang die Aktivität der Kinase ihr Maximum erreicht und im Laufe der S-Phasen Progression kontinuierlich abnimmt. Zur gleichen Zeit steigt die für die S-Phasen Progression sowie für den S/G2-Übergang essenzielle Zyklin A-Cdk2 bzw. Zyklin A-Cdk1 Aktivität kontinuierlich an, erreicht ihr Maximum acht bis zehn Stunden nach dem G1/S-Übergang und kehrt fünf Stunden später auf das Ausgangsniveau zurück. Dabei entsprechen die ersten sechs Stunden der S-Phasen spezifischen Zyklin A-Cdk2 Aktivität und die darauf folgenden Stunden der S/G2-spezifischen Zyklin A-Cdk1 Aktivität. Die Zuordnung der Zyklin A-abhängigen Kinaseaktivitäten zu den entsprechenden Zeiten im Zellzyklus

ergibt sich beim Betrachten der Immunpräzipitation-Western Blot Analyse (**Abb. 5-26D**, Spalte 1).

Die Messung der Zyklin E-Cdk2 Aktivitäten bestrahlter, induzierter wtp53 TO-CV-1-null, -Flag-mut Δ p53 und -Flagmutp53 Zellen ergibt, dass die Zyklin E-Cdk2 Aktivität für zwei Stunden inhibiert ist (**Abb. 5-26A**), woraus hervorgeht, dass diese sehr schnelle ATR-vermittelte Initialisierung der zellulären Schadensantwort unabhängig vom p53 Status der geschädigten Zelle sein muss. Ursache für diese schnelle aber nur kurzfristige Inhibition dieser Kinaseaktivität zeigt die Western Blot Analyse der 10 J/m² bestrahlten wtp53 TO-CV-1 Zellen. Unmittelbar nach Bestrahlung am G1/S-Übergang wird die Zyklin E-Cdk2 aktivierende Phosphatase Cdc25A degradiert und bereits ab vier Stunden wieder stabilisiert (**Abb. 5-26B**). Diese Ergebnisse zeigen, dass nach UV-Bestrahlung von Zellen, die sich am G1/S-Übergang befinden, unabhängig vom p53 Status die ATR-abhängige Initiation der S-Phasen Schadensantwort mittels Aktivierung der Chk1 Kinase erfolgt, deren enzymatische Aktivität zur Degradation der Zyklin E-Cdk2 aktivierenden Phosphatase Cdc25A führt. Die daraus resultierende Inhibition der Zyklin E-Cdk2 Aktivität, die für den Eintritt in die replikative S-Phase essenziell ist, führt nur zur kurzfristigen Attenuation der Zellzyklusprogression (Bartek und Lukas, 2001).

Im Gegensatz zur beobachteten Inhibition der Zyklin E-Cdk2 Aktivität ist die schadeninduzierte Reduktion der Zyklin A-Cdk2/1 Aktivität abhängig vom p53 Status der geschädigten Zelle. In wtp53 TO-CV-1-null Zellen führt die Bestrahlung am G1/S-Übergang zur signifikanten Reduktion der Zyklin A-Cdk2/1 Aktivität, die erst acht Stunden später langsam wieder ansteigt (**Abb. 5-26C**, Spalte 1). Dieser Befund entspricht dem durchflusscytometrisch ermittelten Proliferationsprofil, das während dieses Zeitraums eine eindeutige S-Phasen Attenuation aufweist (**Abb. 5-25A**). Auch in bestrahlten wtp53 TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen, in denen endogenes wtp53 dominant-negativ inhibiert ist, ist die Zyklin A-Cdk2/1 Aktivität während der ersten acht Stunden deutlich reduziert (**Abb. 5-26C**, Spalte 3) und folglich die S-Phasen Progression attenuiert (**Abb. 5-25B**). Allerdings steigt in Abwesenheit von funktionellem wtp53 die Zyklin A-Cdk2/1 Aktivität acht Stunden nach Bestrahlung stärker an als in den wtp53 TO-CV-1-null Zellen. Aus diesen Befunden lässt sich schließen, dass in bestrahlten G1/S Zellen acht Stunden später p53 verantwortlich für die Reduktion der Zyklin A-Cdk2/1 Aktivität ist. Gravierender wirkt sich die Inhibition von Δ p53 in wtp53 TO-CV-1-Flag-mut Δ p53 Zellen aus; trotz Bestrahlung am G1/S-Übergang steigt nach ca. zwei Stunden die Zyklin A-Cdk2/1 Aktivität wie in den unbestrahlten Zellen stetig an und sinkt erst zehn Stunden nach Bestrahlung deutlich ab (**Abb. 5-25C**). Die fehlende

Reduktion der S-Phasen spezifischen Zyklin A-Cdk2/1 Aktivität spiegelt sich auch in der ungestörten S-Phasen Progression wider, die in bestrahlten „type I“ mutp53 und in den induzierten wtp53 TO-CV-1-Flag-mutΔp53 Zellen durchflusscytometrisch festgestellt werden konnte (Abb. 5-21C; Abb. 5-25C). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass Δp53 verantwortlich für die Reduktion der Zyklin A-Cdk2/1 Aktivität während der ersten acht Stunden nach UV-Bestrahlung am G1/S-Übergang ist und p53 erst acht Stunden nach Bestrahlung diese Aufgabe übernimmt.

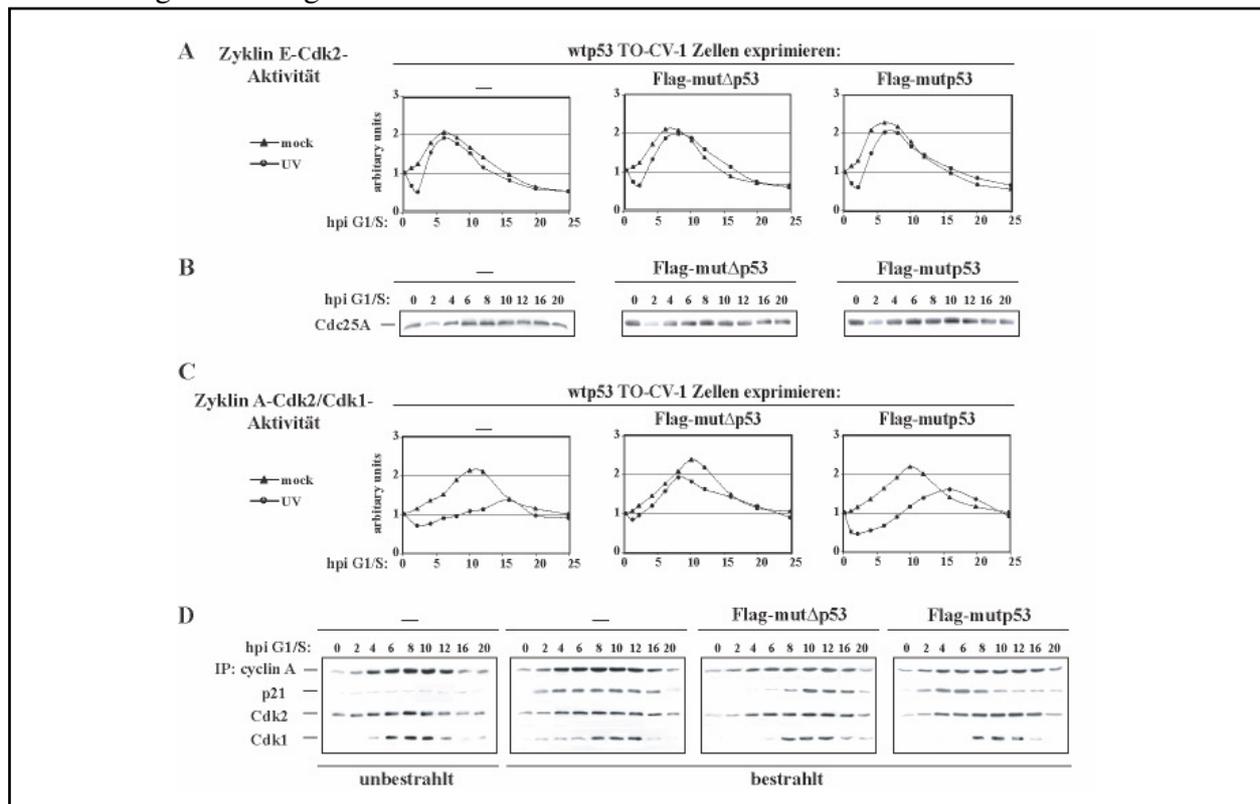


Abb. 5-26: Δp53 transaktiviertes p21 führt zur Reduktion der Zyklin A-Cdk2 Aktivität, während p53 transaktiviertes p21 die Zyklin A-Cdk1 Aktivität reduziert.

Synchronisierte, Dox-induzierte wtp53 TO-CV-1 Zellen, die den leeren Vektor (-), Flag-mutΔp53 oder Flag-mutp53 exprimieren, wurden am G1/S-Übergang (0) nicht (-) oder mit 10 J/m² bestrahlt, zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die Aktivitäten von Zyklin E-Cdk2 (A) und Zyklin A-Cdk2/Cdk1 (C) im „target-bound“-Histon-Kinaseaktivitätstest gemessen. (B) Die Expression der Zyklin E-Cdk2-aktivierenden Phosphatase Cdc25A wurde im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper analysiert. (D) Die Komplexierung von Zyklin A mit Cdk2, Cdk1 und p21 wurde im Western Blot mit spezifischen Antikörpern untersucht.

Nachdem die Reduktion der Zyklin A-Cdk2/1 Aktivität mit dem p53 Status der geschädigten Zellen korreliert ist es nahe liegend, dass der von Δp53 sowie p53 transaktivierte Cdk-Inhibitor p21 mittels Interaktion mit diesen Kinasen verantwortlich für deren temporäre Aktivitätsreduktion ist. Die Evaluierung der Komplexbildung zwischen p21 und den Zyklin

A-abhängigen Kinasen Cdk2 sowie Cdk1 zeigt, dass in bestrahlten wtp53 TO-CV-1-null Zellen dieser Komplex von zwei bis 16 Stunden nach Bestrahlung detektierbar ist (**Abb. 5-26D**, Spalte 2) und entspricht somit dem zeitlichen Verlauf der Reduktion dieser Kinaseaktivität (**Abb. 5-26C**, Spalte 2). Auffallend ist auch, im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen, der bis zu 16 Stunden anhaltende Zyklin A-Cdk2 Komplex und die um zwei Stunden verspätete Komplexbildung von Zyklin A mit der G2-fördernden Kinase Cdk1 (**Abb. 5-26D**, Spalte 1 und 2). Insgesamt gesehen zeigen diese Ergebnisse, dass wtp53 TO-CV-1 Zellen, die am G1/S-Übergang UV bestrahlt wurden, nicht nur die S-Phase attenuieren sondern auch vier Stunden später in die Mitose eintreten. Auch G1/S bestrahlte wtp53 TO-CV-1-Flag-mut Δ p53 und -Flag-mutp53 Zellen erhalten den Zyklin A-Cdk2 Komplex vier Stunden länger und bilden den Zyklin A-Cdk1 Komplex zwei Stunden später (**Abb. 5-26D**, Spalte 3 und 4). Jedoch interagiert in wtp53 TO-CV-1-Flag-mut Δ p53 Zellen p21 mit dem Kinasekomplex erst ab acht Stunden nach Bestrahlung und erklärt warum die Zyklin A-Cdk2/1 Aktivität in diesen Zellen während der ersten acht Stunden nicht reduziert wird (**Abb. 5-26C**, Spalte 2). In den Δ p53 inaktivierten TO-CV-1 Zellen interagiert p53 transaktiviertes p21 zehn Stunden nach Bestrahlung mit dem Zyklin A-Cdk2/1 Komplex (**Abb. 5-26D**, Spalte 3), wodurch die Aktivität dieser Kinase erst nach dem Durchlaufen der replikativen S-Phase in der G2-Phase reduziert wird (**Abb. 5-26C**, Spalte 2; **Abb. 5-25C**). Im Gegensatz dazu wirkt sich die dominant-negative Inaktivierung von wtp53 nicht negativ auf die Attenuation der S-Phasen Progression aus, da Δ p53 transaktiviertes p21 von zwei bis acht Stunden nach Bestrahlung die Aktivität von Zyklin A-Cdk2 stark reduziert (**Abb. 5-26D**, Spalte 4). Konsequenterweise führt in bestrahlten Zellen mit inaktiviertem wtp53 die fehlende p21 Expression zur schnelleren Reaktivierung von Zyklin A-Cdk1 (**Abb. 5-26C**, Spalte 3), wie dies auch aus den p21-freien Zyklin A-Cdk2/1 Komplexen zehn Stunden nach Bestrahlung ersichtlich ist (**Abb. 5-26D**, Spalte 4). Anders als bei den G1/S bestrahlten wtp53 TO-CV-1-Flag-mut Δ p53 Zellen, bei denen wt Δ p53 inaktiviert ist, hat die Inaktivierung von wtp53 keine Konsequenzen bezüglich der S-Phasen Attenuation und der sich anschließenden Zellzyklusprogression (**Abb. 5-25B**).

Insgesamt zeigen die erzielten Ergebnisse, dass Δ p53 transaktiviertes p21 die Aktivität der S-Phasen spezifischen Kinase Zylin A-Cdk2 reduziert und ist auf Grund dessen verantwortlich für die beobachtete Attenuation der S-Phasen Progression. Im Gegensatz dazu reduziert p53 transaktiviertes p21 die Aktivität der S/G2 und G2 spezifischen Kinase Zyklin A-Cdk1,

Befund, dass auch der Zeitpunkt der Cdc25C-katalysierten Dephosphorylierung des Tyrosinrests 15 und somit Aktivierung der Zyklin B assoziierten Cdk1 in den bestrahlten wtp53 TO-CV-1-Flag-mut Δ p53 Zellen wesentlich später erfolgt als in TO-CV-1 Zellen mit funktionellem Δ p53 (**Abb. 5-27B**). Demnach wird in Zellen, die über kein funktionsfähiges Δ p53 verfügen und auf Grund dessen den p53-unabhängigen ATR-intra-S-Phasen Kontrollpunkt nicht aufrecht erhalten können, die Zellzyklusprogression in G2 abgebremst. Anzumerken ist, dass in UV-bestrahlten wtp53 TO-CV-1-Flag-mut Δ p53 Zellen p53 transaktiviertes p21 nicht mit der Zyklin B-Cdk1 Kinase komplexiert und somit nicht zu deren Inaktivierung beiträgt (Daten nicht gezeigt). Zu klären bleibt, welche physiologische Implikation die S- bzw. G2-Phasen Attenuation für die genomische Integrität hat, die in UV-geschädigten G1/S Zellen in Abhängigkeit des p53 Status beobachtet wird.

5.9 Die Δ p53-vermittelte Attenuation der S-Phasen Progression ermöglicht die Entkopplung von Reparatur- und Replikationsereignissen UV-geschädigter Zellen

Die Aktivierung strahleninduzierter Kontrollpunkte führt in erster Linie zur Attenuation der Zellzyklusprogression und zur Mobilisierung der Reparaturereignisse, bevor die Zellen Richtung Mitose weiter progressieren. Wie die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen, ist die ATR-vermittelte Aktivierung des intra-S-Phasen Kontrollpunkts p53 und Δ p53 unabhängig, jedoch ist die Aufrechterhaltung des intra-S-Phasen Kontrollpunkts, die sich in Form einer Attenuation der Zellzyklusprogression bemerkbar macht, abhängig von transkriptionell aktivem Δ p53 und somit vom p53 Status der am G1/S-Übergang geschädigten Zellen. Anzunehmen ist, dass während der Attenuation der Zellzyklusprogression die Reparatur des geschädigten Genoms erfolgt, dessen qualitative Instandsetzung wiederum Einfluss auf die Zellzyklusprogression nimmt. Die Messung der Reparaturaktivität isogener induzierbarer wtp53 TO-CV-1 Zellen, die am G1/S-Übergang mit 10 J/m^2 geschädigt wurden, erfolgte mit der alkalischen Comet-Analyse, mit der DNA Einzelstrangbrüche nachgewiesen werden, die von dem NER Mechanismus herrühren. Allerdings erzeugen replikative Vorgänge wie auch der NER Mechanismus DNA Einzelstrangbrüche, die mit der Comet-Analyse erfasst werden (Olive und Banath, 1993). Deshalb wurde zur Unterscheidung zwischen replikations- und reparaturbedingten Strangbrüchen zusätzlich die DNA Replikation mittels ^3H -Thymidin-Einbau gemessen. Wie erwartet steigt in allen unbestrahlten wtp53 TO-CV-1 und in der parentalen Zelllinie wtp53 CV-1 die Inkorporation von ^3H -Thymidin sofort an und endet acht Stunden später, woraus hervorgeht, dass ausgehend vom G1/S-Übergang die replikative Phase in diesen Zellen unabhängig vom p53 Status immer acht Stunden beträgt (**Abb. 5-28**, linke

Spalten). Aus der Comet-Analyse ist ersichtlich, dass in den unbestrahlten Zellen während der S-Phase Strangbruch Signale auftreten, deren Beginn sowie Ende mit der gemessenen Replikationsaktivität korrelieren und somit auf aktive DNA Replikation zurückzuführen sind (Abb. 5-28, rechte Spalten).

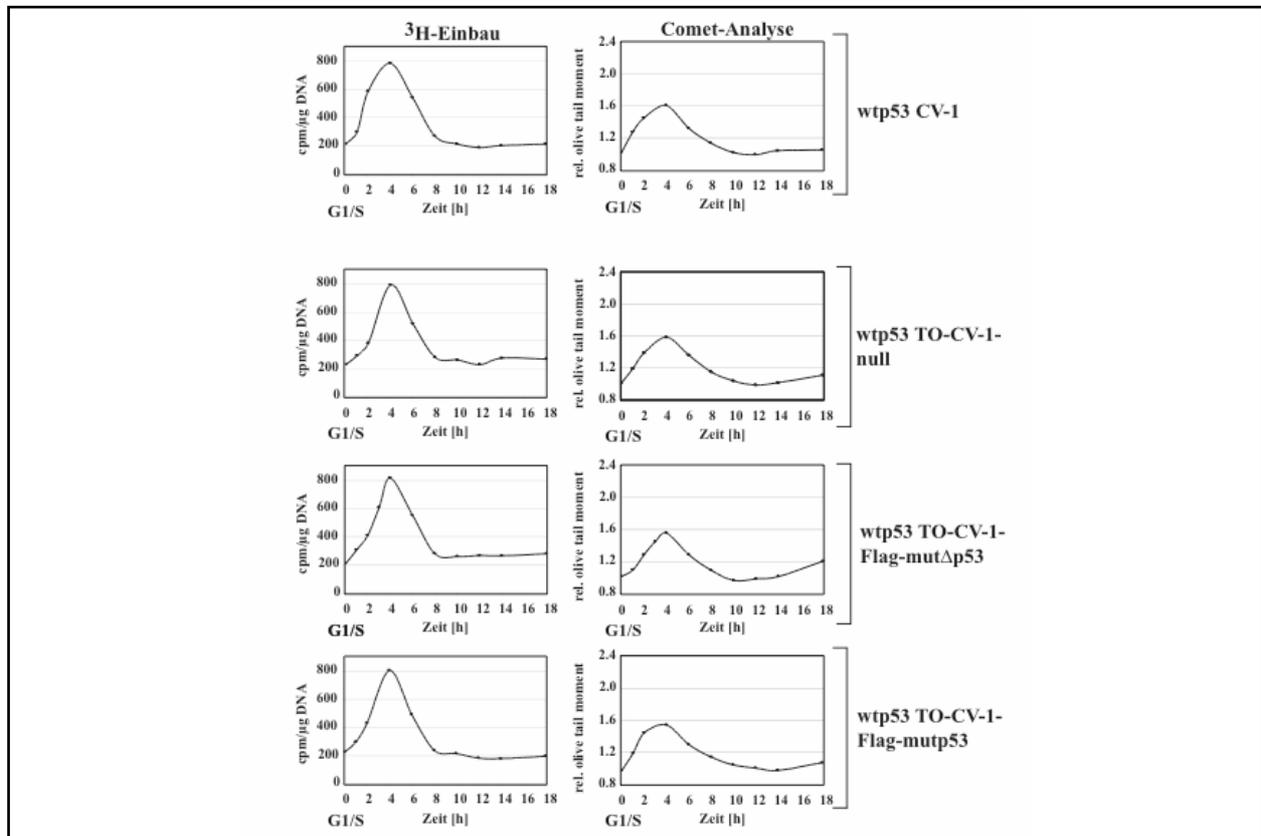


Abb. 5-28: Evaluierung der Replikationsereignisse mittels ^3H -Einbau und Comet-Analyse ausgehend vom G1/S-Übergang unbestrahlter wtp53 CV-1 sowie Dox-induzierter wtp53 TO-CV-1 Zellen. Synchronisierten wtp53 CV-1 sowie Dox-induzierte wtp53 TO-CV-1-null, -mut Δ p53 und -Flag-mutp53 Zellen wurden ausgehend vom G1/S-Übergang (0) zu den angegebenen Zeitpunkten für die Messung der Replikationsaktivität (^3H -Einbau) sowie Entstehung von replikationsbedingten DNA Strangbrüchen (alkalische Comet-Analyse) verwendet. Das Verhältnis von ^3H [cpm] zu DNA [μg] gibt die DNA Syntheserate an, während das Strangbruch-Signal mit dem „relative olive tail moment“ ermittelt wurde.

