

**Identifizierung und Charakterisierung molekularbiologischer Veränderungen
am Beispiel des Tumorsuppressors p53
in der Tamoxifen- bzw. Bromdeoxyuridin-induzierten
Karzinogenese im Labornager**

Inaugural – Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Vorgelegt von

Virginia Marossek

aus Wuppertal

Wuppertal

2001

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Referent(in): Prof. Dr. W. Kunz

Koreferent(in): Priv.-Doz. Dr. H.-W. Vohr

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2001

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. U. Wirnitzer für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit, für die hervorragende Betreuung mit anregenden Diskussionen und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Prof. Dr. W. Kunz danke ich für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit im Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und seine Hilfe bei der Korrektur und dem Abschluß dieser Arbeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. H.-W. Vohr danke ich für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit im Institut Toxikologie der Bayer-AG, Wuppertal, und seine konstruktive Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

Herzlich bedanke ich mich bei Herrn R. Wolf für die hervorragende und produktive Zusammenarbeit, sowie bei Herrn N. Sedlak für die Hilfe bei jeglichen Computerproblemen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abkürzungen.....	4
Synonyme.....	5
1. Einleitung.....	6
1.1 Das p53-Protein.....	7
1.2 Die Struktur von p53.....	7
1.3 Funktionen des p53-Proteins.....	9
1.3.1 Zellzyklus-Kontrolle.....	11
1.3.2 Apoptose.....	12
1.3.3 Weitere p53-Funktionen.....	13
1.4 Regulation von p53.....	14
1.5 p53 in der Kanzerogenese.....	15
1.5.1 p53 in der Humankanzerogenese.....	16
1.5.2 p53 in der Kanzerogenese des Nagers.....	17
1.6 Risikoabschätzung zum karzinogenen Potential.....	18
1.7 Fragestellung und Ziele.....	19
2. Material und Methoden.....	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 Geräte.....	20
2.1.2 Chemikalien.....	21
2.1.3 Material für die Immunhistochemie.....	21
2.1.4 Material für die PCR.....	22
2.1.5 Material für die Klonierung.....	24
2.1.6 Material für die Sequenzierung.....	25
2.1.7 Material zur Herstellung von Mutanten.....	26
2.1.8 Material für die Temperatur-Gradienten-Gelelektrophorese (TGGE).....	27
2.1.9 Material für den „Cleavase Fragment Length Polymorphism“ (CFLP).....	27
2.1.10 Material für den „Restriction Site Mutation Assay“(RSM).....	29
2.1.11 Material für das MutS-Bindungsexperiment.....	29
2.1.12 Material für die Gelelektrophorese.....	30
2.1.13 Sonstiges.....	30
2.2 Methoden.....	32
2.2.1 Tierexperiment.....	32
2.2.2 Immunhistochemie.....	33
2.2.2.1 Asservierung von Organen.....	33
2.2.2.2 Anfertigung von Gewebeschnitten.....	33
2.2.2.3 Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten mit p53-Antikörpern.....	34

2.2.2.4 Mikrodissektion.....	35
2.2.3 DNA-Isolierung.....	35
2.2.4 Die Polymerase-Ketten-Reaktion.....	37
2.2.4.1 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	38
2.2.5 Klonierung.....	39
2.2.6 Plasmidisolierung.....	42
2.2.7 Sequenzierung.....	42
2.2.7.1 Kolorimetrische Detektion.....	44
2.2.7.2 Chemilumineszenz Detektion.....	44
2.2.8 Herstellung von Mutanten.....	45
2.2.9 Temperatur-Gradienten-Gelelektrophorese (TGGE).....	46
2.2.9.1 Silberfärbung.....	47
2.2.10 „Cleavase Fragment Length Polymorphism“ (CFLP).....	48
2.2.11 „Restriction Site Mutation Assay“ (RSM).....	48
2.2.12 MutS Bindungsexperiment.....	49
2.2.13 Bidirektionaler didesoxy-Fingerpint (biddF).....	50
2.2.14 Bestimmung von DNA-Konzentrationen.....	50
3. Ergebnisse.....	52
3.1 Testung verschiedener Mutations-Detektions-Systeme.....	52
3.1.1 Immunhistochemie, Mikrodissektion, PCR und Sequenzierung: die Effizienz des Systems wird durch die Sensitivität der Sequenzierung eingeschränkt.....	52
3.1.2 Kontrollmutanten zur Bestimmung der Sensitivität verschiedener Mutations-Detektions-Systeme.....	58
3.1.3 Die Temperatur-Gradienten-Gelelektrophorese (TGGE) ist aufgrund ihrer zu geringen Sensitivität zur Detektion seltener Mutationen nicht geeignet.....	59
3.1.4 Der „Cleavase Fragment Length Polymorphism“ (CFLP) ist aufgrund schlechter Reproduzierbarkeit zur Mutations-Detektion ungeeignet.....	62
3.1.5 Die Effizienz des „Restriction Site Mutation Assay“ (RSM) bei der Anreicherung mutanter DNA-Moleküle ist ungenügend.....	63
3.1.6 Das MutS Bindungsexperiment führt nicht zu der gewünschten Anhebung des Anteils an mutanten Molekülen in einem DNA- Gemisch.....	64
3.1.7 Der bidirektionale didesoxy-Fingerpint (biddF) ist unter den getesteten Systemen die effizienteste Methode zur Detektion seltener Mutationen.....	65
3.2 Detektion von Mutationen im p53 Exon 5-9 nach Tamoxifen-Exposition in der Ratte.....	68

3.3 Detektion von Mutationen im p53 Exon 5-8 nach Bromdeoxyuridin- bzw. Ethidiumbromid-Exposition in der Maus.....	70
4. Diskussion.....	72
4.1 Immunhistochemische Darstellung von p53 in der Leber von Tamoxifen- behandelten Ratten und Bromdeoxyuridin- bzw. Ethidiumbromid- behandelten Mäusen.....	73
4.2 Der biddF als eine Sensitive Methode zur Detektion unbekannter Mutationen vor einem Wildtyp-Hintergrund.....	74
4.3 Induktion von p53-Mutationen durch Tamoxifen in der Leber der Ratte.....	78
4.4 Induktion von p53-Mutationen durch Bromdeoxyuridin und Ethidiumbromid in der Leber der Maus.....	81
4.5 p53 als Marker für die Tumorentstehung.....	83
5. Ausblick.....	85
6. Zusammenfassung.....	86
7. Literaturverzeichnis.....	88
Eidesstattliche Erklärung.....	101
Lebenslauf.....	102

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
abs.	Absolut
AIF	Apoptose induzierender Faktor
APS	Ammoniumpersulfat
BAI1	brain-specific angiogenesis inhibitor 1
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaar
BrdU	Bromdeoxyuridin
BSA	bovine serum albumin (Rinderserum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	Diethylaminoethylen
d.h.	das heißt
DNA	Desoxy-Ribo-Nukleinsäure
ds	Eppstein Barr Virus kodiertes nukleäre Antigen 5
E.coli	Escherichia Coli
EtBr	Ethidiumbromid
g	Gramm
GADD45	Growth Arrest and DNA Damage Inducible Protein
h	Stunde
HBxAG	Hepatitis B x-Antigen
IGF	insulin-like growth factor
IGF-BP3	insulin-like growth factor-1-binding protein 3
kb	Kilobasen (1000 bp)
kD	kilo Dalton
kg	Kilogramm
l	Liter
m	männlich
μ	Mikro
mA	Milliampere
mdm2	murine double minute 2
mg	Milligramm
min.	Minute
ml	Milliliter
mut	Mutante
n.d.	nicht durchgeführt
NNM	N-Nitrosomorpholin
o.ä.	oder ähnliches
p.A.	zur Analyse
PAA	Polyacrylamid
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	p53 induzierte Gene
PK	Proteinase K
ppm	parts per million
rb	retino blastoma Gen
rpm	rounds per minute
rATP	ribo Adenosin-Triphosphat
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SA-AP	Streptavidin Alkalische Phosphatase
s.o.	siehe oben
ss	single strand (einzelstängig)
s.u.	siehe unten
SV40 T	simian virus 40 large T-antigen
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tm	Schmelzpunkt
Tsp	Thrombospondin

u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
V	Volt
W	Watt
W	weiblich
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Synonyme

Antigen	Ein von einer Zelle an ihrer Oberfläche präsentiertes oder frei vorliegendes Protein, dessen Epitope durch Antikörper oder T-Zellen erkannt werden
Antikörper	Erkennt und bindet spezifisch Proteine oder Proteinbereiche und deren glykosilierten Varianten (Antigene)
Apoptose	programmierter Zelltod
Buffy coat	Nach Abtrennung des Plasmas und des Blutkuchens durch Zentrifugation enthält diese Schicht die weißen Blutzellen
Blunt (ended)	DNA-Moleküle mit glatten Enden, d.h. beide Stränge haben eine identische Länge und alle Basenpaare liegen gepaart vor
ddH ₂ O	doppelt deionisiertes Wasser
ddNTP	2'-dideoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
Demaskieren	Antigene werden durch diesen Prozeß für Antikörper zugänglich gemacht
direct blotting	direktes Überführen von Nukleinsäuremolekülen aus einem PAA-Gel auf eine Nylon-Membran während der Elektrophorese
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
double strand	doppelsträngiges DNA-Molekül
hot spot	Bereich in der DNA in dem gehäuft Mutationen auftreten
in vitro	in Zellkulturen o.ä. durchgeführte Versuche/erhaltene Ergebnisse
in vivo	im lebenden Organismus
knock-out	bei gentechnisch veränderten Tieren: Tiere ohne funktionelles Allel eines bestimmten Gens
loop	durch Basenfehlpaarung entstehende DNA-Schleife
mismatch	fehlgepaartes Basenpaar
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
Recovery	Phase ohne Exposition nach einer Behandlung von Versuchstieren
single cell PCR	Einzelzell PCR
single strand	einzelsträngiges DNA-Molekül
slot	Geltasche; ausgesparter Bereich zum Auftragen von Proben
sticky (ends)	DNA-Moleküle mit überhängenden Enden
Template	durch eine PCR zu vervielfältigender Nukleinsäurebereich

1. Einleitung

Laut der Weltgesundheitsorganisation WHO wird es in den nächsten Jahren einen dramatischen Anstieg an neuen Krebserkrankungen geben. Statt der derzeit 10 Millionen Neuerkrankungen weltweit pro Jahr wird sich diese Zahl bis zum Jahr 2020 voraussichtlich verdoppeln (WHO/ K.Sikora, 2001). Das Gebiet der Krebsforschung ist daher ein großes und sehr aktuelles Forschungsgebiet, das viele Interessen, auch die der Industrie, auf sich zieht. Deshalb ist die Nachfrage nach wirksamen Therapeutika zur Behandlung von Krebserkrankungen weiterhin groß, und es gilt nach wie vor ungeklärte Stoffwechselwege und Mechanismen in der Tumorentstehung aufzuklären, um wirksame Therapien zu etablieren und eine möglichst frühe Diagnose der Krankheit zu ermöglichen.

Nahezu alle Gewebezellen können entarten und unterschiedlichste Tumore mit verschiedenen Merkmalen bilden. Grundsätzlich ist den entarteten Zellen aber eines gleich: ihre Systeme zur Wachstumskontrolle versagen. In der normalen Zelle werden von außen ankommende Wachstumssignale durch membranständige Rezeptoren aufgefangen und durch Signalkaskaden im Zellinneren zum Zellkern geleitet. Dort vermitteln Transkriptionsfaktoren die ankommenden Signale und aktivieren Gene, deren Produkte den Zellzyklus vorantreiben. In diese Signalkaskaden sind viele sogenannte Proto-Onkogene involviert, die in einer normalen Zelle überwiegend für Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren und Signalübermittler kodieren und deswegen unmittelbar an der Proliferation und Differenzierung der Zelle beteiligt sind (Poremba et al., 1996). Mutiert solch ein Proto-Onkogen, so kann das entstehende Onkogen zu einer permanenten Aktivierung der wachstumsfördernden Signalkaskaden und zu unkontrolliertem Zellwachstum führen. Ein Beispiel hierfür stellt die Familie der ras-Onkogene dar.

Antagonisten zu den Proto-Onkogenen sind die Tumorsuppressor-Gene, die das Zellwachstum inhibieren. Tumorsuppressoren sind nicht direkt an Proliferation oder Differenzierung beteiligt, sondern wirken über Aktivierung der Expression anderer Gene (Poremba et al., 1996). Ankommende, das Wachstum hemmende Botschaften werden von der Zelle über ähnliche Signalkaskaden verarbeitet wie wachstumsfördernde, führen aber zur Expression von den Zellzyklus inhibierenden Proteinen. Die Inaktivierung von Tumorsuppressoren durch Mutationen kann demnach ebenfalls zu unkontrolliertem Wachstum führen. Ein Beispiel hierfür ist das im Cytoplasma vorkommende Protein des Genes *NF-1*, das ras-Proteine komplexiert, bevor sie zu einer Wachstumsförderung führen können (Knudson, 1971 und 1990; Stanbridge, 1990; Varmus und Weinberg, 1994; Weinberg, 1996). Ein weiteres, sehr prominentes Mitglied der Familie der Tumorsuppressor-Gene, die nach heutigem Kenntnisstand mindestens 24 definierte Mitglieder aufzuweisen hat (Macleod, 2000), ist p53. p53 ist in mehr als 50% der menschlichen Tumoren sowohl auf der DNA-Ebene als auch auf der Proteinebene verändert (Poremba et al., 1996; Hainaut et al., 1997; Soussi, 2000a; Soussi et al., 2000b; Abb.1). Das codierte Protein hat eine Vielzahl von z.T. noch nicht komplett aufgeklärten Funktionen, auf die im Weiteren näher eingegangen wird.

1.1 Das p53-Protein

Das Phosphoprotein p53, das als Tumorsuppressor agiert, wurde erstmalig 1979 von A. Levine, D. Lane und W. Old als Onkogen beschrieben und erst 10 Jahre später, 1989, von B. Vogelstein und seinen Kollegen der Gruppe der Tumorsuppressorgene zugeordnet (Lane et al., 1979; Linzer et al., 1979; DeLeo et al., 1979; Joy et al., 1981; *Frontiers in Bioscience*, 2001; HHMI, 2001). Seitdem hat sich die Forschung zu diesem Gen und dem daraus resultierenden Protein in unübersichtlichem Maße weiterentwickelt, was sich in einer Vielzahl an Publikationen zum Thema p53 niederschlägt. Auch das Interesse der Öffentlichkeit ist inzwischen groß. So wurde 1993 p53 von der Fachzeitschrift „Science“ zum Molekül des Jahres gekürt (Culotta und Koshland, 1993), während die Zeitung „Die Zeit“ im p53-Gen das „Wächtergen“ und im entsprechenden Protein den „Schutzengel des Genoms“ sieht (Die Zeit, 1995). Zudem wurde den namenhaften Forschern David P. Lane, Arnold J. Levine und Bert Vogelstein 1998 der bedeutende deutsche Medizinpreis, der Paul Ehrlich- und Ludwig Darmstaedter-Preis, für ihre Erfolge in der p53-Krebsforschung verliehen (Biospektrum, 1998).

p53 ist gerade in der Krebsforschung von solch großem Interesse, da die Veränderung oder Inaktivierung des codierenden Genes durch Mutationen oder die Interaktion von p53 mit Onkogenprodukten von DNA-Tumoviren zu Krebs führen können (Levine et al., 1991). Dies zeigt sich unter anderem darin, daß p53-Mutationen oder veränderte p53-Expression in Tumoren beim Menschen eine große Rolle spielen (Poremba et al., 1996; Hainaut et al., 1997; Soussi, 2000a; Soussi et al., 2000b). Da Mutationen in bestimmten Genen in Tumoren als das Ergebnis eines Selektionsprozesses auf Wachstumsvorteile während der fortschreitenden Karzinogenese betrachtet werden, wird diesen Genen eine kausale Rolle in der Kanzerogenese zugeordnet. Die Häufigkeit und weltweite Verteilung von p53-Mutationen in verschiedenen Tumorarten wird in Abb.1 dargestellt.

1.2 Die Struktur von p53

Das humane *p53*-Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (NCBI Genes and disease Map, 2001) und codiert ein Phosphoprotein mit einem Molekulargewicht von 53 kD. Die *p53*-Gene des Menschen und der Maus weisen 11, das der Ratte nur 10 Exons auf, da hier das Intron zwischen Exon 6 und 7 fehlt (Hulla et al., 1993). Bei Säugern ist der Tumorsuppressor sowohl auf DNA- als auch auf Proteinebene mit Homologien von 93% in den Exons 5-8, d.h. in den Proteindomänen II-V, hochgradig konserviert (Soussi et al., 1990; Prives, 1994; siehe auch Abb.2). Das p53-Protein gliedert sich in mehrere funktionelle Bereiche (Abb.2). Aminosäuren 1-43 bilden die N-terminale transaktivierende Proteindomäne, über die eine Interaktion mit den Transkriptionskomplexen erfolgt (Prives, 1994), wobei benachbarte Domänen ebenfalls involviert werden können (Chang J. et al., 1995a). Momand et al. (1992) zeigten, daß die Bindung des

Mdm2-Proteins an den N-Terminus von p53 dessen Transaktivierungsaktivität hemmt und zu seinem Abbau führt.

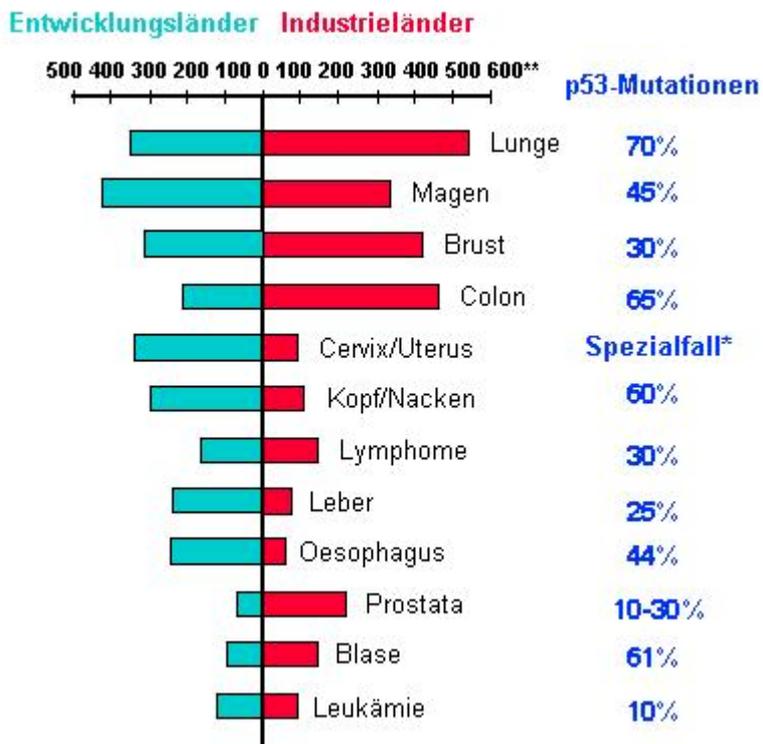


Abb.1 p53-Mutationen in Tumoren des Menschen

**Anzahl der Krebsfälle pro Jahr x1000; * 84% aller Cervix-Karzinome enthalten HPV16- und HPV18-DNA, wobei das E6-Protein die Degradation des p53-Proteins beschleunigt. Dies bewirkt eine geringe Konzentration an aktivem p53, und wird als ursächlich für die Entstehung der Cervix-Karzinome betrachtet (nach Soussi, 2000b und 2001; zur Hausen 2000; Rothmann et al, 1998).

Über den hoch-konservierten Bereich, bestehend aus den Aminosäuren 100-300, interagiert das funktionelle Protein mit spezifischen DNA-Sequenzen. Diese spezifische DNA-Bindungsdomäne weist auf DNA-Ebene 93% Homologie zwischen den Säugetieren auf, und ist am häufigsten in Humantumoren mutiert (Soussie, 1990; Prives, 1994; Cho, 1994; Vogelstein, 1994). Die vom aktiven p53-Protein erkannte DNA-Sequenz hat die generelle Form des vier Mal hintereinander liegenden Palyndroms 5'-(PuPuPuC(A/T)(A/T)GpyPyPy)²-3' (Vogelstein et al., 1992 und 1994), wobei Pu für eine Purin-, Py für eine Pyrimidin-Base steht. Die Bindung von wt-p53 an Promotoren mit diesem Palyndrom kann die Transkription z.B. des MCK-Proteins oder des p21^{WAF1/CIP1}-Proteins aktivieren (Zambetti et al., 1992; Jackson et al., 1998; El-Deiry et al., 1993). Außerdem können eine Vielzahl von viralen Proteinen, wie SV40-T, HPVE6, HBV-HbxAG oder CMVIE84, und zellulären Proteinen, wie HSP70 oder PCNA, durch Interaktion mit der DNA-Bindungsdomäne zum Funktionsverlust des p53-Proteins führen (Shay et al., 1992; Momand et al., 1992; Crook et al., Chang et al., 1995a; Speir et al., 1994). Zwischen DNA-Bindungs- und Transaktivierungsdomäne

befindet sich eine Prolin-reiche Region, die mit verschiedenen Signal-übertragenden Molekülen in Wechselwirkung treten kann (Gorina et al., 1996).

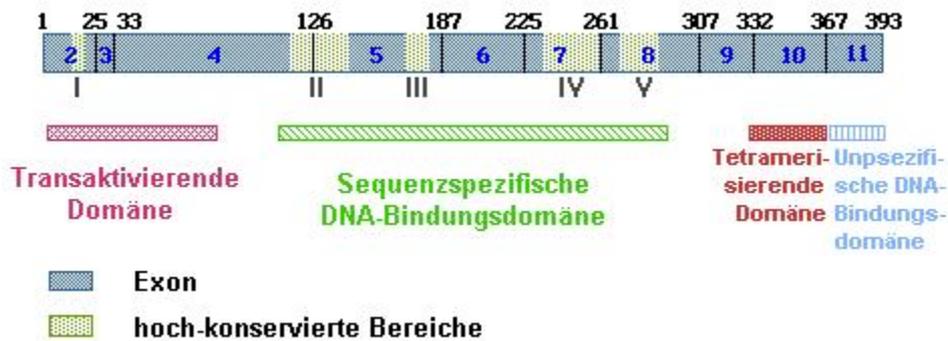


Abb.2 Struktur des humanen p53-Proteins

Die Ziffern oberhalb des Proteins geben Aminosäurepositionen an, die innerhalb des Proteins stehen für die Exons auf DNA-Ebene. Römische Zahlen stehen für die einzelnen hoch-konservierten Protein-Bereiche. Erläuterung siehe Text. (verändert, aus „The Role of p53 in the Cell Cycle and its Link to Cancer“, <http://attila.stevens-tech.edu/chembio/spinel/index.htm> (2001))

Biologisch aktiv ist p53 nur als Tetramer, für dessen Bildung die Tetramerisierungsdomäne (Aminosäuren 320-360) verantwortlich ist (Prives, 1994; Jeffrey et al., 1995). Zusätzlich findet man dort die sogenannten Kernlokalisationssequenzen NLS I, II und III, die die Translokation von p53 in den Zellkern vermitteln (Ko et al., 1996).

Die C-terminale Domäne bindet sequenzspezifisch einzelsträngige DNA-Fragmente, doppelsträngige DNA-Enden sowie deletierte und insertierte DNA-Bereiche (Jayaraman et al., 1995). Auf diese Weise kann p53 Mutationen und fragmentierte DNA erkennen, und Maßnahmen zur Korrektur der Schäden oder zur Zerstörung der Zelle können eingeleitet werden.

1.3 Funktionen des p53-Proteins

Die Kernfunktion des Proteins p53 ist die eines Transkriptionsfaktors, der aktivierend oder hemmend auf die Expression anderer Gene wirken kann (Poremba et al., 1996). Als transkriptioneller Aktivator bindet p53 als Tetramer über den N-Terminus an seine spezifische Erkennungssequenz, wobei es zumindest teilweise von dem Initiierungsfaktor TFIID abhängig ist (Liu et al., 1993; Truant et al., 1993). Eine Auswahl von Genen, die durch p53 aktiviert werden, sind p21^{WAF1/CIP1}, mdm2, GADD45 und bax (siehe auch Tab. 1). Transkriptionshemmend wirkt p53 ebenfalls über seinen N-Terminus aber nicht über seine Konsensussequenz. Als eine Interaktionsmöglichkeit wird die Wechselwirkung von p53 mit dem TATA-box bindenden Protein diskutiert (Liu et al., 1993).