Die Messung der DNA Replikationsaktivität UV-bestrahlter wtp53 CV-1 und wtp53 TO-CV-1 Zellen zeigt im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen (Abb. 5-28), dass während der ersten zwei Stunden nach Bestrahlung die Replikation vollständig inhibiert und die Inkorporation von ^3H -Thymidin in den folgenden vier Stunden sehr gering ist (Abb. 5-29B, 1. Spalte links; UV-Daten für wtp53 CV-1 nicht gezeigt). Sechs Stunden nach Bestrahlung am G1/S-Übergang steigt der ^3H -Einbau rasch an und kommt sechs Stunden später zum Erliegen, woraus hervorgeht, dass die replikative S-Phase, die normalerweise acht Stunden beträgt, in den UV-bestrahlten wtp53 Zellen vier Stunden länger anhält. Auch in G1/S bestrahlten wtp53

TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen, in denen endogenes wtp53 dominant-negativ inaktiviert ist, beginnt die DNA Replikation erst sechs Stunden nach Bestrahlung und folglich ist die replikative S-Phase um vier Stunden verlängert (Abb. 5-29B, 3. Spalte links). Im Gegensatz dazu, ist die Replikation UV-bestrahlter, Dox-induzierter wtp53 TO-CV-1-Flag-mutΔp53 Zellen nur während der ersten zwei Stunden inhibiert und endet bereits acht Stunden nach erfolgter Bestrahlung am G1/S-Übergang (Abb. 5-29B, 2. Spalte links). Die Daten zeigen, dass in UV-bestrahlten Zellen mit inaktivem Δp53 die replikative S-Phase wie auch in den unbestrahlten Zellen acht Stunden beträgt und demnach der Beginn der DNA Replikation trotz Schädigung der DNA nicht verzögert wird.

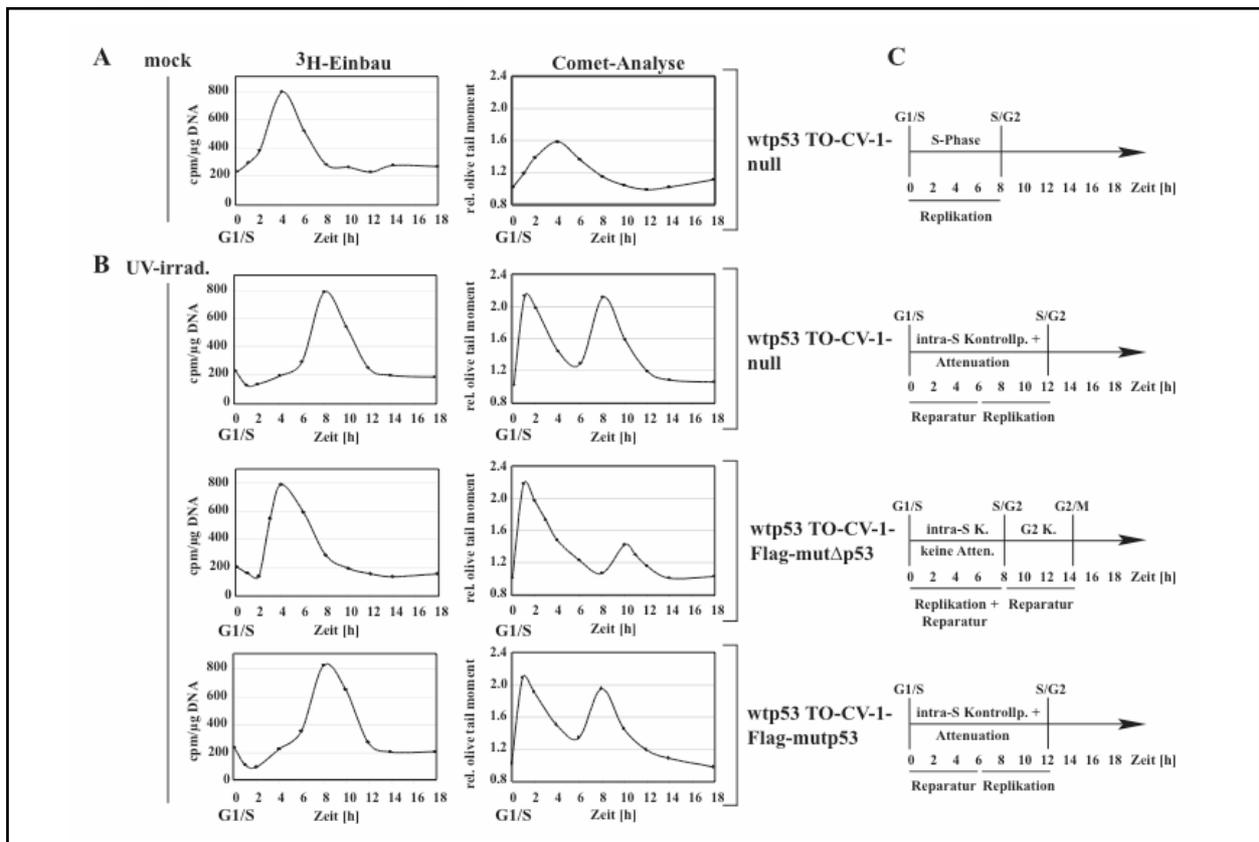


Abb. 5-29: Entkopplung von Reparatur und Replikation ist abhängig von funktionellem Δp53. (A) Synchronisierte, Dox-induzierte wtp53 TO-CV-1-null Zellen wurden am G1/S-Übergang nicht bestrahlt („mock“) oder mit 10 J/m^2 bestrahlt, und zu den angegebenen Zeitpunkten für die Messung der Replikations- (^3H -Einbau) sowie Reparaturaktivität (alkalische Comet-Analyse) verwendet. Das Verhältnis von ^3H [cpm] zu DNA [μg] gibt die DNA Syntheserate an, während das Strangbruch-Signal mit dem „relative tail moment“ ermittelt wurde. (B) Messung der ^3H -Einbaurrate für die Ermittlung der Replikationsaktivität und Ermittlung von Strangbrüchen mittels alkalischer Comet-Analyse Dox-induzierter wtp53 TO-CV-1-Flag-null, -mutΔp53 und -Flag-mutp53 Zellen, die am G1/S-Übergang mit 10 J/m^2 bestrahlt wurden, erfolgte wie unter A beschrieben. (C) Schematische Darstellung der Replikations- und Reparaturereignisse von Dox-induzierten wtp53 TO-CV-1 Zellen, die am G1/S-Übergang unbestrahlt bzw. mit 10 J/m^2 bestrahlt wurden in Abhängigkeit des p53 Status.

Insgesamt zeigen die gemessenen Replikationsaktivitäten G1/S bestrahlter wtp53 TO-CV-1 Zellen, dass unabhängig vom p53 Status die DNA Replikation für zwei Stunden inhibiert ist, während die Inhibition der DNA Replikation für weitere vier Stunden abhängig von funktionellem $\Delta p53$ ist. Demzufolge führt in Hinblick auf die gemessenen Cdk Aktivitäten UV-bestrahlter Zellen (**Abb. 5-26**) die p53/ $\Delta p53$ -unabhängige Inhibition der Zyklin E-Cdk2 Aktivität zur zweistündigen und die $\Delta p53$ -abhängige Reduktion der Zyklin A-Cdk2 Aktivität zur weiteren vierstündigen Inhibition der DNA Replikation.

Der sich um sechs Stunden verzögernde Beginn der DNA Replikation UV-geschädigter wt $\Delta p53$ exprimierender Zellen lässt vermuten, dass während dieser Zeit die Reparatur des geschädigten Genoms statt findet. Auf Grund dessen erfolgte die Evaluierung der DNA Reparaturaktivität mit der alkalischen Einzelzellgelelektrophorese, die die Entstehung reparaturbedingter einzelsträngiger DNA Brüche erfasst (Olive und Durand, 1992). In G1/S bestrahlten wtp53 TO-CV-1-null Zellen sind zwei deutliche DNA Strangbruch Signale detektierbar, deren Maxima eine Stunde und acht Stunden nach Bestrahlung auftreten (**Abb. 5-29B**, 1. Spalte rechts). Der Vergleich mit der ^3H -Einbaurrate zeigt, dass das zweite DNA Strangbruch Signal mit der Replikationsaktivität korreliert, während das erste nicht von dieser Aktivität stammt und folglich dem NER Vorgang entsprechen muss. Auch bestrahlte wtp53 TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen zeigen in der Comet-Analyse zwei Maxima zu den Zeitpunkten eine Stunde und acht Stunden nach Bestrahlung, wobei auch hier das zweite Strangbruch Signal von den Replikations- und das erste von den Reparaturereignissen stammt (**Abb. 5-29B**, 3. Spalte rechts). In den bestrahlten wtp53 TO-CV-1-Flag-mut $\Delta p53$ Zellen weist das Einzelstrangbruch Signal ebenfalls zwei Maxima auf, von denen jedoch das zweite zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt auftritt (**Abb. 5-29B**, 2. Spalte rechts). Dieses zweite Einzelstrangbruch Signal ist zwischen acht und zwölf Stunden nach Bestrahlung detektierbar und ist dementsprechend dem Zeitpunkt der G2-Phasen Attenuation zu zuordnen. Folglich sind mut $\Delta p53$ exprimierende Zellen nicht in der Lage die Replikation während der Reparaturphase zu inhibieren und müssen auf Grund dessen die geschädigte DNA im G2-Phasen Kontrollpunkt nachreparieren.

Die erzielten Ergebnisse zeigen zum ersten Mal, dass der UV-induzierte ATR-vermittelte intra-S-Phasen Kontrollpunkt zwei verschiedene und voneinander unabhängig regulierte Signalwege für die Entkopplung von Reparatur und Replikation aktiviert. Während der erste Signalweg unabhängig von p53 und $\Delta p53$ die Initiation der Replikation für nur zwei Stunden verzögert, ermöglicht der zweite Signalweg mittels der transkriptionellen Aktivität von $\Delta p53$

die Inhibition der DNA Replikation für weitere vier Stunden. Erst diese durch $\Delta p53$ hervorgerufenen Ereignisse erlauben UV-geschädigten S-Phase Primaten Zellen die vollständige Reparatur ihres Genoms und zwar noch vor Beginn der DNA Replikation.

5.10 γ -Bestrahlung am G1/S-Übergang führt zur sequenziellen Aktivierung des intra-S und G2 Kontrollpunkts

Aus den oben beschriebenen Untersuchungen bezüglich der Funktion von $\Delta p53$ in mit UV-Licht geschädigten wtp53 Zellen ging hervor, dass die Isoform ein essenzieller Bestandteil des ATR-aktivierten intra-S-Phasen Kontrollpunkts ist. Die Funktion von $\Delta p53$ in diesem Kontrollpunkt bezieht sich auf die Transaktivierung des *p21*-Promoters, dessen Genprodukt mit der S-phasen spezifischen Kinase Zyklin A-Cdk2 komplexiert und somit deren Aktivität, die einerseits für die Progression durch die S-Phase und andererseits für die DNA Replikation essenziell ist, stark reduziert. Um zu untersuchen, inwieweit p53 und die neue Spleißvariante $\Delta p53$ an den γ -induzierten Schadensreaktionen beteiligt sind, wurden synchronisierte wtp53 CV-1 und Dox-induzierte wtp53 TO-CV-1 Zellen am G1/S-Übergang mit einer subletalen Dosis an γ -Strahlung (2 Gy) geschädigt und zunächst die Aktivierung des γ -induzierten ATM-vermittelten Kontrollpunkts in der Western Blot Analyse überprüft. Wie erwartet erfolgt unmittelbar nach Bestrahlung unabhängig vom p53 Status die autokatalysierte Phosphorylierung von ATM an Serin-1981, die bis zum Eintritt der Zellen in die Mitose anhält (**Abb. 5-30A, B, C**, Spalte 1). Nur in mut $\Delta p53$ exprimierenden TO-CV-1 Zellen zeigt das Phosphorylierungsmuster von ATM einen auffallend biphasischen Verlauf zu den Zeitpunkten zwei Stunden und zehn Stunden nach Bestrahlung (**Abb. 5-30C**, linke Spalte), wobei der spätere Zeitpunkt die Aktivierung eines verstärkten G2-Kontrollpunkts indiziert. Wie die Western Blot Analyse zeigt führt aktiviertes ATM zur Phosphorylierung der schadenspezifischen Kinase Chk2, die von eins bis sechs bzw. acht Stunden nach Bestrahlung in allen wtp53 TO-CV-1 Zellen gut zu detektieren ist (**Abb. 5-30A, B, C**, linke Spalte). Um zu untersuchen, inwieweit p53 und die neue Spleißvariante $\Delta p53$ an den γ -induzierten Schadensreaktionen beteiligt sind, wurden diese Proteine zunächst im Western Blot analysiert. Als zentrale Kennzeichen einer Aktivierung von p53 und $\Delta p53$ gelten die Stabilisierung auf Proteinebene sowie die Phosphorylierung durch die PIK Kinase ATM an Serin-15. Die Analyse der ATM Substrate p53 und $\Delta p53$ zeigt, dass die Stabilisierung beider p53 Proteine sowie deren Phosphorylierung am Serinrest 15 unabhängig voneinander reguliert werden. In den 2 Gy bestrahlten wtp53 CV-1 Zellen ist stabilisiertes p53 nur von ein bis acht und

stabilisiertes $\Delta p53$ von zwei bis sechs Stunden phosphoryliert (Abb. **5-30A**, rechte Spalte). Auch in mutp53 exprimierenden TO-CV-1 Zellen ist $\Delta p53$ zu diesem Zeitpunkt an Serin-15 phosphoryliert, jedoch sind durch die Expression von mutp53 beide p53 Proteine durchgehend stabilisiert und ektopisch exprimiertes Flag-mutp53 bleibt auf Grund seiner mutationsbedingten sehr hohen Halbwertszeit bis zum Ende des Beobachtungszeitraums an Serin-15 phosphoryliert (Abb. **5-30B**, rechte Spalte). Ein anderes Bild ergibt sich bei der Betrachtung der Western Blot Analyse von mut $\Delta p53$ exprimierenden TO-CV-1 Zellen, in denen wie erwartet Flag-mut $\Delta p53$ wie auch endogenes wt $\Delta p53$ unabhängig von der γ -Strahlung immer stabilisiert sind, jedoch kann mit dieser Western Blot Analyse nicht festgestellt werden inwieweit Flag-mut $\Delta p53$ auch die p53 Stabilisierung beeinflusst, da beide Proteine in der SDS-Gelelektrophorese auf gleicher Höhe laufen. Auffallend ist, dass in den Flag-mut $\Delta p53$ exprimierenden Zellen das Signal der Serin-15 Phosphorylierung biphasisch ist und zum späteren Zeitpunkt, der dem G2-Kontrollpunkt entspricht, mit der erneuten Phosphorylierung von ATM korreliert (Abb. **5-30C**, rechte Spalte). Die kurze Phosphorylierungszeit von p53 und $\Delta p53$ unmittelbar nach Bestrahlung indiziert die fehlgeschlagene Aktivierung des $\Delta p53$ -abhängigen intra-S-Phasen Kontrollpunkts, wobei die erneute Aktivierung von p53 zehn Stunden nach Bestrahlung eine verstärkte Attenuation der G2-Phasen Progression impliziert.

Die Überprüfung der erfolgten Aktivierung der p53 Proteine anhand der Induktion des gemeinsamen Zielgens *p21* zeigt die Induktion des Cdk-Inhibitors in wtp53 CV-1 Zellen bereits zwei Stunden nach Bestrahlung, die sich deutlich zehn Stunden nach Bestrahlung und somit kurz vor dem Eintritt der Zellen in die Mitose reduziert (Abb. **5-30A**, rechte Spalte). In Zellen mit dominant-negativ inaktiviertem endogenen wtp53 wird p21 nur von zwei bis sechs Stunden nach Bestrahlung am G1/S-Übergang exprimiert, während nach Inaktivierung von $\Delta p53$ die p21 Hochregulation von acht bis zwölf Stunden nach Bestrahlung erfolgt (Abb. **5-30B, C**, rechte Spalten). Insgesamt zeigt dieses Experiment, dass in 2 Gy bestrahlten G1/S Zellen wie auch in UV-bestrahlten Zellen unmittelbar nach DNA Schädigung $\Delta p53$ verantwortlich für die p21 Expression ist, während p53 erst ab acht Stunden nach Bestrahlung den Cdk-Inhibitor p21 induziert. Auffallend ist, dass in den bestrahlten wtp53 TO-CV-1-Flag-mut $\Delta p53$ Zellen der Cdk-Inhibitor zwei Stunden länger exprimiert wird als in den $\Delta p53$ exprimierenden wtp53 CV-1 Zellen. Dieser Befund weist darauf hin, dass G1/S bestrahlte Zellen ohne funktionellen intra-S-Phasen Kontrollpunkt mittels p53-transaktiviertem p21 die Progression durch die G2-Phase attenuieren.

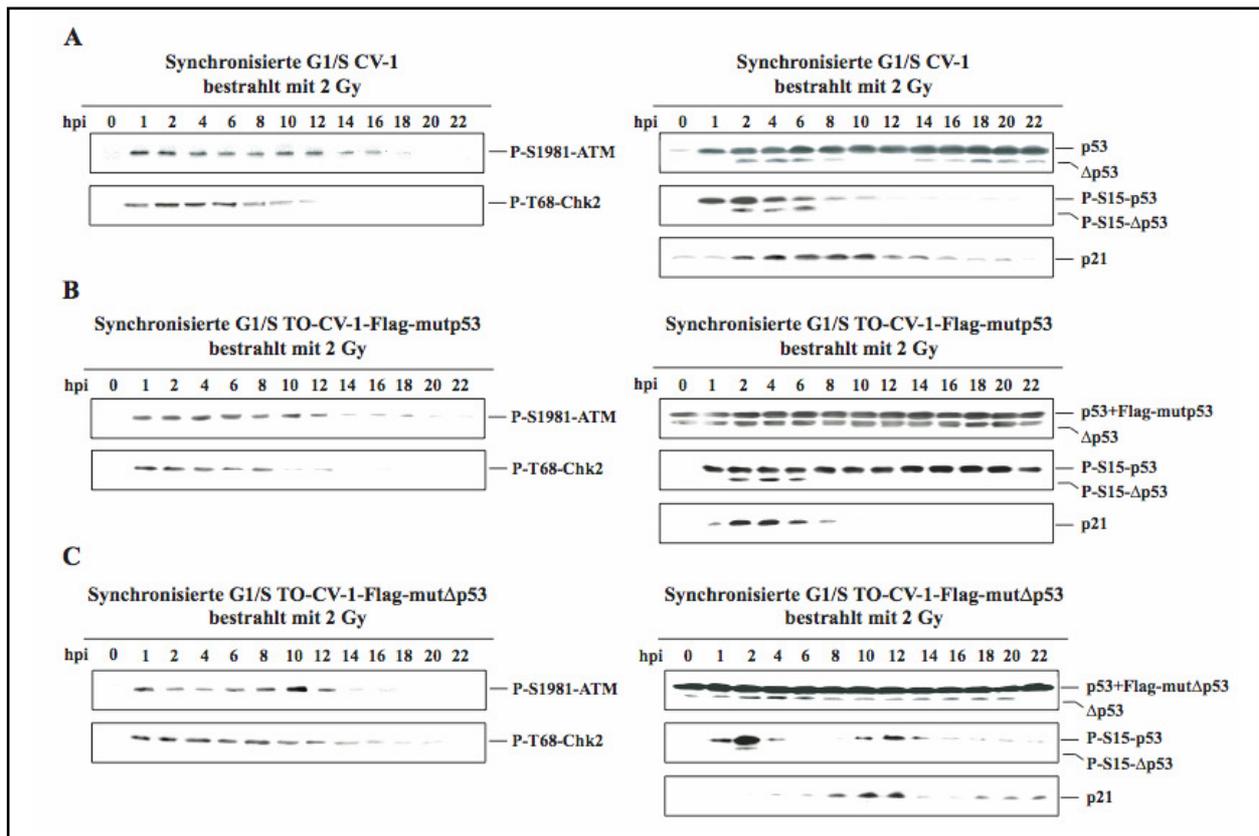


Abb. 5-30: Analyse der p53 Proteine sowie des p53-induzierbaren Genprodukts p21 nach strahleninduzierter Aktivierung der ATM-Signalkaskade in Abhängigkeit des p53 Status. Synchronisierte wtp53 CV-1 (A) sowie Dox-induzierte wtp53 TO-CV-1-Flag-mutp53 (B) und -Flag-mutΔp53 (C) Zellen wurden am G1/S-Übergang mit 2 Gy bestrahlt, zu den angegebenen Zeiten nach Bestrahlung (hpi) geerntet und in einer Western Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern untersucht. Bestrahlung mit 2 Gy führt zur Phosphorylierung von ATM, Chk2, zur Stabilisierung und Phosphorylierung von p53 und Δp53. Stabilisierung und Aktivierung von p53 und Δp53 führen zur Hochregulation des Cdk-Inhibitors p21. Dominant-negative Inaktivierung von endogenem wtΔp53 oder wtp53 führt zu Veränderungen der Phosphorylierung von ATM, p53, Δp53 und p21 Expression.

Die Frage, ob in wtp53 Zellen, die am G1/S-Übergang mit 2 Gy bestrahlt werden, wie auch in UV-bestrahlten wtp53 Zellen, die Transkriptionsfaktoren Δp53 und p53 den *p21*-Promoter sequenziell transaktivieren, beantwortete sich durch die Verwendung der induzierbaren wtp53 TO-CV-1-Flag Zelllinien. Der direkte Nachweis erfolgte durch Chromatin-Immunpräzipitation, mit der die Interaktion von p53 bzw. Δp53 mit dem Promoter des p53-induzierbaren Zielgens *p21* *in vivo* analysiert werden kann. Die Assoziation von p53 bzw. Δp53 koimmunpräzipitierter Promoter-DNA wurde durch PCR-Amplifikation unter Verwendung von Promoter-spezifischen „primern“ analysiert. **Abb. 5-31** zeigt die Interaktion von p53 und Δp53 koimmunpräzipitierter Promoter-DNA in wtp53 CV-1, „type II“ mutp53 SW480 und den isogenen, Dox-induzierten wtp53 TO-CV-1-Flag Zellen, die am G1/S-Übergang mit 2 Gy bestrahlt wurden. Für den Nachweis der sequenziellen Interaktion von p53

und $\Delta p53$ mit dem *p21*- Promoter wurde die ChIP jeweils zu einem frühen (3 hpi) und einem späten (7 hpi) Zeitpunkt nach γ -Bestrahlung am G1/S-Übergang durchgeführt. Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, bindet drei Stunden nach Bestrahlung ausschließlich $\Delta p53$ an den *p21*-Promoter, während sieben Stunden nach Schädigung der DNA am G1/S-Übergang p53 mit dem Promoter assoziiert. Die Befunde bestätigen, dass auch γ -Bestrahlung am G1/S-Übergang zur sequenziellen Aktivierung von $\Delta p53$ und p53 führt, wobei der *p21*-Promoter zunächst von $\Delta p53$ und anschließend von p53 transaktiviert wird.

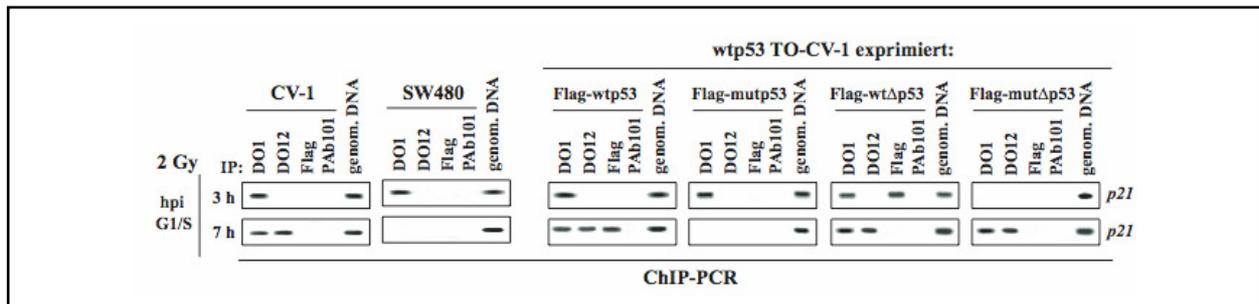


Abb. 5-31: ChIP-PCR von Zellen, die am G1/S-Übergang geschädigt wurden, zeigen differenzielle Promoterbindung von $\Delta p53$ und p53 in Abhängigkeit des Zeitpunkts der Schadensapplikation. Synchronisierte wtp53 CV-1, „type II“ mutp53 SW480 und induzierbare wtp53 TO-CV-1-Flag Zellen, die nach Zugabe von Dox Flag-wtp53, Flag-mutp53, Flag-wt $\Delta p53$ oder Flag-mut $\Delta p53$ exprimieren, wurden nach Bestrahlung am G1/S-Übergang mit 2 Gy zu den angegebenen Zeitpunkten mit Formaldehyd behandelt und einer ChIP-Analyse unterzogen. Für die Chromatin-Immünpräzipitation wurden die folgenden monoklonalen Antikörper verwendet: Anti-Flag, erkennt ektopisch exprimierte Flag-markierte p53 und $\Delta p53$ Proteine; DO1, erkennt p53 und $\Delta p53$; DO12, erkennt nur p53; PAb101 ist T-Ag spezifisch und erkennt keine p53 Proteine. Der p53 bzw. $\Delta p53$ assoziierte *p21*-Promoter wurde mit spezifischen „primern“ durch PCR amplifiziert und im Agarosegel mit Ethidium Bromid gefärbt. Genomische DNA wurde als Größenmarker eingesetzt.

Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass auch in γ -bestrahlten wtp53 Zellen der Cdk Inhibitor p21 mit Zyklin A-Cdk2/Cdk1 komplexiert. Dabei interagiert p21 mit den Zyklin A-abhängigen Kinasen Cdk2 ab zwei bzw. mit Cdk1 ab sechs Stunden nach Bestrahlung am G1/S-Übergang (**Abb. 5-32A**, rechte Spalte). Die Verwendung der induzierbaren wtp53 TO-CV-1-Flag Zelllinien macht deutlich, dass von zwei bis ca. sechs Stunden nach Bestrahlung ausschließlich $\Delta p53$ -transaktiviertes p21 an die S-Phase-spezifische Zyklin A-Cdk2 bindet (**Abb. 5-32B**, linke Spalte), während ab sechs Stunden nach Bestrahlung p53-transaktiviertes p21 mit der spät-S- bzw. S/G2-Phase-spezifischen Zyklin A-Cdk1 interagiert (**Abb. 5-32B**, rechte Spalte). Obwohl die Entstehung der Zyklin A-Cdk Komplexe in unbestrahlten und γ -bestrahlten Zellen identisch ist, bleiben diese Protein-Komplexe in den γ -bestrahlten Zellen zwei Stunden länger erhalten, woraus geschlossen werden kann, dass der Eintritt in die Mitose sich um zwei Stunden verzögert.

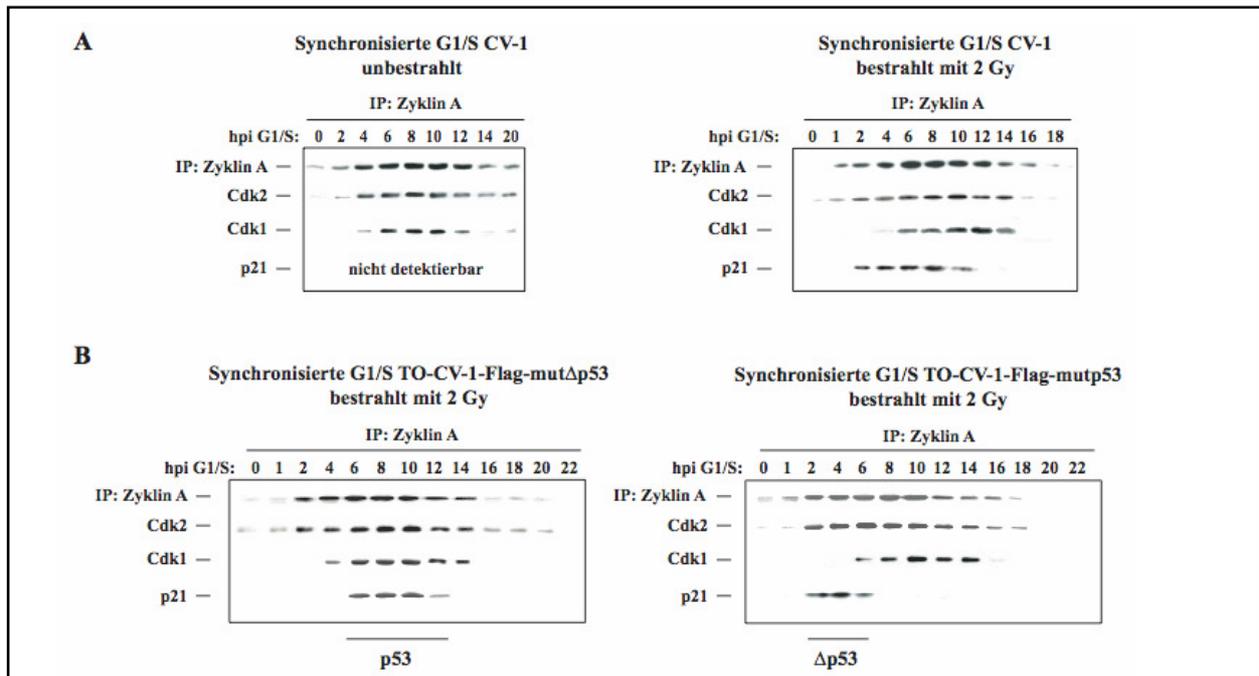


Abb. 5-32: In wtp53 CV-1 Zellen, die am G1/S-Übergang mit 2 Gy bestrahlt werden, interagiert der Cdk-Inhibitor p21 mit den Zyklin A-Cdk Komplexen. Synchronisierte wtp53 CV-1 Zellen (**A**) und Dox-induzierte wtp53 TO-CV-1 Zellen, die Flag-mut Δ p53 oder Flag-mutp53 exprimieren (**B**), wurden am G1/S-Übergang (0) mit 2 Gy bestrahlt bzw. im Falle von CV-1 unbestrahlt belassen, zu den angegebenen Zeitpunkten (hpi) geerntet und in einer Western Blot Analyse die Komplexbildung von Zyklin A mit Cdk2, Cdk1 und p21 mit spezifischen Antikörpern untersucht.

Der Eintritt der Zellen in die replikative S-Phase, die S-Phasen Progression und der Übergang der Zellen in die Mitose vorbereitende G2-Phase sind gekennzeichnet durch die sequenzielle Bildung sowie Aktivierung der Zyklin-abhängigen Kinasen Zyklin E-Cdk2, Zyklin A-Cdk2 und -Cdk1, wobei die Aktivierung der Cdk2 Kinasen durch die Cdc25A- und die der Cdk1 Kinasen durch die Cdc25C-katalysierte Dephosphorylierung der katalytischen Untereinheit der entsprechenden Kinase erfolgt. Zur Überprüfung der Cdk-Aktivitäten wurden synchronisierte wtp53 CV-1 sowie die induzierten wtp53 TO-CV-1-Flag-mutp53/mut Δ p53 Zellen am G1/S Übergang mit 2 Gy bestrahlt und die Aktivität der Cdks im „target-bound“-Histon-Kinaseaktivitätstest gemessen. Für das Kontrollexperiment zur Bestimmung der Cdk-Aktivitäten wurden die entsprechenden am G1/S-Übergang synchronisierten, unbestrahlten Zellen verwendet. Die Messung der Zyklin E-Cdk2 Aktivität zeigt, dass in allen unbestrahlten Zellen sechs Stunden nach dem G1/S-Übergang die Aktivität der Kinase ihr Maximum erreicht und im Laufe der S-Phasen Progression kontinuierlich abnimmt (**Abb. 5-33A**). Zur gleichen Zeit steigt die für die S-Phasen Progression sowie für den S/G2-Übergang essenzielle Zyklin A-Cdk2 bzw. Zyklin A-Cdk1 Aktivität kontinuierlich an, erreicht ihr Maximum acht bis zehn Stunden nach dem G1/S-Übergang und kehrt vier Stunden später auf das

Ausgangsniveau zurück (**Abb. 5-33B**). Die für die Mitose essenzielle Aktivität von Zyklin B-Cdk1 erreicht ihr Maximum zwei Stunden später als Zyklin A-Cdk2/1 und zwar genau zu dem Zeitpunkt, bei dem die Zellen durch die Mitose gehen (**Abb. 5-33C**, wtp53 TO-CV-1 Zellen ohne Abb.).

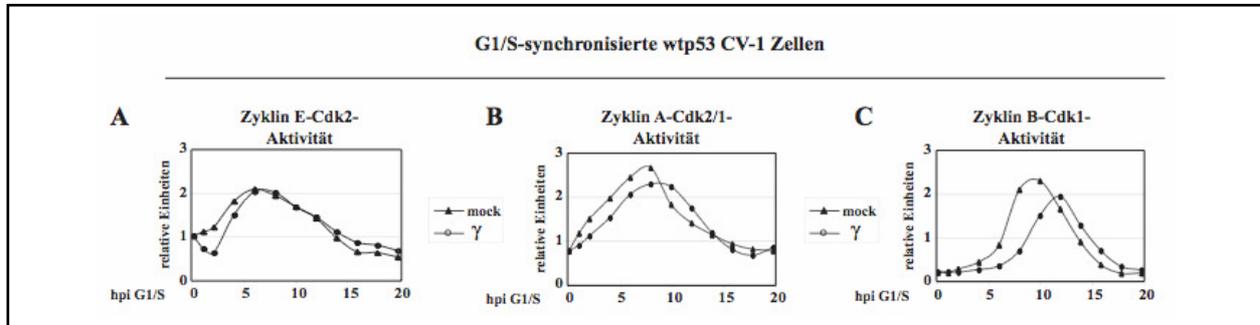


Abb. 5-33: Wtp53 CV-1 Zellen, die am G1/S-Übergang mit 2 Gy bestrahlt werden, zeigen Veränderungen in den Cdk-Aktivitäten. Synchronisierte CV-1 Zellen wurden am G1/S-Übergang (0) mit 2 Gy bestrahlt oder unbestrahlt belassen, zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die Cdk-Aktivitäten im „target-bound“-Histon-Kinaseaktivitätstest gemessen. Bestrahlung mit 2 Gy reduziert die Zyklin E-Cdk2 (**A**) sowie Zyklin A-Cdk2/1 (**B**) Aktivität und verzögert somit die Aktivierung der Mitose-fördernden Zyklin B-Cdk1 Aktivität um 2 h (**C**).

Aus der Western Blot Analyse von 2 Gy bestrahlten wtp53 CV-1 sowie induzierten TO-CV-1 Zellen geht hervor, dass unmittelbar nach DNA Schädigung am G1/S-Übergang die Zyklin E-Cdk2 aktivierende Phosphatase Cdc25A degradiert, aber bereits ab zwei bis vier Stunden wieder stabilisiert ist (**Abb. 5-26B**, **Abb. 5-34**). Dieses Ergebnis zeigt, dass auch nach γ -Bestrahlung von Zellen, die sich am G1/S-Übergang befinden, unabhängig vom *p53* Status die ATM-abhängige Initiation der S-Phasen Schadensantwort mittels Aktivierung der Chk2 Kinase erfolgt, deren enzymatische Aktivität zur Degradation der Zyklin E-Cdk2 aktivierenden Phosphatase Cdc25A führt. Die daraus resultierende Inhibition der Zyklin E-Cdk2 Aktivität, die für den Eintritt in die replikative S-Phase essenziell ist, führt wie auch bei UV Strahlung zur kurzfristigen Attenuation der Zellzyklusprogression (**Abb. 5-33A**).

In mit 2 Gy bestrahlten G1/S Zellen zeigt die Messung der Zyklin A-Cdk2/1 Aktivitäten eine deutliche Reduktion, die mit der Interaktion des Cdk-Inhibitors p21 und folglich mit dem *p53* Status korreliert. Im Unterschied zu UV-bestrahlten wtAp53 exprimierenden Zellen ist in γ -bestrahlten wtp53 CV-1 sowie wtp53 TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen die Reduktion der Cdk2 Aktivität weniger ausgeprägt und nur von kurzer Dauer, während in mutAp53 Zellen diese Aktivität überhaupt nicht reduziert wird (**Abb. 5-33A**, wtp53 TO-CV-1 Zellen ohne Abb.). Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, dass

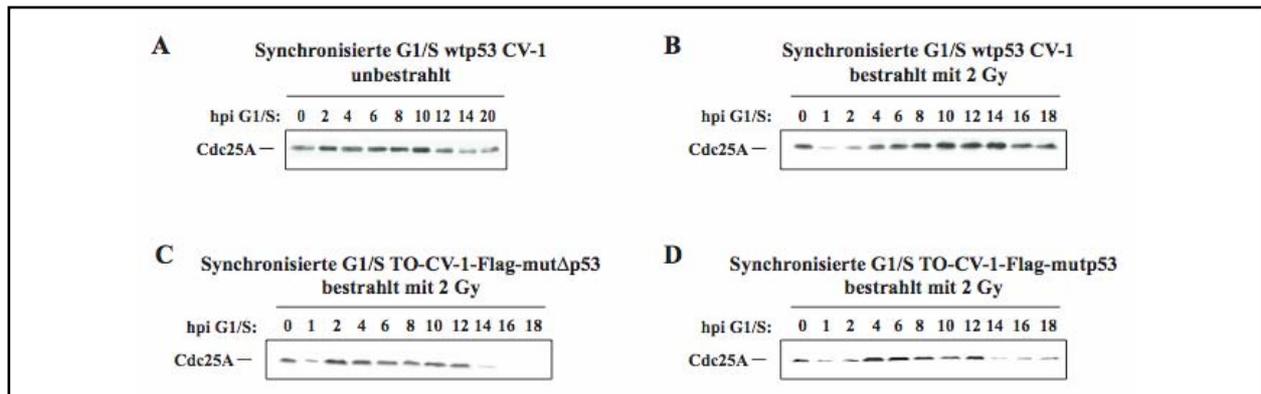


Abb. 5-34: Evaluierung der Cdc25A Expression in 2 Gy bestrahlten G1/S Zellen in Abhängigkeit des *p53* Status. Synchronisierte wtp53 CV-1 Zellen (A) und Dox-induzierte wtp53 TO-CV-1 Zellen, die Flag-mut Δ p53 (C) oder Flag-mutp53 exprimieren (D), wurden am G1/S-Übergang (0) mit 2 Gy bestrahlt bzw. im Falle von CV-1 unbestrahlt belassen (B), zu den angegebenen Zeitpunkten (hpi) geerntet und in einer Western Blot Analyse die Expression der Zyklin E-Cdk2 aktivierenden Phosphatase Cdc25A mit einem spezifischen Antikörper untersucht.

eine subletale Schädigung durch γ -Strahlung im Gegensatz zur UV-Strahlung sich nicht gravierend auf das Proliferationsverhalten auswirkt. Jedoch reicht die kurzfristige Δ p53-vermittelte Reduktion der Zyklin A-Cdk2 Aktivität aus, um die Progression der S-Phase und konsequenterweise den Eintritt in die G2-Phase zu verzögern. Diese Annahme wird unterstützt durch den Befund, dass auch der Zeitpunkt der Aktivierung des Zyklin B-Cdk1 Komplexes im Vergleich zu unbestrahlten Zellen sich in 2 Gy bestrahlten Zellen nur um zwei Stunden verzögert (Abb. 5-33C). Darüber hinaus ist in unbestrahlten und 2 Gy bestrahlten wtp53 CV-1 und mutp53 exprimierenden TO-CV-1-Flag Zellen die inhibitorische Tyrosin-15 Phosphorylierung von Cdk1 genau zu dem Zeitpunkt (10 hpi) entfernt, bei dem die Zellen Richtung Mitose gehen. Die Dephosphorylierung und somit Aktivierung von Cdk1 erfolgt durch die Cdk1-aktivierende Phosphatase Cdc25C, deren strahleninduzierte inhibitorische Phosphorylierung an Serin-216 zehn Stunden nach Bestrahlung aufgehoben ist (Abb. 5-35B, D). Demnach liegt in 2 Gy bestrahlten CV-1 und TO-C-1-Flag-mutp53 Zellen die Ursache der verzögerten Aktivierung des Mitose-fördernden Komplexes in der zweistündigen verspäteten Aktivierung der Zyklin A-Cdk2/1 Kinase, deren Aktivierung grundsätzlich der von Zyklin B-Cdk1 vorausgehen muss. Ein anderes Bild entsteht, wenn wtp53 TO-C-1-Flag-mut Δ p53 Zellen am G1/S-Übergang mit 2 Gy geschädigt werden: Chk2-katalysierte Phosphorylierung und somit Inaktivierung der Cdk1-aktivierenden Phosphates Cdc25C erfolgt zwei Stunden später als in wt Δ p53 exprimierenden Zellen, hält dementsprechend auch länger an und verzögert die Aktivierung von Cdk1 konsequenterweise um zwei Stunden (Abb. 5-35C).