Genprodukt	Funktion
p21 (WAF1/Cip1)	Inhibiert verschiedene Cyclin-abhängige Kinasen (cdk); bindet cdk's, Cycline und PCNA; hemmt den Zellzyklus.
mdm2	Das Onkogen-Produkt inaktiviert p53-vermittelte Transkription; bildet eine autoregulatorische Rückkopplungsschleife mit p53.
GADD45	Bindet nach DNA-Schädigung an PCNA und kann den Zellzyklus stoppen; ist direkt an der DNA-Reparatur beteiligt.
Bax	Ein Mitglied der Bcl2-Familie, die Apoptose vorantreibt; wird nicht in allen Zelltypen durch p53 induziert.
IGF-BP3	Treibt die Apoptose voran

Tab. 1 Beispiele für Genprodukte, die von p53 transkriptionell aktiviert werden (nach Levine, 1997)

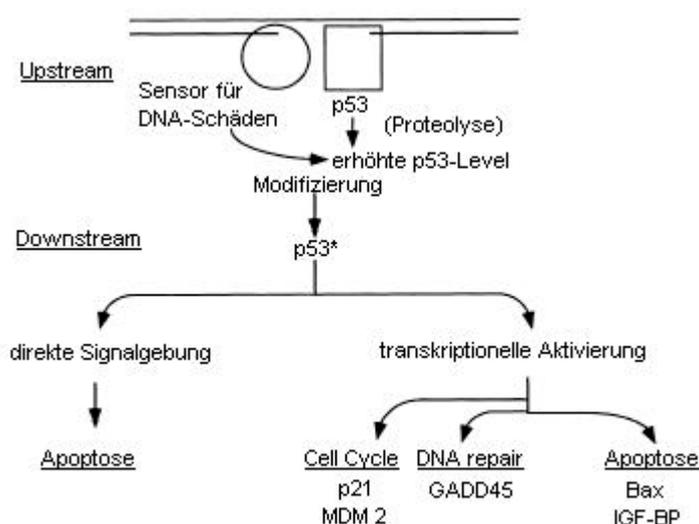


Abb.3 Die Vorgänge in der p53-Aktivierung

DNA-Schäden (als Bruch in der Doppellinie an der Bildoberseite dargestellt) werden durch „Sensor“-Moleküle (Kreis und Quadrat) und möglicherweise durch die C-terminale Domäne von p53 erkannt. Wenn beide Sensor-Moleküle einen DNA-Schaden erkennen, wird p53 durch Phosphorylierung modifiziert. Dies erhöht die Halbwertszeit von p53 und führt nach sterischen oder allosterischen Veränderungen zur Bindung des Proteins an spezifische DNA-Sequenzen, die „downstream“ Gene regulieren. Ein Signalweg ist abhängig, der andere unabhängig von der Transkription von „downstream“ Genen (Levine, 1997).

Transkriptionelle Repression durch p53 ist z.B. bekannt für beta-Actin, p53 selbst, hsp70, c-jun, c-fos und PCNA (Bogler, 2001). Quantifizierung von p53 mRNA-Spiegeln einer humanen

Lungenkrebs-Zelllinie, die temperatur-sensitives p53 exprimiert, nach Temperaturerhöhung mittels DNA-Mikroarrays ermöglichte die Identifizierung von 289 primären und sekundären p53-Zielgenen. Davon werden 212 Gene durch p53 aktiviert, 77 werden gehemmt (Kannan et al., 2001).

p53 kann nach seiner Aktivierung je nach Zelltyp oder physiologischer Situation unterschiedliche Ziele durch direkte Signalgebung oder durch Transkriptionsaktivierung ansprechen (siehe Abb.3). Die Konsequenz für die Zelle ist abhängig von den entstehenden Genprodukten: es kommt zu einem Zellzyklusstop, DNA-Reparatur oder auch zur Apoptose (programmierter Zelltod).

1.3.1 Zellzyklus-Kontrolle

Eine der Aufgaben von p53 liegt in der Kontrolle des Zellzyklus, der in vier Stadien unterteilt wird: die G₁-, S-, G₂- und M-Phase. Hierbei steht G für Lücke (gap), S für Synthese und M für Mitose. Befindet die Zelle sich nicht in Teilung, sondern in einem Ruhestadium, also außerhalb des Zellzyklus, so ist sie in der sogenannten G₀-Phase. Innerhalb des Zellzyklus findet man zwei Kontrollpunkte, die sogenannten „checkpoints“ (Hartwell et al., 1989), an denen das Erbgut auf seine Integrität überprüft wird und der Kreislauf der Zellverdopplung unterbrochen werden kann. Ursachen für einen Stop im Zyklus sind z.B. DNA-Schäden, Sauerstoffmangel, Onkogenaktivierung oder Infektion durch einige Viren, wobei genaue Mechanismen zum Teil noch ungeklärt sind (Jacks et al., 1996). Am Kontrollpunkt in der späten G₁-Phase (G₁/S-Kontrollpunkt) wird vor dem Eintritt in die S-Phase die Integrität der DNA vor ihrer Replikation überprüft. Liegt ein Schaden vor, so wird die Synthese solange herausgezögert, bis der Schaden behoben ist, wobei ein transients Anstieg der intrazellulären Konzentration an wt-p53 zu beobachten ist. Ist der DNA-Schaden irreparabel, so wird Apoptose eingeleitet. Nach der Synthese wird die DNA am G₂-Kontrollpunkt auf eventuelle Replikationsfehler und Chromosomenbrüche untersucht (Hartwell et al., 1989 und 1991).

Die Schlüsselkomponenten der Regulation des Zellzyklus sind Komplexe aus Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) und ihrer regulatorischen Untereinheiten, den Cyclinen. Die Cycline aktivieren durch Bindung die CDKs und dirigieren sie dann zu ihrem entsprechenden Substrat (Weinberg, 1996). Es gibt verschiedene Cycline und CDKs, die in unterschiedlicher Zusammensetzung in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus agieren (siehe dazu Abb.4).

Cyclin B steuert so im Komplex mit CDC2-Kinasen die Passage durch die M-Phase, Cyclin D mit CDK2, CDK4 oder CDK6 die mittlere und späte G₁-Phase. Wichtig für den Übergang von der G₁-Phase in die S-Phase scheint der CDK-Inhibitor p21 zu sein, dessen Bildung von p53 initiiert wird (Hermeking et al., 1995). p21 hemmt die Funktion verschiedener CDKs, was die Phosphorylierung von RB und damit die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F verhindert. Dadurch werden Gene, die den Eintritt in die S-Phase vermitteln, nicht induziert und der Zell-Zyklus wird blockiert. Außerdem stellt p21 sicher, daß keine weitere S-Phase erfolgt, bevor der Zyklus nicht durch die M-Phase fortgeschritten ist. Weitere CDKs können von p21 und damit von p53 inhibiert werden (El-Deiry et al., 1993; Funk und Kind, 1997; Harbour und Dean, 2000; Waldmann et al., 1996). Der G₁/S-Übergang und die S-Phase werden durch Wechselwirkungen zwischen Cyclin A und CDK2

reguliert (Weinberg, 1996; Hunter et al., 1994). Der G₂-Kontrollpunkt scheint ebenfalls von der p53/p21 Wechselwirkung beeinflusst zu werden (Bunz et al, 1998).

Wird p53 durch Mutation oder andere Faktoren inaktiviert, so geht der Zelle ein wichtiger Faktor des Zellzyklus verloren, und es kommt zu nicht erkannten und nicht reparierten DNA-Schäden, die in der Folge zu unkontrollierter Zellteilung führen können. So können Mutationen entstehen, die für die Zelle Wachstumsvorteile darstellen und so zur Tumorentstehung beitragen.

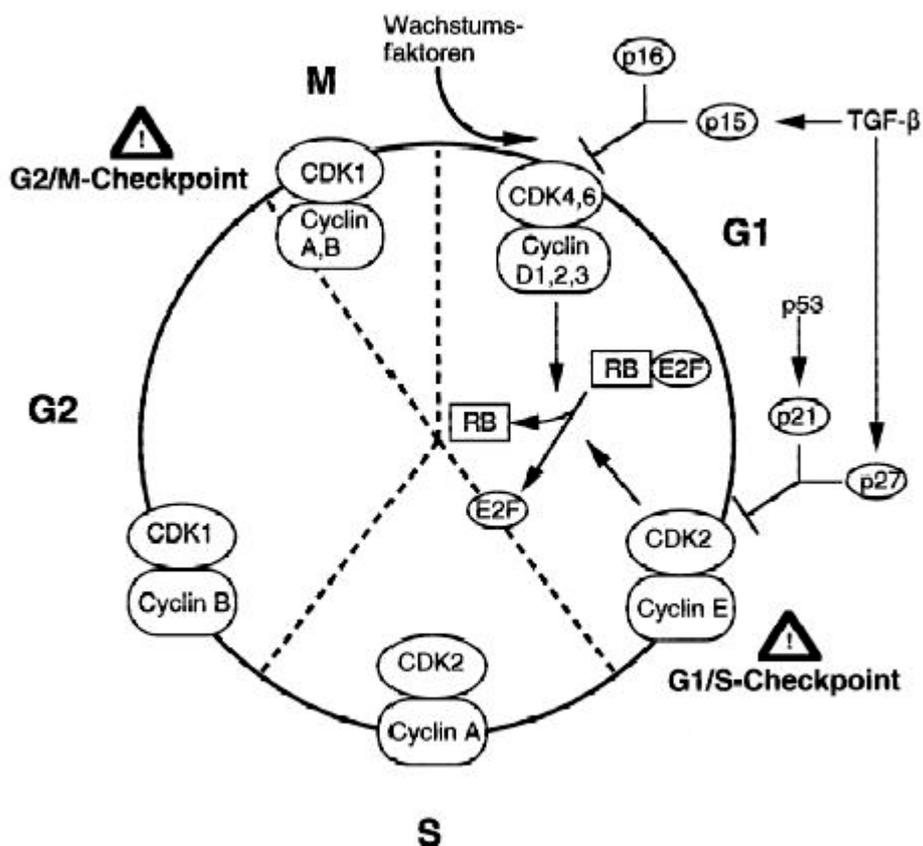


Abb.4 Schematischer Ablauf des Zellzyklus

Es sind die im Zellzyklus wichtigsten CDK/Cyclin-Komplexe, sowie die in der G1-Phase wirksamen Inhibitoren dargestellt. Als ein Substrat wurde exemplarisch das Tumorsuppressorprotein RB eingezeichnet, dessen Phosphorylierung zur Freisetzung von E2F und damit zum Übergang in die S-Phase führt (nach Funk und Kind, 1997). → = Aktivierung; ⊥ = Hemmung

1.3.2 Apoptose

Ist ein DNA-Schaden irreparabel, so wird Apoptose eingeleitet. Es wird angenommen, daß die Entscheidung der Zelle zwischen Zellzyklusstopp und Apoptose neben dem Ausmaß der DNA-Schäden auch von der p53-Konzentration, von p21 und den Wechselwirkungen zwischen den p53- und Rb-Stoffwechselwegen bestimmt wird (Agarwal, 1998; Polyak et al., 1996; Chen et al., 1996).

p53 spielt hierbei als einer der Hauptregulatoren des Zellzyklus eine führende Rolle. Im Gegensatz zum p53-vermittelten Wachstumsstopp kann Apoptose, wie schon in Abb.4 gezeigt, sowohl mit als auch ohne durch p53 vermittelte transkriptionelle Aktivierung initiiert werden, wobei sich beide Wege ergänzen (Amundson et al., 1998; Bates und Vousden, 1999). Verschiedene p53-induzierte Gene tragen zur Einleitung der Apoptose bei, dabei ist die Induktion eines Genproduktes unzureichend. Ein Beispiel ist IGF-BP3, dessen Genexpression durch p53 aktiviert wird. IGF-BP3 kann den Wachstumsfaktor IGF inhibieren und so in den Zellzyklus eingreifen. p53 selber hemmt zusätzlich die Transkription des IGF-1-Rezeptors, wodurch Apoptose gefördert wird (Buckbinder et al., 1995; Werner et al., 1996; Prisco et al., 1997; Sionov und Haupt, 1999). Ein anderes p53-induziertes Genprodukte ist z.B. Bax, das die Freisetzung des Apoptose induzierenden Faktors AIF und von Cytochrom C aus den Mitochondrien fördert, was wiederum zur Aktivierung von Caspasen und zur Apoptose führt (Susin et al., 1999; Sionov und Haupt, 1999). Dies sind nur zwei Beispiele aus einer Menge von Proteinen und Protein-Kaskaden (wie z.B. Fas/APO, PIG, p85, usw.), die in die komplizierten Prozesse, die zur Apoptose führen, involviert sind. Detaillierte Informationen hierzu sind u.a. in den Publikationen von A.J.Levine (1997), R.V.Sionov (1999) oder A.H.Wyllie (1997) zu finden.

Für den Organismus bedeutet der Verlust von funktionellem p53 in der Apoptose, daß Zellen mit irreparablen DNA-Schäden nicht eliminiert werden, sich schließlich durch Selektion auf Wachstumsvorteile gegenüber „normalen“ Zellen weiter teilen, und so zur Tumorentstehung beitragen. Funktionelles p53 unterstützt somit die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität.

1.3.3 Weitere p53-Funktionen

Die Gene, die für die Thrombospondine 1 und 2 (Tsp1 und 2) und BAI1 (Gehirn-spezifischer Angiogenese Inhibitor 1) kodieren, sind ebenfalls Ziel der transkriptionellen Aktivierung durch p53. Dies sind Inhibitoren der Neoangiogenese, der Bildung von Netzwerken neuer Blutgefäße aus bereits vorhandenen Gefäßen, die z.B. für die Versorgung von Tumoren ab einer bestimmten Größe essentiell sind (Dameron et al., 1994; Nishimori et al., 1997; Rovinsky et al., 1998). Ein funktionelles p53 trägt auf diesem Wege zur Hemmung des Tumorwachstums bei, wohingegen der Ausfall der p53-Funktion unkontrolliertes Tumorwachstum fördert, da die Versorgung des neu entstehenden Gewebes durch Neoangiogenese gesichert wird.

Eine weitere für p53 diskutierte Funktion ist seine Involvierung in die zelluläre Seneszenz. Unter Seneszenz versteht man die Alterung der Zelle durch den Verlust des proliferativen Potentials mit wachsender Anzahl an Zellteilungen. p53 scheint über den, in die Seneszenz verwickelten, p19^{ARF}/p53/p21^{WAF1/CIP1}-Stoffwechselweg zur Zellalterung beizutragen (Hayflick, 1975; Bringold und Serrano, 2000). Fehlfunktionen oder Ausfall von p53 führen hier zu weiteren Teilungen gealterter Zellen und zu höherer Wahrscheinlichkeit für die Tumorentstehung.

1.4 Regulation von p53

p53 liegt in der Zelle normalerweise in latenter Form und in geringen Konzentrationen vor. Durch eine Vielzahl von zellulären Stressfaktoren, wie Genotoxine, Hitzeschock, Hypoxie, Hyperoxie, Wachstumsfaktoren, metabolische Veränderungen, aktivierte Onkogene und mehr, kann die Konzentration an aktivem p53 schnell steigen und adaptive Antworten wie Wachstumsstopp oder Apoptose auslösen. Die Art der initiierten Antwort hängt vom Zelltyp und dem umliegenden Gewebe ab (Prives und Hall, 1999). Die absolute intrazelluläre Konzentration von p53-Protein ruft, je nach Höhe, unterschiedliche Effekte hervor (Chen et al., 1996; Lassus et al., 1996), und ergibt sich aus dem dynamischen Gleichgewicht zwischen Protein-Synthese und -Degradation. Die Induktion von p53 nach DNA-Schädigung oder Expression viraler Onkogene wird hauptsächlich durch post-translationale Mechanismen vermittelt (Oren, 1999), wobei sie über eine erhöhte Halbwertszeit zu einem intrazellulären Anstieg der p53-Konzentration führt (Prives und Hall, 1999). In der ungestressten Zelle wird der p53-Umsatz durch eine Rückkopplungsschleife gesteuert: p53 aktiviert die Produktion des Proteins MDM2, das seinerseits an p53 bindet und es als Ziel für die Degradation kennzeichnet (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997). Eine Vielzahl von Möglichkeiten für die Wirkungsweise von MDM2, wie z.B. die Funktion als eine E6 Ubiquitin-Ligase oder das Herausschleusen des gebundenen p53 aus dem Nukleus ins Cytoplasma, wurde nachgewiesen (Honda et al., 1997; Roth et al., 1998).

Als Reaktion auf DNA-Schäden und zellulären Stress kann p53 vor allem über Phosphorylierung reguliert und in seiner Funktion verändert werden. Wie schon erwähnt, ist die tetramere Quartärstruktur die in vivo funktionale. Diese kann in proliferativer Konformation (positive Wirkung auf das Zellwachstum), in anti-proliferativer Konformation (G1-Arrest im Zellzyklus) oder in komplexierter Form (inaktiviert; führt zu unkontrollierter Zellteilung) vorliegen wobei die proliferative Form durch verschiedene Proteinkinasen in die stärker phosphorylierte anti-proliferative Form umgewandelt werden kann (Ullrich et al., 1992a und b). Die Umkehrung dieser Reaktion wird durch Phosphatasen katalysiert.

In Versuchen mit bakteriell exprimiertem humanen p53 wurde gezeigt, daß p53-Oligomere nur dann an die Konsensussequenz (spezifische Erkennungssequenz) binden, wenn ein Serin-Rest am C-Terminus der p53-Proteine phosphoryliert ist. Wird das Serin z.B. durch die Aminosäure Alanin ersetzt, so erlischt die wachstumshemmende Wirkung von p53 (Hupp et al., 1992 und 1995). Phosphorylierung scheint demnach ebenfalls dazu beizutragen, inaktive p53-Moleküle zu aktivieren. Ein Funktionsverlust von p53 aufgrund von Konformationsveränderungen muß also nicht zwingend auf ein Mutationereignis im *p53*-Gen zurückgeführt werden, sondern kann auch in Fehlern im p53-unabhängigen Phosphorylierungs/ Dephosphorylierungsprozeß begründet liegen. Nicht nur Phosphorylierung auch Acetylierung des C-Terminus, oder eine temporäre Verknüpfung von beiden Prozessen, steht in der Diskussion um die Regulation von p53 (Gu et al., 1997; Sakaguchi et al., 1998; Luo et al., 2000).

Eine weitere Möglichkeit, die p53-Funktionen zu beeinflussen, ist die Zurückhaltung des Proteins im Cytoplasma der Zelle durch Bindung an andere Proteine, die sogenannte Sequestrierung durch

zelluläre oder virale Proteine, die eine Translokalisierung in den Zellkern, in dem p53 aktiv werden kann, unterbindet. Diese Wechselwirkungen mit p53 wurden z.B. für EBNA, HBxAg und das menschliche Homologon des MDM2 gezeigt (Szekely et al., 1993; Wang et al., 1994; Momand et al., 1992).

Eine Übersicht über die wichtigsten Mediatoren zur Regulation des p53-Proteins ist zu finden in der Veröffentlichung von Sionov und Haupt, 1999.

1.5 p53 in der Kanzerogenese

Die Tumorentstehung ist ein vielschichtiger und langwieriger Prozeß. Nach heutigen allgemein akzeptierten Erkenntnissen läßt er sich in drei Phasen gliedern: die Initiation, die Promotion und die Progression (Sculte-Hermann, 1985; Marks, 1989; Weinberg, 1996). Initiation und Progression sind irreversibel, die Promotion reversibel (Pitot, 1993; Bursch, 1984). Die Initiation stellt ein Mutationsereignis in irgendeiner Zelle inmitten einer normalen Zellpopulation dar. Da einige Mutationen zu Wachstumsvorteilen der mutierten Zellen führen, kann sich ihr Potential zur Teilung gegenüber dem umliegenden Gewebe erhöhen, wenn der DNA-Schaden nicht rechtzeitig durch intrazelluläre Reparaturmechanismen behoben wird. Die mutierte Zelle und ihre Tochterzellen sind morphologisch normal, führen aber durch ihre erhöhte Teilungsaktivität zur sogenannten Hyperplasie.

Ereignet sich in einer dieser Zellen eine weitere Mutation, so kann die Zellteilungskontrolle weiter gelockert werden. Tochterzellen verändern dann auch ihre äußere Gestalt und Zellphysiologie, es kommt zur Dysplasie, Form und Orientierung der Zellen zueinander sind abnorm. In der Folge können sich weitere Mutationen ereignen, die die betroffene Zelle weiter verändern können. Aussehen und Wachstum dieser Zelle weichen zunehmend von der des Ursprunggewebes ab. Dies entspricht der Entstehung eines prä-invasiven (in-situ) Tumors, der noch keine Gewebegrenzen überschreitet. Dieser Tumor kann immer in seinem Gewebe verbleiben (gutartiger Tumor). Der Weg von der Zelle mit erhöhter Teilungsaktivität bis zum sichtbaren Tumor wird als die reversible Promotion bezeichnet. Die Vernichtung dieser entarteten Zellen und damit die Rückbildung des Tumors erreicht der Organismus u.a. durch Vorgänge wie die Apoptose (Pitot, 1993).

Weitere Mutationsereignisse können dazu führen, daß derart veränderte Zellen den Tumor verlassen, über das Blut oder die Lymphe in andere Gewebe eindringen und dort Metastasen bilden. Man spricht dann von einem malignen oder invasiven Tumor. Diese Progression kann bis zum Tod des betroffenen Organismus führen (Weinberg, 1996; Grafström, 1996).

Diese Beschreibung der Tumorentstehung ist schematisch gehalten und deshalb nicht allgemeingültig. Die Tumorentwicklung ist unter anderem von der Art der mutierten Gene und der Fähigkeit der Zelle, DNA-Schäden zu reparieren, abhängig. So weisen manche Tumorarten zahlreiche Mutationen auf, während in anderen nur sehr wenige, z.B. in Genen des Mismatch-Reparatur-Systems, gefunden werden.

Wie erwähnt spielen wachstumsfördernde proto-Onkogene und wachstumshemmende Tumorsuppressorgene in der Krebsentstehung eine entscheidende Rolle. Proto-Onkogene werden, wenn sie durch Mutationen überexprimiert werden, zu Onkogenen, die zu unkontrollierten Zellteilungen und zur Fixation neuer Mutationen beitragen. Durch Mutationen oder andere Prozesse ausgeschaltete Tumorsuppressorgene haben ihre Fähigkeit, die Zellteilung zu kontrollieren oder den Zelltod zu initiieren, verloren und tragen so zur deregulierten Zellteilung bei (Weinberg, 1996; Poremba et al., 1996). Die beschriebenen Prozesse sind schematisch in Abb.5 dargestellt, wobei hier zwischen Promotion und Progression noch die Konversion der Zellen als zusätzlicher Schritt eingeschoben wurde.

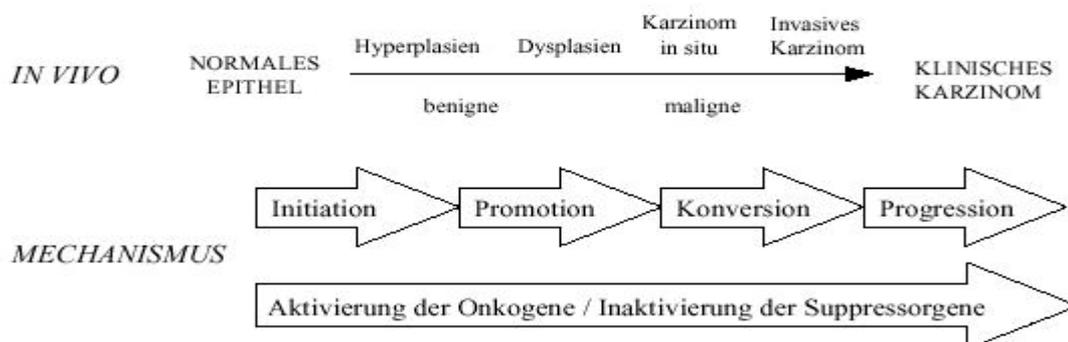


Abb.5 Darstellung des mehrstufigen Kanzerogeneseprozesses; Beschreibung siehe Text (nach Grafström et al., 1996)

Ein bereits erwähntes Beispiel für die Tumorsuppressorgene ist p53. Mutationen dieses Gens können in zwei Klassen eingeteilt werden. Die „loss of function“ Mutationen ziehen einen Funktionsverlust des wt-p53 nach sich, während die „gain of function“ Mutationen zu einer neuen Funktion des Proteins, hin zum Tumorwachstum führen (Lin et al., 1994).

1.5.1 p53 in der Humankanzerogenese

In über 50% nahezu aller humanen Tumorarten tritt eine veränderte p53-Expression auf. Davon sind mehr als 80% missense Mutationen in den konservierten Genbereichen, die über unterschiedliche Mechanismen (Nonsense- oder Spleißmutationen, Allelverlust oder Neuordnung des Gens) zu einem veränderten Protein und zu dessen verändertem Stoffwechsel (z.B. höhere Halbwertszeit) führen (Soussi et al., 1994; Chang et al., 1995b). Beispiele, die an Untersuchungen mit Humanmaterial gefunden wurden (in vivo-Daten), sind im Folgenden angesprochen:

in Patienten mit dem hereditären Li Fraumeni Syndrom, einer Krankheit, die durch multiple primäre Tumoren mit früher Manifestation im Kindes- und jungen Erwachsenenalter charakterisiert ist, wurden im Normalgewebe meistens Keimbahnmutationen in einem p53-Allel festgestellt, während in Tumoren häufig der Verlust eines p53-Allels gefunden wurde (Malkin et al., 1993).

Das E6-Protein der humanen Papilloma Viren 16 und 18 führt in Karzinomen des Anogenitaltraktes zur Inaktivierung des p53-Proteins durch dessen beschleunigte Degradation (Scheffner et al., 1990).

Die Involvierung von p53 in der Apoptose konnte bei Patienten mit Ataxia teleangiectasia (AT) nach DNA-Schädigung und bei humanen Lungenkrebszellen in vitro gezeigt werden (Duchaud et al., 1994; Fujiwara et al., 1993).

Ein weiterer essentieller Mechanismus ist die Sequestrierung des p53-Proteins durch virale und zelluläre Proteine. Beispiele hierfür sind das EBNA 5, das HBxAg und das humane Analogon des MDM2-Proteins (Szekely et al., 1993; Wang et al., 1994; Momand et al., 1992). Aber auch durch Mutationen der Kernlokalisationssequenzen von p53 kann es zur Sequestrierung im Cytoplasma kommen, wie in Brust- und Colonkarzinomen beobachtet wurde (Moll et al., 1992).

p53 spielt eine wichtige Rolle für die Stabilität und Integrität des Genoms: primäre normale Fibroblasten von Patienten mit Li Fraumeni Syndrom zeigten in der Zellkultur einen hohen Grad an genomischer Instabilität, der durch das Einbringen von wt-p53 aufgehoben werden kann (Yin, 1992).

Auch in der klinischen Therapie von Krebspatienten spielt p53 eine Rolle. Der Verlust von p53 hat zur Folge, daß DNA-Schäden, die durch Bestrahlung bzw. Chemotherapeutika gesetzt wurden, nicht zur DNA-Reparatur oder alternativ zum Zelltod, sondern zum Überleben der geschädigten Zelle führen (Griffith et al., 1997). Dies hat Relevanz für die Behandlung von Tumorpatienten durch Bestrahlung und Chemotherapie. Der Erfolg hängt hierbei von der unterschiedlichen Empfindlichkeit von Tumorzelle und normaler Zelle ab. Ist der Tumorzelle die Möglichkeit zur Apoptose durch inaktiviertes p53 geraubt, so wirkt sich das therapeutische Einbringen von DNA-Schäden während der Therapie eher nachteilig aus. So sprechen Tumore mit einem häufigen Auftreten von p53-Mutationen, wie z.B. Lungen- oder Kolonkarzinome, nur schlecht auf Bestrahlung und Chemotherapie an. Tumore, die im allgemeinen keine Veränderungen im p53-Gen enthalten, haben dagegen eine eher positive Prognose (Fischer, 1994).

1.5.2 p53 in der Kanzerogenese des Nagers

Zur veränderten p53-Expression im Nager gibt es bis heute nur wenige, nicht systematische Daten. Um die Rolle von p53 in der Nager-Kanzerogenese in vivo zu untersuchen, wurden Mäuse mit unterschiedlichem p53-Genotyp konstruiert und die Inzidenz der spontanen und induzierten Tumorentstehung untersucht. So zeigten p53-defiziente Mäuse ohne wt-p53 Allel eine erhöhte Inzidenz und verringerte Entstehungszeit spontaner Tumore: 75% der behandelten Mäuse wiesen nach 6 Monaten Tumore mit einem hohen Grad an Aneuploidien und Mutationen auf. p53-Hemizygot mit einem wt- und einem inaktivierten p53 Allel zeigten ein ähnliches Tumorspektrum, wobei die Tumore nach längerer Latenz entstanden. Die heterozygoten Mäuse, die ein wt- und ein mutiertes p53 Allel enthalten, wiesen eine Tumorzinzenz von 20% nach 18 Monaten auf, während Tiere mit einem reinen Wildtyp Genotyp in dem Versuchszeitraum keine Tumore entwickelten

(Donehower, 1992; Lavigueur et al., 1989). Aus diesen Daten läßt sich folgern, daß eine fehlende p53-Aktivität gendosisabhängig die Entstehung von spontanen Tumoren in diesem System fördert. Daß p53 auch an der Apoptose beteiligt ist wurde in einem in vivo-Experiment an p53-defizienten Mäusen untersucht. Hierbei wurden die Tiere mit γ -Strahlung ganzkörperbestrahlt, um in epithelialen Stammzellen des Darms Apoptose zu untersuchen. p53-defiziente Mäuse zeigen sich resistent gegen die Induktion der Apoptose, während die Empfindlichkeit über hemizygote bis hin zu wildtyp-Tieren ansteigt (Merrit et al., 1994).

Die Beteiligung von p53 an der DNA-Reparatur im Nager wurde u.a. an Tieren untersucht, die mit Benzo(a)pyren behandelt wurden. Hierbei zeigt sich eine zeitliche Korrelation zwischen DNA-Adduktbildung und einer transienten positiven p53-Immunhistochemie (Bjelogrljic et al., 1994).

p53 scheint in seiner Wirkungsweise demnach sowohl beim Nager als auch beim Menschen vergleichbar zu sein.

1.6 Risikoabschätzung zum karzinogenen Potential

Zur Abschätzung der karzinogenen Wirkung einer Substanz wie z.B. eines Pharmakons oder eines Pflanzenschutzmittels auf den Menschen sind international Kanzerogenitätsstudien an Ratten und Mäusen und die Extrapolation der ermittelten Daten auf den Menschen vorgeschrieben. Um den Transfer der erlangten Daten auf den Menschen zu verbessern, ist ein grundlegendes Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen der Karzinogenese sowohl bei Nagern als auch beim Menschen unerlässlich (Harris, 1993 und 1996).

Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur und –Synthese, Differenzierung, Integrität und Plastizität des Genoms und Apoptose sind hierin essentielle zelluläre Prozesse und Funktionen (Weinberg, 1996; Harris, 1995). Ziel ist es, Stoffwechselwege oder Moleküle zu finden, die in ihrem Ablauf oder ihrer Wirkung zwischen Nager und Mensch vergleichbar sind und zudem noch in vielen Zell- und Gewebetypen vorkommen. So könnten spezifische Veränderungen an ihnen als Marker bei der Extrapolation des abgeschätzten Krebsrisikos aus der Laborstudie auf den Menschen dienen und zur Entwicklung alternativer Karzinogenitätsstudien mit geringeren Laufzeiten und Tierzahlen beitragen.

Ein Molekül, das diesen Kriterien entspricht, ist der Tumorsuppressor p53. Das Gen hat eine evolutionär hochgradig konservierte Sequenz (Soussi et al., 1990), eine relativ simple molekulare Struktur (siehe Abb.2) und viele zelluläre Funktionen, die in Mensch und Labornager vergleichbar oder sogar identisch sind (siehe oben).

Könnte eine veränderte p53-Expression in der induzierten Karzinogenese und eventuell auch in der Präkarzinogenese verschiedener induzierter Tumorarten bei Labornagern gezeigt werden, so könnte dieses Gen bzw. sein Genprodukt, eventuell in Kombination mit weiteren Tumormarkern, als Marker für Tumore etabliert werden. Die Untersuchung von Tumormarkern in präneoplastischen Stadien der Kanzerogenese könnte die Langzeitstudien (2 Jahre) an

Labornagern ersetzen, und den Behandlungszeitraum auf einige Monate verkürzen. Dies ist sowohl aus ökonomischer Sicht als auch in Hinsicht auf Tierschutzaspekte erstrebenswert.

1.7 Fragestellung und Ziele

In dieser Arbeit sollte ein Schritt in Richtung der Etablierung des Tumorsuppressors p53 als Marker zur frühen Erkennung von neoplastischen Veränderungen gemacht werden. Dazu sollten Methoden etabliert werden, die die Detektion von verändertem p53 schon in der frühen Karzinogenese und nicht erst im Tumor ermöglicht. Ferner wurde in dieser Arbeit die Wirkung der mit DNA wechselwirkenden Chemikalien Ethidiumbromid und Bromdeoxyuridin in vivo untersucht. Diese Substanzen wurden in dem, von den Zulassungsbehörden für Kanzerogenitätsstudien empfohlenen, sogenannten Ames-Test als mutagen klassifiziert, tierexperimentell wurde dies aber nicht überprüft.

Ratten bzw. Mäuse wurden mit Tamoxifen bzw. Bromdeoxyuridin und Ethidiumbromid behandelt und auf die Induktion molekularbiologischer Veränderungen im Tumorsuppressor p53 untersucht. Dazu wurden Ratten mit dem Östrogen-Analogon Tamoxifen, das in Ratten Lebertumore induziert (Hard et al., 1993), über die Zeiträume 3, 6, 9 und 12 Monate behandelt, im Anschluß abgetötet und die Organe fixiert. Durch die verschiedenen Behandlungszeiträume sollte eine Aussage über einen Zusammenhang zwischen Expositionsdauer und Mutationseignissen bzw. -mustern im p53-Gen ermöglicht werden. In der Maus wirkt Tamoxifen lediglich agonistisch und nicht hepatokarzinogen (Wogan et al., 1997). Deshalb wurden Mäuse mit den als mutagen geltenden, in der Molekularbiologie genutzten, DNA-Farbstoffen Bromdeoxyuridin bzw. Ethidiumbromid behandelt. Die Exposition wurde über einen Zeitraum von 13 Wochen bzw. 13 Wochen mit anschließender 13-wöchiger Erholungsphase, der sogenannten Recovery, durchgeführt. Dies entspricht in etwa den subchronischen Studien, die routinemäßig in der Pharmaindustrie durchgeführt werden. Zu den näheren Hintergründen der Versuche siehe auch den Absatz „Tierversuche“ im Kapitel „Material und Methoden“.

Im Anschluß sollte auf archiviertem, d.h. Formaldehyd-fixiertem oder schockgefrorenem, Lebergewebe p53-Immunhistochemie bevorzugt mit prä-neoplastischem aber auch, falls vorhanden, mit Tumor-Gewebe durchgeführt werden, um eventuelle Akkumulationen von p53 nachzuweisen. Wie erwähnt führt eine verlängerte Halbwertszeit zur intrazellulären Akkumulation von p53 und damit zur immunhistochemischen Darstellbarkeit. Die verlängerte Halbwertszeit kann Hinweis sein auf Mutationen aber auch auf Wechselwirkungen mit Proteinen oder auf Reaktion auf zellulären Stress.

Über einen Vergleich verschiedener Mutationsdetektions-Verfahren sollte eine molekularbiologische Methode zur Identifizierung von seltenen Mutationen vor einem starken Hintergrund an wt-Molekülen, wie er in prä-neoplastischem Gewebe zu erwarten ist, entwickelt werden, um die Detektion von p53-Mutationen in den Lebern der behandelten Tiere zu ermöglichen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysenwaage AK160	METTLER TOLEDO
Brutschrank, Typ B 6060	HERAEUS
Digitaler Farbdrucker CP-D1E,	MITSUBISHI
Einschweiß-Gerät Polystar® 100 GE,	RISCHE+HERFURTH
Eismaschine UBE 220,	ZIEGRA
GATC 1500 "Direct Blotting" Electrophoresis-	
DNA-Sequencer mit Zubehör	GATC GmbH
GATC CCU 1500 Schrittmotorsteuerung	GATC GmbH
GATC LINK UV-Crosslinker (254 nm)	GATC GmbH
GATC Tube 30 (18x30 cm, für Hybaid Mini Ofen)	GATC GmbH
GEL-PRO® Apparatur für die Agarosegelelektrophorese	CURTIN MATHESON SCIENTIFIC INC.
Gewebe-Einbett-Automat, Modell 2050	BAVIMED
Gewebeeinheit-Automat Histomaster-Combi®, Modell 2062	BAVIMED
Hybaid Mini-Ofen MK II	MWG BIOTECH
Instant Kamera System MP4+	POLAROID
+ Kamera	HAMAMATSU
+ Monitor	SONY
Kühlplatte, Typ PEC 2001	VOGEL
Kühlschrank FKS 3600	LIEBHERR
Lichtmikroskop, Axioskop 20	ZEISS
Magnetrührer, IKAMAG RET®	IKA-LABORTECHNIK
Mikroskop-Kamera MC100 mit Belichtungssteuerung	ZEISS
Mikrotom, Anglia Scientific, Cambridge, England Typ 200	VOGEL
Mikrowelle de luxe M 694	MIELE
Minifold I Dot/Slot System	QIAGEN
Objektträgerdrucker VSP-90	VOGEL
Paraffin-Ausgießeinheit, Modell 2080	BAVIMED
pH-Meter, Typ 763, Multi-Calimatik®	KNICK
Power Pac 200 Power-Supply	BIO-RAD
Power Pac 3000 Power-Supply	BIO-RAD
Röntgenfilmentwicklungsgerät CURIX 60	AGFA
Röntgenfilm-Inkubationskammer Hyperscreen® 24x30 cm	AMERSHAM
Schüttelinkubator Innova® 4000	NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC
Thermo-Cycler Trio Thermoblock + Trio Heated Lid	BIOMETRA
Tiefkühlschrank -80°C, ULT 2586-5-V12	REVCO SCIENTIFIC INC.
Tiefkühlschrank -20°C, GS 3002	LIEBHERR
Ultrareines Wasser System Milli-Qplus 185 für ddH ₂ O	MILLIPORE
UV-Handlampe NU-4KL	FAUST
UV-Tisch Reprostar II	CAMAG
VAGE™ vertikale Gelapparatur	STRATAGENE
Vakuumpumpe + Regulator	BIO-RAD
Vortexgerät REAX 2000	HEIDOLPH
Waage PE1600	METTLER TOLEDO
Waage, PM2500 DeltaRange®	METTLER-TOLEDO
Wasserbad Haake K20	HAAKE
Wasserbad Haake GH	HAAKE
Wasserbad 3044	KÖTTERMANN LABORTECHNIK
Wasserbad SW-21C	JULABO LABORTECHNIK
Wasserbad, Modell 3057	BAVIMED
Zentrifuge 5415C	EPPENDORF
Zentrifuge 5402 (kühlfähig)	EPPENDORF
Zentrifuge Varifuge 3.0R	HERAEUS SEPATECH

2.2.2 Chemikalien

Blockierungsreagens	ROCHE
GATC Gellösung 30%	GATC
Roti Phenol-Chloroform-Lösung	ROTH
SAAP-Konjugat	ROCHE

Alle weiteren Chemikalien wurden über die Firmen Difco Laboratories, MERCK, BIOMOL, Sigma Aldrich Chemie GmbH oder Gibco BRL bezogen.

2.1.3 Materialien für die Immunhistochemie

Proteine

Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V	BIOMOL
Streptavidin-Peroxidase (LABEL)	BIOGENEX
Ziegenerum (normal)	DAKO

Antikörper

CM5, Kaninchen-Anti-Maus, polyklonal	LANE D., SPARKS A. (Dundee/Schottland)
Biotinylierte-Anti-Kaninchen-Immunglobuline (LINK)	BIOGENEX

Lösungen und Puffer

0.5% BSA

- 2.5 g BSA ad. 500 ml TBS

0.5% H₂O₂/Methanol:

- 196.7 ml Methanol (absolut)
- 3.3 ml H₂O₂ (30%)

10% CoCl₂:

- 1 g CoCl₂ (wasserfrei) ad. 10 ml H₂O dest.

10% NiSO₄:

- 1 g NiSO₄ x 6 H₂O ad. 10 ml H₂O dest.

DAB-Lösung:

- 500 mg 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
- ad. 20 ml Phosphatpuffer (siehe unten)
- 1 ml-Aliquots bei -20°C lagern

Kernechtrot-Lösung:

- 5 g Al₂SO₄ ad. 100 ml H₂O demin.
- Lösung auf 60°C erhitzen
- Zugabe von 0.1 g Kernechtrot
- 30-60 min. rühren
- abgekühlte Lösung filtrieren und lichtgeschützt aufbewahren

Phosphatpuffer (50 mM, pH 7.6):

- 7.21 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O
- 1.31 g NaH₂PO₄ x H₂O
- ad. 1 l H₂O demin.

Peroxidase-Substrat-Lösung:

- 150 ml 50 mM Phosphatpuffer
- + 3 ml DAB-Lösung*

→ beides unter Vakuum filtrieren

- + 375 µl 10% CoCl₂*♦
- + 300 µl 10% NiSO₄*♦
- + 30 µl 30% H₂O₂*♦

- * = unter starkem Rühren hinzugeben
- ♦ = Verstärker für die Signalentwicklung

1 M Tris/HCl:

- 121.1 g Tris ad. 800 ml H₂O demin.
- pH-Adjustierung auf pH 7.6 mit cc. HCl
- ad. 1000 ml H₂O demin.

TBS:

- 10 mM Tris/HCl, pH 7.6
- 150 mM NaCl

Sonstiges

Einbettenschälchen, Tissue-Tek[®] III, 24x24 mm
 Küvetten mit Deckel, Duran[®] Glaskästen
 Objektträger SuperFrost[®]/Plus
 Organkassetten Tissue-Tek[®] III

LAB-TEK
 FISCHER SCIENTIFIC
 MENZEL-GLÄSER
 SAKURA

2.1.4 Material für die PCR

Alle Konzentrationsangaben laut Hersteller (soweit Informationen angegeben wurden)

StrataPrep [™] PCR Purification Kit: DNA-Bindungslösung DNA-Waschpuffer Zentrifugen-Silikasäulen	STRATAGENE
Taq DNA Polymerase Kit: Taq DNA Polymerase 10x Reaktionspuffer minus Mg 50 mM Magnesiumchlorid	GIBCO BRL
Expand [™] High Fidelity (HF) PCR System: Enzym-Mix (Taq/Pwo) 10x Expand HF Puffer minus MgCl ₂ 10x Expand HF-Puffer mit 15 mM MgCl ₂ MgCl ₂ stock (25 mM)	ROCHE
Taq DNA Polymerase Kit: Taq DNA Polymerase 10x PCR-Puffer mit 15 mM MgCl ₂ 25 mM MgCl ₂ 5x Q-Solution	QIAGEN
Desoxynucleotid-Mix (100 mM) Dünnwandige PCR-Reaktionsgefäße 0,5 ml	STRATAGENE EPPENDORF

Primer

GIBCO

p53-Exon 5

E5F ("forward", 24-mer): 5'-GAC CTT TGA TTC TTT CTC CTC TCC-3'
 E5R ("reverse", 20-mer): 5'-GGG AGA CCC TGG ACA ACC AG-3'
 E5F-Bio (24-mer): Biotin-5'-GAC CTT TGA TTC TTT CTC CTC TCC-3'
 E5R-Bio (20-mer): Biotin-5'-GGG AGA CCC TGG ACA ACC AG-3'
 E5F-n ("nested", 20-mer): 5'-TCT CCT CTC CTA CAG TAC TC-3'
 E5R-n (20-mer): 5'-CCA GTG CTC ACC GTC ACC AT-3'
 E5F-GC (24+40-mer): 5'-[CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCGCCCGCCCG]
 GAC CTT TGA TTC TTT CTC CTC TCC-3'

p53-Exon 6+7

E6+7F (19-mer): 5'-CTG GTT GTC CAG GGT CTC C-3'
 E6+7R (20-mer): 5'-CCC AAC CTG GCA CAC AGC TT-3'
 E6+7F-Bio (19-mer): Biotin-5'-CTG GTT GTC CAG GGT CTC C-3'
 E6+7R-Bio (20-mer): Biotin-5'-CCC AAC CTG GCA CAC AGC TT-3'
 E6+7F-n (19-mer): 5'-CCG GCC TCT GAC TTA TTC TT-3'
 E6+7R-n (20-mer): 5'-CAG CTT CCT ACC TGG AGT CT-3'
 E6+7F-GC (19+40-mer): 5'-[CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCGCCCGCCCG]
 CTG GTT GTC CAG GGT CTC C-3'

p53-Exon 8+9

E8+9F (20-mer): 5'-CTT ACT GCC TTG TGC TGT GC-3'
 E8+9R (21-mer): 5'-CTT AAG GGT GAA ATA TTC TCC-3'
 E8+9F-Bio (20-mer): Biotin-5'-CTT ACT GCC TTG TGC TGT GC-3'
 E8+9R-Bio (21-mer): Biotin-5'-CTT AAG GGT GAA ATA TTC TCC-3'
 E8+9F-n (20-mer): 5'-CTT GTG CTG TGC CTC CTC TT-3'
 E8+9R-n (21-mer): 5'-AGG AGC TTG TGC TGG TGG GC-3'
 E8+9R-GC (21+40-mer): 5'-[CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCGCCCGCCCG]
 CTT AAG GGT GAA ATA TTC TCC-3'

[] = bezeichnen die sogenannte GC-Klammer für die TGGE

H-ras/Ratte und Maus – zur Herstellung von Kontrollen

Wildtyp:

Codon 12F Ratte (30-mer): 5'-ACA GAA TAC AAG CTT GTG GTG GTG GGC CCT-3'
 Codon 13F Ratte (30-mer): 5'-AGA ATA CAA GCT TGT GGT GGT GGG CCC TGG-3'
 Codon 12/13R Ratte (20-mer): 5'-CAG GTA GTC AGA GGT CAC CT-3'
 Codon 12F Maus (30-mer): 5'-ACA GAA TAC AAG CTT GTG GTG GTG GGC CCT-3'
 Codon 13F Maus (30-mer): 5'-TGA GTA TAA ACT TGT GGT GGT TGG CCC TGG-3'
 Codon 12/13R Maus (20-mer): 5'-GTT ACC TCT ATC GTA GGG TC-3'

Mutante:

Codon 12/13F Ratte+Maus (46-mer): 5'-GCT ATG ACA GAA TAC AAG CTT GTG GTG GTG
 GGC GCT GAA GAC GTG G-3'
 Codon 12/13R Ratte (26-mer): 5'-CTC TGG CAG GTA GTC AGA GCT CAC CT-3'
 Codon 12/13R Maus (26-mer): 5'-TGT TTG GTC ATT TAC CCA TGA CCA CT-3'

Random Primer Oligonucleotide (überwiegend Hexamere)

GIBCO BRL

2.1.5 Material für die Klonierung

Alle Konzentrationsangaben laut Hersteller (soweit Informationen angegeben wurden)

PCR-Script™ Amp Cloning Kit: STRATAGENE

Klonierte Pfu DNA Polymerase (0,5 U/μl)
 dNTP-Mix (10 mM)
 10x Polierungs-Puffer
 pPCR-Script™ Amp SK(+) Klonierungsvektor (10 ng/μl)
 10x PCR-Script Reaktionspuffer
 rATP (10 mM)
 Kontroll-PCR Insert (1,1 kb) (100 ng/μl)
 SrfI Restriktionsenzym (5 U/μl)
 T4 DNA-Ligase (4 U/μl)
 Epicurian Coli® XL10-Gold™ Kan ultrakompetente Zellen
 pUC18 Kontrollplasmid (0,1 ng/μl)
 XL10-Gold™ β-Mercaptoethanol-Mix (1,44 M)

QIAmp DNA Mini Kit: QIAGEN

Lysispuffer ATL
 Proteinase K
 Lysispuffer AL
 Rnase A (20mg/ml)
 Waschpuffer AW1
 Waschpuffer AW2
 Elutionspuffer AE
 Zentrifugen-Silikasäulen

QIAprep Spin Miniprep Kit: QIAGEN

Puffer P1
 RNase A
 Puffer P2
 Puffer N3
 Puffer PB
 Puffer PE
 Puffer EB
 Zentrifugen-Silikasäulen

Lösungen und Puffer

LB-Ampicillin-Agar:

- 10 g NaCl
- 10 g Trypton
- 5 g Hefe-Extrakt
- 20 g Agar
- ad 1 l ddH₂O
- pH-Wert mit 5 N NaOH auf 7,0 einstellen
- 30 min. bei 121°C autoklavieren und auf 55°C abkühlen lassen
- Zugabe von 5 ml Filter-sterilisiertes Ampicillin (10 mg/ml)
- je 25 ml in Petrischalen gießen, bei RT abkühlen lassen und bei 4°C aufbewahren