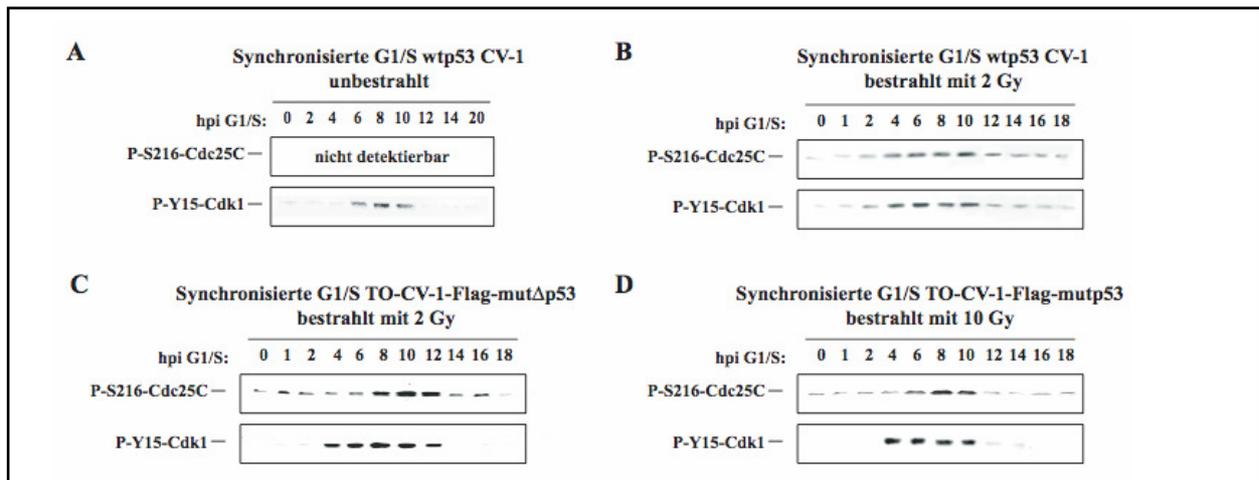


Abb. 5-35: Evaluierung der strahleninduzierten Phosphorylierung von Cdc25C und Cdk1 2 Gy bestrahlter G1/S Zellen in Abhängigkeit des *p53* Status. Synchronisierte wtp53 CV-1 Zellen (A) und Dox-induzierte wtp53 TO-CV-1 Zellen, die Flag-mutΔp53 (C) oder Flag-mutp53 exprimieren (D), wurden am G1/S-Übergang (0) mit 2 Gy bestrahlt bzw. im Falle von CV-1 unbestrahlt belassen (B), zu den angegebenen Zeitpunkten (hpi) geerntet und in einer Western Blot Analyse die Expression von P-S216-Cdc25C sowie P-Y15-Cdk1 mit spezifischen Antikörpern untersucht.

Dieses Resultat impliziert, dass γ -bestrahlte mutΔp53 Zellen, die den ATM-initiierten intra-S-Phasen Kontrollpunkt nicht aufrechterhalten können, den G2 Kontrollpunkt verstärken. Dieser Befund reflektiert auch das schadeninduzierte Proliferationsverhalten UV-bestrahlter mutΔp53 Zellen, die auf Grund der fehlenden intra-S-Phasen Attenuation den G2 Kontrollpunkt aktivieren.

Der zeitliche Verlauf der Formation und Dissoziation des Zyklin B-Cdk1 Komplexes erfolgt in unbestrahlten bzw. 2 Gy bestrahlten CV-1 und bestrahlten TO-C-1-Flag-mutΔp53 sowie Flag-mutp53 Zellen identisch (Abb. 5-36). Dieser Befund korreliert mit der Beobachtung, dass eine Bestrahlung mit 2 Gy sich nicht gravierend auf das Proliferationsverhalten auswirkt. Auffallend jedoch ist, dass im Gegensatz zu den wtp53 CV-1 Zellen in den bestrahlten mutΔp53 exprimierenden TO-CV-1 Zellen Zyklin B-Cdk1 mit p53 transaktiviertem p21 acht Stunden nach Bestrahlung am G1/S-Übergang interagiert und dieser Komplex bis kurz vor dem Eintritt der Zellen in die Mitose erhalten bleibt (Abb. 5-36B). Die schadeninduzierte Interaktion des Cdk-Inhibitors p21 mit Zyklin B-Cdk1 in mutΔp53 Zellen ist ein Indiz dafür, dass der *p53* Status der geschädigten Zelle Einfluss auf die ATM-Signalkaskade und somit Qualität des G2 Kontrollpunkts nimmt. Des Weiteren weist dieser Befund darauf hin, dass sowohl in 2 Gy bestrahlten als auch in UV bestrahlten G1/S Zellen der intra-S-Phasen Kontrollpunkt eine wichtige Funktion bei der Erhaltung der genomischen Integrität haben muss.

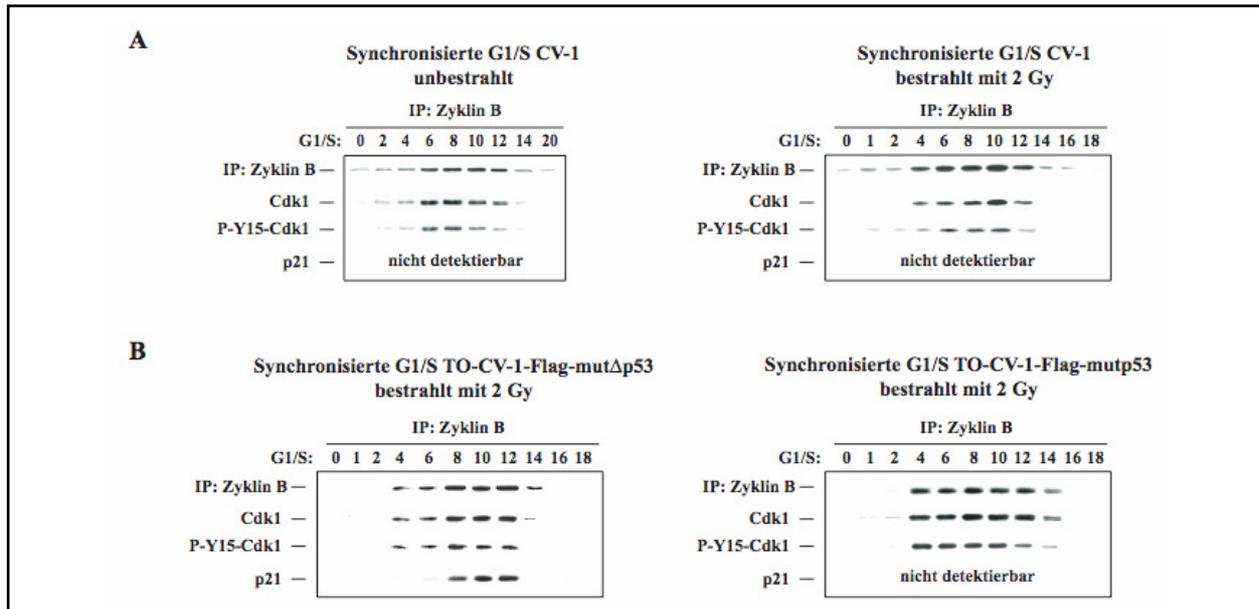


Abb. 5-36: In wtp53 TO-CV-1-Flag-mutΔp53 Zellen, die am G1/S-Übergang mit 2 Gy bestrahlt werden, interagiert der Cdk-Inhibitor mit Zyklin B-Cdk1. Synchronisierte wtp53 CV-1 Zellen (A) und Dox-induzierte wtp53 TO-CV-1 Zellen, die Flag-mutΔp53 oder Flag-mutp53 exprimieren (B), wurden am G1/S-Übergang (0) mit 2 Gy bestrahlt bzw. im Falle von CV-1 unbestrahlt belassen (A), zu den angegebenen Zeitpunkten (hpi) geerntet und in einer Western Blot Analyse die Komplexbildung von Zyklin B mit Cdk1, P-Y15-Cdk1 und p21 mit spezifischen Antikörpern untersucht.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen 2 Gy bestrahlter Zellen, dass unmittelbar nach Erzeugung von DNA Doppelstrangbrüchen am G1/S-Übergang die ATM-vermittelte, Δp53-abhängige Schadensantwort zur Attenuation der S-Phasen Progression führt, während in Abwesenheit von funktionellem Δp53 ein verstärkter G2 Kontrollpunkt auftritt. Diese strahleninduzierte Schadensreaktion zeigt sich auch in der FACS-Analyse 2 Gy bestrahlter, Dox-induzierter wtp53 TO-CV-1 Zellen. In allen unbestrahlten, Dox-induzierten wtp53 TO-CV-1 Zellen ist die replikative S-Phase ausgehend vom G1/S-Übergang acht Stunden später abgeschlossen und nach einer vierstündigen G2-Phasen Progression treten die Zellen in die mitotische Phase ein, die an dem für asynchron wachsende Zellen charakteristischen entsprechendem Zellzyklusprofil erkennbar ist (Abb. 5-37, Zeitpunkt 12 hpi). Demnach dauert in allen „mock“ behandelten wtp53 TO-CV-1 Zellen, ausgehend vom G1/S-Übergang, die Zellzyklusprogression bis zum Beginn der ca. dreißigminütigen Zellteilung zwölf Stunden. Im Gegensatz dazu, attenuieren am G1/S-Übergang bestrahlte wtp53 TO-CV-1-null und -Flag-mutp53 Zellen bis sechs Stunden nach Bestrahlung die S-Phasen Progression, gefolgt von einer moderaten G2-Phasen Attenuation, die in wtp53 CV-1-null Zellen bis zehn Stunden (Abb. 5-37A) und in wtp53 TO-CV-1-mutp53 Zellen bis acht

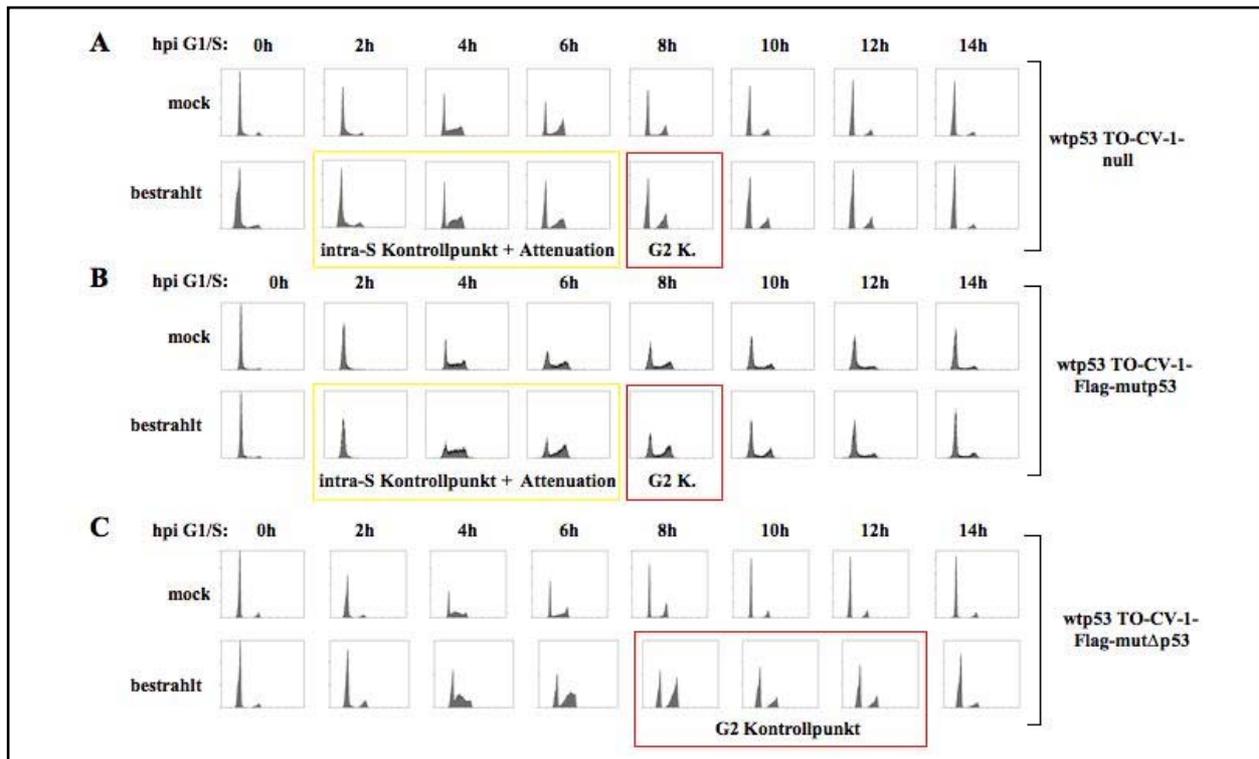


Abb. 5-37: FACS-Analyse Isoleucin-synchronisierter, Dox-induzierter wtp53 TO-CV-1 Zellen, die am G1/S-Übergang mit 2 Gy bestrahlt wurden. Ausgehend vom G1/S-Übergang (0 h) wurden unbestrahlte („mock“) sowie bestrahlte Zellen 14 h lang weiter kultiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen mit Ethanol fixiert und mit Propidium gefärbt. Bei der durchflusscytometrischen Analyse zur Bestimmung des DNA Gehalts wurden je 10.000 Zellen erfasst. **(A)** TO-CV-1-null Zellen, die endogenes wtp53 und $\Delta p53$ exprimieren attenuieren die S- sowie G2-Phasen Progression. **(B)** TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen, die endogenes wtp53 dominant-negativ inaktivieren, attenuieren die S- und G2-Phasen Progression. **(C)** TO-CV-1-Flag-mut $\Delta p53$ Zellen, die endogenes wt $\Delta p53$ dominant-negativ inaktivieren können die S-Phase nicht attenuieren aber aktivieren den G2-Kontrollpunkt.

Stunden nach Bestrahlung detektierbar ist (**Abb. 5-37B**). Bereits 14 bzw. zwölf Stunden nach 2 Gy Bestrahlung am G1/S-Übergang zeigen die Zellen eine normale Zellzyklusphasenverteilung, wobei mutp53 exprimierende Zellen auf Grund der fehlenden p21 Expression in der späten S-Phase schneller in die mitotische Phase eintreten. Anders verhalten sich bestrahlte wtp53 TO-CV-1-Flag-mut $\Delta p53$ Zellen, in denen wt $\Delta p53$ dominant-negativ inaktiviert ist. Wie die FACS-Analyse zeigt durchlaufen diese Zellen mit einem erhöhten S-Phasen Anteil ungebremst die replikative S-Phase zeigen jedoch von acht bis zwölf Stunden nach Bestrahlung am G1/S-Übergang einen deutlich erhöhten G2-Phasen Anteil (**Abb. 5-37C**). Aus diesem Ergebnis geht hervor, dass sowohl die UV- als auch die γ -geschädigten mut $\Delta p53$ Zelle den fehlenden intra-S-Phasen Kontrollpunkt mit der Aktivierung

des G2-Kontrollpunkts bzw. bei γ -Strahlung mit einer verstärkten G2-Phasen Attenuation kompensieren.

5.11 Die $\Delta p53$ -vermittelte Attenuation der S-Phasen Progression ermöglicht die Entkopplung von NHEJ Reparatur- und Replikationsereignissen γ -geschädigter Zellen

Die Aktivierung der γ -induzierten ATM-vermittelten Schadensantwort führt in *wtp53* Zellen sowohl zur Aktivierung des intra-S als auch des G2 Kontrollpunkts, die neben der Attenuation der Zellzyklusprogression auch die Reparaturmaschinerie aktivieren. Wie die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen, ist die Aktivierung der Kontrollpunkte intra-S und G2 unabhängig von der transkriptionellen Aktivität beider *p53*-Proteine, jedoch spielen beide Aktivitäten eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung bzw. Dauer der schadeninduzierten Kontrollpunkte in S bzw. in G2. Anzunehmen ist, dass während der Attenuation der Zellzyklusprogression die Reparatur des geschädigten Genoms erfolgt, dessen qualitative Instandsetzung wiederum Einfluss auf die Schadensreaktion nimmt. Dies wird besonders deutlich bei der Betrachtung von Zellen, die am G1/S-Übergang mit UV-Licht geschädigt wurden. Ausschließlich Zellen, die auf Grund der transkriptionellen Aktivität von $\Delta p53$ den ATR-initiierten intra-S Kontrollpunkt aufrechterhalten können, reparieren die geschädigte DNA noch vor Beginn der Replikation. Unbekannt ist, ob γ -bestrahlte Zellen ebenfalls in Abhängigkeit des *p53* Status ihr geschädigtes Genom ebenfalls noch vor Beginn der DNA Replikation reparieren. Diese Fragestellung ergibt sich aus dem unterschiedlichen Reparaturprozessen, die in UV- bzw. γ -geschädigten Zellen stattfinden. UV-Strahlung aktiviert den „nucleotide excision repair“ (NER) Mechanismus, während durch γ -Strahlung verursachte DNA Doppelstrangbrüche die schadeninduzierte Signalkaskade mobilisieren, die zur Aktivierung der Reparaturwege NHEJ („non homologous end joining“) und HDR (homology-directed repair) führen. Die Art und Weise wie die Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen erfolgt ist abhängig vom DNA Gehalt und somit von der Position der geschädigten Zelle im Zellzyklus. Plausibel ist, dass geschädigte Zellen mit einem DNA Gehalt von 2N ihre Schäden nur über den NHEJ Reparaturweg beheben können, während die akkuratere HDR erst während bzw. nach Duplikation des Genoms ermöglicht werden kann. Auf Grund dessen war es von Interesse, die Reparaturvorgänge in G1/S γ -bestrahlten CV-1 bzw. TO-CV-1-Flag-*mutp53* und -*mut $\Delta p53$* Zellen zu untersuchen insbesondere in Hinblick auf die durch den *p53* Status bedingte unterschiedliche Schadensreaktion.

Die Messung der Reparaturaktivitäten von wtp53 CV-1 sowie den Dox induzierten wtp53 TO-CV-1 Zellen, die am G1/S-Übergang geschädigt wurden, erfolgte mit der alkalischen Comet-Analyse. Allerdings erzeugen replikative Vorgänge, wie auch γ -Strahlung Strangbrüche, die mit der Comet-Analyse erfasst werden (Olive und Banath, 1993). Deshalb wurde zur Unterscheidung zwischen replikationsbedingten und strahleninduzierten Strangbrüchen zusätzlich die DNA Replikation mittels ^3H -Thymidin-Einbau gemessen. Synchronisierte, unbestrahlte und mit 2 Gy bestrahlte wtp53 CV-1 Zellen weisen während der S-Phase ein DNA Strangbruch Signal auf, das, wie die Messung der Replikationsaktivität zeigt, auf aktive DNA Replikation zurückzuführen ist (Abb. 5-38A, B, linke Spalte). Anzumerken ist, dass bei der Messung der Replikationsaktivität unbestrahlter wtp53 CV-1 Zellen, diese Zellen bereits mit der DNA Replikation begonnen haben, wie dies aus der sehr hohen ^3H -Einbaurate zum Zeitpunkt Null hervorgeht. Offensichtlich ist, dass die maximale Replikationsaktivität in 2 Gy bestrahlten wtp53 CV-1 Zellen deutlich später auftritt als in den unbestrahlten Zellen und reflektiert die intra-S-vermittelte zwei- bis dreistündige Inhibition des Replikationsstarts.

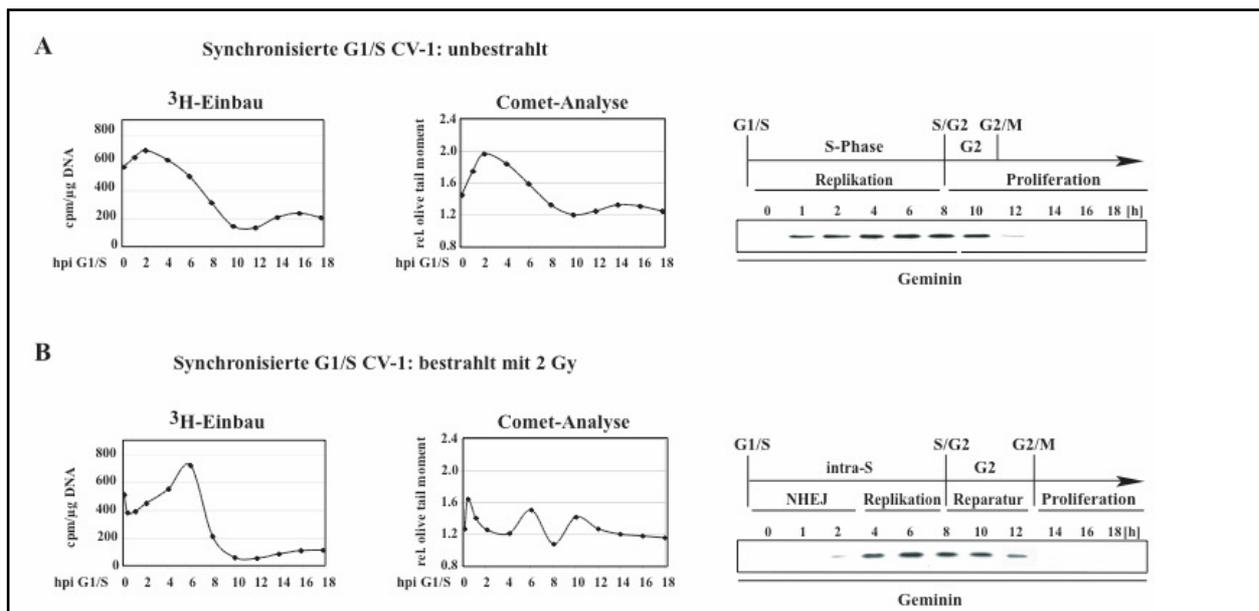


Abb. 5-38: Replikations- und Reparaturereignisse am G1/S-Übergang mit 2 Gy bestrahlter wtp53 CV-1 Zellen. Synchronisierte wtp53 CV-1 Zellen wurden am G1/S-Übergang (0) nicht (A) bzw. mit 2 Gy (B) bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten für die Messung der Replikations- (^3H -Einbau) sowie Reparaturaktivität (Comet-Analyse) verwendet. Der Nachweis von Geminin, ein Marker für den Beginn der DNA Replikation sowie den Beginn der Mitose, erfolgte im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper. Bestrahlung mit 2 Gy verzögert den Beginn der Replikation um 3 h und der Mitose um 2 h.

Die strahleninduzierte ca. dreistündige Verzögerung des Beginns der DNA Replikation bestätigt sich bei der Betrachtung des Expressionsverlaufs von Geminin. Geminin ist ein

wichtiger Replikationsfaktor, der unmittelbar nach Initiation der Replikation stabilisiert wird und eine fundamentale Rolle bei der Prävention einer Reinitiation spielt. Die Expression von Geminin steigt während der S- und G2-Phase kontinuierlich an und ist schließlich nach dem Eintritt der Zellen in die Mitose nicht mehr detektierbar (McGarry und Kirschner, 1998). In unbestrahlten wtp53 CV-1 Zellen entspricht die Geminin Expression der gemessenen Replikationsaktivität sowie einer ungestörten Zellzyklusprogression. Unmittelbar nach dem Eintritt der Zellen in die S-Phase steigt die Proteinmenge an Geminin kontinuierlich an und bricht nach dem Beginn der Mitose, die zwischen zehn und elf Stunden nach dem G1/S-Übergang stattfindet, abrupt ab (**Ab. 5-38A**, rechte Spalte). Auch in 2 Gy bestrahlten wtp53 CV-1 Zellen korreliert der Verlauf der Geminin Expression mit dem Beginn der Replikation und dem Eintritt der Zellen in die Mitose, wobei Geminin von vier bis zwölf Stunden nach Bestrahlung detektierbar ist (**Abb. 5-38B**, rechte Spalte). Dieses Ergebnis bestätigt, dass subletale Schädigung am G1/S-Übergang die Zellzyklusprogression kaum beeinträchtigt und die Zellen mit nur einer zweistündigen Verspätung durch die Mitose gehen.

Direkt nach Bestrahlung mit 2 Gy ist in wtp53 CV-1 Zellen mit der alkalischen Comet-Analyse ein deutliches Strangbruch Signal detektierbar, das zwei Stunden nach Bestrahlung auf das Grundniveau absinkt und anschließend zwei Maxima zu den Zeitpunkten sechs und acht Stunden nach Bestrahlung aufweist (**Abb. 5-38A**, linke Spalte). Der Vergleich mit der ³H-Einbaurrate zeigt, dass das zweite DNA Strangbruch Signal mit der Replikationsaktivität korreliert, während das erste und das dritte Signal nicht von dieser Aktivität stammen. Daraus kann geschlossen werden, dass das erste Comet-Signal, das noch vor Beginn der DNA Replikation gemessen wird auf Grund des DNA Gehalts von 2N der NHEJ Reparatur entspricht, während das dritte Signal, das nach Beendigung der DNA Replikation entsteht, nach der gängigen Meinung die Aktivität der HDR reflektieren könnte. Der Vergleich der gemessenen ³H-Einbaurrate mit der Position der 2 Gy bestrahlten wtp53 CV-1 Zellen im Zellzyklus zeigt, dass unmittelbar nach Aktivierung des ATM-vermittelten intra-S-Phasen Kontrollpunkts die Replikation zu Gunsten der NHEJ Reparatur inhibiert ist, während nach Beendigung der DNA Replikation und Aktivierung des G2 Kontrollpunkts weitere Reparaturprozesse stattfinden. Dieses Experiment zeigt zum ersten Mal, dass am G1/S-Übergang erzeugte DNA Doppelstrangbrüche zwei Reparaturereignisse induzieren, wobei der erste unmittelbar vor dem Beginn der Replikation im intra-S-Phasen Kontrollpunkt und der zweite nach abgeschlossener Replikation im G2 Kontrollpunkt stattfindet.

Bestrahlung von Zellen am G1/S-Übergang mit 2 Gy induziert in Abhängigkeit des *p53* Status entweder den intra-S-Phasen und einen moderaten G2 Kontrollpunkt oder eine verstärkte Attenuation der G2-Phasen Progression. Deshalb war es von Interesse, die Replikations- und Reparaturaktivitäten in Dox-induzierten *wtp53* TO-CV-1-Flag-mut Δ *p53* und Flag-mut Δ *p53* Zellen zu messen und diese mit den Aktivitäten der *wtp53* CV-1 Zellen zu vergleichen. Wie **Abb. 5-39A** zeigt, verzögert sich in *wtp53* TO-CV-1-Flag-mut Δ *p53* Zellen nach Bestrahlung mit 2 Gy der Beginn der Replikation kaum, wie dies auch bei der Betrachtung der Geminin Expression deutlich hervorgeht, und die Replikation endet, wie auch in unbestrahlten Zellen, acht Stunden nach dem Eintritt in die replikative S-Phase. Auch in 2 Gy bestrahlten *wtp53* CV-1-Flag-mut Δ *p53* Zellen beginnt unmittelbar nach Bestrahlung der NHEJ Reparaturprozess, der allerdings in Abwesenheit von funktionellem wt Δ *p53* nicht vollständig von der Replikation entkoppelt ist. Nach Beendigung der replikativen Phase ist ein drittes Comet Signal detektierbar, das die Entstehung von neuen, reparaturbedingten Strangbrüchen indiziert, jedoch nimmt in Abwesenheit von funktionellem Δ *p53* dieser Reparaturprozess zwei Stunden länger in Anspruch und bedingt somit den um zwei Stunden verspäteten Eintritt in die Mitose.

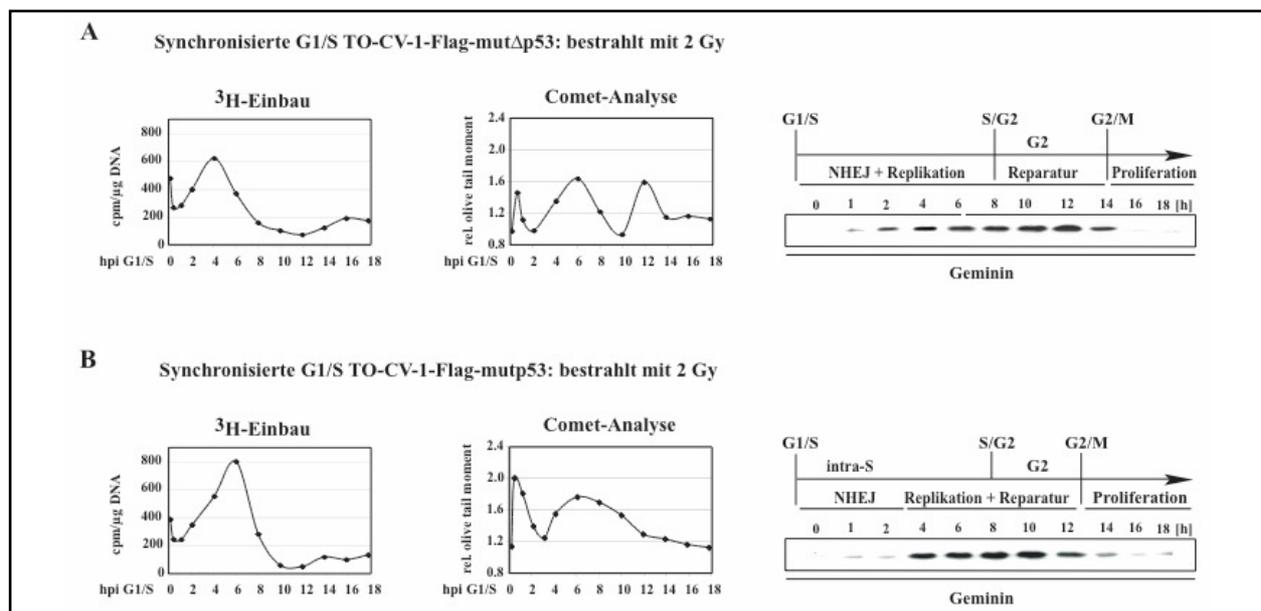


Abb. 5-39: Replikations- und Reparaturereignisse am G1/S-Übergang mit 2 Gy bestrahlter *wtp53* TO-CV-1 Zellen. Synchronisierte, Dox induzierte *wtp53* CV-1-Flag-mut Δ *p53* (A) und *wtp53* TO-CV-1-Flag-mut Δ *p53* (B) Zellen wurden am G1/S-Übergang (0) mit 2 Gy bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten für die Messung der Replikations- (3 H-Einbau) sowie Reparaturaktivität (alkalische Comet-Analyse) verwendet. Der Nachweis von Geminin, ein Marker für den Beginn der DNA Replikation sowie den Beginn der Mitose, erfolgte im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper. Bestrahlung mit 2 Gy verzögert nur in mut Δ *p53* exprimierenden Zellen den Beginn der Replikation um 3 h, während mut Δ *p53* Zellen in die Mitose 2 h später eintreten.

Ein völlig anderes Bild ergibt die Untersuchung 2 Gy bestrahlter wtp53 TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen, in denen endogenes wtp53 dominant-negativ inaktiviert ist. Obwohl die Replikation, wie auch in wtp53 CV-1 Zellen, auf Grund der $\Delta p53$ -vermittelten S-Phasen Attenuation erst vier Stunden nach Bestrahlung beginnt und das NHEJ Reparatursignal vor Beginn der Replikation endet, zeigt das darauf folgende Strangbruch Signal einen völlig anderen Verlauf (**Abb. 5-38B**, rechte Spalte). Die Comet-Analyse impliziert, dass nach abgeschlossener NHEJ Reparatur zusätzliche Strangbruch-produzierende Reparaturprozesse bereits während der replikativen Phase stattfinden, die, im Gegensatz zu wtp53 CV-1 und mut $\Delta p53$ Zellen, in mutp53 Zellen zeitlich nicht von der späten replikativen Phase entkoppelt sind. Die Daten weisen darauf hin, dass in 2 Gy bestrahlten G1/S Zellen wtp53 Einfluss auf die Replikations- und Reparaturvorgänge in der späten S-Phase nimmt, während in γ - wie auch in UV-bestrahlten Zellen $\Delta p53$ unmittelbar nach Bestrahlung am G1/S-Übergang die Replikation zu Gunsten der Reparatur inhibiert und somit beide Prozesse entkoppelt.

Die Messung der Replikations- und Reparaturaktivität in 2 Gy bestrahlten Zellen zeigt, dass $\Delta p53$ eine wichtige Funktion zu Beginn, nicht jedoch am Ende der geschädigten S-Phase ausübt. Dieses Resultat ergibt sich bei Betrachtung der Replikations- und Reparaturaktivitäten von Zellen, die in Anwesenheit von wt $\Delta p53$ mutp53 exprimieren. Auffällig in der Comet-Analyse ist das von drei bis zwölf Stunden lang anhaltende, zweite Strangbruch Signal, das zeitlich der replikativen S-Phase und dem G2 Kontrollpunkt zugeordnet werden kann. Dieser Befund deutet darauf hin, dass noch vor Beendigung der DNA Replikation bereits weitere Strangbruch-initiiierende Reparaturprozesse gestartet werden, die in wtp53 exprimierenden Zellen erst nach Beendigung der replikativen Phase als drittes diskretes Signal auftreten (**Abb. 5-38**). Demzufolge nimmt wtp53 Einfluss auf die Koordination der Replikations- und die in der G2-Phase stattfindenden Reparaturprozesse, die in wtp53 CV-1 aber auch in wtp53 TO-CV-1-Flag-mut $\Delta p53$ Zellen als zwei diskrete Strangbruch Signale zu erkennen sind.

Insgesamt zeigt sich, dass in γ -bestrahlten G1/S-Zellen die Reparatur- und Replikationsprozesse zu zwei verschiedenen Zeitpunkten in der S-Phase entkoppelt werden, wobei $\Delta p53$ am G1/S-Übergang und p53 am S/G2-Übergang arbeitet. Zusätzlich implizieren diese Ergebnisse einen sogenannten „cross talk“ zwischen den strahleninduzierten Reparaturvorgängen und der Reaktivierung von Zellzykluskontrollpunkten, die vor allem in γ -bestrahlten mut $\Delta p53$ Zellen anhand der erneuten Aktivierung von ATM nach der replikativen

S-Phase (**Abb. 5-30C**) und der daraus entstehenden verstärkten G2-Phasen Attenuation offensichtlich wird (**Abb. 5-37C**).

Die Beobachtung, dass die Intensität des G2-Kontrollpunkts abhängig vom *p53* Status der G1/S geschädigten Zelle ist, spricht für eine unterschiedliche Reparaturqualität unmittelbar vor dem Beginn und während der DNA Replikation. Deshalb kann angenommen werden, dass der G2 Kontrollpunkt für weitere Reparaturvorgänge wie HDR benutzt wird, deren Ausmaß in Abhängigkeit des *p53* Status erfolgen könnte. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde der zeitliche Verlauf strahleninduzierter Doppelstrangbrüche ausgehend vom G1/S-Übergang in 2 Gy bestrahlten *wtp53* TO-CV-1 Zellen ermittelt. Ein Marker, der Doppelstrangbrüche zuverlässig anzeigt ist die Phosphorylierung des Histons H2AX, das im phosphorylierten Zustand als γ H2AX bezeichnet wird. In mit 2 Gy bestrahlten Zellen entstehen im Zellkern unmittelbar nach erfolgter DNA Schädigung ca. maximal 80 γ H2AX-Focis, die die Anzahl der entstanden Doppelstrangbrüche reflektieren und deren Verschwinden mit der Reparatur von Doppelstrangbrüchen korreliert (Bouquet et al., 2006; Rothkamm und Lobrich, 2003). Die Messung der γ -induzierten Doppelstrangbrüche in den *wtp53* TO-CV-1-Flag Zellen ergab, dass unabhängig vom *p53* Status immer im Durchschnitt 40 γ H2AX-Focis unmittelbar nach Bestrahlung am G1/S-Übergang entstehen. Die Messung der Anzahl der strahleninduzierten γ H2AX-Focis mittels Konfokaler Laser Scanning Mikroskopie über einen Beobachtungszeitraum von 24 Stunden ergab, dass die für DNA Doppelstrangbrüche charakteristischen γ H2AX-Foci bereits zwischen sieben und zehn Stunden in allen *wtp53* TO-CV-1-Flag Zellen nicht mehr nachweisbar sind (**Abb. 5-40**). Der Vergleich der Entstehung sowie Entfernung der γ H2AX-Focis mit der Position der Zelle im Zellzyklus erbrachte ein überraschendes Resultat; die vollständige Reparatur der strahleninduzierten Doppelstrangbrüche erfolgte nicht wie angenommen im G2 Kontrollpunkt sondern bereits unmittelbar vor und während der replikativen S-Phase.

Dennoch bleibt die Frage bestehen welcher Reparaturmechanismus im G2 Kontrollpunkt die Strangbrüche erzeugt, die mit der Comet-Analyse als eindeutiges Signal erfasst werden und dessen Intensität abhängig vom *p53* Status der am G1/S-Übergang geschädigten Zelle ist (**Abb. 5-38B**, **Abb. 5-39A,B**). Offensichtlich ist, dass es sich bei diesen Strangbrüchen nicht um Doppel- sondern Einzelstrangbrüche handeln muss, nachdem das G2-Phasen Strangbruch Signal erst zehn Stunden nach γ -Bestrahlung am G1/S-Übergang und nach der Reparatur der Doppelstrangbrüche entsteht. In Betracht gezogen werden muss, dass γ -Strahlung nicht nur Doppelstrangbrüche erzeugt sondern auch zur Oxidation von Basen führt

und auf Grund dessen Zellen, die am G1/S-Übergang bestrahlt wurden, für die Korrektur zusätzliche Reparaturprozesse wie BER („base excision repair“) in der sich anschließenden G2 Phase initiieren.

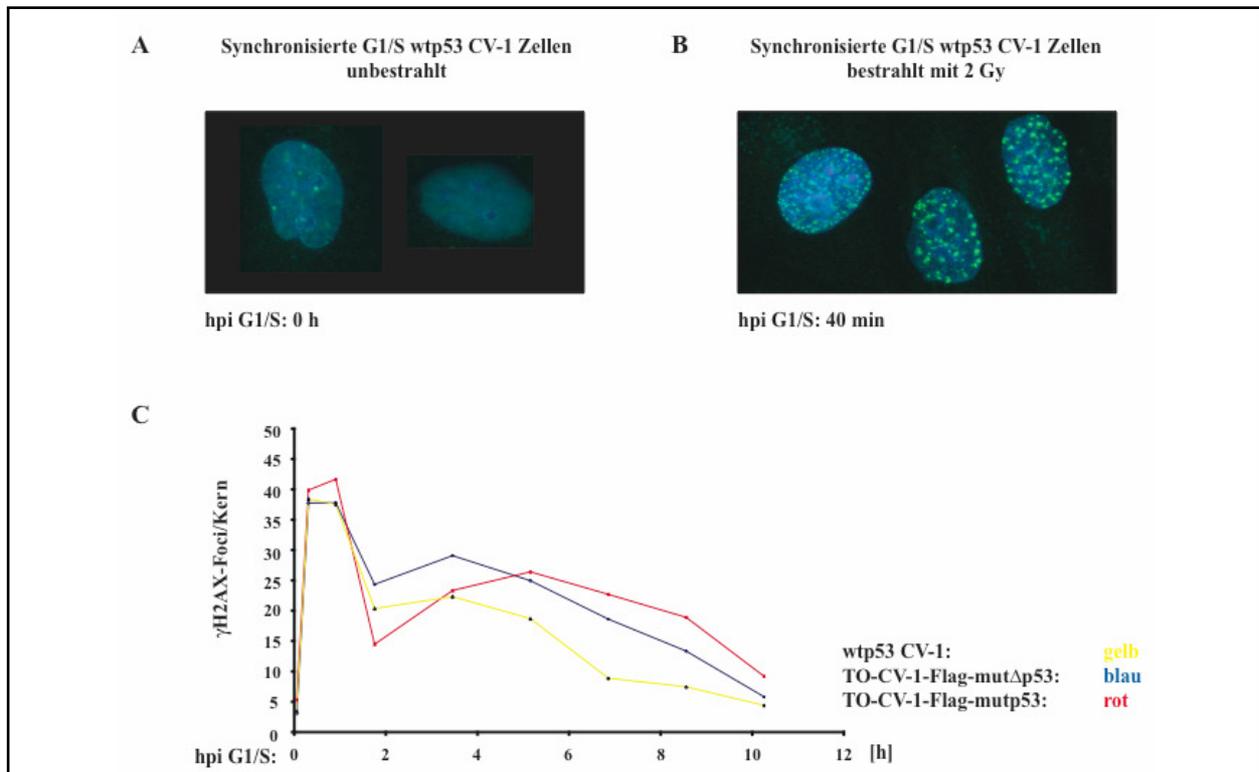


Abb. 5-40: Reparatur von Doppelstrangbrüchen in 2 Gy bestrahlten G1/S Zellen mittels Evaluierung der γ H2AX-Foci Bildung in Abhängigkeit des p53 Status. Synchronisierte wtp53 CV-1 und Dox-induzierte wtp53 TO-CV-1-Flag-mut Δ p53 und -Flag-mutp53 Zellen wurden am G1/S Übergang nicht (0 h) bzw. mit 2 Gy bestrahlt, zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und für die Immunfluoreszenz vorbereitet. Der Zellkern wurde mit dem DNA Farbstoff DAPI (blau) angefärbt und die Entstehung der γ H2AX-Focis erfolgte mit einem Alexa Fluor 488-konjugierten Antikörper (grün). (A) γ H2AX-Focis in unbestrahlten wtp53 CV-1 Zellen und (B) 40 min nach Bestrahlung. (C) . Die γ H2AX-Focis wurden in jeweils 50 Zellkernen pro Zeitwert ausgezählt und statistisch ausgewertet.