NZY⁺ Broth:

- 10 g NZ Amin
- 5 g Hefe-Extrakt
- 5 g NaCl
- ad 1 l ddH₂O
- pH-Wert mit 5 N NaOH auf 7,5 einstellen
- 30 min. bei 121°C autoklavieren und bei RT abkühlen lassen
- Zugabe von 12,5 ml 1 M MgCl₂, 12,5 ml 1 M MgSO₄ und 10 ml 2 M Glucose (filter-sterilisiert)

X-Gal (10% w/v):

- 0,1 g X-Gal
- 900 µl DMF

IPTG (0,2 M):

- 0,048 g IPTG
- 1 ml ddH₂O (steril)

NZY⁺ Broth-X-Gal-IPTG:

- 20 µl 10% X-Gal (Endkonzentration 2%)
- 5 µl 0,2 M IPTG (Endkonzentration 10 mM)
- ad 100 µl NZY⁺ Broth

Glycerol-Lösung:

- 65% (v/v) Glycerol
- 0,1 M MgSO₄
- 25 mM Tris/HCl, pH 8,0 (20°C)

Sonstiges

Falcon 2059 15 ml Polypropylengefäße	FALCON
BssH II Restriktionsendonuclease	ROCHE
EcoN I Restriktionsendonuclease	NEW ENGLAND BIOLABS
Epicurian Coli [®] SoloPack [™] Gold superkompetente Zellen	STRATAGENE

2.1.6 Material für die Sequenzierung

Alle Konzentrationsangaben laut Hersteller (soweit Informationen angegeben wurden)

GATC Cycle Sequencing Kit:

GATC

ddGTP, ddATP, ddTTP ddCTP

BioCycle[®] dNTP-Mix10x BioCycle[®] ReaktionspufferStopp-Mix (99% [v/v] deionisiertes Formamid, 5 mM Na₂-EDTA, 0,1% [w/v]

Bromphenolblau)

Kontroll DNA mit Primer

EnzymeThermo Sequenase[™] DNA PolymeraseAMERSHAM PHARMACIA
BIOTECH**Lösungen und Puffer für Sequenzierung und kolorimetrische Detektion****Maleinsäurepuffer (pH 7,5 [20°C]):**

- 23,21 g Maleinsäure zur Synthese
 - 17,53 g Natriumchlorid p.A.
 - 16 g Natriumhydroxid Plätzchen p.A.
- gleichzeitig in ca. 1,9 l ddH₂O lösen, pH-Wert einstellen und auf 2 l auffüllen

10 % (w/v) Blocking Puffer (pH ca. 6,0):

- 10 % Blockierungsreagens
 - 90 % Maleinsäure-Puffer
- lösen bei 60°C unter Rühren und 30 min. bei 121°C autoklavieren; Aliquots bei -20°C lagern

Streptavidin-AP Lösung:

- Streptavidin-AP vor Gebrauch 5 min. bei 10000 rpm zentrifugieren
- Streptavidin-AP (1U/μl) 1:5000 mit 1,5% Blockierungslösung verdünnen

Reaktionspuffer (pH 9,5):

- 5,84 g Natriumchlorid
- 2 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat
- 11,58 g Tris ultra rein
- pH-Wert einstellen und auf 1 l mit ddH₂O auffüllen

Harnstoff-Diluent (Bsp. für ein 4%-iges Gel):

- 84 g Harnstoff ultra rein
- 18,7 g 10x TBE
- 73,4 g Tris ultra rein
- (für andere Gelkonzentrationen den Wasseranteil entsprechend variieren)

Sequenziergel (Bsp. für ein 4%-iges Gel):

- 3,35 ml GATC-Gellösung 30 % (30% [w/v] Acrylamid, 0,8% [w/v] Bisacrylamid)
- 21,65 ml Harnstoff-Diluent
- + 112,5 μl 10% APS
- + 25 μl TEMED

10x TBE:

- 154,5 g Tris ultra rein
- 26,2 g Borsäure
- 9 g Ethylendiamin Tetraessigsäure Na₂-Salz Hydrat
- 810 g dd H₂O

10 % (w/w) APS:

- 1 g Ammoniumpersulfat p.A.
- 9 g ddH₂O
- Aliquots bei -20°C lagern

Sonstiges

GATC Direct-Blotting-Membran	GATC
GATC Haifischkamm-Set (0,19 mm, 32 Slots)	GATC
GATC Kamm-Set (0,35 mm, 15 Slots)	GATC
GATC Kamm-Set (0,35 mm, 30 Slots)	GATC
GATC Klebeband	GATC

2.1.7 Material zur Herstellung von Mutanten

Alle Konzentrationsangaben laut Hersteller (soweit Informationen angegeben wurden)

QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit:	STRATAGENE
PfuTurbo™ DNA Polymerase	
10x Reaktionspuffer	
DpnI Restriktionsenzym (10 U/μl)	
Oligonucleotid-Kontrollprimer 1 [34-mer (100 ng/μl)]	
Oligonucleotid-Kontrollprimer 2 [34-mer (100 ng/μl)]	
pWhitescript™ 4,5-kb Kontrollplasmid (5ng/μl)	
dNTP-Mix	
Epicurian Coli® XL1-Blue™ superkompetente Zellen	
pUC18 Kontrollplasmid	

Lösungen und Puffer

Exo VII Reaktionspuffer:

- 67 mM di-Kaliumhydrogenphosphat
→ pH-Wert mit ortho-Phosphorsäure (85% [v/v]) auf pH 7,9 einstellen
- 8,3 mM EDTA
- 10 mM 2-Mercaptoethanol
→ pH-Wert des Puffers prüfen und evtl. mit ortho-Phosphorsäure auf pH 7,9 justieren

T4-Reaktionspuffer (PCR-Script™ Amp Cloning Kit) für eine Reaktion:

- 5 µl pPCR-Script Reaktionspuffer
- 2,5 µl 10 mM rATP
- 41,5 µl dd H₂O

Mutagenese-Primer

p53-Mut1 (35-mer): 5'-GCT CCG ACT ATA CCA CTG TCC ACT ACA AGT ACA TG-3'
 p53-Mut2 (35-mer): 5'-CAT GTA CTT GTA GTG GAC AGT GGT ATA GTC GGA GC-3'
 p53-Mut3 (40-mer): 5'-GCT CTC TCC TTC CAT AGC ATT GCC CAC CAG CAC AAG CTC C-3'
 p53-Mut4 (40-mer): 5'-GGA GCT TGT GCT GGT GGG CAA TGC TAT GGA AGG AGA GAG C-3'
 p53-Mut5 (35-mer): 5'-CTC TGA CTT ATT CTT GCT CTT TGG CCT GGC TCC TC-3'
 p53-Mut6 (35-mer): 5'-GAG GAG CCA GGC CAA AGA GCA AGA ATA AGT CAG AG-3'

2.1.8 Material für die Temperatur-Gradienten-Gelelektrophorese (TGGE)

Gel-Support-Film 213mm x 210mm	QIAGEN
Whatman Polybondfilm für TGGE Maxi 23,3cm x 23,3cm	SCHLEICHER&SCHUELL

Lösungen und Puffer

50x MOPS-Puffer pH 8,0
 1 M MOPS
 50 mM EDTA

40% Glycerol

10 % Ethanol p.A. }
 0,5% Essigsäure } in ddH₂O

0,1% AgNO₃ in ddH₂O

1,5% NaOH
 0,01% NaBH₄
 0,15% Formaldehyd 37% } in ddH₂O

0,75% Na₂CO₃

2.1.9 Material für den „Cleavase Fragment Length Polymorphism“ (CFLP)

Alle Konzentrationsangaben laut Hersteller (soweit Informationen angegeben wurden)

Biotin Luminiscent Detection Kit:	ROCHE
Streptavidin-Alkalische Phosphatase (Molekularbiologie-Grad, 1U/µl)	
CSPD® (0,25 mM); Blockierungsreagens	

CFLP™ PowerScan™ System (Kit nicht mehr erhältlich): GIBCO BRL
 Cleavase® I Enzym (25 U/μl)
 10x CFLP™-Puffer (100 mM MOPS (pH 7,5)
 0.5% (w/v) Tween® 20, 0,5% (w/v) Nonidet™ P-40])
 2 mM MnCl₂
 10 mM MgCl₂
 Stopp-Lösung
 destilliertes Wasser
 Wildtyp-Kontroll-DNA (50 fmol/μl, 1059 bp doppelsträngiges DNA-Fragment)
 Mutante Kontroll-DNA (50 fmol/μl, 1059 bp doppelsträngiges DNA-Fragment)

CFLP® Scanning System (Kit nicht mehr erhältlich): ROCHE
 Cleavase® I Enzym (25 U/μl)
 10x CFLP®-Puffer
 0.5% (w/v) Tween® 20
 0,5% (w/v) Nonidet™ P-40])
 2 mM MnCl₂
 10 mM MgCl₂
 Stopp-Lösung
 DNA-Dilutionspuffer
 Wildtyp-Kontroll-DNA-Fragment (50 fmol/μl, 516 bp humanes Tyrosinasegen)
 mutantes Kontroll-DNA-Fragment (50 fmol/μl, 516 bp humanes Tyrosinasegen),

Lösungen und Puffer für die Biotin-Luminiszenz-Detektion

Waschpuffer:

- 0,1 M Maleinsäure
- 0,15 M NaCl
- Mit festem NaOH den pH auf 7,5 [20°C] einstellen
- 0,3% Tween 20

Maleinsäurepuffer:

- 0,1 M Maleinsäure
- 0,15 M NaCl
- Mit festem NaOH den pH auf 7,5 [20°C] einstellen

Detektionspuffer:

- 0,1 M Tris/HCl
- 0,1 M NaCl
- pH 9,5 (20°C)

Streptavidin-AP Lösung:

- Streptavidin-AP vor Gebrauch 5 min. bei 10000 rpm zentrifugieren
- Streptavidin-AP (1U/μl) 1:5000 mit 5x Blockierungslösung verdünnen

10x Blockierungslösung:

- Blockierungsreagenz 1:10 mit Maleinsäurepuffer verdünnen
- lösen bei 60°C unter Rühren und 30 min. bei 121°C autoklavieren; Aliquots bei -20°C lagern

5x Blockierungslösung:

- 10x Blockierungslösung 1:1 mit Maleinsäurepuffer verdünnen

Entwickler G345
 Fixierer G153

AGFA
 AGFA

2.1.10 Material für den „Restriction Site Mutation Assay“ (RSM)**Enzyme**

Bgl I	NEW ENGLAND BIOLABS
Bst N I	NEW ENGLAND BIOLABS

Dazugehörige Puffer:	
NEB 2,3	NEW ENGLAND BIOLABS
100xBSA (10 mg/ml)	NEW ENGLAND BIOLABS

2.1.11 Material für das MutS-Bindungsexperiment

Blotting-Papier GB003	SCHLEICHER&SCHUELL
Mismatch Binding Protein E.coli Mut S	GENE CHECK

Lösungen und Puffer

10 % (w/v) Blocking Puffer (pH ca. 6,0):

- 10 % Blockierungsreagens
- 90 % Maleinsäure-Puffer

→ lösen bei 60°C unter Rühren und 30 min. bei 121°C autoklavieren; Aliquots bei -20°C lagern

Denhardt-Lösung (Current Protocols in Molecular Biology, 1995):

- 20 mg Ficoll 400
- 20 mg Polyvinylpyrrolidon
- 20 mg BSA
- ad 10 ml ddH₂O

Denhardt-Lösung (Ibelgaufits H., 1993):

- 10 mg Ficoll 400
- 10 mg Polyvinylpyrrolidon
- 10 mg BSA
- ad 100 ml ddH₂O

PolydIdC

- 10 µg PolydIdC
- in 5 ml ddH₂O

HEPES-Puffer:

- 50 mM HEPES-KOH pH 8,0
- 20 mM KCl
- 6 mM MgCl₂
- 1 mM DTT

MutS-Reaktionspuffer:

- 20 mM Tris-HCl pH 7,6
- 5 mM MgCl₂
- 0,1 mM Dithiothreitol (DTT)
- 0,01 mM EDTA

Releasing Solution

- 10 mM Tris-Hcl pH 8,0
- 1 M NaCl

Membranen

BA 83	SCHLEICHER&SCHUELL
BA 84	SCHLEICHER&SCHUELL
Immobilon P Transfer Membran	MILLIPORE
NA 45	SCHLEICHER&SCHUELL
NY 12 N	SCHLEICHER&SCHUELL
NY 13 N	SCHLEICHER&SCHUELL

2.1.12 Material für die Gelelektrophorese

QIAquick Gel Extraction Kit: Puffer QG Puffer PE Puffer EB Zentrifugen-Silikasäulen	QIAGEN
DNA-Längenstandard III (0,12-21,2 kb)	ROCHE
Biotinylierte ϕ X174/Hinf I Fragmente	GIBCO BRL
pBR 322/Alu I Längenstandard	BIOMOL

Lösungen und Puffer

TAE-Puffer (50x):
 - 242 g Tris ultra rein
 - 57,1 ml Essigsäure 100%
 - 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
 - ad 1 l ddH₂O

TBE-Puffer (10x):
 - 108 g Tris ultra rein
 - 55 g Borsäure
 - 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
 - ad 1 l ddH₂O

Gel-Probenpuffer:
 - 0,25% (v/v) Bromphenolblau
 - 0,25% (v/v) Xylencyanol
 - 30% (v/v) Glycerol

2.1.13 Sonstiges

Dünnschichtchromatographie-Fertigschicht-Glasplatten DURASIL-25 UV 254 nm, 50 x 100 mm	FISHER SCIENTIFIC
Filtertips 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l	EPPENDORF
Nylonmembran Nytran N 0,45	SCHLEICHER & SCHUELL
Parafilm "M"	AMERICAN NATIONAL CAN
Petrischalen mit Nocken 94x16 mm, schwer	GREINER
PicoGreen [®] dsDNA Quantitation Kit: 20x TE Puffer	MOLECULAR PROBES
200x PicoGreen [®] dsDNA Quantifizierungsreagens Lambda DNA Standard (100 μ g/ml)	
Polypropylen-Reagensröhrchen 14 ml Falcon [®] 2059	BECTON-DICKINSON

QiAmp Blood Kit:

Lysispuffer AL
Qiagen Protease
Waschpuffer AW
Elutionspuffer AE
Zentrifugen-Silikasäulen

Röntgenfilm Biomax™ MS

Safe-Lock Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml

Serologische Pipetten Falcon® (steril)

1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml

Spritzenaufsatzfilter Millex®-GS (0,22µm)

Spritzenaufsatzfilter Millex®-HA (0,45 µm)

Standardtips 10 µl, 100 µl, 1000 µl

Sterilfilter STERIFIL® D-GS (0,22µm)

Sterilfilter STERIFIL® D-HA (0,45 µm)

Trockeneis

QIAGEN

KODAK

EPPENDORF

BECTON-DICKINSON

MILLIPORE

MILLIPORE

EPPENDORF

MILLIPORE

MILLIPORE

AIRLIQUIDE

2.2 Methoden

2.2.1 Tierexperimente

Als Grundlage für die vorliegende Arbeit wurden folgende Tierexperimente durchgeführt. Entsprechend dem in Tabelle 2 angegebenen Applikationsschema wurde Wistar-Ratten täglich, an sieben Tagen in der Woche, per Magensonde eine Suspension aus Tamoxifen-Citrat in 0,5%iger wässriger Tyloselösung appliziert. Die Behandlung erfolgte über die angegebenen Zeiträume. Des weiteren wurden CD-1 Mäuse 13 Wochen mit entweder 80 ppm 5-Bromo-2'-Deoxyuridin oder 100 ppm Ethidiumbromid in Pellets gefüttert. Die Hälfte der Tiere wurde im Anschluß, zur sogenannten „Recovery“, 13 Wochen mit Kontrollfutter gefüttert (Tab.3).

Tiernummer	Geschlecht	Dosis	Behandlung
1-2	m	0 mg/kg/d	12 Monate
3-4	m	22 mg/kg/d	6 Monate
5-6	m	22 mg/kg/d	9 Monate
7-8	m	22 mg/kg/d	12 Monate
9-10	w	0 mg/kg/d	12 Monate
11-12	w	22 mg/kg/d	3 Monate
13-14	w	22 mg/kg/d	6 Monate
15-16	w	22 mg/kg/d	9 Monate
17-18	w	22 mg/kg/d	12 Monate

Tab.2 Applikationsschema der Tamoxifen-Studie.

m = männlich; w = weiblich; mg/kg/d = Milligramm Substanz pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag

Tiernummer	Geschlecht	Substanz	Dosis	Behandlung
1-7	m	Kontrolle	0 ppm	13 Wochen
8-13	m	BrdU	80 ppm	13 Wochen
16-21	m	EtBr	100 ppm	13 Wochen
22-28	w	Kontrolle	0 ppm	13 Wochen
29-35	w	BrdU	80 ppm	13 Wochen
36-42	w	EtBr	100 ppm	13 Wochen
43-49	m	Kontrolle	0 ppm	13+13 Wochen
50-56	m	BrdU	80 ppm	13+13 Wochen
59-62	m	EtBr	100 ppm	13+13 Wochen
64-70	w	Kontrolle	0 ppm	13+13 Wochen
71-77	w	BrdU	80 ppm	13+13 Wochen
78-84	w	EtBr	100 ppm	13+13 Wochen

Tab.3 Applikationsschema der Ethidiumbromid- und Bromdeoxyuridin-Studie.

m = männlich; w = weiblich; BrdU = Bromdeoxyuridin; EtBr = Ethidiumbromid; 13 Wochen = 13 Wochen Behandlung; 13+13 Wochen = 13 Wochen Behandlung + 13 Wochen Recovery

Alle Tiere wurden nach den Versuchszeiträumen in Diethylether-Narkose ausgeblutet und entnommene Organe 24 h in 4% Formaldehyd (PBS-gepuffert) fixiert. Teile der Lebern wurden schockgefroren (s.u.).

2.2.2 Immunhistochemie

2.2.2.1 Asservierung von Organen

In einer Sektion wurden den Versuchstieren die zu archivierenden Organe entnommen, 24 Stunden in einer 4%-igen Formaldehydlösung fixiert, ca. 5 mm dicke Leberteile in beschrifteten Tissue-Tek®-Kassetten mit Leitungswasser mindestens eine Stunde gewässert und in den Gewebereinheit-Automat Histomaster-Combi® überführt. Innerhalb eines Tages wurde das Gewebe automatisch durch eine Reihe mit 1x 80% Ethanol, 2x 90% Ethanol, 3x 100% Ethanol, 3x Xylol und 3x Paraffin entwässert und paraffiniert.

Nach diesem Prozeß wurden die Kassetten wiederholt in 70°C heißes Paraffin gelegt und in, auf 70°C vorgewärmte, Einbettungsschalen überführt. Die dabei unten zum Liegen kommende Seite wurde die spätere Schnittfläche. Die Schale wurde mit flüssigem Paraffin aufgefüllt, mit einer Tissue-Tek®-Kassette abgedeckt und auf einer Kühlplatte auf 2°C abgekühlt. Den erkalteten Block löst man aus der Schale und schneidet ihn so zurecht, daß er in ein Mikrotom eingespannt werden kann.

Eine weitere Art der Asservierung steht mit dem Schockgefrieren zur Verfügung. Hierbei wurden die in der Sektion entnommenen Lebern in kleinere Stücke zerteilt, in flüssigem, –120°C kaltem Isopentan schockgefroren, auf beschriftete Papierstücke „aufgefroren“ und bei –80°C gelagert.

2.2.2.2 Anfertigung von Gewebeschnitten

Paraffinschnitte

Die zu schneidenden Paraffinblöcke wurden mit der Schnittfläche nach unten auf einer Kühlplatte auf 2°C abgekühlt und in ein Mikrotom gespannt, dessen Block so justiert wurde, daß die Schnittfläche ungefähr horizontal unter der Klinge zu liegen kam. Nach dem Anschneiden der Gewebefläche wurde die gewünschte Schnittdicke eingestellt und der erste Schnitt verworfen. Alle darauffolgenden Schnitte wurden in 50°C warmes abgekochtes Wasser überführt und konnten dann auf einen SuperFrost®/Plus Objektträger aufgezogen werden. Die fertigen Schnitte wurden über Nacht bei RT getrocknet und dann gelagert oder für histologische oder immunhistochemische Untersuchungen verwendet.

Gefrierschnitte

In einem Kryostat (-20°C) wurden die benötigten und beschrifteten Objektträger, Objekthalter, Pinsel und Schäufelchen gekühlt. Der tiefgekühlte Gewebeblock wurde mit ein oder zwei Tropfen ddH₂O auf einen Gewebehalter aufgefroren, in das Kryostat eingespannt und zu einer geraden Schnittfläche mit der größten möglichen Gewebefläche angeschnitten. Dann wurden 5 µm Schnitte angefertigt, mit Hilfe eines Pinsels auf das Schäufelchen gebracht und bei RT auf einen Objektträger überführt, der sofort auf Trockeneis eingefroren wurde. Der alternative Schritt der Dehydratisierung in 100% Aceton entfiel, da das Gewebe bei diesem Wasserentzug geschädigt wird, was in der Immunhistochemie zu unspezifischen Antikörperbindungen führen kann. Zur weiteren Lagerung wurden die Objektträger in Aluminiumfolie gewickelt und bei -80°C gelagert.

2.2.2.3 Immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten mit p53-Antikörpern

Die angefertigten Gewebeschnitte wurden wie folgt weiter behandelt:

Die Schnitte wurden durch eine Alkoholreihe wie unten angegeben deparaffiniert und rehydratisiert, wobei dieser Schritt bei Gefrierschnitten entfällt. In, jeweils mit ca. 200 ml Flüssigkeit gefüllten, Glasküvetten wurden die folgenden Waschschrte bei RT durchlaufen:

- 2x 5 min. Xylol
- 3x 2 min. 100% Ethanol
- 1x 2 min. 90% Ethanol
- 1x 5 min. 70% Ethanol
- 2x 5 min. waschen in TBS (auch für Gefrierschnitte)

Die Blockade endogener Peroxidasen erfolgte durch eine 30 minütige Inkubation in 0,5% H₂O₂/Methanol gefolgt von zwei Waschschrten für je 5 min. in TBS (Küvetten, RT).

Die Blockade unspezifischer Proteinbindungsstellen erfolgte entweder für 30 min. mit 3% Rinderserum Albumin/TBS bei RT in der Küvette oder für 30 min. mit je 100 µl 5% Ziegenserum/TBS pro Schnitt bei RT in der feuchten Kammer.

Vom Erst-Antikörper, Anti-p53-CM5, wurden Verdünnungen zwischen 1:1000 und 1:1750 in TBS angefertigt und diese direkt auf den Schnitt pipettiert (100 µl pro Schnitt, 4°C über Nacht). Die Antikörperverdünnung muß für jede neue Antikörpercharge optimiert werden. Für die Negativkontrolle wurde statt des Erstantikörpers CM5 nur TBS eingesetzt.

Als Zweit-Antikörper wurden Biotinylierte-Anti-Kaninchen-Immunglobuline (LINK) der Firma BioGenex verwendet (100 µl pro Schnitt, RT, 20 min.). Nach einem 1 minütigen Waschschrte in TBS in der Küvette bei RT wurde Streptavidin-Peroxidase (LABEL) unverdünnt auf das Gewebe gegeben (100 µl pro Schnitt, 20 min RT) und 3x 5 min. in TBS gewaschen.

Die Schnitte wurden 1-3 min. in der Peroxidase-Substratlösung gefärbt, 2x 5 min. gewaschen in TBS und 2x 5 min. in H₂O, 5 min. in Kernechtrot gegengefärbt und mehrmals in demineralisiertem Wasser gewaschen (alle Schritte in der Küvette bei RT).

Sollten die Schnitte eingedeckt werden, so wurden sie vorher durch eine Alkoholreihe (je 2 min. 70%, 96% und 100% Ethanol, Xylol) entwässert, für die Weiterverwendung zur Mikrodissektion entfiel diese.

Die Präparate wurden mit Eukitt eingedeckt, in der Dunkelheit getrocknet, gelagert und später unter einem Lichtmikroskop ausgewertet.