Demnach ist in G1/S geschädigten Zellen die Reparatur von γ -induzierten DNA

Doppelstrangbrüchen komplexer als die Reparatur UV-induzierter einzelsträngiger DNA und involviert auf Grund der vielschichten Schadensart mehrere Reparaturprozesse, die die Aktivierung des intra-S und G2 Kontrollpunkts bedingen. Anzunehmen ist, dass das NHEJ der erste Schritt im Doppelstrangbruch Reparaturweg ist, gefolgt von der HDR, wobei diese nicht wie angenommen im G2 Kontrollpunkt stattfindet sondern bereits während der replikativen S-Phase und offensichtlich zu neuen reparaturbedingten Doppelstrangbrüchen führt, die am sprunghaften Anstieg der Anzahl der γ H2AX-Focis vier Stunden nach Bestrahlung erkennbar ist (**Abb. 5-40C**). Die Aktivierung des G2 Kontrollpunkts nach

Beendigung der DNA Replikation wird vermutlich vom BER Mechanismus in Anspruch genommen, der bei der Entfernung von oxidierten Basen Einzelstrangbrüche erzeugt und die in der Comet-Analyse als diskreter „peak“ allerdings nur in wtp53 exprimierenden Zellen erfasst werden können (**Abb. 5-38B, Abb. 5-39A,B**). Insgesamt zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse, dass die koordinierte Aktivität von p53 und Δ p53 einen substantiellen Einfluss auf die zelluläre Reaktion nach DNA Schädigung nimmt, und der p53/ Δ p53 Status von großer Bedeutung für die Reparaturprozesse UV- und γ -induzierter DNA Schäden ist.

6. Diskussion

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der molekularen Mechanismen, mit denen die schadeninduzierten Kontrollpunkte bei eintreffendem Schaden zu definierten Zeitpunkten im Zellzyklus aktiviert und insbesondere die darauf folgende Koordination von Zellzyklusprogression und Reparatur der geschädigten Zelle in Abhängigkeit des *p53* Status erreicht wird.

Die Untersuchung dieser Fragen stand im Zentrum der hier vorgelegten Arbeit und erfolgte überwiegend anhand synchronisierter *wtp53* CV-1 Zellen sowie induzierbarer *wtp53* TO-CV-Zellen. Dieses isogene TO-Zellsystem wurde auf Grund der bei der Durchführung dieses Vorhabens entdeckten neuen *p53*-Spleißvariante, die als $\Delta p53$ bezeichnet wurde, etabliert. Das induzierbare TO-Zellsystem erlaubt nach Zugabe von Doxycyclin (Dox) die ektopische Expression von Flag-markiertem *mutp53* bzw. *mut $\Delta p53$* und somit die dominant-negative Inaktivierung von endogenem *wtp53* bzw. *wt $\Delta p53$* . Von Vorteil ist, dass im isogenen Zellsystem die individuelle Funktion der Effektoren *p53* und $\Delta p53$ sowie deren koordinierte Aktivität im schadeninduzierten Signalweg unter Beibehaltung des identischen genetischen Hintergrundes untersucht werden kann. Für die Untersuchungen schadeninduzierter zellulärer Vorgänge wurden überwiegend synchronisierte Zellen am G1/S-Übergang bestrahlt. Ausgewählt wurde diese Position im Zellzyklus nachdem festgestellt werden konnte, dass DNA Schädigung zu diesem Zeitpunkt in *wtp53* Zellen zwei Kontrollpunkte sequenziell aktiviert, den intra-S und den G2 Kontrollpunkt. Diese durch γ -Strahlung induzierte, ATM-vermittelte Schadensantwort unterscheidet sich von der zellulären Reaktion die am G1/S-Übergang durch UV-Licht ausgelöst wird. UV-Strahlung löst in *wtp53* Zellen nur die Aktivierung des ATR-vermittelten intra-S- aber nicht den G2-Kontrollpunkt aus.

Durch Bestrahlung von *wtp53* Zellen mit je einer subletalen Dosis an ionisierender γ -Strahlung (2 Gy) und 10 J/m^2 konnten verschiedene Schadensreaktionen gezielt hervorgerufen werden. Zwar führen beide Bestrahlungsarten zu einer temporär begrenzten Schadensreaktion, jedoch reagieren die Zellen in Bezug auf die Aktivierung der Zellzykluskontrollpunkte und der Reparaturmechanismen völlig unterschiedlich. Unabhängig von der applizierten Schadensart induzieren sowohl erzeugte Einzel- als auch Doppelstrangbrüche eine Stabilisierung und Aktivierung von *p53* und $\Delta p53$ sowie die Induktion von *p53*-Zielgenen. Dies zeigt, dass beide *p53*-Proteine unabhängig von der Schadensart an der Schadensreaktion beteiligt sind. Jedoch wirkt sich der *p53* Status der

geschädigten Zelle definitiv auf die ATM- bzw. ATR-vermittelte Schadensreaktion aus, wie dies aus den Untersuchungen UV- und γ -bestrahlter wtp53 CV-1 bzw. Dox induzierter wtp53 TO-CV-1-Flag-mutp53 und -Flag mut Δ p53 Zellen hervorging.

6.1 Funktion von Δ p53 im UV-induzierten intra-S-Phasen Kontrollpunkt

Die Untersuchung einer Korrelation der Reparaturfähigkeit von Zellen, die sich in ihrem p53 Status unterscheiden, mit dem Zellzyklusverhalten nach Bestrahlung führte zur Entdeckung einer neuen Isoform von p53. Die im Rahmen dieser Arbeit entdeckte p53-Isoform, bezeichnet als Δ p53, entsteht durch alternatives Exon-Exon Spleißen des p53-Transkripts und wurde mittels RT-PCR Analyse in humanen Primärzellen, primären Affenzellen sowie in etablierten Affenzelllinien und humanen Tumorzelllinien aber nicht in Nagerzellen nachgewiesen. Durch den alternativen Spleißvorgang werden zwischen Exon sieben und neun 198 Nukleotide (66 AS) entfernt, die die Information für die gesamte „hinge“-Region sowie einen Teil der „core“-Domäne enthalten. Der Leserahmen wird durch den Spleißvorgang nicht verändert, wodurch die im C-Terminus lokalisierte Tetramerisierungsdomäne erhalten und funktionsfähig bleibt. Oligomerisierungsstudien, die sowohl *in vivo* als auch mit exprimierten und gereinigten rekombinant erzeugten p53 Proteinen *in vitro* durchgeführt wurden ergaben, dass Δ p53 nur mit sich selbst aber nicht mit Volllänge p53 komplexieren kann.

Aus weiteren Untersuchungen ging hervor, dass bei erfolgter Zellschädigung diese neue p53-Isoform wie Volllänge p53 stabilisiert und aktiviert wird. Obwohl durch das interne Exon-Exon Spleißen 39 Aminosäurereste der Kerndomäne, die der konservierten „box V“ Domäne entsprechen, deletiert werden, assoziiert und transaktiviert Δ p53 bestimmte p53-regulierte Gene. Der p53-Spleißvariante fehlt nicht nur die „box V“ Domäne sondern auch die gesamte „hinge“-Region, eine kurze Aminosäuresequenz, die die spezifische DNA Bindungsdomäne mit der Tetramerisierungsdomäne verbindet und die DNA Bindung von p53 allosterisch reguliert (Waterman et al., 1995). Vermutlich ist die „hinge“-Region an der Regulation der differentiellen transkriptionellen Aktivität von p53 involviert nachdem aus der Keimbahn isoliertes p53 mit mutierter „hinge“-Region seine apoptotische aber nicht Zellzyklus-regulierende Funktion verloren hat (Aurelio et al., 2000, Kong et al., 2001). Tatsächlich transaktiviert Δ p53 im Gegensatz zu p53, das sowohl anti-apoptotische Gene (z.B. *p21*, *14-3-3 σ*) als auch pro-apoptotische Gene (z.B. *bax*, *PIG3*) anschaltet, ausschließlich die anti-apoptotischen Gene. Der *in vivo* Nachweis der differentiellen Transaktivierungsaktivität von Δ p53 wurde unter anderem auch mit Hilfe von mutanten p53 Zelllinien erbracht, bei denen p53 in dem Bereich mutiert ist, der durch das alternative Spleißen entfernt wird. In

diesen Zellen ist das Volllänge p53 durch die Mutation inaktiviert, während die durch alternatives Spleißen generierte Isoform eine völlig intakte wildtyp Sequenz hat. Nachdem $\Delta p53$ nur Homo- aber keine Hetero-Oligomere bildet, wird ihre Funktion durch mutanten p53 (mutp53) nicht beeinträchtigt. In der Tat konnte gezeigt werden, dass in derartigen mutp53 Zellen, die als „type II“ bezeichnet werden, die differenzielle Transaktivierungseigenschaft von $\Delta p53$ durch genotoxischen Stress aktiviert wird. Im Gegensatz dazu ist in „type I“ mutanten p53 Zellen, bei denen die Mutation außerhalb der Spleißregion liegt und folglich beide p53-Formen mutiert sind, $\Delta p53$ transkriptionell inaktiv. Diese Befunde zeigen, dass im Gegensatz zu p53 die neue p53-Spleißvariante $\Delta p53$ über eine intrinsische differenzielle Transaktivierungsaktivität verfügt, die unabhängig von p53 agiert.

Der erste Hinweis für eine biologische Relevanz von $\Delta p53$ ergab sich aus biochemischen Analysen synchronisierter Zellen, die während verschiedener Stadien im Zellzyklus mit UV-Licht oder ionisierender Strahlung geschädigt wurden. Die Ergebnisse der ChIP-PCR zeigten, dass die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren p53 und $\Delta p53$ zellzyklusabhängig reguliert wird. Während wildtyp p53 (wtp53) die p53-induzierbaren Gene in der G1- und G2-Phase transaktiviert, arbeitet wildtyp $\Delta p53$ (wt $\Delta p53$) ausschließlich im intra-S-Phasen Kontrollpunkt. Anzunehmen ist, dass p53 während der replikativen S-Phase transkriptionell eingeschränkt ist, damit Zellen während dieser DNA Strangbruch erzeugenden Zellzyklusphase nicht durch die Aktivierung der p53-abhängigen Apoptose eliminiert werden (Gottifredi et al., 2001). Auf Grund dessen ist die Generierung einer alternativen p53-Spleißform, die nur wachstumsregulierende Gene wie *p21* und *14-3-3 σ* transaktiviert, plausibel.

Weitere Untersuchungen bezüglich der Funktion von $\Delta p53$ in geschädigten wildtyp p53 Zellen ergaben, dass die neue p53-Isoform ein essenzieller Bestandteil des durch ATM/ATR aktivierten intra-S-Phasen Kontrollpunktes ist. Bereits bekannt ist, dass nach Bestrahlung von Zellen am G1/S Übergang unabhängig vom p53 Status die ATM/ATR-abhängige Initiation der S-Phasen Schadensantwort mittels Aktivierung der Chk2/Chk1 Kinasen erfolgt, deren enzymatische Aktivität zur Degradation der Zyklin E-Cdk2 aktivierenden Phosphatase Cdc25A führt. Die daraus resultierende Inhibition der Zyklin E-Cdk2 Aktivität, deren Aktivität für den Eintritt in die replikative S-Phase und für die Rekrutierung des DNA Polymerase α -Primase Ladungsfaktors Cdc45 an den lizenzierten Replikationsursprung essenziell ist, führt allerdings nur zur kurzfristigen Inhibition der „origin“-abhängigen Initiation der bidirektionalen DNA Replikation (Bartek und Lukas, 2001). Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass insbesondere nach UV-Bestrahlung nur

Zellen diese sehr schnelle ATR-Chk1-Cdc25A-Zyclin E-Cdk2-vermittelte zweistündige S-Phasen Schadensantwort für weitere vier Stunden aufrecht erhalten können, in denen transkriptionell aktives wt Δ p53 generiert wird. Wie die erzielten Ergebnisse zeigen, ist ATR für die Aktivierung von Δ p53 in UV-bestrahlten G1/S Zellen absolut notwendig, nachdem die dominant-negative Inaktivierung von endogenem ATR die Stabilisierung sowie Serin-15 Phosphorylierung von Δ p53 und konsequenterweise die Transaktivierung des *p21*-Promoters unterbindet. Allerdings kann angenommen werden, dass ATR nicht der einzige Faktor ist, der die Aktivierung von Δ p53 bzw. die eingeschränkte Transaktivierungsaktivität von p53 reguliert. Vermutlich sind bei der Regulation der Zellzyklus-abhängigen Transaktivierungsaktivität beider p53 Proteine die Interaktion mit Chromatin-modifizierenden Faktoren wie z.B. der Histon-Acetyltransferase p300 und CBP mit involviert (Barlev et al., 2001; Espinosa und Emerson, 2001; An et al., 2004). Jedoch spielt auch die Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren p53 und Δ p53 eine Rolle bei der Regulation der differentiellen Transaktivierungsaktivität, zumal die ATR-aktivierte schadensspezifische Kinase Chk1 und die ATM-aktivierte schadensspezifische Kinase Chk2 p53 am Serinrest 20 phosphorylieren, während Δ p53 an seinem Serinrest 20 unphosphoryliert bleibt, da auf Grund des Spleißprozesses die mit Chk2 bzw. Chk1 interagierende „box V“ Domäne in Δ p53 fehlt (Craig et al., 2006). Demzufolge muss ein komplexes regulatorisches Netzwerk verantwortlich für die Zellzyklus-abhängige Regulation der transkriptionellen Aktivität von p53 und Δ p53 sein, das bislang noch nicht aufgeklärt ist.

Bekannt ist, dass die ATR-vermittelte Signalkaskade sowohl die S-Phasen Progression als auch die DNA Replikation nur temporär attenuiert bzw. inhibiert. Allerdings inhibiert der kürzlich aufgedeckte ATR-Chk1-Cdc25A-Zyclin E-Cdk2 Signalweg die Replikation nur kurzfristig (Bartek et al., 2004). Wie jedoch aus der Messung der Replikationsaktivität hervorging, ist in wt p53 Zellen, die am G1/S-Übergang mit 10 J/m² bestrahlt wurden, die Replikation für insgesamt sechs Stunden inhibiert. Auf Grund dessen ist es naheliegend, dass neben der p53-unabhängigen Cdc25A-Zyclin E-Cdk2 Reaktionskaskade zusätzliche schadeninduzierte Signalwege im ATR-vermittelten intra-S-Phasen Kontrollpunkt involviert sein müssen, die zur länger fristigen Inhibition des Replikationstarts führen. Wie die erzielten Ergebnisse zeigen, erfolgt die Δ p53-abhängige Attenuation der S-Phasen Progression durch die Δ p53-vermittelte Transaktivierung des *p21*-Promoters, dessen Genprodukt mit der Kinase Zyclin A-Cdk2 komplexiert und somit deren Aktivität, die für die Initiation der DNA Replikation und die Progression durch die S-Phase essenziell ist (Hunter und Pines, 1994), stark reduziert. Die Messung der Cdk2-Aktivitäten ergab, dass zeitgleich mit der

Reaktivierung von Zyklin E-Cdk2, die Zyklin A-Cdk2 Aktivität auf Grund der Komplexierung mit p21 abrupt abnahm. Die Reduktion der Aktivität von Zyklin A-Cdk2 führte nicht nur zur Attenuation der S-Phasen Progression sondern darüber hinaus auch zur Aufrechterhaltung der Inhibition der DNA Replikation für weitere vier Stunden. Die Messung der Reparatur- (Comet-Assay) und Replikationsaktivitäten (Tritium-Einbau) unmittelbar nach UV-Bestrahlung der Zellen am G1/S-Übergang ergab, dass während der attenuierten S-Phase die DNA innerhalb der ersten sechs Stunden vollständig repariert wurde. Unmittelbar nach abgeschlossener Reparatur, die mit der Inaktivierung von $\Delta p53$ und der daraus resultierenden Reaktivierung der S-Phasen spezifischen Kinase Zyklin A-Cdk2 korrelierte, erfolgte die vollständige Replikation des Genoms innerhalb von sechs Stunden. Demnach wird die replikative S-Phase, die in unbestrahlten diploiden wtp53 Primatenzellen normalerweise acht Stunden beträgt, nach UV-Bestrahlung am G1/S-Übergang um vier Stunden verlängert. Ein anderer Sachverhalt ergab sich bei der Untersuchung von Dox-induzierten wtp53 CV-1-Flag-mut $\Delta p53$ Zellen, in denen endogenes wt $\Delta p53$ dominant-negativ inaktiviert ist. Unmittelbar nach UV-Bestrahlung wurden Strangbrüche gemessen, deren Signal exakt mit der gemessenen Replikationsaktivität übereinstimmte. In diesen Zellen, die über kein funktionsfähiges $\Delta p53$ verfügen, konnte der initiierte ATR-intra-S-Phasen Kontrollpunkt nicht aufrechterhalten werden und die geschädigten Zellen durchliefen ungebremst die replikative Phase. Jedoch wurde zehn Stunden nach erfolgter Bestrahlung am G1/S-Übergang ein zweites Reparatur-Signal detektiert, das mit der beobachteten attenuierten G2-Phase korrelierte. Die Messung der Cdk Aktivitäten ergab, dass die Zyklin A-Cdk2/1 Aktivität zwar nicht reduziert war, aber am Ende der S-Phase die katalytische Untereinheit der für die G2-Phasen Progression notwendigen Zyklin B-Cdk1 inhibitorisch phosphoryliert blieb. Auf Grund dessen verlangsamte sich die G2-Phasen Progression und der Eintritt der geschädigten mut $\Delta p53$ Zellen in die Mitose verzögerte sich um vier Stunden. Die Verwendung von „type I“ mutanten *p53* Zellen, bei denen die *p53* Mutation außerhalb der Spleißregion liegt und folglich inaktives, mutp53 und mut $\Delta p53$ exprimieren bestätigte die Funktion der neuen p53-Spleißvariante im intra-S-Phasen Kontrollpunkt. Dieses mit „type I“ mutp53 Zellen durchgeführte Experiment zeigt auch, dass nach dem Zusammenbruch des intra-S-Phasen Kontrollpunkts die Aktivierung des G2 Kontrollpunkts unabhängig von wtp53 ist. Darüber hinaus ergaben Untersuchungen mit induzierten wtp53 TO-CV-1-Flag-mutp53-273H Zellen, in denen ektopisch exprimiertes Flag-mutp53-273H endogenes wtp53 dominant-negativ inaktiviert, dass für die Attenuation der S-Phasen Progression wtp53 entbehrlich ist. Somit zeigen diese Daten, dass wt $\Delta p53$ exprimierende Zellen DNA Schäden vor Beginn der DNA

Replikation und mut Δ p53 exprimierende Zellen DNA Schäden unabhängig von wtp53 während und nach erfolgter DNA Replikation reparieren.

Zusammenfassend ergibt sich für den UV-initiierten ATR-vermittelten intra-S-Phasen Kontrollpunkt folgender Sachverhalt: die durch Chk1-Cdc25A-induzierte Inhibition der Zyklin E-Cdk2-Aktivität sowie die durch ATR- Δ p53-induzierte Reduktion der Zyklin A-Cdk2-Aktivität und die daraus resultierende Attenuation der S-Phasen Progression sowie Inhibition der DNA Replikation erlauben erst die Reparatur des geschädigten Genoms noch vor Beginn der Replikation (**Abb. 6-1**). Des Weiteren kann postuliert werden, dass die vollständige Reparatur geschädigter DNA vor Beginn seiner Duplikation zur Erhaltung der genomischen Stabilität beiträgt, während die Duplikation von unvollständig bzw. fehlerhaft reparierter DNA, wie dies in „type I“ mutp53 Zellen der Fall ist, die Manifestation von Mutationen begünstigt.