2.2.2.4 Mikrodissektion

Spezifisch p53 gefärbte Zellen wurden aus dem Gewebeschnitt zur anschließenden PCR isoliert. Dazu wurde ein immunhistochemisch gefärbter, aber nicht eingedeckter Schnitt mit 1 ml TBS-Puffer überschichtet. Unter mikroskopischer Kontrolle bei 50-facher Vergrößerung wurde mit Hilfe einer sterilen Kanüle der gewünschte Zellbereich vom Objektträger gelöst, aus dem Puffer entnommen und in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß mit 180 µl Puffer ATL (Qiagen) überführt. Aus den so isolierten Zellen und Zellfragmenten wurde entweder DNA isoliert (nach dem Protokoll für DNA-Isolierung aus Geweben von Qiagen), oder sie wurden, nach Inkubation mit Proteinase K (PK), über Nacht, in 1x PCR-Puffer, direkt in eine PCR-Reaktion eingesetzt.

2.2.3 DNA-Isolierung

Zur Isolierung hochreiner DNA für PCR, Sequenzierung, Klonierung o.ä. wurde auf die sehr zeitsparende Methode der DNA-Isolierung über Silicamatrix-Säulen zurückgegriffen. Bei dieser Art der DNA-Isolierung bleiben keine Lösemittelrückstände in der Probe zurück, so daß später keine störenden Wechselwirkungen auftreten. Es wurden, je nach Ausgangsmaterial, verschiedene Kits der Firma QIAGEN verwendet. Sofern nicht anders vorgegeben, wurden alle Zentrifugationsschritte bei RT und 14000 rpm in einer Kühl-Zentrifuge durchgeführt.

Die DNA-Isolierung aus nativem Blut erfolgte mit dem „QIAamp Blood Kit“ nach dem „Blood & Body Fluid Protocol“.

Die Abtrennung des Plasmas erfolgte durch eine 6 minütige Zentrifugation mit 6000 rpm, nach der ca. 200 µl buffy coat und Blutkuchen in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt wurden. Nach Zugabe von 25 µl QIAGEN Protease und 200 µl Puffer ATL wurden die Ansätze 15 sec. intensiv durchmischt und die Zellen durch eine 10 minütige Inkubation im 70°C Wasserbad lysiert. Es folgte die Zugabe von 210 µl Ethanol abs. p.A. zur Fällung der genomischen DNA, eine sorgfältige Durchmischung der Proben und die Überführung auf Silicasäulchen, die in 2 ml Sammelgefäße gestellt worden waren. Nach einer 1 minütigen Zentrifugation wurden die Sammelgefäße ausgetauscht und die matrixgebundene DNA zwei Mal durch Zugabe von 500 µl Puffer AW und 1 minütiger Zentrifugation gewaschen und die Säulen anschließend für 2 min. durch Zentrifugation getrocknet. Die Elution der DNA erfolgte durch Zugabe von 100 µl auf 70°C vorgewärmten Puffer

AE, 5-minütiger Inkubation und anschließender 1-minütiger Zentrifugation. Die so erhaltene DNA wurde bei -20°C gelagert.

DNA-Isolierung aus gefrorenem oder paraffiniertem Lebergewebe erfolgte mit dem „QIAamp Tissue Kit“ nach dem „Tissue Protocol“.

Eingesetzt wurden Gewebemengen von wenigen Zellen bis zu 25 mg asservierten Lebergewebes. Größere Gewebemengen wurden mechanisch zerkleinert, d.h. zerschnitten oder gequetscht, kleinere Mengen direkt eingesetzt. In ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden auf das Gewebe 180 μl Puffer ATL und 20 μl Proteinase K-Stocklösung gegeben und das Gemisch über Nacht bei 55°C bei 250 rpm auf einer Schüttelplattform inkubiert. Danach folgte die Zugabe von 200 μl Puffer AL, eine gründliche Durchmischung der Proben und die Überführung des Reaktionsgemisches auf Silicasäulchen. Nach einer 1-minütigen Zentrifugation wurden die Sammelgefäße ausgetauscht und die matrixgebundene DNA zwei Mal durch Zugabe von 500 μl Puffer AW und 1 minütiger Zentrifugation gewaschen und die Säulen anschließend für 2 min. durch Zentrifugation getrocknet. Die Elution der DNA erfolgte durch Zugabe von 100 μl auf 70°C temperierten Puffer AE, 5-minütiger Inkubation und anschließender 1-minütiger Zentrifugation. Die so erhaltene DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.4 Die Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Grundlage zur Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde gelegt durch die Arbeit von Kleppe et al. 1971. Das eigentliche Verfahren wurde 1985 von K.Mullis entdeckt (Mullis et al., 1986) und dient seitdem zur Vervielfältigung einzelner DNA-Moleküle. Seit Entdeckung der thermostabilen DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Saiki et al., 1988) kann der Prozeß auch automatisiert durchgeführt werden.

Die PCR ist ein in vitro-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäurebereichen definierter Länge und Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuren (Ibelgaufts, 1993), die in drei Schritte gegliedert werden kann: die Denaturierung (Trennung der komplementären DNA-Stränge des Templates bei 95°C), das Primer-Annealing (bei Primer-spezifischen Temperaturen) und die Elongation (Synthese des zum Template komplementären Stranges). Diese werden zwischen 30 und 45 mal wiederholt wobei sich die DNA-Konzentration exponentiell erhöht, so daß ein einzelnes Molekül als Template ausreicht, um auf Agarosegelen detektierbare Mengen DNA zu erhalten (Alberts et al., 1995).

Den kurzen doppelsträngigen Bereich, den die Primer mit dem Template bilden, benötigt die Polymerase zur Bindung und Initiation der Elongation. Die Primer sind kurze sequenzspezifische Oligonukleotide, bei deren Synthese Länge und Sequenz des Primers sowie Stabilität und eventuelle Sekundärstrukturen beachtet werden müssen (Taq PCR Handbuch, 1997). Die ungefähre Annealingtemperatur errechnet sich aus der Formel $T = 4x (G+C) + 2x (A+T)$ (Ibelgaufts, 1993), die optimale Temperatur wird in Versuchen ermittelt.

Detektiert und auf korrekte Fragmentlänge überprüft wird das amplifizierte Fragment mittels Agarosegelelektrophorese.

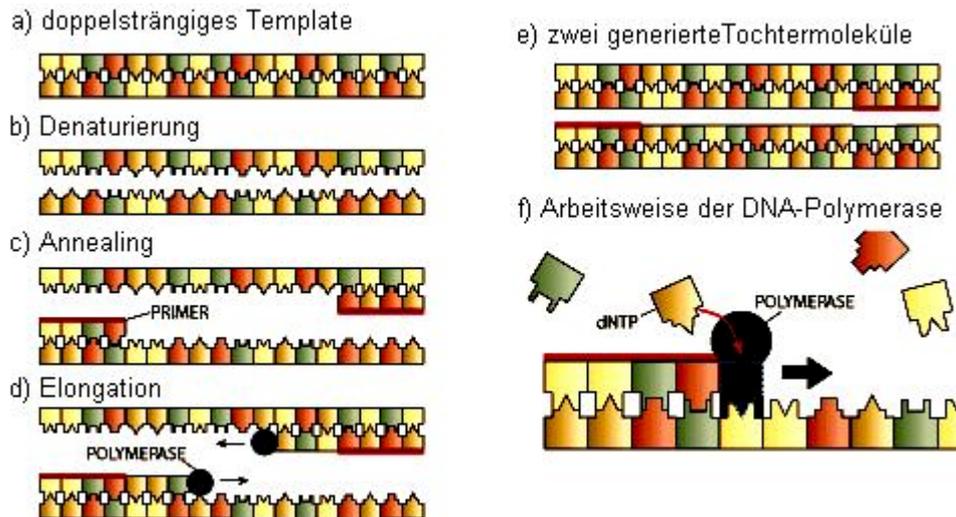


Abb.6 Schematische Darstellung der einzelnen Schritte einer PCR (a-e) sowie der Details der Elongation durch die DNA-Polymerase (f) (nach Dragon).

Reaktionsansätze für eine PCR-Reaktion wurden mit Reagenzien unterschiedlicher Hersteller angesetzt und enthielten folgende Komponenten:

Ansatz nach dem Protokoll von GIBCO BRL/100 μ l Ansatz

10	μ l	10x PCR-Puffer minus $MgCl_2$
2	μ l	10 mM dNTP-Mix
x	μ l	50 mM $MgCl_2$
1	μ l	Primer A
1	μ l	Primer B
x	μ l	Template
0,5	μ l	Taq DNA-Polymerase (2,5 Units)
ad 100	μ l	ddH ₂ O

Ansatz nach dem Protokoll von ROCHE für das Expand™-HF System/100 μ l Ansatz

Mastermix 1	
1	μ l 10 mM dNTP-Mix
1	μ l Primer A
1	μ l Primer B
x	μ l Template
ad 50	μ l ddH ₂ O
Mastermix 2	
10	μ l 10x PCR-Puffer minus $MgCl_2$
x	μ l 25 mM $MgCl_2$
0,5	μ l Enzym-Mix (Taq/Pwo; 2,6 Units)
ad 50	μ l ddH ₂ O

Hierbei hing die Magnesiumkonzentration vom Template ab und sollte zur Optimierung variiert werden. Die eingesetzten Template-mengen lagen bei 0,5-1 μ g pro Ansatz. Primer A bezeichnet den forward-Primer, Primer B den dazugehörigen reverse-Primer (siehe auch Material für die PCR). Die eingesetzten Primer hatten eine Konzentration von 10 pmol/ μ l.

Ansatz nach dem Protokoll von QIAGEN/100 µl Ansatz, für eine „single-cell PCR“

33	µl PK-Verdau
4	µl Primer A
4	µl Primer B
2	µl 10 mM dNTP-Mix
20	µl 5x Q-Solution
10	µl 10x PCR-Puffer*
0,75	µl Taq DNA-Polymerase (3,75 Units)
26,25	µl ddH ₂ O

Primer A bezeichnet den forward-Primer, Primer B den dazugehörigen reverse-Primer (siehe auch Material für die PCR). Die eingesetzten Primer hatten eine Konzentration von 10 pmol/µl. Die 5x Q-Solution für schwierige Templates ist in dem PCR-Kit der Firma QIAGEN enthalten, die Bestandteile sind unbekannt. * Es wurden 10 µl statt 7 µl 10x PCR-Puffer eingesetzt (die 33 µl Verdau sind in 1x Puffer), da so die besten PCR-Resultate zu erreichen waren.

Ein PCR-Programm lief nach folgendem Schema ab:

Schritt 1	95°C	3 min.	} 35x bis 40x
Schritt 2	X°C	1 min.	
Schritt 3	72°C	1 min.	
Schritt 4	95°C	1 min.	
Schritt 5	X°C	3 min.	
Schritt 6	72°C	5 min.	
Schritt 7	4°C	unendlich	

X°C ist der Ersatz für die entsprechenden, den Primern angepaßten, Annealingtemperaturen (siehe Ergebnisse). Überprüft wurden die PCR-Produkte auf Gelen mit 1% Agarose in 1x TBE-Puffer, die 20 min. in 5 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung gefärbt wurden. Die PCR-Produkte wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.2.4.1 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden entsprechend ihrer Qualität aufgereinigt. Befanden sich neben dem gewünschten PCR-Produkt unspezifische Nebenprodukte oder „Primer-Dimer“ im Ansatz, so erfolgte die Aufreinigung durch eine Gelelektion mit DEAE-Membranen.

Hierbei wurde der PCR-Ansatz mit 1/6 seines Volumens an Gel-Probenpuffer versetzt und auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, so daß die zu isolierende Bande gut getrennt von den Nebenprodukten vorlag. Das Gel wurde in einer Ethidiumbromid-Lösung (5 µg/ml) gefärbt, vor und hinter der gewünschten Bande unter UV-Kontrolle mit einem Skalpell eingeschnitten, und mit einer stumpfen Pinzette wurden zurechtgeschnittene Cellulosemembranstücke in die Schnitte gesetzt, die zuvor je 5 min. in 10 mM EDTANa₂ pH 8,0 und in 0,5 M NaOH inkubiert, 3x in ddH₂O gewaschen worden waren. Die hinter der zu eluierenden Bande befindlichen Membranstücke dienten dabei zur Eliminierung höhermolekularer DNA-Fragmente aus dem PCR-Ansatz. Nach dem Einsetzen der Membranstücke wurde das Gel zurück in die Pufferkammer gelegt, erneut für 20 min. Spannung angelegt und anschließend die Streifen mit den gewünschten DNA-Fragmenten in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt.

Nach 2-maligem Waschen des Streifens mit je 1 ml NET (Niedrigsalz)-Puffer wurden unter UV-Kontrolle alle nicht fluoreszierenden Membranteile mit einem Skalpell abgeschnitten, die restlichen Stücke in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße mit ca. 600 µl hsNET (Hochsalz)-Puffer gegeben und 30 min. bei 60°C sowie 1 h bei RT inkubiert. Eine Kontrolle der Membranfragmente unter UV-Licht brachte Sicherheit über die restlose Elution der DNA.

Das in den DNA-Fragmenten interkalierte Ethidiumbromid wurde mit dem 2-fachen Volumen n-Butanol ausgeschüttelt. Die wäßrige Phase wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, 1x mit ca. 2 Volumen Phenol/Chloroform extrahiert, erneut die wäßrige Phase abgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

Sollten von einem ansonsten reinen PCR-Produkt nur Primer, dNTPs und Enzym entfernt werden, so wurde auf Silicasäulen zurückgegriffen („StrataPrep™ PCR Purification Kit“). Hierbei wurde das PCR-Produkt mit einem Volumen an DNA-Bindungspuffer gemischt, auf eine Silicasäule pipettiert, zentrifugiert, 1 mal mit 1x PCR-Waschpuffer gewaschen und die Säule durch Zentrifugation getrocknet. Die Elution der DNA erfolgte durch Zugabe von je 50 µl Elutionspuffer (Tris/HCl pH 8,5), einer 5 minütigen Inkubation bei RT und abschließender Zentrifugation (alle Zentrifugationsschritte erfolgten für 30 sec. mit 14000 rpm bei RT). Die Eluate wurden bei -20°C gelagert.

Eine weitere Variante zur Entfernung von Oligonukleotiden und Enzymen aus einem Reaktionsgemisch ist die selektive Präzipitation. Hierbei wurde der PCR-Probe ein gleiches Volumen an 4 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumina auf RT equilibriertes Ethanol p.A. (100%) zugegeben, die DNA bei 14000 rpm für 20 min. bei RT pelletiert und das Sediment mit 200 µl Ethanol p.A. (80%, RT) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 min. bei RT wurde überschüssiges Ethanol entfernt, das Pellet unter Vakuum getrocknet und in 50 µl Elutionspuffer (Tris/HCl, pH 8,5 [20°C]) resuspendiert.

2.2.5 Klonierung

Zu Generierung größerer Mengen DNA gleichen Ursprungs (d.h. identischer Sequenz) und zur Herstellung von Kontrollen mit Wildtyp- und mutanten p53-Sequenzen wurden aufgereinigte PCR-Produkte kloniert und in E.coli transformiert.

Die Klonierung erfolgte mit dem „PCR-Skript™ Amp Cloning Kit“ der Firma Stratagene. Glattendige („blunt ended“) PCR-Produkte werden mit dem vorverdauten pPCR- Skript™ Amp SK(+) Klonierungsvektor, dem Restriktionsenzym Srf I und der T4 DNA Ligase inkubiert. Durch das im Reaktionsansatz vorhandene Restriktionsenzym, das den Vektor kontinuierlich neu verdaut, kann ein konstant hohes Niveau an verdautem Vektor aufrecht erhalten werden, ohne daß der geschnittene Vektor dephosphoryliert werden muß. Dies ermöglicht die Nutzung von nicht-phosphorylierten, unmodifizierten Primern in der PCR.

Srf I erkennt die Oligonukleotidsequenz 5'-GCCC/GGGC-3' und erzeugt Schnittstellen mit glatten Enden. Das mit der Taq DNA-Polymerase erstellte PCR-Produkt hat hingegen überhängende („sticky“) Enden, so daß diese zur Klonierung in den Vektor mit Hilfe der Pfu DNA-Polymerase

aufgefüllt wurden (siehe Abb. 7). Diese sogenannte „fill-in“ Reaktion wurde wie folgt in 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt:

- 10 μ l PCR-Produkt
- 1 μ l 10 mM dNTP-Mix (2,5 mM je dNTP)
- 1,3 μ l 10x „polishing buffer“
- 1 μ l klonierte Pfu DNA-Polymerase (0,5 Units)

Die eingesetzte Menge an PCR-Produkt war hierbei unabhängig von der vorhandenen DNA-Konzentration. Der Ansatz wurde gemischt, mit Mineralöl überschichtet und 30 min. bei 72°C inkubiert. Danach wurde die DNA entweder sofort kloniert oder bei –20°C aufbewahrt.

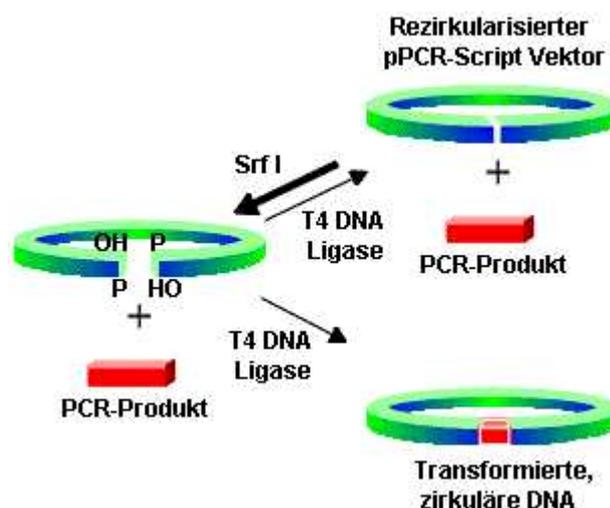


Abb.7 Die pPCR-Script™ Klonierungs-Methode (nach STRATAGENE, 2000a).

Der zur Klonierung eingesetzte Vektor (Abb. 8) ist ein modifizierter pBlueskript SK(+) Phagemid mit einer Srf I-Schnittstelle und β -Lactamase-Gen Amp^r zur Selektion nach erfolgreicher Transformation. Die Selektion auf erfolgreiche Insertion eines DNA-Fragmentes erfolgte bei diesem Vektor durch Klonierung in das lacZ-Gen aus E.coli. Ohne Insert katalysiert die codierte β -Galaktosidase den Umsatz des Substrates 5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galaktosid (X-Gal) in einen blauen Farbstoff (= blaue Bakterienkolonie). Nach Inaktivierung des lacZ-Gens durch erfolgreiche Insertion eines DNA-Fragmentes besteht keine enzymatische Aktivität mehr – die Klone sind weiß. Dies ermöglichte eine visuelle Differenzierung rekombinanter von nicht-rekombinanten Bakterien (Ibelgauffs, 1993).

Mit dem Restriktionsenzym BssH II ließen sich klonierte DNA-Fragmente isolieren und per Molekulargewichtsbestimmung im Agarosegel auf erfolgreiche Klonierung des korrekten Inserts überprüfen.

Zur Ligation der PCR-Produkte in den Vektor wurde folgende Reaktion in 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen angesetzt:

- 1 µl pPCR-Skript Amp SK(*) Klonierungsvektor (10 ng)
- 1 µl PCR-Skript 10x Reaktionspuffer
- 0,5 µl 10 mM rATP
- 4 µl glattendiges PCR-Produkt (unabhängig von seiner Konzentration)
- 1 µl Srf I Restriktionsendonuklease (5 Units)
- 1 µl T4 DNA Ligase (4 Units)
- 1,5 µl ddH₂O

Der Ligationsansatz wurde 1 h bei 25°C inkubiert, 10 min. auf 65°C erhitzt und dann in die Transformation eingesetzt oder bei –20°C gelagert.

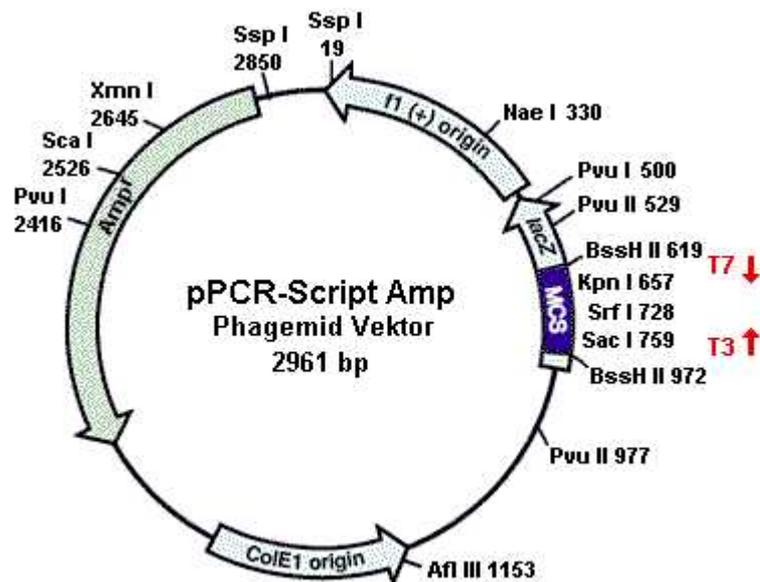


Abb.8 Der pPCR-Script™ Amp SK(+) Klonierungsvektor. MCS = multiple Klonierungsstelle, die von T3- und T7-Promotoren flankiert wird, lacZ = β-Galactosidase-codierendes Gen aus *E. coli*, f1(+) origin = Replikationsorigin des filamentösen Bakteriophagen f1, ColE1 origin = Plasmid-Replikationsorigin zur Verwendung bei Abwesenheit eines Helferphagen, Amp^r = Gen für β-Lactamase. Linien markieren Positionen verschiedener Restriktionsschnittstellen (nach STRATAGENE 1998a und 2000a).

Die Transformation erfolgte, ebenso wie alle vorher erwähnten Schritte der Klonierung, nach dem Handbuch des Stratagene PCR-Skript™ Amp Cloning Kits. Dazu wurden die Epicurian Coli® XL 10-Gold™ Kan ultrakompetenten Zellen und das XL 10 Gold™ β-Mercaptoethanol auf Eis aufgetaut und 40 µl-Aliquots der Zellen auf vorgekühlte 15 ml Falcon 2059 Polypropylen-Röhrchen verteilt. Nach Zugabe von je 1,6 µl β-Mercaptoethanol wurde 10 min. auf Eis inkubiert und dabei alle 2 min. leicht gemischt. Dann wurden 2 µl des Ligationsansatzes hinzugegeben und nochmals 30 min. auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 30 sec. bei 42°C, bei dem die Einhaltung des Zeitraumes und der Temperatur sehr kritisch sind, wurden die Ansätze erneut für 2 min. auf Eis transferiert. Dem Ansatz wurde dann 450 µl auf 42°C vorgeheiztes NZY⁺Broth zugegeben und 1 h bei 37°C und 250

rpm auf einer Schüttelplattform geschüttelt. Für die Blau-Weiß-Selektion der Bakterien (s.o.) wurden je 100 µl 2% X-Gal und 10 mM IPTG in 100 µl NZY⁺Broth zugegeben, auf einer LB-Ampicillin-Agar-Platte (50 µl/ml Ampicillin) verteilt und diese bei RT luftgetrocknet. Danach wurden 100 µl bzw. 200 µl des Transformationsansatzes ausplattiert und die Platten ü.N. bei 37 °C inkubiert.

Alle Schritte erfolgten dabei unter sterilen Bedingungen. Die Auswertung erfolgte am darauffolgenden Tag durch Auszählung der blauen und weißen Kolonien.

2.2.6 Plasmidisolierung

Nach der ü.N.-Inkubation wurden rein weiße Kolonien mit einer Impföse von der Agarplatte gepickt, 3 ml LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin) in einem 10 ml Reaktionsgefäß angeimpft und ü.N. bei 37 °C und 250 rpm auf dem Schüttler inkubiert.

Die Plasmid-Isolierung aus den ü.N.-Kulturen erfolgte nach dem Protokoll des „QIAprep Spin Plasmid Kits“. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei RT mit 14000 rpm (Zentrifuge 5402/Eppendorf) wenn nicht anders angegeben. Die Kulturen wurden ½ h mit 3500 rpm zentrifugiert, das gut abgetropfte Bakterienpellet in 250 µl Puffer P1 (enthält Rnase A) resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 250 µl Puffer P2 folgten ein 4-6 maliges Über-Kopf-Drehen der Gefäße zur vorsichtigen Durchmischung der Proben ohne Fragmentierung der bakteriellen chromosomalen DNA, Zugabe von 350 µl Puffer N3 und sofortiges 4-6 maliges Über-Kopf-Drehen der Proben. Dies dient zur Fällung zellulärer Proteine und chromosomaler Bakterien-DNA. Nach 10-minütiger Zentrifugation wurde der Überstand in Silicasäulchen überführt, 1 min. zentrifugiert, die an die Silicamatrix gebundene DNA durch Zugabe von 750 µl Puffer PE und 1 minütiger Zentrifugation gewaschen und die Säulen 1 min. durch Zentrifugation getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl Puffer EB oder 10 mM Tris/HCl pH 8,5 für 5 min. inkubiert und 1 min. zentrifugiert. Das Eluat wurde bei -20°C gelagert.

2.2.7 Sequenzierung

Zur Sequenzierung sind zwei Techniken bekannt: die spezifische chemische Spaltung von Nukleotid-Sequenzen nach Maxam-Gilbert, die heute aber eher historische Bedeutung hat (Maxam et al., 1977) und das Kettenabbruch-Verfahren nach Sanger, das in dieser Arbeit angewandt wurde (Sanger et al., 1977).

Hierzu wird ein zur Zielsequenz komplementäres Oligonukleotid hybridisiert und durch eine spezielle DNA-Polymerase ein komplementärer Strang synthetisiert. Für jedes Templates werden vier verschiedene Ansätze durchgeführt, bei denen zusätzlich zu den dNTPs jeweils ddGTP, ddATP, ddTTP oder ddCTP angeboten werden. Nach Einbau eines ddNTPs kann die Polymerase aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe keine Strangverlängerung mehr katalysieren und es kommt zum Strangabbruch. Für jede Nukleotid-Position erhält man bei richtig gewähltem Verhältnis der Nukleotide statistisch die gleiche Menge Abbruchfragmente. Der Nachweis der zwischen ca. 30bp-

800bp langen Fragmente wird durch Markierung entweder der Primer, der dNTPs oder der ddNTPs mit Biotin, Fluoreszenz-Farbstoffen oder radioaktiven Elementen und der Auftrennung auf einem denaturierendem PAA-Gel ermöglicht (Styer, 1994; Ibelgauf, 1993).

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem GATC 1500-System und der Direct Blotting Elektrophorese der Firma GATC GmbH gearbeitet. Bei dieser Methode werden mit biotinylierten ddNTPs markierte Fragmente auf ein vertikales PAA-Gel aufgetragen. Im Gegensatz zu herkömmlichen Sequenzierungen wird der Gellauf aber nicht gestoppt, sondern die Fragmente werden unterhalb des direkt auf eine, unter den angeschrägten Glasplatten per Förderband hindurchgezogene, Nylonmembran geblottet. Durch Bestrahlung mit UV-Licht wird die DNA an die Membran fixiert und im Anschluß kolorimetrisch detektiert.

Für die Sequenzierung von klonierten Fragmenten oder PCR-Fragmenten wurden die Reaktionen für das sogenannte „Cycle Sequencing“ wie folgt angesetzt:

Hauptmix:

0,2-1 µg	Template
10 pmol	unmarkierter Primer
2 µl	BioCycle [®] Reaktionspuffer
2 µl	BioCycle [®] dNTP-Mix
5-10 U	Thermo Sequenase [™] DNA Polymerase
ad 20 µl	ddH ₂ O

Der Hauptmix wurde zu gleichen Teilen (je 5 µl) auf vier 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Für die G-Reaktion wurde 1 µl BioCycle[®] ddGTP zugegeben und analog dazu die A-, T- und C-Reaktion angesetzt. Nach Überschichten der Reaktionen mit Mineralöl wurde das Cycle Sequencing in einem Thermocycler durchgeführt. Dazu verwendete Programme waren:

Für Primer mit einer Annealingtemperatur über 50°C:

95°C	3 min.	} x40
X°C	30 sec.	
95°C	30 sec.	
60°C	4 min.	
4°C	unendlich	

X°C entspricht den Annealingtemperaturen der unterschiedlichen Primern.

Für Primer mit einer Annealingtemperatur unter 50°C:

95°C	3 min.	} x40
X°C	30 sec.	
60°C	30 sec.	
95°C	30 sec.	
60°C	4 min.	
4°C	unendlich	

X°C entspricht den Annealingtemperaturen der unterschiedlichen Primern.

Nach Beendigung des PCR-Programmes wurden die Reaktionen durch Zugabe von je 4 µl Stopp-Mix gestoppt, die Proben bei -20°C oder 4°C gelagert und vor dem Auftragen auf ein 4%iges PAA-Gel 3 min. bei 90°C denaturiert. Nach einem Vorlauf des Geles mit konstanten 30 W (ca. 1700 V/ 17

mA) für 30 min. wurden ca. 2 µl jeder Probe aufgetragen. Nach einem Probeneinlauf, 10 min. bei konstanten 500 V, wurde der Hauptlauf gestartet, konstant 30 W (ca. 1900 V/ 15 mA).

Der Vorlauf erwärmt das Gel und verhindert, ebenso wie eine angeklebte Metallplatte, Temperaturschwankungen, die Unregelmäßigkeiten im Bandenmuster hervorrufen. Der Probeneinlauf bei geringer Spannung dient zur Verhinderung einer Salzfront im Gel. Mit Hilfe eines Schrittmotors kann die Geschwindigkeit des Förderbandes und damit der Membran variiert werden, so daß die Bandenabstände auf der Membran beliebig eingestellt werden können. Es besteht auch die Möglichkeit, nacheinander zwei verschiedene Geschwindigkeiten zu fahren. Für die Sequenzierung wurde im vorliegenden Fall eine Geschwindigkeit zwischen 23,5 und 25 cmh⁻¹ gewählt.

2.2.7.1 Kolorimetrische Detektion

Nach dem Gellauf wurde die DNA unter UV-Licht für 2 min. auf der Membran fixiert. Die Entwicklung erfolgte in einem Hybrid-Mini-Ofen in einer verschließbaren Röhre, die während der folgenden Inkubationen automatisch bei 30°C und 8 rpm um ihre Längsachse gedreht wurde. Nach zwei Equilibrierungsschritten mit 1x 150 ml ddH₂O und 1x 150 ml Maleinsäurepuffer für je 5 min. folgte eine Blockade mit 80 ml 1,5% Blocking-Puffer für 45 min. und die Inkubation für 30 min. mit 10 µl SA-AP Konjugat in 20 ml Blocking-Puffer. Im Anschluß wurde 3x 10 min. mit je 150 ml Maleinsäurepuffer und 1x 10 min. mit Reaktionspuffer gewaschen und mit je 70 µl BCIP und NBT in 20 ml Reaktionspuffer 45 min. bis zu 4 h inkubiert. Dabei bindet das Streptavidin an die Biotinmarkierungen der DNA und die Streptavidin-gekoppelte Alkalische Phosphatase katalysiert die Umsetzung des Substrates zu einem violetten Niederschlag. Anhand des Bandenmusters konnte die Sequenz der untersuchten Nukleinsäure bestimmt werden. Die Membran wurde aufgrund der Lichtsensitivität des Farbkomplexes in der Dunkelheit aufbewahrt.

2.2.7.2 Chemilumineszenz Detektion

Es besteht auch die Möglichkeit der sensitiveren Chemilumineszenz zur Detektion von biotinylierten Nukleinsäuremolekülen. Hierbei erfolgt die enzymatische Freisetzung von Energie in Form von Strahlung, die mit Röntgenfilmen detektierbar ist.

Die Detektion erfolgte mit dem Biotin Luminiscent Detection Kit. Hierfür wurde nach der UV-Fixierung die Membran 5 min. mit 100 ml ddH₂O und 3 min. in 100 ml Waschpuffer gespült, 30 Minuten mit 100 ml 5x Blockierungslösung blockiert und 30 min. mit 20 ml SA-AP Lösung inkubiert. Nach zwei Waschschritten in je 100 ml Waschpuffer für je 15 min. wurde die Membran 5 min. in 100 ml Detektionspuffer equilibriert, mit der DNA-Seite nach oben in eine Klarsichthülle gelegt, 1 ml CSPD[®]-Lösung zugegeben und 10 Minuten bei RT in der Dunkelheit inkubiert. Danach wurden Röntgenfilme 30 min. bzw. 1 h exponiert und entwickelt. Im Anschluß an diese Entwicklung kann zusätzlich

kolorimetrisch detektiert werden. Diese Verfahren wurde bei der Detektion der CFLP-Ergebnisse angewandt.

2.2.8 Herstellung von Mutanten

Zur Etablierung von Systemen wie MutS-Bindeexperiment, CFLP oder biddF wurden sequenzspezifische p53-Kontrollplasmide (wt, Mut 1/2, Mut 3/4, Mut 5/6) mit bekannter wildtyp- oder mutanter Sequenz mit dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit hergestellt. Dazu wurde ein pPCR-Script SK(+)-Klonierungsvektor mit einem p53 Exon 5-9-Insert denaturiert, mit Primern, die die gewünschte Mutation enthielten, hybridisiert und die Plasmide amplifiziert. Das Resultat sind doppelsträngige DNA-Moleküle mit Einzelstrangbrüchen („nicks“). Das nicht-mutierte, methylierte parentale Plasmid kann dann über einen Verdau mit Dpn I abgebaut und die mutierte DNA in XL 1-Blue superkompetente Zelle transformiert werden. Dpn I erkennt spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA und baut sie ab, so daß die nicht-methylierte amplifizierte DNA durch eine Restriktion mit Dpn I selektierbar ist (Nelson M. et al., 1992; Weiner et al., 1994). In den E.coli-Zellen erfolgt automatisch die Reparatur der „nicks“.

Es wurden folgende Reaktionen durchgeführt:

Ansatz für die Kontrolle

5	µl	10x Reaktionspuffer
2	µl	pWhitescript™ 4,5 kb Kontrollplasmid (5 ng/µl)
1,25	µl	Kontrollprimer 1 (100 ng/µl)
1,25	µl	Kontrollprimer 2 (100 ng/µl)
1	µl	25 mM dNTP-Mix
39,5	µl	ddH ₂ O

Ansatz für eine Mutante

5	µl	10x Reaktionspuffer
1	µl	p53 Exon 5-9 in pPCR-Script SK(+)-Klonierungsvektor (10 bzw. 50 ng/µl)
1,25	µl	Primer Mut1, Mut3 oder Mut5 (je 100 ng/µl)
1,25	µl	Primer Mut2, Mut4 oder Mut6 (je 100 ng/µl)
1	µl	25 mM dNTP-Mix
40,5	µl	ddH ₂ O

Die Reaktionen wurden in 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen angesetzt und dann je 1 µl PfuTurbo™ DNA Polymerase (2,5 U/µl) hinzugegeben. Nach Überschichtung mit Mineralöl wurde folgendes Programm im Thermocycler durchlaufen:

95°C	30	sec.	} 13x
95°C	30	sec.	
55°C	1	min.	
68°C	12/10	min.	
4°C	unendlich		

Die 12-minütige Elongationszeit ist hierbei für die Kontrolle (Vektor ist ca. 4,5 kb lang), die 10-minütige für die erzeugten Mutanten (Vektor ist ca. 3 kb lang).

10 µl jedes Ansatzes werden auf 1%igen Agarosegelen auf erfolgreiche PCR-Reaktion überprüft, die restlichen 40 µl wurden mit je 1 µl Dpn I (10 U/µl) bei 37°C 1 h verdaut.

Die Transformation von je 1 µl der Dpn I-Ansätze in E.coli XL 1-Blue superkompetente Zellen erfolgte wie im Absatz Klonierung beschrieben.

Eine Deletionsmutante (del12) wurde durch Verdau des p53 Exon5-9-Klones mit EcoN I und Exonuklease VII sowie späterer Inkubation mit T4 DNA-Ligase hergestellt. Ausgenutzt wurde dabei, daß Plasmid DNA nach Linearisierung mit einer Restriktionsendonuklease, Inkubation mit einer Exonuklease und mit T4 DNA Ligase und Transformation in E.coli ungerichtete Deletionen enthalten kann (Stuitje et al., 1978).

Es wurden folgende Reaktionsschritte durchgeführt:

EcoN I-Verdau

10 µl Vektor mit Insert
5 µl 10x Reaktionspuffer NEB 4
1 U EcoN I
ad 40 µl ddH₂O

Die Inkubation erfolgte in einem 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß für 1 ½ h bei 37°C. Nach selektiver Präzipitation (siehe Aufreinigung von PCR-Produkten) wird das Sediment in 49 µl Exonuklease VII-Reaktionspuffer aufgenommen und nach Zugabe von 1 µl Exonuklease VII (1,5 U/µl) für 1 ½ h bei 37°C inkubiert. Nach erneuter selektiver Präzipitation wird das resultierende Pellet in 49 µl T4-Ligase-Reaktionspuffer und 1 µl T4 DNA-Ligase resuspendiert und bei 25°C für 1 h und bei 65°C für 10 min. inkubiert. Die resultierenden Proben wurden auf 1% Agarosegelen analysiert und die Deletionen über Sequenzierung verifiziert.

2.2.9 Temperatur-Gradienten-Gel-Elektrophorese (TGGE)

Eine schnelle und sensitive Methode zur Erkennung von Sequenzvariationen, die schon über längere Zeiträume genutzt wird, ist die TGGE (Rosenbaum und Riesner, 1987; Wulfert, 2001). Zunutze macht sich dieses Verfahren das unterschiedliche Schmelzverhalten gleich langer Nukleinsäuremoleküle mit Sequenzunterschieden bis zu Veränderungen in einem Basenpaar und den Effekt von partieller Denaturierung auf das Migrationsverhalten im denaturierenden PAA-Gel (Wartell et al., 1998).

Die TGGE wurde in dieser Arbeit wie folgt durchgeführt:

Es wurden aus genomischer DNA, isoliert aus gefrorenen Rattenlebern, PCR-Produkte mit GC-Klammern für p53 E5, E6+7 und E8+9 generiert. Die Ansätze und PCR-Programme wurden wie im Abschnitt PCR beschrieben durchgeführt. Die Bedingungen waren 57°C/ 1,5 mM MgCl₂ für E5 und E8+9 sowie 57°C/ 1,0 mM MgCl₂ für E6+7. Es wurden Kontrollfragmente aus p53-Klonen mit und ohne Mutation eingesetzt (wt, Mut1/2, Mut3/4, Mut5/6 und del12; siehe „Kontrollen zur Feststellung der Sensitivität der Mutations-Detektions-Systeme“ im Kapitel Ergebnisse). Mit Hilfe von

Mischungsverhältnissen aus wt und den verschiedenen Mutanten, die 3 min. bei 90°C denaturiert und durch Abkühlung bis auf 4°C renaturiert wurden, konnte das System etabliert und seine Sensitivität bestimmt werden.

Die Proben wurden mit Gel-Probenpuffer versetzt und je 6 µl (insgesamt 150 ng DNA) auf 8% denaturierende, horizontale, glycerolhaltige PAA-Gele aufgetragen.

Herstellung der Gele:

Die Glasplatten wurden mit ddH₂O und Ethanol p.A. gereinigt und auf der ebenen Glasplatte ein Gel-Support-Film (dient als späterer Träger für das PAA-Gel) durch Aufreiben mit einem Lineal fixiert. Nach dem Auflegen der Spacer und der Glasplatte mit dem Steg für den Slot wurden die Platten ringsum geklammert.

Die Gellösung bestand aus folgenden Komponenten:

10,6 ml	30% Acrylamidlösung (von GATC)
0,8 ml	50x MOPS-Puffer
2,0 ml	40% Glycerol
6,6 ml	ddH ₂ O
19,2 g	Harnstoff

Nach Lösung des Harnstoffs wurde ad 40 ml mit ddH₂O aufgefüllt, 50 µl TEMED und 150 µl 10% APS hinzugegeben und die Lösung zwischen die Glasplatten gegossen und das Gel 2h polymerisiert.

Danach wurde das Gel mit der Filmseite nach unten auf das Heizelement der horizontalen Gelapparatur, das mit etwas Glycerol oder Wasser bedeckt war, luftblasenfrei aufgebracht. Auf Gel-Breite geschnittene Stücke Filterpapier wurden dergestalt auf die, an die Pufferkammern angrenzenden, Gel-Enden gelegt, daß sie in den Laufpuffer (1x MOPS) hingen. Nach dem Auftragen der Probe wurde eine Glasplatte auf das Filterpapier gelegt, so daß die Gesamtfläche des Gels bedeckt war. Zum Probeneinlauf wurde für 1h eine uniforme Temperatur von 20°C und eine Spannung von 120 V angelegt. Der, je nach Probe variable und durch perpendikulare TGGEs ermittelte, Temperaturgradient wurde angelegt und die Probe für 15 min an die Temperaturen equilibriert. Es folgte ein Hauptlauf mit angelegtem Temperaturgradienten und mit von der Probe abhängiger Dauer bei 120 V.

Die parallele TGGE wurde mit dem ermittelten Temperaturgradienten für jedes Exon durchgeführt, und die Proben bis zu dem ermittelten Schmelzpunkt, der über Abmessen auf dem Gel ermittelt wurde, laufen gelassen. Nach Beendigung des Laufes wurden die Banden mittels Silberfärbung visualisiert und danach ausgewertet.

2.2.9.1 Silberfärbung

Das Gel wurde mit dem Gel-Support-Film nach unten in eine Wanne, die der Gelgröße entsprach, gelegt und alle weiteren Schritte, sofern nicht anders angegeben auf einem Schüttler bei 55 rpm und RT durchgeführt. Alle verwendeten Puffer wurden vor Gebrauch frisch angesetzt. Es wurde 2x3 min. in je 300 ml 10% Ethanol und 0,5% Essigsäure in ddH₂O gewaschen, 1x10 min. in 0,1% Silbernitrat

inkubiert und dann das Gel beidseitig gründlich unter fließendem ddH₂O abgewaschen. Entwickelt wurde durch Schütteln in 300 ml 1,5% NaOH, 0,01% NaBH₄ und 0,15% Formaldehyd 37% in ddH₂O, bis alle Banden gut sichtbar waren. Nach einer ca. 5 minütigen Inkubation in 300 ml 0,75% Na₂CO₃ wurde das Gel in Klarsichtfolie eingeschweißt und aufbewahrt.

2.2.10 „Clevase Fragment Length Polymorphism“ (CFLP)

Ein weiteres, hochempfindliches System zur Detektion von Mutationen in DNA-Fragmente bis zu höchstens 1000 bp Länge ist der CFLP (Oldenburg et al., 2000; Firmeninformationen Gibco BRL und Roche), eine Variante der SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism).

Durchführung der Versuche erfolgte mit den Systemen von Roche oder Gibco BRL mit folgender Vorgehensweise.

Reaktionsmix: 2 µl 10x CFLP-Puffer
 2 µl 2 mM MnCl₂
 1 µl Clevase I Enzym (25 Units)
 2 µl ddH₂O
 13 µl DNA (50 ng) in ddH₂O

Als Negativkontrolle wurde statt Clevase I nur ddH₂O zugegeben. Zur Feststellung der Sensitivität des Systems wurden Mischungsverhältnisse des Wildtyps mit mutanten Kontrollen von 1:1, 10:1, 25:1 und 100:1 eingesetzt (Die Mutanten werden gezeigt im Kapitel Ergebnisse: „Kontrollen zur Feststellung der Sensitivität der Mutations-Detektions-Systeme“). Es wurde zunächst die DNA im Thermocycler denaturiert und dann die restlichen vorgemischten und auf die Reaktionstemperatur vorgewärmten Reagenzien zugegeben. Reaktionstemperatur und -dauer für jedes Fragment wurden in einem Etablierungsexperiment mit 45°C, 50°C und 55°C für 1 min., 2 min., 3 min. oder 5 min. ermittelt. Durch Zugabe von 16 µl Stop-Mix wurde die Reaktion gestoppt.

Die Auswertung erfolgte über 4% denaturierende PAA-Gele per „direct blotting“ und sowohl Chemilumineszenz-Entwicklung als auch colorimetrischer Detektion (siehe Direct Blotting Elektrophorese).

2.2.11 „Restriktion Site Mutation Assay“ (RSM)

Zur Anreicherung mutanter Sequenzen aus einem Gemisch von Wildtyp und Mutante wurde der RSM entwickelt (Parry et al., 1990), mit dem eine Mutation bekannter Lokalisation im DNA-Fragment identifiziert werden kann.

Zur Etablierung und Sensitivitätsbestimmung des Systems in dieser Arbeit wurde das H-ras Gen der Ratte gewählt, da in diesem Gen Mutationen fast ausschließlich in den Codons 12 und 13 des Exons 1 sowie in Codon 61 des Exons 2 gefunden werden (Watzinger et al., 1998). Positivkontrollen wurden mit Hilfe von mutanten 5'-Primern aus genomischer DNA über PCR für

Codon 12+13 für die Ratte generiert. Es wurden PCRs nach oben aufgeführtem Protokoll mit einer $MgCl_2$ -Konzentration von 0,25 mM/1,5 mM (mut/wt), einer Annealingtemperatur von 52°C/60°C (mut/wt) und 35 Zyklen mit dem Expand HF-System von Roche durchgeführt (siehe Methoden: PCR). Als Template diente DNA, die aus gefrorenen Lebern von unbehandelten Ratten isoliert und 1:10 zu einer Konzentration $<1 \mu g$ verdünnt worden war. Diese PCR-Produkte wurden kloniert, ausgesuchte Klone wurden sequenziert und wt bzw. mutanter Genotyp bestätigt (siehe Methoden: Klonierung). Aus den Klonen wurden mittels PCR (Bedingungen wt: 60°C Annealing, 1,5 mM $MgCl_2$; Mutante: 52°C Annealing, 0,25 mM $MgCl_2$) die gewünschten Fragmente amplifiziert und in den RSM eingesetzt.

Verschiedene Mischungsverhältnisse von wt und Mutante wurden wie folgt behandelt:

Codon 12:	2 μl 10x Puffer NEB 2 0,2 μl 100x BSA 0,1 μl BstN I (1 Unit) 7,7 μl ddH ₂ O 10 μl PCR-Produkt	Inkubation bei 60°C ü.N.
Codon 13:	2 μl 10x Puffer NEB 3 0,1 μl Bgl I (1 Unit) 7,9 μl ddH ₂ O 10 μl PCR-Produkt	Inkubation bei 37°C ü.N.

Es wurden jeweils 10 μl PCR-Produkt, unabhängig von seiner Konzentration, eingesetzt. Der Erfolg der Restriktion mit BstN I bzw. Bgl I wurde auf einem 1% Agarosegel überprüft. 1 μl aus einem als erfolgreich gewerteten Verdau wurde in eine zweite PCR-Reaktion mit oben genannten Bedingungen eingesetzt. Nach Überprüfung auf einem 1% Agarosegel wurden die PCR-Produkte erneut einem Restriktionsverdau unterzogen, an den sich, wenn die Restriktion nachzuweisen war, eine weitere PCR-Reaktion anschloß. Über Sequenzierung wurde die Anreicherung überprüft.

2.2.12 MutS Bindungsexperiment

Die Integrität des Genoms ist abhängig von der Fähigkeit des Organismus, auftretende DNA-Schäden zu korrigieren. Dies geschieht z.B. bei E.coli durch das MutHLS System, bei dem ungepaarte Basen erkannt und korrigiert werden (Lahue et al., 1989). MutS ist Bestandteil von im Handel erhältlichen Mutationsdetektionssystemen, von denen eins in dieser Arbeit getestet wurde.

Durchführung des Versuchs:

Es wurden Membranstücke und zwei Blatt Blotting-Papier GB003 5 min. in 1x MutS-Puffer equilibriert und in den Slot/Dot-Blotter der Firma Schleicher&Schuell eingelegt. Überschüssige Flüssigkeit wurde unter Vakuum entfernt. Es folgten eine 20 minütige Inkubation mit 500 ng MutS in 1x MutS-Puffer pro Slot, eine 1 stündige Blockade mit einer Blockierungsreagenz und 20 min. Inkubation mit DNA in Blockierungs-Reagenz. Nach 5 Waschschritten mit je 150 μl 1x MutS-Puffer wurden Membranstücke mit der gebundenen DNA ausgeschnitten, in je 40 μl Releasing-Solution gegeben,

30 min. bei RT inkubiert und davon 1 µl oder 5µl in eine PCR eingesetzt. Alternativ wurde die Entfernung der Puffer durch ausschlagen statt unter Vakuum durchgeführt.

2.2.13 Bidirektionaler dideoxy-Fingerprint (biddF)

Der biddF zugrunde liegt der dideoxy-Fingerprint (ddF), eine als die möglicherweise effektivste Screening-Technologie bekannte Methode, die eine Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al., 1977) mit einer SSCP („single strand conformation polymorphism“, Orita et al., 1989a und b) verbindet (Shevchenko et al., 2000; Sarkar et al., 1992).