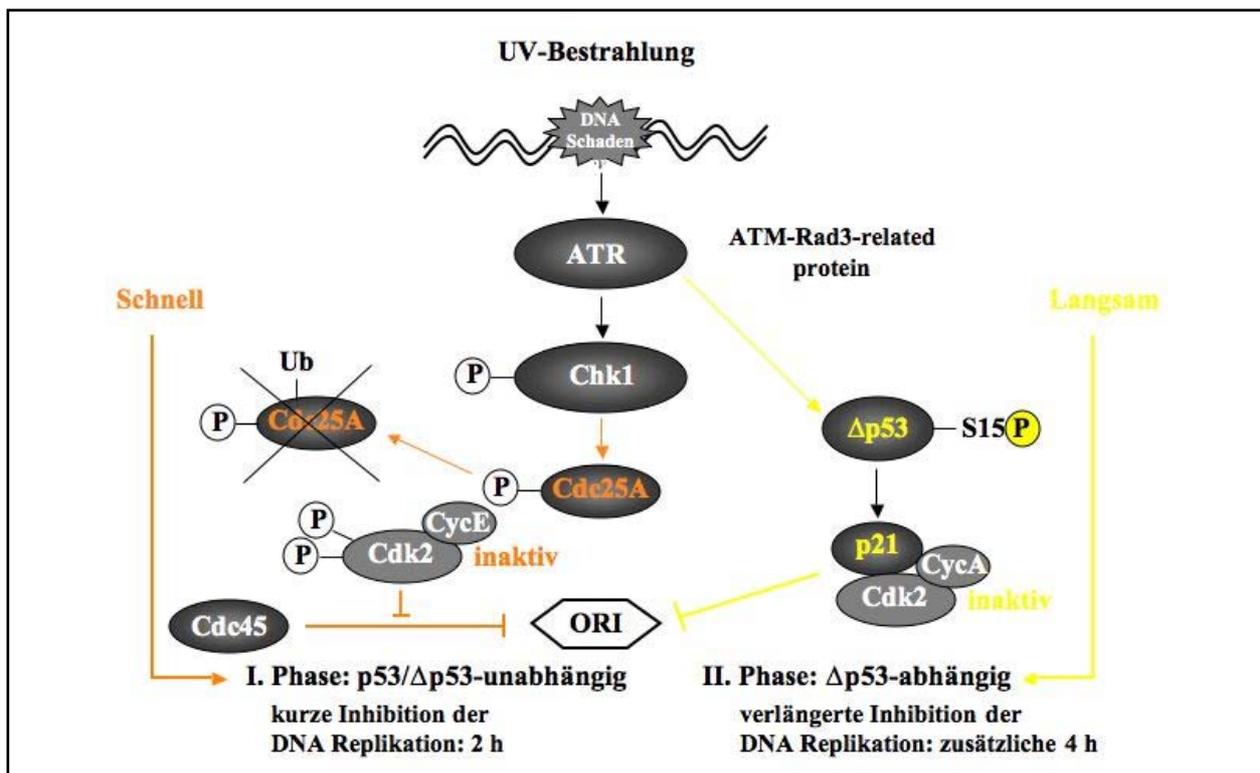


Abb. 6-1: Der UV-induzierte intra-S-Phasen Kontrollpunkt. UV-Bestrahlung am G1/S-Übergang aktiviert den ATR-vermittelten intra-S-Phasen Kontrollpunkt, der durch die kombinierte Aktion der unabhängig voneinander agierenden Signalwege Chk1-Cdc25A-Zyklus E-Cdk2 und ATR- Δ p53-p21-Zyklus A-Cdk2 die Initiation der Replikation zu Gunsten der Reparatur für insgesamt 6 h inhibiert.

6.2 Funktion von $\Delta p53$ im γ -induzierten intra-S-Phasen Kontrollpunkt

Mit der Identifizierung der p53-Spleißvariante $\Delta p53$ kommt in Primatenzellen ein weiterer Faktor hinzu, der die Komplexität p53-vermittelter Signale erhöht und die zelluläre Schadensreaktion beeinflusst. Die beobachtete Stabilisierung von $\Delta p53$ nach genotoxischem Stress, die unabhängig von der applizierten Schadensart und Schadensschwere erfolgt weist darauf hin, dass $\Delta p53$ an unterschiedlichen zellulären Schadensreaktion beteiligt ist. Dies konnte durch detaillierte Analysen belegt und charakterisiert werden. Dabei zeigte sich, dass die transkriptionelle Aktivität von $\Delta p53$ in UV-geschädigten Zellen vor allem während der replikativen S-Phase von Bedeutung ist und eine Entkopplung des NER (nucleotide excision repair) Reparaturweges und der Replikation nach UV-Strahlung bewirkt. Während in UV-geschädigten wtp53 Zellen $\Delta p53$ ausschließlich nach Aktivierung des ATR-vermittelten intra-S Kontrollpunkts den Cdk-Inhibitor p21 transaktiviert, induziert p53 erst in der späten S-Phase diesen wachstumsregulierenden Faktor. Nicht bekannt war, ob auch γ -Strahlung eine zellzyklusabhängige Aktivierung von p53 und $\Delta p53$ bewirkt und insbesondere, ob in G1/S geschädigte Zellen die Aktivität von $\Delta p53$ einen Einfluss auf die Entkopplung der DNA Doppelstrangbruchreparatur und der DNA Replikation nehmen kann, wie dies im Falle von UV-bestrahlten Zellen, die NER und Replikation zeitlich trennen, gezeigt werden konnte.

Bekannt ist, dass DNA Schädigung in die beginnende Zellteilung intervenieren kann, indem die Aktivierung des Mitose-fördernden Faktors Zyklin B-Cdk1 entweder verspätet erfolgt oder komplett inhibiert wird. Dieser in der G2-Phase operierende Kontrollmechanismus involviert die Aktivierung der ATM/ATR-induzierten Signalkaskade, an deren höchsten Stelle der heterotrimere Mre11/Rad50/Nbs1-Komplex (MRN) steht, der sowohl „upstream“ als auch „downstream“ von ATM und ATR als Sensor fungiert (Kim *et al.*, 1999; Lee und Paul, 2004). ATM kann direkt oder indirekt und ATR nur indirekt Einfluss auf die Reparatur strahleninduzierter Doppelstrangbrüche nehmen, wobei in der G2-Phase auf Grund des doppelten Chromosomensatzes der Reparaturweg über die HDR (homologous directed repair) genommen wird. Dagegen wird postuliert, dass strahleninduzierte Doppelstrangbrüche, die vor Beginn der Replikation entstehen auf Grund des einfachen Chromosomensatzes über den nicht-homologen Reparaturweg (non homologous end joining, NHEJ) beseitigt werden. Diese Annahme impliziert, dass subletale DNA Schäden, die am G1/S-Übergang entstehen, nach erfolgter Aktivierung des ATM/ATR-induzierten intra-S-Kontrollpunkts durch den NHEJ Reparaturweg noch vor Beginn der Replikation repariert werden und folglich die Zellen ohne weitere Verzögerung Richtung Mitose progressieren sollten. **Die hier vorgestellte Arbeit zeigt jedoch, dass unabhängig von der Position der Zelle**

im Zellzyklus zum Zeitpunkt der Erzeugung von Doppelstrangbrüchen der G2 Kontrollpunkt immer aktiviert wird. Dabei stellte sich die Frage, warum am G1/S-Übergang geschädigte wtp53 Zellen, trotz Aktivierung des intra-S Kontrollpunkts zusätzlich den G2 Kontrollpunkt anschalten. Beide Kontrollpunkte werden über die ATM-Chk2-Phosphorylierungskaskade induziert, die bei subletaler Schädigung mit 2 Gy die transaktivierende Eigenschaft von $\Delta p53$ und p53 kurzfristig sequenziell aktiviert und die Zellzyklusprogression konsequenterweise nur moderat attenuiert. Die kurzfristige temporäre Attenuation der Progression der Zellzyklusphasen in S und G2 ist auf die $\Delta p53$ - und p53-induzierte Hochregulation des Cdk-Inhibitors p21 zurückzuführen, wobei $\Delta p53$ -transaktiviertes p21 die Aktivität der S-Phasen spezifischen Kinase Zyklin A-Cdk2 reduziert und p53-transaktiviertes p21 verantwortlich für die Reduktion der S/G2-spezifischen Zyklin A-Cdk1 Aktivität ist. Eine Beteiligung von p53 an der verzögerten Aktivierung von Zyklin B-Cdk1 ist nicht nachweisbar und zeigt, dass in wtp53 Zellen der G2 Kontrollpunkt bei subletalen γ -induzierten Schäden unabhängig von transkriptionell aktivem p53 ist und ausschließlich auf der Chk2-vermittelten temporären Inaktivierung der Cdk1-aktivierenden Phosphatase Cdc25C beruht.

Der Grund der sequenziellen Aktivierung der Kontrollpunkte intra-S und G2 zeigt sich bei der Messung der Reparaturaktivitäten, die einmal unmittelbar nach Initiation des intra-S-Kontrollpunkts und später noch einmal nach Initiation des G2-Kontrollpunktes auftreten. Dabei entspricht das erste Reparatursignal der NHEJ Reparatur, die noch vor Beginn der DNA Replikation die Doppelstrangbrüche schließt. Das zweite Reparatursignal, das erst nach abgeschlossener DNA Replikation entsteht, stammt nicht wie ursprünglich angenommen von der HDR Reparatur sondern von einem DNA Einzelstrang-erzeugenden DNA Reparaturmechanismus. Bislang wurde angenommen, dass in der G1- und der frühen S-Phase Doppelstrangbrüche über das NHEJ repariert werden, während die akkuratere HDR erst nach erfolgter Duplikation des Genoms möglich ist und deshalb der bevorzugte Reparaturweg in den späteren Zellzyklusphasen ist (Lieber *et al.*, 2003; Rothkamm *et al.*, 2001). Die Messung von Doppelstrangbrüchen mittels Evaluierung der Anzahl vorhandener γ H2AX-Focis zeigte jedoch, dass unabhängig vom p53 Status der geschädigten Zelle, die Strangbrüche bereits zwischen sieben und zehn Stunden nach γ -Bestrahlung am G1/S-Übergang repariert waren. In Betracht gezogen werden muss, dass γ -Strahlung nicht nur Doppelstrangbrüche erzeugt sondern auch zur Oxidation von DNA Basen führt, die mittels „base excision repair“ (BER) entfernt werden müssen. Dieser Sachverhalt erklärt auch, warum im G2 Kontrollpunkt ein weiteres Strangbruch Signal mit der alkalischen Comet-Analyse erfasst wird, das auf Grund

der fehlenden γ H2AX-Focis DNA Einzelstrangbrüche sein müssen, die bei der Entfernung beschädigter Basen durch den BER Mechanismus generiert werden. Nachdem die Beschädigung des Genoms mit Gamma-Strahlung unterschiedliche Arten von DNA Schäden erzeugt ist plausibel, dass nach γ -Bestrahlung am G1/S-Übergang unterschiedliche Reparaturprozesse aktiviert werden müssen, die einerseits die Reparatur der Doppelstrangbrüche mittels NHEJ noch vor Beginn der Replikation und andererseits die Reparatur zusätzlicher DNA Schäden während und nach Duplikation des Genoms ermöglichen. Bei Betrachtung des Kurvenverlaufs der γ H2AX-Foci Entstehung fällt auf, dass zwei Stunden nach Bestrahlung am G1/S-Übergang die Anzahl der Doppelstrangbrüche stark gesunken ist aber zwei Stunden später wieder signifikant ansteigt. Demzufolge entstehen während der replikativen Phase neue Doppelstrangbrüche, die durchaus von dem HDR Mechanismus stammen könnten. Vorläufige Untersuchungen zeigten, dass sechs Stunden nach Bestrahlung am G1/S-Übergang zeitgleich mit der zweit höchsten Anzahl gemessener γ H2AX-Focis und somit DNA Doppelstrangbrüchen der DNA Polymerase δ Prozessivitätsfaktor PCNA mit dem Cdk-Inhibitor p21 interagiert (Daten nicht gezeigt). Nachdem PCNA nur in wtp53 und mut Δ p53 Zellen aber nicht in mutp53 Zellen mit p21 interagiert, erfolgt die Transaktivierung des *p21*-Promoters durch p53. Der Zellzyklus-regulierende Faktor p21 inhibiert nicht nur Cdks sondern inhibiert auch die Interaktion von Polymerase δ mit PCNA. Konsequenterweise wird die Prozessivität der Elongationspolymerase δ erniedrigt, wodurch sich bei der Synthese des Leitstrangs kürzere DNA Fragmente bilden, die durchaus Substrate für die HDR sein könnten und die Entstehung von neuen Doppelstrangbrüchen während der replikativen S-Phase erklären würde. Dieser hier angedachte molekulare Mechanismus könnte mittels p53-transaktiviertem p21 die HDR und Replikation koordinieren und γ -geschädigten G1/S Zellen die „Nachreparatur“ ihres Genoms während der replikativen Phase ermöglichen. Die Nachreparatur des Genoms sollte erforderlich sein, da der weniger akkuraten NHEJ bei der Doppelstrangbruch Reparatur Fehler unterlaufen könnten, die anschließend in der S-Phase korrigiert werden müssten, wobei die Fehlerkorrektur durch den HDR Mechanismus durchgeführt werden könnte. Allerdings erklärt diese Modellvorstellung nicht warum auch in mutp53 exprimierenden wtp53 TO-CV-1 Zellen während der replikativen Phase neue Doppelstrangbrüche entstehen und inwieweit diese Strangbrüche tatsächlich den Vorgang der HDR-gekoppelten DNA Replikation reflektieren.

Im Gegensatz zu UV-induzierten Schäden, deren Reparatur mittels NER Einzelstrangbrüche erzeugt, ist die Reparatur γ -induzierter DNA Schäden bei weitem

komplexer. Obwohl das Schließen der Doppelstrangbrüche nur kurze Zeit in Anspruch nimmt, sind weitere Reparaturvorgänge für die Wiederherstellung des Genoms nötig. Wie auch in UV-bestrahlten G1/S Zellen ist zunächst die $\Delta p53$ -vermittelte Reduktion der S-Phasen- und Replikations-spezifischen Zyklin A-Cdk2 Aktivität eine Voraussetzung für die Entkopplung von Reparatur und Replikation. Bestrahlte G1/S-TO-CV-1-Flag-mut $\Delta p53$ Zellen können nach Initiation der schadeninduzierten ATM-Signalkaskade die ansteigende Zyklin A-Cdk2 Aktivität nicht drosseln und initiieren auf Grund dessen die Replikation noch vor Beendigung der NHEJ Reparatur. Auch wenn die $\Delta p53$ -vermittelte Reduktion der Zyklin A-Cdk2 Aktivität nur zwei Stunden beträgt, sind diese zwei Stunden für einen optimalen Verlauf von NHEJ Reparatur und Replikation entscheidend. Anders als in UV-bestrahlten Zellen ist in γ -bestrahlten Zellen p53 transaktiviertes p21 essenziell um weitere Prozesse wie Replikation/HDR und BER im intra-S-Phasen und G2 Kontrollpunkt zu koordinieren. Dies zeigt sich besonders in mutp53 Zellen, die auf Grund von transkriptionsinaktivem p53 zusätzliche Reparaturen nicht im G2 Kontrollpunkt sondern vermutlich bereits während der Duplikation des Genoms durchführen. Demzufolge ist die Entkopplung dieser fundamentalen Ereignisse über die Modulation der Cdk Aktivitäten und somit über den p53 Status reguliert.

6.3 Polyploidisierung und die p53/ $\Delta p53$ Konstellation

Die hier vorgelegten Untersuchungen zur Funktion von $\Delta p53$ konzentrierten sich auf die Frage inwieweit $\Delta p53$ Einfluss auf die Zellzyklusprogression und Reparaturprozesse hat. Anhand vergleichender Analysen mit „type I“ und „type II“ mutp53 Zellen, die jeweils mit einer subletalen und letalen Dosis an γ -Strahlung beschädigt wurden, zeigten sich erhebliche Konsequenzen des p53 Status für die zelluläre Schadensreaktion. So sind „type II“ mutp53, die wt $\Delta p53$ und mutp53 exprimieren aber nicht „type I“ mutp53 Zellen, die mut $\Delta p53$ und mutp53 exprimieren, besonders radioresistent und geschützt gegen 10 Gy Gamma-induzierte Apoptose (siehe **Abb. 5-1**, **Abb. 5-2**). Ein derart gestörtes Gleichgewicht zwischen p53 und $\Delta p53$ ist, wie die untersuchten „type II“ mutp53 Zellen zeigen, die Mutation innerhalb des Bereichs, der bei der Generierung von $\Delta p53$ durch den Prozess des alternativen Spleißens deletiert wird, und demzufolge nur p53, nicht jedoch $\Delta p53$ modifiziert. Diese „Bedingung“ erfüllt unter anderem eine der häufigsten „hot spot“-Mutationen des p53 Gens, die in humanen Tumoren gefunden wurden: Codon 273 Mutation (Vousden und Lu, 2002). Da die Prognose von Tumorpatienten mit einer Codon 273 p53 Mutation signifikant schlechter ist als die anderer p53 Mutationen (P. Hainaut, persönliche Mitteilung), ist die Biologie solcher Zellen von besonderem Interesse für die Krebsforschung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde

deshalb auch untersucht, inwieweit der besondere p53/ Δ p53 Status von Codon 273 mutp53 Zellen kausal mit der schlechten klinischen Prognose zusammenhängen könnte. Wie sich zeigte, korreliert die Radioresistenz der Codon 273 „type II“ mutp53 Zellen mit der Bildung polyploider Zellen (Abb. 6-2). Dabei wird die Polyploidisierung der Zellpopulation durch 10 Gy Bestrahlung stark induziert und zwar unabhängig vom Zelltyp (siehe Abb. 5-1, Abb. 5-2).

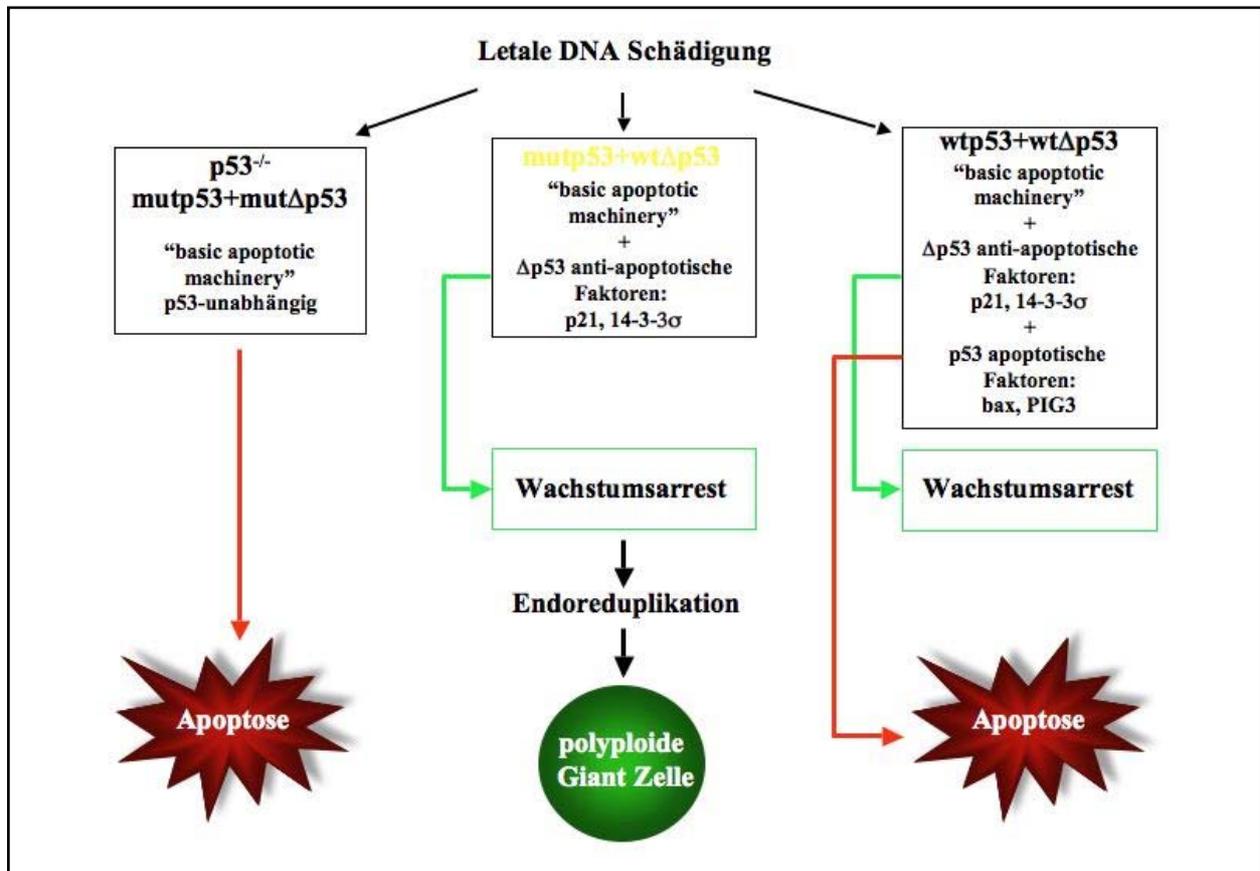


Abb. 6-2: Einfluss der p53/ Δ p53 Konstellation auf die strahleninduzierte Schadensreaktion. DNA Schädigung mit 10 Gy führt in mutp53/mut Δ p53 und p53-null Zellen zur p53-unabhängigen Apoptose, während in wtp53/wt Δ p53 Zellen die p53-induzierten apoptotischen Signale die Δ p53-induzierten Überlebenssignale dominieren. Mutp53/wt Δ p53 Zellen entziehen sich auf Grund der anti-apoptotischen Wirkung von Δ p53 der Termination durch Polyploidisierung.