Die Durchführung der Versuche erfolgte weitestgehend analog zur Sequenzierung mit dem BioCycle[®] Sequencing Kit wie folgt:

Ansatz:

0,5 µl	Primer A-bio (10 pmol/µl)
0,5 µl	Primer B-bio (10 pmol/µl)
0,5 µl	BioCycle [®] Reaktionspuffer
0,5 µl	BioCycle [®] dNTP-Mix
0,25 µl	ThermoSequenase [™] DNA Polymerase (1,25 Units)
0,75 µl	ddH ₂ O
1 µl	ddNTP

Hierbei steht Primer A-bio für den entsprechenden biotinylierten Forward-Primer, Primer B-bio für den Reverse Primer des zu untersuchenden Exons. Die Proben wurden mit Mineralöl überschichtet und in eine Sequenzier-Reaktion eingesetzt. Das weitere Vorgehen entsprach dem Protokoll für Sequenzierung (s.o.).

2.2.14 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die Bestimmung von Konzentrationen in DNA-Proben erfolgte zum einen über Vergleich mit Proben bekannter Konzentrationen auf 1%igen Agarosegelen, zum anderen fluorimetrisch. Zur Messung wurde der "PicoGreen[®] ds DNA Quantitation Kit" eingesetzt, der eine Quantifizierung von minimal 25 pg/ml doppelsträngiger DNA in einem Standard-Spectrofluorimeter bzw. 250 pg/ml in einem Fluoreszenz-Mikroplatten-Lesegerät erlaubt und damit sehr sensitiv ist. Diese Sensitivität liegt wesentlich höher als die der konventionellen Messung der Extinktion bei 260 nm und verhindert eine kontaminationsbedingte Interferenz (MOLECULAR PROBES, Produkt Information, 1998).

Für die Quantifizierung der DNA-Proben wurde zunächst eine Standard-Kurve erstellt. Dazu wurde 20x TE-Puffer 1:20 in dd H₂O, 50x λ-DNA 1:50 in 1x TE-Puffer und PicoGreen 1:200 in 1x TE-Puffer verdünnt und folgende λ-DNA-Standardkurven-Proben vorbereitet:

Volumen (μl) 2 $\mu\text{g/ml}$ λ -DNA	Volumen (μl) TE-Puffer	Volumen (μl) PicoGreen 1:200	Finale DNA- Konzentration
100	0	100	1 $\mu\text{g/ml}$
10	90	100	100 ng/ml
1	99	100	10 ng/ml
0,1	99,9	100	1 ng/ml
0	100	100	0 ng/ml

Analog wurde 1 μl eines PCR-Produktes (100 μl -Reaktion) auf 100 μl mit 1x TE-Puffer verdünnt und zu 100 μl einer 1:200 in 1x TE-Puffer verdünnten PicoGreen-Lösung pipettiert. Die Messung der so vorbereiteten DNA-Proben und Berechnung der DNA-Konzentration erfolgt anschließend unter Verwendung des Fluoreszenz-Mikroplatten-Lesegerätes und der installierten Software.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung und Testung verschiedener Mutations-Detektions- bzw. -Anreicherungssysteme

3.1.1 Immunhistochemie, Mikrodissektion, PCR und Sequenzierung: die Effizienz dieses Systems wird durch die Sensitivität der Sequenzierung eingeschränkt

Zellen präsentieren auf ihrer Oberfläche Antigene, die durch Antikörper spezifisch gebunden werden können. Markierte Antikörper können die vorhandenen Antigene durch eine Farb- oder Fluoreszenzreaktion sichtbar machen.

Bei der Anfertigung von Gewebeschnitten werden Zellen angeschnitten und so intrazelluläre Antigene für spezifische, markierte Antikörper zugänglich gemacht. In einigen Fällen kann es nötig werden, die Antigene für die je nach Immunglobulin-Klasse voluminösen Antikörper zu demaskieren, da durch die Formaldehydfixierung und die Einbettung in Paraffin Proteine quervernetzt wurden und nicht mehr frei zugänglich sind (Linden et al., 1994 und 1995). In Abbildung 8 wird schematisch die mehrstufige Antigendetektion dargestellt.

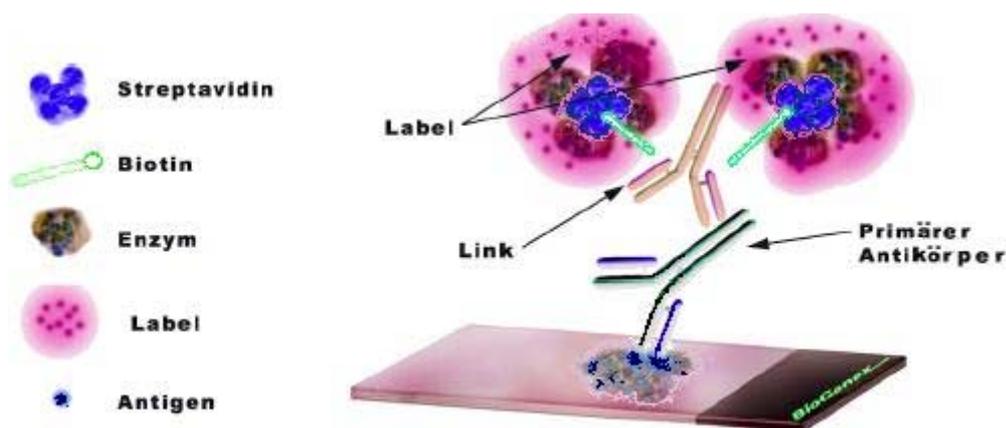


Abb.8 Darstellung des Detektionssystems zur immunhistochemischen Visualisierung akkumulierten p53-Proteins (BioGenex, 2001)

Auf dem Objektträger fixiert befindet sich der Gewebeschnitt, in dieser Arbeit Gefrier- oder Paraffinschnitte der Lebern von Ratten oder Mäusen. In den angeschnittenen Hepatocyten kann der primäre anti-p53-Antikörper freiliegendes Antigen erkennen und spezifisch binden. Der Primärantikörper wurde aus Kaninchen gewonnen und wird seinerseits durch biotinylierte anti-Kaninchen-Immunglobuline (Link) erkannt. Detektiert wird durch Zugabe eines Meerrettichperoxidase-konjugierten Streptavidins, das vier Biotin-Bindungsstellen aufweist (Label). Durch diese irreversible Bindung (Ibelgauffs, 1993) entsteht ein dreidimensionaler Komplex, dessen enzymatischer Bestandteil, die Meerrettichperoxidase, die Umsetzung des farblosen Substrates bestehend aus DAB und den Signalverstärkern Cobaltchlorid, Nickelsulfat und Wasserstoffperoxid zu einem braun-schwarzen Präzipitat katalysiert.

Verändertes p53 oder veränderter p53-Stoffwechsel ist durch verlängerte Halbwertszeit gegenüber dem Normalzustand und der daraus folgenden intrazellulären Akkumulation des Proteins in der Zelle detektierbar (Maltzman und Czyzyk, 1984; Wagener, 1996). Die Immunhistochemie auf 5 µm dicken Paraffinschnitten der Rattenlebern wurde mit dem p53-Antikörper CM 5 in einer Verdünnung von 1:1750 durchgeführt. Als Blockadereagens diente 0,5% BSA. Die Durchführung erfolgte ohne Vorbehandlung der Schnitte durch Kochen in Puffer o.ä.. Sie brachte eindeutige und reproduzierbare Ergebnisse, die in Tabelle 4 dargestellt sind.

Tiernummer	Behandlungszeitraum	Immunhistochemie
11	3 Monate	+
12	3 Monate	+
3	6 Monate	+
4	6 Monate	+++
13	6 Monate	++
14	6 Monate	+++
5	9 Monate	++
6	9 Monate	+
15	9 Monate	+/-
16	9 Monate	++
1*	12 Monate	-
2*	12 Monate	-
9*#	12 Monate	+
10*	12 Monate	-
7	12 Monate	+/-
8#	12 Monate	++
17	12 Monate	-
18	12 Monate	+/-

Tab.4 p53-spezifische Immunhistochemie auf paraffiniertem Lebergewebe von mit Tamoxifen behandelten Ratten

(-) = keine p53-spezifisch gefärbten Zellen; (+/-) = ca. 5-10 gefärbte Zellen; (+) = ca. 10-20 gefärbte Zellen; (++) = ca. 20-50 gefärbte Zellen; (+++) = >50 gefärbte Zellen. Alle Angaben beziehen sich jeweils auf einen Schnitt (ca.0,5 bis 1 cm²). Soweit nicht anders angegeben, handelt es sich um cytoplasmatische Färbungen; * = Tiere der Kontrollgruppe; # = nukleäre Färbung im Tumorgewebe.

Makroskopisch wurden bei drei Tieren des längsten Behandlungszeitraumes (Nr.7, 8 und 17) und einem Tier der Kontrollgruppe (Nr.9) Leberneoplasien gesehen.

Immunhistochemisch konnte zwischen cytoplasmatischen und nukleären Signalen (p53-spezifisch gefärbte Zellen) in Hepatocyten unterschieden werden. Im ersten Fall war die p53-Färbung auf das Cytoplasma der Zellen beschränkt, im zweiten Fall auf den Zellkern. Diese nukleären Signale befanden sich im Tumorgewebe bei den Tiernummern 8 und 9 und waren ungeordnet im gesamten Neoplasiebereich zu finden. Die cytoplasmatischen Signale waren meist sternförmig um Blutgefäße angeordnet, traten aber auch diffus im Gewebe verteilt auf. Ein Beispiel für eine als (+++) gewertete positive p53-Immunhistochemie mit cytoplasmatischen Signalen ist in Abb. 9 dargestellt.

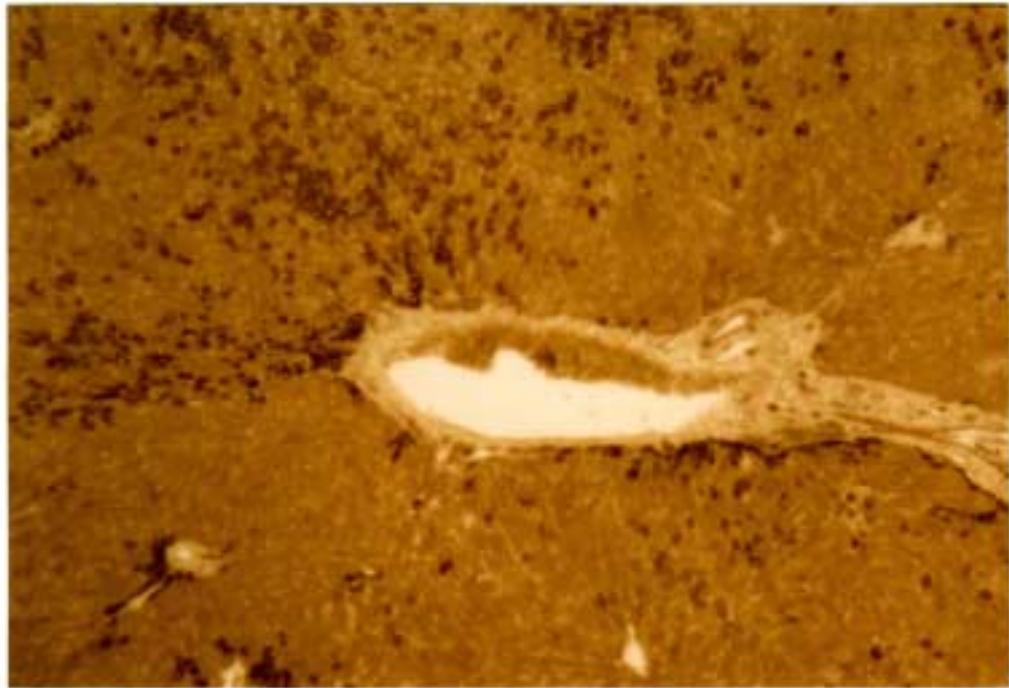


Abb.9 Darstellung einer p53-Immunhistochemie
 Dargestellt ist die mikroskopische Aufnahme eines p53-positiv gefärbten Paraffinschnittes (5µm) der Leber einer mit Tamoxifen behandelten Ratte (Tiernummer 4, 6 Monate Behandlung). Erkennbar sind sowohl sternförmig angeordnete (Bildmitte, um das Gefäß) als auch diffus verteilte (linke obere Bildecke) cytoplasmatische Signale.

Die Häufigkeit p53-spezifischer Signale nimmt von 3 bis zu 6 Monaten Behandlung mit Tamoxifen zu, sinkt bei 9 Monaten leicht ab und ist bis zu 12 Monaten Behandlung gleichbleibend. Drei Tiere der Kontrollgruppe wiesen keine Auffälligkeiten auf, während für Tiernummer 9 Neoplasie und p53-Signale in diesem Gewebe festzustellen waren.

Im Auftreten von p53-Signalen zeigte sich eine Abhängigkeit von der Behandlungsdauer. Bei den 6 Monate lang behandelten Tieren fand sich die größte Anzahl positiv gefärbter Zellen. Je ein Tier zeigte hierbei ca. 10-20 bzw. 20-50, 2 Tiere mehr als 50 angefärbte Zellen pro Leberschnitt. Die Tiere der 3-Monatsgruppe wiesen jeweils 10-20 Signale auf und auch in den 9 Monate behandelten Tieren nahm die Signalhäufigkeit im Verhältnis zu den 6 Monate behandelten ab: zwei Tiere zeigten ca. 20-50, eines 10-20 und eines 5-10 Signale pro Schnitt. In der Gruppe, die 12 Monate behandelt worden war gab es zwei Tiere mit 5-10 und ein Tier ohne cytoplasmatische Signale im Leberparenchym. Das vierte zeigte ca. 20-50 nukleäre Signale im Tumorgewebe. Diese nukleären Signale waren auch in einem Tier der Kontrollgruppe zu beobachten, während die Leberzellen der restlichen unbehandelten Ratten keine Färbung zeigten.

Die Immunhistochemie auf Gefrierschnitten aus Lebern Tamoxifen-behandelter Ratten wurde mit dem p53-spezifischen Antikörper CM 1 durchgeführt. Es wurden keine reproduzierbaren p53-positiven Signale gefunden.

Für die mit Ethidiumbromid (EtBr) und Bromdeoxyuridin (BrdU) behandelten Mäuse wurden 5 µm Paraffinschnitte der Lebern in immunhistochemische Untersuchungen mit den Antikörpern CM 1

und CM 5 eingesetzt. Hier konnten keine reproduzierbaren p53-positiven Signale detektiert werden.

Die immunhistochemisch behandelten, nicht eingedeckten Paraffinschnitte der Ratten aus der Tamoxifenstudie, wurden in die Mikrodisektion eingesetzt. Hierbei wurden Bereiche, die möglichst viele p53-Signale enthielten, mit einer sterilen Kanüle unter dem Mikroskop vom Objektträger gelöst und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach einer über-Nacht Inkubation mit Proteinase K (PK) wurde eine PCR mit dem gesamten Verdau als Template angeschlossen. PCR wurde durchgeführt für die Exons 5, 6+7 und 8+9. Die Bedingungen und die zu erwartenden Fragmentlängen können der folgenden Auflistung (Abb.10) entnommen werden.

<u>Gen</u>	<u>Tierart</u>	<u>Exon/Codon</u>	<u>Annealing</u>	<u>MgCl₂-Konzentration</u>	<u>Fragmentgröße</u>
p53	Ratte	E 5	59°C	1,5 mM	264 bp
		E 6+7	59°C	1,5 mM	294 bp
		E 8+9	57°C	1,5 mM	328 bp
		E 5-9	61°C	3,0 mM	1111 bp
		E 5 nested#	48°C	1,5 mM	211 bp
		E 6+7 nested#	69°C	2,5 mM	262 bp
		E 8+9 nested#	63°C	1,5 mM	270 bp
p53	Maus	E 5+6	64°C	4,0 mM	495 bp
		E 7+8	70°C**	2,5 mM	690 bp
H-ras	Ratte	C 12	60°C	1,5 mM	126 bp
		C 13	60°C	1,5 mM	124 bp
		C 61.1	55°C	1,5 mM	193 bp
		C 61.3	50°C	1,5 mM	191 bp
H-ras	Maus	C 12	60°C	1,5 mM	169 bp
		C 13	60°C	1,5 mM	167 bp
		C 61.1	57°C	1,5 mM	153 bp
		C 61.3	55°C	1,5 mM	151 bp

Abb. 10 Optimierte Bedingungen für die PCR der Gene p53 und H-ras bei Ratte und Maus

**Bei dieser hohen Annealingtemperatur wurde die PCR als two-step-PCR durchgeführt, d.h. die Separation von Annealing und Elongation entfiel.

Exon „X“ nested = Amplifikation eines Fragmentes aus Exon „X“ mit Primern, die innerhalb des original Fragmentes „X“ liegen

Entgegen Angaben in anderen Diplom- bzw. Doktorarbeiten war ich hierbei in der Lage, aus archiviertem Formalin-fixiertem, paraffiniertem und immunhistochemisch behandeltem Material mit einer Ausbeute von ca. 80% gegenüber den publizierten 10% (z.B. Helmes, 1997) PCR-Produkte zu amplifizieren. Die erhaltenen spezifischen PCR-Produkte wurden nach Aufreinigung dann entweder direkt oder nach Klonierung in die Sequenzierung eingesetzt. Die Sequenzierung direkt aus dem PCR-Produkt erbrachte keinen direkten Hinweis auf Mutationen, wobei ein nicht reproduzierbarer Hintergrund an unspezifischen Banden zu beobachten war. Diese Ergebnisse werden detailliert in Tabelle 5 dargestellt.

Tiernummer (Geschlecht)	Zeitraum der Behandlung/ Monate	Immun- histochemie	PCR			Sequenzierung von PCR-Produkten		
			E5	E6+7	E8+9	E5	E6+7	E8+9
1 (m)	12	negativ	+	+	+	n.d.	n.d.	n.d.
2 (m)	12	negativ	+	+	+	k.M.	k.M.	k.M.
3 (m)	6	positiv	+	+	+	k.M.	k.M.	k.M.
4 (m)	6	positiv	+	+	+	k.M.	k.M.	k.M.
5 (m)	9	positiv	+	+	+	k.M.	k.M.	k.M.
6 (m)	9	positiv	+	+	+	k.M.	k.M.	k.M.
7 (m)	12	positiv	+	+	+	k.M.	k.M.	k.M.
8 (m)	12	positiv	+	+	+	k.M.	k.M.	k.M.
9 (w)	12	positiv	+	+	+	k.M.	k.M.	k.M.
10 (w)	12	negativ	+	+	+	n.d.	n.d.	n.d.
11 (w)	3	positiv	+	+	+	k.M.	k.M.	k.M.
12 (w)	3	positiv	+	+	+	k.M.	k.M.	k.M.
13 (w)	6	positiv	+	+	+	k.M.	k.M.	k.M.
14 (w)	6	positiv	+	+	+	k.M.	k.M.	k.M.
15 (w)	9	positiv	+	+	+	k.M.	k.M.	k.M.
16 (w)	9	positiv	+	+	+	k.M.	k.M.	k.M.
17 (w)	12	negativ	+	+	+	k.M.	k.M.	k.M.
18 (w)	12	positiv	+	+	+	k.M.	k.M.	k.M.

Tab.5 Darstellung der Ergebnisse aus der Immunhistochemie auf Paraffinschnitten von Lebern Tamoxifen-behandelter Ratten mit anschließender Mikrodissektion, PCR und Sequenzierung

m = männlich; w = weiblich; + = PCR wurde erfolgreich durchgeführt; positiv / negativ = Signale in der Immunhistochemie vorhanden / nicht vorhanden; n.d. = nicht durchgeführt; k.M. = keine Mutation detektiert

In Erwägung gezogen wurde die Klonierung von PCR-Produkten und anschließende Sequenzierung der Klone, um diese Hintergrundbanden auszuschließen. Bei der Untersuchung genetisch inhomogenen Materials aus prä-neoplastischem Gewebe stellt sich hierbei die Problematik, daß bei der angenommenen geringen Anzahl mutierter DNA-Moleküle eine sehr große Menge an Klonen sequenziert werden müßte, um eine zuverlässige Aussage zu erhalten. Zudem hat in prä-Neoplasien noch keine Selektion auf bestimmte Mutationen stattgefunden, so daß verschieden mutierte Moleküle erwartet werden können. Exemplarisch wurden trotzdem Klonierungen von PCR-Produkten durchgeführt, die die Erwartungen durch das Auftreten eines unübersichtlichen und nicht reproduzierbaren Musters an Sequenzabweichungen vom p53-Wildtyp bestätigten.

Die Sensitivität der Sequenzierung in Hinsicht auf die Detektion einer Mutante vor einem Hintergrund an Wildtyp-Molekülen wurde sowohl für die Sequenzierung mit dem GATC 1500-System und der Direct Blotting Elektrophorese der Firma GATC GmbH als auch in einer Fremdfirma für die ABI-Prism Sequenziermaschine getestet. In beiden Fällen war die Mutation bei einer Verdünnung wt:mut von 10:1 nicht mehr vor dem allgemeinen Hintergrund zu detektieren. In Abb.11 ist die Sensitivitätsbestimmung für die ABI-Prism-Sequenzierung dargestellt.

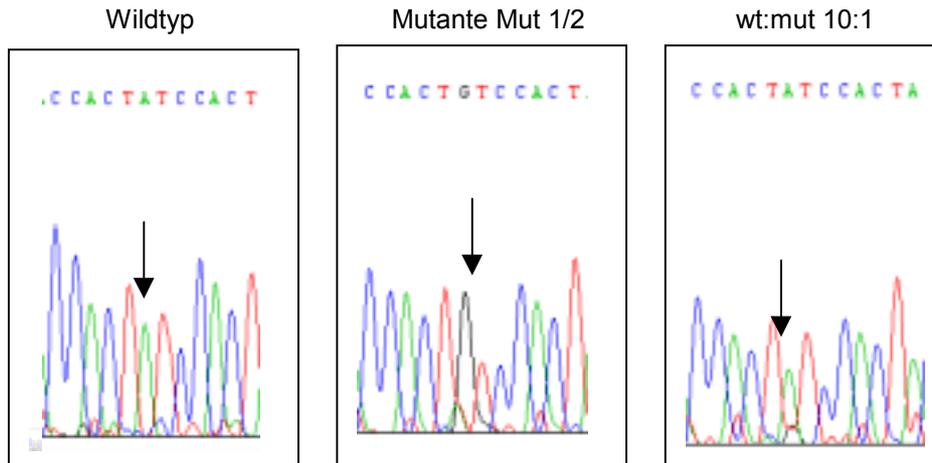


Abb.11 Darstellung der Sensitivität der Sequenzierung über eine ABI-Prism-Sequenziermaschine

Dargestellt sind die Sequenzreaktionen mit dem forward-Primer für p53 E6+7-wt, p53 E6+7-Mut1/2 und ein Mischungsverhältnis wt:mut von 10:1. Der Wildtyp und die Mutante sind eindeutig zu charakterisieren, in dem Mischungsverhältnis ist der Peak für die Mutante (G) vor dem Hintergrund an unspezifischen Peaks nicht zu detektieren.

Die Sensitivität der Sequenzierung ist demnach limitierend für die genaue Charakterisierung eines mutanten Moleküles in einem Gemisch mit Wildtyp-Molekülen. Es wurde daher nach einer anderen Methode zur Anreicherung oder zur Detektion mutanter p53-DNA vor einem hohen Hintergrund an wt p53-DNA gesucht. Zur Etablierung dieser Methoden und zur Überprüfung ihrer Sensitivität wurden Klone mit mutanter und wildtyp p53-DNA konstruiert.

3.1.2 Kontrollmutanten zur Bestimmung der Sensitivität verschiedener Mutations-Detektions-Systeme

Mit dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene wurden die Mutanten Mut 1/2, Mut 3/4 und Mut 5/6 hergestellt (siehe auch Tab.6). Eine Kontrolle mit einer größeren Deletion, genannt del 12, wurde über ungerichtete Mutagenese konstruiert. Die wt-Kontrolle wurde über Sequenzierung von p53-Klonen mit dem Insert p53 E5-9 verifiziert und als Template für die Bildung der Mutanten genutzt (wt-Sequenz aus Hulla et al., 1993, Datenbank EM_RO). Die Mutanten weisen folgende Sequenzunterschiede zum Wildtyp auf: del 12 hat eine 12 bp Deletion der Basen 5'-CACAGGCCCAGC-3' zwischen den Positionen 596-607 im 1111bp Fragment p53 E5-9 sowie einen Basenaustausch von T→C an Position 468 und einen von A→G an Position 620; Mut 1/2 ist durch einen Austausch von A→G an Position 425 charakterisiert, Mut 3/4 durch eine Transition von C→T an Position 1040 und Mut 5/6 durch einen Wechsel von A→T an Position 289. Die gewünschten Sequenzen der Kontrollen wurden über Sequenzierung bestätigt.