Vielmehr beruht die Bildung polyploider Zellen infolge 10 Gy γ -Bestrahlung tatsächlich auf einen besonderen p53/ Δ p53 Status, d.h. der Kombination von wt Δ p53 und mutp53, wie dies in 10 Gy bestrahlten, Dox-induzierten wtp53 TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen simuliert werden konnte (siehe BMU Abschlussbericht StSch 4359, Abb. 5-17).

Polyploide Zellen haben in verschiedenen Organismen wichtige Funktionen und werden gezielt gebildet. Bei Säugern sind Megakaryocyten das am besten charakterisierte Beispiel einer vom Organismus „erwünschten“ polyploiden Zelle (Ravid et al., 2002). Vor allem aus

der Tumorbiologie aber auch aus anderen Krankheitsbildern ist die Polyploidisierung darüber hinaus als pathologischer Effekt bekannt, der zu einem frühen Zeitpunkt der Tumorgenese zu beobachten ist und mit der genetischen Instabilität vieler Tumorzellen korreliert wird. Genetische Instabilität kann unter Selektionsdruck, wie ihn z.B. genotoxischer Stress darstellt, derart „flexiblen“ Zellen einen erheblichen Vorteil verschaffen. Diese Überlegung steht in Einklang mit der häufig beobachteten Radio- und Chemoresistenz vieler Tumorzellen (Johnstone et al., 2002). Eine Verbindung zwischen genetischer Instabilität, Polyploidie und Therapieresistenz wird durch zwei Studien nachdrücklich belegt. So wurde beschrieben, dass polyploide Zellen über besondere Überlebens- und Reparatur-Mechanismen verfügen, die sie resistent gegen genotoxischen Stress machen und vor der Eliminierung schützen (Illidge et al., 2000; Ivanov et al., 2003).

In diesem Kontext könnte ein bekannter $p53/\Delta p53$ Status von Tumoren eine wertvolle prognostische Größe darstellen. Tatsächlich zeigte die Evaluierung des $p53$ Status einer Kohorte von 88 Patienten mit einem Mamakarzinom, dass von den untersuchten Tumoren 12% der genetischen Konstellation $mutp53/wt\Delta p53$ entsprachen. Die ermittelte biologische Korrelationssignifikanz zeigte, dass die absolute Überlebensrate für Patienten mit der genetischen Konstellation $mutp53/wt\Delta p53$ im Vergleich zu $wtp53/wt\Delta p53$ signifikant reduziert ist und auf Grund des BCS Wertes ($p = 0,009$) die genetische Konstellation $mutp53/wt\Delta p53$ als potentieller Tumormarker für das Mamakarzinom identifizieren könnte (siehe Jahresabschlussbericht StSch 4463; Baumbusch et al., 2006). Auf Grund der bislang relativ kleinen Kohorte, die für die Untersuchungen zur Verfügung stand, ist es jedoch verfrüht eine definitive Aussage darüber zu treffen, inwieweit der $p53$ Status entscheidend für den Ausgang der Chemo- bzw. Radiotherapie ist. Deshalb ist die Untersuchung von weiteren Mamakarzinomen und vor allem auch anderen Tumorarten erforderlich, um die genetische Konstellation $mutp53/wt\Delta p53$ bei bestimmten Krebsarten als Tumormarker zu etablieren.

7. Literaturverzeichnis

Aaronson, S. A., and Todaro, G. J. (1968). Development of 3T3-like lines from Balb-c mouse embryo cultures: transformation susceptibility to SV40. *J Cell Physiol* 72, 141-148.

- Abraham, R. T.** (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 15, 2177-2196.
- Abramova, N. A., Russell, J., Botchan, M., and Li, R.** (1997). Interaction between replication protein A and p53 is disrupted after UV damage in a DNA repair-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7186-7191.
- Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Grosse, F., Kim, E., Wiesmuller, L., and Deppert, W.** (1999). Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene* 18, 7706-7717.
- An, H. J., Logani, S., Isacson, C., and Ellenson, L. H.** (2004). Molecular characterization of uterine clear cell carcinoma. *Mod Pathol* 17, 530-537.
- Appella, E., and Anderson, C. W.** (2000). Signaling to p53: breaking the posttranslational modification code. *Pathol Biol (Paris)* 48, 227-245.
- Ashcroft, M., and Vousden, K. H.** (1999). Regulation of p53 stability. *Oncogene* 18, 7637-7643.
- Aurelio, O. N., Kong, X. T., Gupta, S., and Stanbridge, E. J.** (2000). p53 mutants have selective dominant-negative effects on apoptosis but not growth arrest in human cancer cell lines. *Mol Cell Biol* 20, 770-778.
- Azzam, E. I., de Toledo, S. M., Pykett, M. J., Nagasawa, H., and Little, J. B.** (1997). CDC2 is down-regulated by ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Cell Growth Differ* 8, 1161-1169.
- Barlev, N. A., Liu, L., Chehab, N. H., Mansfield, K., Harris, K. G., Halazonetis, T. D., and Berger, S. L.** (2001). Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell* 8, 1243-1254.
- Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J.** (2004). Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 792-804.
- Bartek, J., and Lukas, J.** (2001). Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 13, 738-747.
- Baumbusch, L. O., Myhre, S., Langerod, A., Bergamaschi, A., Geisler, S. B., Lonning, P. E., Deppert, W., Dornreiter, I., and Borresen-Dale, A. L.** (2006). Expression of full-length p53 and its isoform Δ p53 in breast carcinomas in relation to mutation status and clinical parameters. *Mol Cancer* 5, 47.
- Bessard, A. C., Garay, E., Lacronique, V., Legros, Y., Demarquay, C., Houque, A., Portefaix, J. M., Granier, C., and Soussi, T.** (1998). Regulation of the specific DNA

binding activity of *Xenopus laevis* p53: evidence for conserved regulation through the carboxy-terminus of the protein. *Oncogene* 16, 883-890.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Chang, B. D., Broude, E. V., Dokmanovic, M., Zhu, H., Ruth, A., Xuan, Y., Kandel, E. S., Lausch, E., Christov, K., and Roninson, I. B. (1999a). A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res* 59, 3761-3767.

Chang, B. D., Swift, M. E., Shen, M., Fang, J., Broude, E. V., and Roninson, I. B. (2002). Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 389-394.

Chang, B. D., Xuan, Y., Broude, E. V., Zhu, H., Schott, B., Fang, J., and Roninson, I. B. (1999b). Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene* 18, 4808-4818.

Chemnitz, J. (2003) Regulation des Intra-S-Phasen Kontrollpunktes in UV-geschädigten Primatenzellen, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg.

Chen, X., Ko, L. J., Jayaraman, L., and Prives, C. (1996). p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev* 10, 2438-2451.

Chene, P. (2003). Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 102-109.

Chipuk, J. E., and Green, D. R. (2003). p53's believe it or not: lessons on transcription-independent death. *J Clin Immunol* 23, 355-361.

Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M., and Green, D. R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303, 1010-1014.

Cline, S. D., and Hanawalt, P. C. (2003). Who's on first in the cellular response to DNA damage? *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 361-372.

Collins, S. J., Gallo, R. C., and Gallagher, R. E. (1977). Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature* 270, 347-349.

Craig, A.L., Chrystal, J., Sphyrus, N., Harrison, B., Soctt, M., Dornreiter, I., and Hupp, T.R. A docking site for the Cal-CAM kinase superfamily overlaps with the MDM2 ubiquitination signal in the DNA-binding domain of p53. Submitted

D'Andrea, A. D., and Grompe, M. (2003). The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer* 3, 23-34.

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

El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.

Espinosa, J. M., and Emerson, B. M. (2001). Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell* 8, 57-69.

Fei, P., and El-Deiry, W. S. (2003). P53 and radiation responses. *Oncogene* 22, 5774-5783.

Fischer, P., Nacheva, E., Mason, D. Y., Sherrington, P. D., Hoyle, C., Hayhoe, F. G., and Karpas, A. (1988). A Ki-1 (CD30)-positive human cell line (Karpas 299) established from a high-grade non-Hodgkin's lymphoma, showing a 2;5 translocation and rearrangement of the T-cell receptor beta-chain gene. *Blood* 72, 234-240.

Foley, G. E., Handler, A. H., Lynch, P. M., Wolman, S. R., Stulberg, C. S., and Eagle, H. (1965). Loss of neoplastic properties in vitro. II. Observations on KB sublines. *Cancer Res* 25, 1254-1261.

Fritsche, M., Haessler, C., and Brandner, G. (1993). Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* 8, 307-318.

Gaiddon, C., Moorthy, N. C., and Prives, C. (1999). Ref-1 regulates the transactivation and pro-apoptotic functions of p53 in vivo. *Embo J* 18, 5609-5621.

Gazdar, A. F. (1990). Cell biology and molecular biology of small cell and non-small cell lung cancer. *Curr Opin Oncol* 2, 321-327.

Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., and Parks, W. P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51, 1417-1423.

Gottifredi, V., Shieh, S., Taya, Y., and Prives, C. (2001). p53 accumulates but is functionally impaired when DNA synthesis is blocked. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1036-1041.

Gudkov, A. V., and Komarova, E. A. (2003). The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat Rev Cancer* 3, 117-129.

Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-299.

Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Vousden, K. H., and Oren, M. (1995). Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev* 9, 2170-2183.

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

Horikoshi, N., Usheva, A., Chen, J., Levine, A. J., Weinmann, R., and Shenk, T. (1995). Two domains of p53 interact with the TATA-binding protein, and the adenovirus 13S E1A protein disrupts the association, relieving p53-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 15, 227-234.

Horton, L. E., and Templeton, D. J. (1997). The cyclin box and C-terminus of cyclins A and E specify CDK activation and substrate specificity. *Oncogene* 14, 491-498.

Hull, R. N., Minner, J. R., and Smith, J. W. (1956). New viral agents recovered from tissue cultures of monkey kidney cells. I. Origin and properties of cytopathogenic agents S.V.1, S.V.2, S.V.4, S.V.5, S.V.6, S.V.11, S.V.12 and S.V.15. *Am J Hyg* 63, 204-215.

Hwang, B. J., Ford, J. M., Hanawalt, P. C., and Chu, G. (1999). Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 424-428.

Iliakis, G. (1997). Cell cycle regulation in irradiated and nonirradiated cells. *Semin Oncol* 24, 602-615.

Iliakis, G., Wang, Y., Guan, J., and Wang, H. (2003). DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* 22, 5834-5847.

Illidge, T. M., Cragg, M. S., Fringes, B., Olive, P., and Erenpreisa, J. A. (2000). Polyploid giant cells provide a survival mechanism for p53 mutant cells after DNA damage. *Cell Biol Int* 24, 621-633.

Ivanov, A., Cragg, M. S., Erenpreisa, J., Emzinsh, D., Lukman, H., and Illidge, T. M. (2003). Endopolyploid cells produced after severe genotoxic damage have the potential to repair DNA double strand breaks. *J Cell Sci* 116, 4095-4106.

Jainchill, J. L., Aaronson, S. A., and Todaro, G. J. (1969). Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol* 4, 549-553.

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

Jayaraman, L., and Prives, C. (1999). Covalent and noncovalent modifiers of the p53 protein. *Cell Mol Life Sci* 55, 76-87.

Jin, S., and Levine, A. J. (2001). The p53 functional circuit. *J Cell Sci* *114*, 4139-4140.

Johnson, G. D., and Nogueira Araujo, G. M. (1981). A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. *J Immunol Methods* *43*, 349-350.

Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., and Lowe, S. W. (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* *108*, 153-164.

Kastan, M. B., Zhan, Q., el-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B., and Fornace, A. J., Jr. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* *71*, 587-597.

Kim, G. D., Choi, Y. H., Dimtchev, A., Jeong, S. J., Dritschilo, A., and Jung, M. (1999). Sensing of ionizing radiation-induced DNA damage by ATM through interaction with histone deacetylase. *J Biol Chem* *274*, 31127-31130.

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

Kokontis, J. M., Wagner, A. J., O'Leary, M., Liao, S., and Hay, N. (2001). A transcriptional activation function of p53 is dispensable for and inhibitory of its apoptotic function. *Oncogene* *20*, 659-668.

Kong, X. T., Gao, H., and Stanbridge, E. J. (2001). Mechanisms of differential activation of target gene promoters by p53 hinge domain mutants with impaired apoptotic function. *J Biol Chem* *276*, 32990-33000.

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

Kubbutat, M. H., and Vousden, K. H. (1998). Keeping an old friend under control: regulation of p53 stability. *Mol Med Today* *4*, 250-256.

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

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.

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

Lee, J. H., and Paull, T. T. (2004). Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* *304*, 93-96.

Leibovitz, A., Stinson, J. C., McCombs, W. B., 3rd, McCoy, C. E., Mazur, K. C., and Mabry, N. D. (1976). Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* *36*, 4562-4569.

Li, R., and Botchan, M. R. (1993). The acidic transcriptional activation domains of VP16 and p53 bind the cellular replication protein A and stimulate in vitro BPV-1 DNA replication. *Cell* 73, 1207-1221.

Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U., and Schwarz, K. (2003). Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 712-720.

Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89, 175-184.

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

Lundberg, A. S., and Weinberg, R. A. (1999). Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 35, 1886-1894.

Magrath, I., Lee, Y. J., Anderson, T., Henle, W., Ziegler, J., Simon, R., and Schein, P. (1980). Prognostic factors in Burkitt's lymphoma: importance of total tumor burden. *Cancer* 45, 1507-1515.

Manteuil, S., Pages, J., Stehelin, D., and Girard, M. (1973). Replication of simian virus 40 deoxyribonucleic acid: analysis of the one-step growth cycle. *J Virol* 11, 98-106.

McKay, B. C., Ljungman, M., and Rainbow, A. J. (1999). Potential roles for p53 in nucleotide excision repair. *Carcinogenesis* 20, 1389-1396.

Melchior, F., and Hengst, L. (2002). SUMO-1 and p53. *Cell Cycle* 1, 245-249.

Melle, C., and Nasheuer, H. P. (2002). Physical and functional interactions of the tumor suppressor protein p53 and DNA polymerase alpha-primase. *Nucleic Acids Res* 30, 1493-1499.

Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U. M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11, 577-590.

Miyashita, T., and Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299.

Nakano, K., Balint, E., Ashcroft, M., and Vousden, K. H. (2000). A ribonucleotide reductase gene is a transcriptional target of p53 and p73. *Oncogene* 19, 4283-4289.

Nigg, E. A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 17, 471-480.

Obaya, A. J., and Sedivy, J. M. (2002). Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 59, 126-142.

- Olive, P. L., and Banath, J. P.** (1993). Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and 125IdUrd. *Int J Radiat Biol* *64*, 349-358.
- Oren, M.** (2003). Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* *10*, 431-442.
- Peng, C. Y., Graves, P. R., Thoma, R. S., Wu, Z., Shaw, A. S., and Piwnica-Worms, H.** (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* *277*, 1501-1505.
- Picksley, S. M., and Lane, D. P.** (1993). The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? *Bioessays* *15*, 689-690.
- Pines, J., and Hunter, T.** (1994). The differential localization of human cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *Embo J* *13*, 3772-3781.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B.** (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature* *389*, 300-305.
- Ravid, K., Lu, J., Zimmet, J. M., and Jones, M. R.** (2002). Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *J Cell Physiol* *190*, 7-20.
- Robinson, J. P., and International Society for Analytical Cytology** (1997). *Current protocols in cytometry* (New York: Wiley).
- Rohaly, G., Chemnitz, J., Dehde, S., Nunez, A. M., Heukeshoven, J., Deppert, W., and Dornreiter, I.** (2005). A novel human p53 isoform is an essential element of the ATR-intra-S phase checkpoint. *Cell* *122*, 21-32.
- Roninson, I. B.** (2003). Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res* *63*, 2705-2715.
- Rothkamm, K., Kruger, I., Thompson, L. H., and Lobrich, M.** (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* *23*, 5706-5715.
- Rubbi, C. P., and Milner, J.** (2003). p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *Embo J* *22*, 975-986.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2 (Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sandri, M. I., Isaacs, R. J., Ongkeko, W. M., Harris, A. L., Hickson, I. D., Broggin, M., and Vikhanskaya, F.** (1996). p53 regulates the minimal promoter of the human topoisomerase IIalpha gene. *Nucleic Acids Res* *24*, 4464-4470.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *74*, 5463-5467.

- Schneider, E., Montenarh, M., and Wagner, P.** (1998). Regulation of CAK kinase activity by p53. *Oncogene* 17, 2733-2741.
- Sears, L. E., Moran, L. S., Kissinger, C., Creasey, T., Perry-O'Keefe, H., Roskey, M., Sutherland, E., and Slatko, B. E.** (1992). Circumvent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase. *Biotechniques* 13, 626-633.
- Shiloh, Y.** (2003). ATM: ready, set, go. *Cell Cycle* 2, 116-117.
- Smith, M. L., and Fornace, A. J., Jr.** (1995). Genomic instability and the role of p53 mutations in cancer cells. *Curr Opin Oncol* 7, 69-75.
- Smith, M. L., and Seo, Y. R.** (2002). p53 regulation of DNA excision repair pathways. *Mutagenesis* 17, 149-156.
- Takahashi, T., Carbone, D., Takahashi, T., Nau, M. M., Hida, T., Linnoila, I., Ueda, R., and Minna, J. D.** (1992). Wild-type but not mutant p53 suppresses the growth of human lung cancer cells bearing multiple genetic lesions. *Cancer Res* 52, 2340-2343.
- Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y., and Nakamura, Y.** (2000). A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* 404, 42-49.
- Taylor, W. R., Agarwal, M. L., Agarwal, A., Stacey, D. W., and Stark, G. R.** (1999). p53 inhibits entry into mitosis when DNA synthesis is blocked. *Oncogene* 18, 283-295.
- Taylor, W. R., and Stark, G. R.** (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20, 1803-1815.
- Therrien, J. P., Drouin, R., Baril, C., and Drobetsky, E. A.** (1999). Human cells compromised for p53 function exhibit defective global and transcription-coupled nucleotide excision repair, whereas cells compromised for pRb function are defective only in global repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15038-15043.
- Thoma, F.** (1999). Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair. *Embo J* 18, 6585-6598.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.

- Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J., and McCawley, P.** (1977). The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 13, 213-217.
- Vaux, D. L.** (2002). Apoptosis timeline. *Cell Death Differ* 9, 349-354.
- von der Weth, A., and Deppert, W.** (1992). Lytic infection of primary rhesus kidney cells by simian virus 40. *Virology* 189, 334-339.
- Vousden, K. H., and Lu, X.** (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2, 594-604.
- Wang, Q., Zambetti, G. P., and Suttle, D. P.** (1997). Inhibition of DNA topoisomerase II alpha gene expression by the p53 tumor suppressor. *Mol Cell Biol* 17, 389-397.
- Wang, X. W., Yeh, H., Schaeffer, L., Roy, R., Moncollin, V., Egly, J. M., Wang, Z., Freidberg, E. C., Evans, M. K., Taffe, B. G., and et al.** (1995). p53 modulation of TFIID-associated nucleotide excision repair activity. *Nat Genet* 10, 188-195.
- Wang, X. W., Zhan, Q., Coursen, J. D., Khan, M. A., Kontny, H. U., Yu, L., Hollander, M. C., O'Connor, P. M., Fornace, A. J., Jr., and Harris, C. C.** (1999). GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3706-3711.
- Waterman, J. L., Shenk, J. L., and Halazonetis, T. D.** (1995). The dihedral symmetry of the p53 tetramerization domain mandates a conformational switch upon DNA binding. *Embo J* 14, 512-519.
- Wickham, T. J., Davis, T., Granados, R. R., Shuler, M. L., and Wood, H. A.** (1992). Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system. *Biotechnol Prog* 8, 391-396.
- Wolter, G.** (2001) Charakterisierung der strahlen-induzierten Komplexbildung von DNA Polymerase α -Primase mit dem Tumorsuppressor p53, Dissertation, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg.
- Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D., and Levine, A. J.** (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 7, 1126-1132.
- Xiao, H., Pearson, A., Coulombe, B., Truant, R., Zhang, S., Regier, J. L., Triezenberg, S. J., Reinberg, D., Flores, O., Ingles, C. J., and et al.** (1994). Binding of basal transcription factor TFIID to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Mol Cell Biol* 14, 7013-7024.
- Zhan, Q., Antinore, M. J., Wang, X. W., Carrier, F., Smith, M. L., Harris, C. C., and Fornace, A. J., Jr.** (1999). Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 18, 2892-2900.

- Zhao, R., Gish, K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffman, W. H., Tom, E., Mack, D. H., and Levine, A. J.** (2000). Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev* *14*, 981-993.
- Zhou, B. B., and Elledge, S. J.** (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* *408*, 433-439.
- Zhou, J., Ahn, J., Wilson, S. H., and Prives, C.** (2001). A role for p53 in base excision repair. *Embo J* *20*, 914-923.
- Zhou, X. Y., Wang, X., Hu, B., Guan, J., Iliakis, G., and Wang, Y.** (2002). An ATM-independent S-phase checkpoint response involves CHK1 pathway. *Cancer Res* *62*, 1598-1603.