Kontrolle	Mutation		Position in p53/Exon 5-9 (1111 bp)	
Mut 1/2	5'-ACT <u>G</u> TC-3'	A->G	425 bp	Exon 6+7
Mut 3/4	5'-GCA <u>T</u> TG-3'	C->T	1040 bp	Exon 8+9
Mut 5/6	5'-CTT <u>T</u> GG-3'	A->T	289 bp	Intron 5
del 12	5'-CACAGGCCCAGC-3'	deletiert	596-607 bp	Intron 7

Tab.6 Mutante Kontrollen zur Sensitivitätstestung von Mutations-Detektions-Systemen

Aus den Klonen wurden die gewünschten Exonbereiche mit den entsprechenden PCR-Programmen (s.o.) und dem Expand HF PCR-System von Roche mittels PCR amplifiziert. Die Konzentration der erhaltenen Fragmente wurde über Fluorometrie gemessen.

3.1.3 Die Temperatur-Gradienten-Gelelektrophorese (TGGE) ist aufgrund ihrer zu geringen Sensitivität zur Detektion seltener Mutationen nicht geeignet

Eine schnelle und sensitive Methode zur Erkennung von Sequenzvariationen in einzelnen und mehreren Basenpaaren von DNA-Fragmenten, die schon über längere Zeiträume genutzt wird, ist die TGGE (Rosenbaum und Riesner, 1987; Wulfert, 2001). Zunutze macht sich dieses Verfahren das unterschiedliche Schmelzverhalten gleich langer Nukleinsäuremoleküle mit Sequenzunterschieden bis zu Veränderungen in einem Basenpaar und den Effekt von partieller Denaturierung auf das Migrationsverhalten im denaturierenden PAA-Gel (Wartell et al., 1998).

In dieser Arbeit wurde die Sensitivität der TGGE zur Detektion mutanter DNA-Fragmente gegenüber einem Hintergrund an wt-Molekülen bestimmt, die in der Literatur nicht beschrieben wird, da fast ausschließlich Untersuchungen mit Hilfe der TGGE an Tumorgewebe oder Material klonalen Ursprungs veröffentlicht werden. Dabei wurden mittels perpendikularer TGGE die Bedingungen für die parallele TGGE etabliert. Hierbei wird eine DNA-Probe in eine über die gesamte Breite eines horizontalen Geles führende Tasche gegeben und senkrecht zur Laufrichtung der Probe ein beliebiger Temperaturgradient zwischen 10°C und 80°C angelegt (siehe Abb.12). Entsprechend zur unterschiedlichen Temperatur über die Breite des Gels wurden Teile der Probe gar nicht, teilweise oder vollständig denaturiert und liefen dementsprechend unterschiedlich schnell. Der Verlauf der resultierenden sigmoiden Kurve erlaubte dann Aufschluß über den Schmelzpunkt (T_m) der DNA, der auf Höhe des Wendepunktes der Kurve liegt.

Setzt man in die TGGE eine PCR-Probe mit einem wt/mut-Gemisch mit sowohl wt-Homoduplices, mut-Homoduplices als auch wt/mut-Heteroduplices ein, so erhält man im Bereich der Schmelztemperatur eine Auffächerung der Kurve in vier verschiedene Kurven (siehe Abb.13).

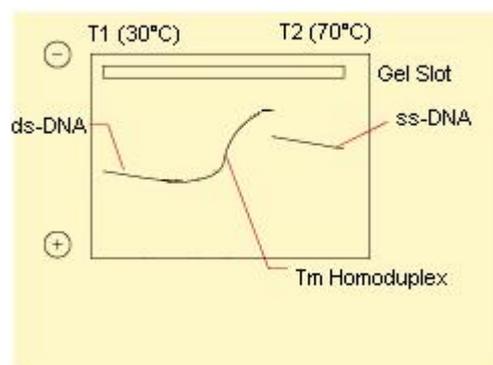


Abb.12 Schema der perpendikularen TGGE (nach Wulfert, 2001): Erläuterung siehe Text

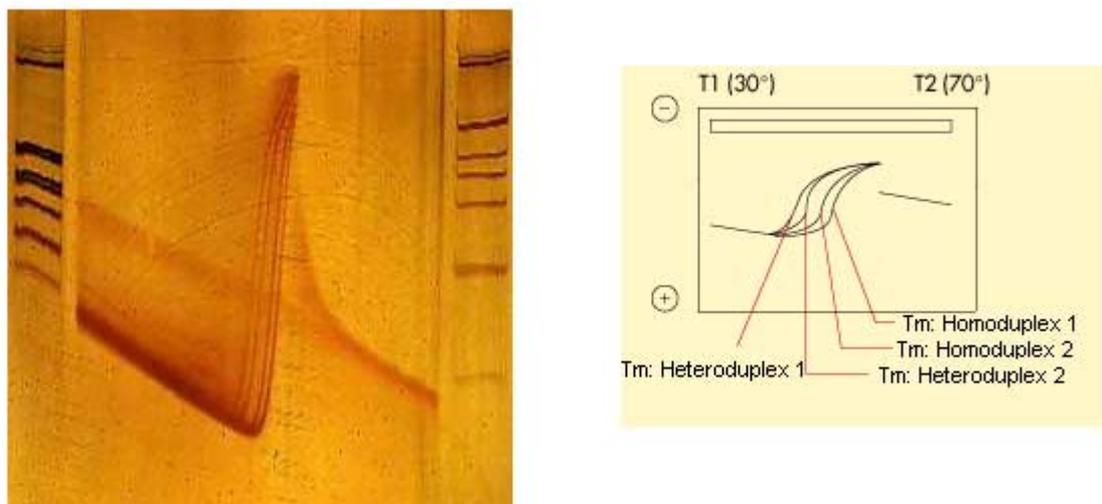


Abb.13 links: originale perpendikuläre TGGE mit einem wt/mut-DNA-Gemisch; rechts: das entsprechende Schema (nach Wulfert, 2001)

Heteroduplices haben aufgrund mindestens eines ungepaarten Basenpaares einen niedrigeren Schmelzpunkt als Homoduplices, ihre Kurven steigen deshalb eher an. In der perpendikulären TGGE konnten für E5, E6+7 und E8+9 des p53-Gens der Ratte die in Tabelle 7 angegebenen Schmelzpunkte und Laufbedingungen ermittelt werden.

Die perpendikuläre TGGE dient zur Etablierung der eigentlichen, parallelen TGGE, bei der der Temperaturgradient parallel zur Laufrichtung angelegt wird. Es können mehrere Proben nebeneinander augetragen werden. Man lässt die Elektrophorese so lange laufen, bis die zu trennenden Proben sich in dem Temperaturbereich befinden, in dem die Auffächerung in der perpendikulären TGGE stattgefunden hat. Den entsprechenden Temperaturbereich kann man über einfaches Abmessen ermitteln, da die Temperaturzunahme linear über den Gradienten erfolgt (Rosenbaum und Riesner, 1987). Finden sich nach Färbung des Geles nur Einzelbanden im Gel, liegt reine wt-DNA in der Probe vor, sieht man mehrere Banden, so hat man auch mutante Moleküle in der aufgetragenen DNA.

Exon	Temperaturgradient	Laufdauer	Schmelzpunkt
E5-GC	30°C < 70°C	4 h	54°C
E6+7-GC	30°C < 65°C	4 h	55°C
E8+9-GC	40°C < 65°C	3½ h	52°C

Tab.7 Ermittelte Bedingungen für die TGGE
GC = GC-Klammer am 5'-Ende eines Primers (E5F / E6+7F / E8+9R)

Um den Temperaturbereich, in dem eine gute Bandenaufftrennung erfolgt, zu vergrößern, wurde mittels PCR ein 40-mer großer G und C-reicher Bereich, eine sogenannte GC-Klammer, an ein Ende des PCR-Produktes angebracht. Dies ermöglicht die Erkennung von Mutationen, die im zuerst aufgeschmolzenen Bereich des Fragmentes vorkommen, durch Stabilisierung des Moleküles während der Hitzedenaturierung im Gel (Myers et al., 1985a; Sheffield et al, 1989). Es

kommt erst bei höheren Temperaturen zur völligen Separation der beiden DNA-Stränge, und so können auch Mutationen, die am Strang-Ende liegen, detektiert werden. Die Sensitivität der Methode in Hinsicht auf Vollständigkeit der erkannten DNA-Alterationen kann hiermit laut Literaturangaben von ca. 40% auf fast 100% angehoben werden (Sheffield et al., 1989; Wu et al., 1998; Myers et al., 1985 a und b; Fisher und Lerman, 1983).

In der parallelen TGGE zur Sensitivitätsbestimmung wurden PCR-Produkte der Exons E6+7 und E8+9 in Mischungsverhältnisse aus p53 wt-DNA und den entsprechenden Mutanten von 1:1, 10:1, 25:1, 50:1, 75:1, 100:1 und 1000:1 eingesetzt. Die ermittelten PCR-Bedingungen waren 57°C/1,5 mM MgCl₂ für E8+9 sowie 57°C/1,0 mM MgCl₂ für E6+7. Die parallelen TGGEs wurden mit den in Tab.7 angegebenen Bedingungen durchgeführt. Reine wt-DNA sollte hierbei eine einzelne, ein Gemisch aus wt- und mut-DNA aufgrund je zwei unterschiedlicher Homo- und Heteroduplices vier verschiedene Banden im denaturierenden PAA-Gel zeigen. Die in dieser Arbeit ermittelte Sensitivität zur Detektion der im Unterschluß vorliegenden Mutanten liegt je nach eingesetzter Kontrolle bei ca. 10% bis 5%.

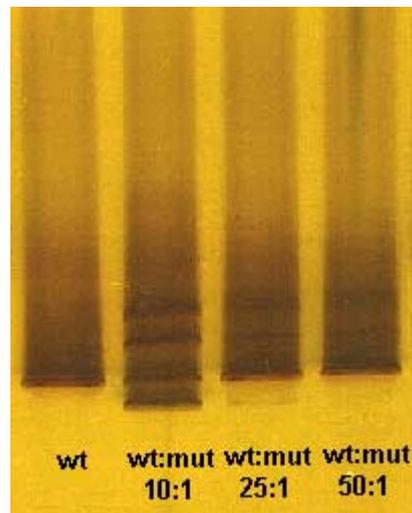


Abb.14 exemplarische Darstellung des Ergebnisses der Sensitivitätsbestimmung für die TGGE anhand p53 Exon 6+7-GC (GC = eingesetztes PCR-Produkt besitzt eine GC-Klammer); mut = Mut 1/2

Bei einer Verdünnung von > 25:1 (wt:mut) ist für Mut 1/2, wie in Abb.14 dargestellt, keine eindeutige Aussage mehr möglich. Hier liegen nur bei dem Verdünnungsverhältnis 10:1 und 25:1 (wt:mut) vier, ansonsten eine Bande vor. Bei einer Verdünnung von > 25:1 ist die Mutante nicht mehr eindeutig zu detektieren, während andere mutante Kontrollen nur mit geringerer Sensitivität oder gar nicht identifiziert werden konnten. Diese Sensitivität ist nicht ausreichend für die in dieser Arbeit angestrebten Untersuchungen und Aussagen. Analoge Ergebnisse ergaben sich für die Sensitivität einer SSCP (single strand conformation polymorphism), wobei die Ergebnisse der Sensitivitätsbestimmung hier nicht dargestellt sind.

3.1.4 Der „Cleavase Fragment Längenpolymorphismus“ (CFLP) ist aufgrund schlechter Reproduzierbarkeit zur Mutations-Detektion ungeeignet

Der CFLP wird dargestellt als schnelle, akkurate und hochsensitive Methode für die Detektion von unbekanntem Mutationen in Nukleinsäuremolekülen mit bis zu 1000 bp Länge (Brow et al., 1996; Sreevatsan et al., 1998a und b; Oldenburg und Siebert, 2000). Er beruht auf der Fähigkeit des Enzymes Cleavase I, das als „hair pins“ bezeichnete Sekundärstrukturen in der DNA erkennt und vor diesen schneidet. Hierzu wird doppelsträngige DNA aus einer PCR denaturiert und wieder abgekühlt. Bei der Abkühlung auf eine für das untersuchte Fragment spezifische Temperatur um 45°C-55°C bildet sich in den Einzelsträngen sequenzabhängig eine Sekundärstruktur aus, die den Wildtyp von der Mutante unterscheidet. Nach Behandlung durch die Cleavase I kann auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel eine Auftrennung der resultierenden Banden erfolgen. Unterschiede im Bandenmuster, das so für jede untersuchte Probe entsteht, weisen auf Mutationen hin (Third Wave Technologies, 2000). Auch hierbei wurde die Etablierung und die Bestimmung der Sensitivität anhand von wt/mut-Gemischen (1:1, 10:1, 25:1 und 100:1) der p53-Exons 5, 6+7 und 8+9 durchgeführt. Experimentell wurde eine Inkubation bei 55°C für 2 min. als optimal ermittelt und für die Versuche eingesetzt. Die ermittelten Reaktionsbedingungen sahen folgendermaßen aus:

Denaturierung	95°C	30 sec.
Abkühlen	55°C	1 min.
Zugabe des CFLP-Mixes	55°C	
Inkubation	55°C	2 min.
Reaktionsstop	55°C	
Aufbewahrung zur Auswertung	4°C	

Eine eindeutige Aussage über Bandenverschiebungen im Vergleich von Proben, die mutante DNA enthalten, zu reinen wt-Proben kann für die Mutante del 12 gemacht werden. Bei einer stärkeren Verdünnung als 10:1 ist aber keine eindeutige Aussage mehr möglich. Die anderen Mutanten (Basenaustauschmutanten) konnten gar nicht detektiert werden. Auch erwies sich das System als nicht stabil und schlecht reproduzierbar, da es nicht immer die gleichen Bandenmuster für die gleichen Proben erbrachte. Damit erwies sich der CFLP als nicht adäquat für diese Arbeit. Die hier beschriebene unzureichende Sensitivität wurde auch von anderen Laboratorien beobachtet, weswegen die Firmen Roche und GIBCO ihre CFLP-Scanning-Kits nach einiger Zeit vom Markt nahmen (persönliche Kommunikation mit den Firmen).

3.1.5 Die Effizienz des „Restriction Site Mutation Assay“ (RSM) bei der Anreicherung mutanter DNA-Moleküle ist ungenügend

Als eine weitere Möglichkeit, Mutanten in einem Überschuß an wt-Molekülen zu detektieren, wird in der Literatur die Anreicherung der veränderten DNA durch Entfernung des Wildtyps beschrieben. Der RSM ist so eine Methode, mit der seltene Mutationen in prä-karzinogenen Zellen in einer Umgebung von wt-Gewebe detektiert werden können (Parry et al., 1990; Jenkins et al., 1999). Das System beruht darauf, daß Restriktionsenzyme spezifische Sequenzen auf einem Nukleinsäuremolekül erkennen, daran binden und die DNA schneiden. Liegt nur eine Base in der Erkennungssequenz verändert vor, so bleibt die DNA unverdaut. In wt/mut-DNA-Gemischen werden nur die wt-Moleküle verdaut, wobei man bei einer Endonuklease-Aktivität <100% ein Gemisch aus wt und Mutante erhält, bei dem das Verhältnis zu Gunsten der Mutanten verschoben ist. Es folgt eine PCR-Reaktion für den betrachteten Bereich. Beide Reaktion können wiederholt werden, bis die gewünschte Anreicherung erreicht ist (Abb.15).

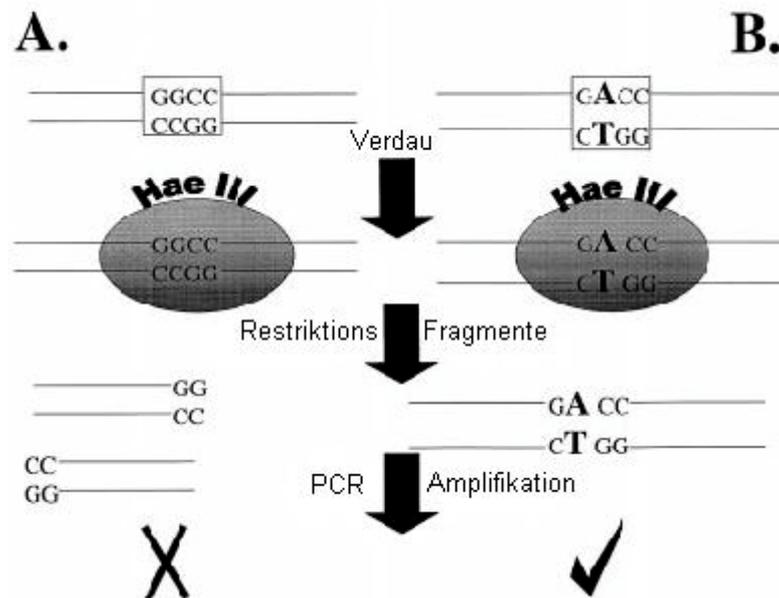


Abb.15 Die Hintergründe des RSM-Assays: A) wt-Sequenz wird spezifisch von der Restriktionsendonuklease erkannt, gebunden und geschnitten und steht nicht mehr zur PCR zur Verfügung B) mutierte DNA wird nicht erkannt, bleibt ungeschnitten und somit weiterhin Template für die PCR (nach Jenkins et al., 1999)

Zur Etablierung der Methode wurden Kontrollen konstruiert, die nicht p53 sondern Gene der ras-Familie zur Grundlage hatten. Bei H-ras und K-ras sind die Codons 12, 13 (Exon1) sowie Codon 61 (Exon 2) als „hot spots“ auftretender Mutationen bekannt (Watzinger et al., 1997). Es wurden deshalb über PCR mit mutanten 5'-Primern Fragmente amplifiziert, bei denen entweder in Codon 12 oder 13 je eine Abweichung von der wt-DNA induziert wurde (siehe Mitchell und Warshawski, 1999). Die Primer wurden hierbei so gewählt, das jeweils eine Punktmutation in Codon 12 bzw. 13 eingeführt wurde, so daß die im Wildtyp vorhandene Erkennungssequenzen für die Endonukleasen BstN I bzw. Bgl I verändert wurden. Die Sequenz der Mutanten wurde über Sequenzierung

bestätigt. Aus wt-Fragmenten sowie den konstruierten Mutanten wurden Mischungsverhältnisse von 10:1, 100:1 und 1000:1 (wt:mut) hergestellt. Diese wurden, genauso wie reine Wildtyp- und reine mutante DNA, zweimal einer PCR unterzogen und zwischen 1. und 2. sowie nach der 2. PCR in einen Verdau mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease eingesetzt. Die jeweiligen Ergebnisse der PCRs und der Verdau wurden auf 1%igen Agarosegelen überprüft. Nach den PCRs wurde nur mit Proben weiter gearbeitet, die Banden korrekter Positionierung im Gel erbracht hatten, nach den Verdau-Ansätzen nur mit nachweislich geschnittenen Fragmenten. Die schnittresistente mutante DNA war hierbei im Agarosegel nicht mehr detektierbar. Nach dem 2. Verdau wurden die Proben zur Verifizierung sequenziert. Dies erbrachte in allen Fällen reine wt-Sequenz, die nach der Schnittstelle der Restriktionsendonuklease schwächer wurde. Die Mutanten waren gegenüber dem wt-Hintergrund nicht erkennbar. Diese Methode führte somit nicht zu einer signifikanten Anreicherung der mutanten DNA-Fragmente und erwies sich ebenfalls als ungeeignet zur Anwendung in dieser Arbeit.

3.1.6 Das MutS Bindungsexperiment führt nicht zu der gewünschten Anhebung des Anteils an mutanten Molekülen in einem DNA-Gemisch

Die Integrität des Genoms ist Abhängig von der Fähigkeit des Organismus, auftretende DNA-Schäden zu korrigieren. Dies geschieht z.B. bei E.coli durch das MutHLS System, bei dem ungepaarte Basen erkannt und korrigiert werden (Lahue et al., 1989). Die Reparatur wird dabei durch die Bindung des dimeren MutS an ein ungepaartes Basenpaar initiiert (Su et al., 1986). In vitro ist das aufgereinigte MutS-Protein in der Lage, alle acht möglichen Basen-Paar-„Mismatches“ zu binden (Su et al., 1988; Babic et al., 1996). Diese Fähigkeit wird genutzt, um in verschiedenen Versuchen Mutationen zu detektieren (Lishanski et al., 1994; Wagner et al., 1995; Parsons et al., 1997; Bellanne-Chantelot, 1997). Im vorliegenden Fall sollte immobilisiertes MutS selektiv Heteroduplices, die nach PCR von wt/mut-Gemischen mit anschließender De- und Renaturierung entstanden waren, binden, ungebundene Homoduplices entfernt werden und eine anschließende PCR die verbliebenen Fragmente amplifizieren (nach Jolly et al., 1997).

Zur Etablierung dieses Experimentes wurden die oben beschriebenen p53-Kontrollen wt, Mut 1/2, Mut 3/4 und del 12 eingesetzt, wobei letztere durch die 12bp Deletion in einer großen Fehlpaarung resultieren sollte. Es wurden Etablierungsversuche mit unterschiedlichen Membranen und verschiedenen Blockierungs-Reagenzien durchgeführt, nach denen die Membran nicht zerschnitten und die DNA abgelöst sondern kolorimetrisch gefärbt wurde. Es wurden alle Kombinationsmöglichkeiten der Membranen BA 83, BA 84, NA 45, NY 12 N, NY 13 N (alle von Schleicher&Schuell) sowie der Immobilon P Transfer Membran (Millipore) mit den Blockadereagenzien 3% BSA, 10% BSA, 10% (w/v) „blocking reagent“ (pH ca. 6,0; Roche), Denhardt-Lösung (Current Protocols in Molecular Biology, 1995), Denhardt-Lösung (Ibelgauffs H., 1993) und PolydIdC getestet. Zusätzlich wurde zwischen der Bindung von Heteroduplices an bereits gebundenes MutS sowie an MutS in Lösung mit späterer Membranbindung variiert.

Am effektivsten erwies sich die Kombination der Nitrocellulose-Membran NA 45 (Schleicher&Schuell) mit der Blockade durch „blocking reagent“ (Roche), wobei aber die Bindung von Homoduplex-DNA an MutS und Membran auch hier nicht ganz ausgeschlossen werden konnte. Alle weiteren Versuche wurden mit diesen Materialien durchgeführt. Aus den Kontrollen wurden Mischungsverhältnisse wt:mut von 1:1, 10:1 und 100:1 angefertigt und nach De- und Renaturierung in das Experiment eingesetzt. Um sicherzustellen, daß MutS wirklich zum Großteil Heteroduplex-DNA bindet, wurde eine Systemkontrolle aus reiner wt-DNA eingesetzt. In der anschließenden PCR konnte für alle Proben ein Produkt amplifiziert werden, wobei die DNA-Konzentrationen der PCR-Produkte in allen Ansätzen vergleichbar war.

Auch mit dieser Methode ließ sich keine Anreicherung der mutanten DNA erreichen. Wie mit den Kontrollen gezeigt werden konnte, wird Homoduplex-DNA in den aufgezählten Versuchen genauso gut gebunden wie Heteroduplexes, was eine ausreichende Entfernung der wt-DNA ausschließt (Abb.16/Bande 5). Zudem wird DNA auch von der Membran gebunden, wenn kein MutS immobilisiert wurde (Abb.16/Bande 1). Auf eine geplante Verifizierung der Mutante durch Sequenzierung wurde daher hier verzichtet.

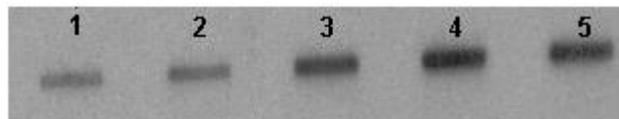


Abb.16 Darstellung des Ergebnisses eines MutS-Bindungsexperiments (Membran NA 45, Blockade durch „blocking reagent“; kolorimetrische Färbung)

Die Ansätze 2-5 wurden mit immobilisiertem MutS durchgeführt. In den Ansätzen 1-4 wurden jeweils Mischungsverhältnisse zwischen Wildtyp und mutanter DNA von 1:1 eingesetzt (Heteroduplexes).

1 = wt:Mut 1/2; Ansatz ohne immobilisiertes MutS; 2 = wt:del 12; 3 = wt:Mut 3/4; 4 = wt:Mut 1/2; 5 = reine wt-DNA (Homoduplexes)

3.1.7 Der bidirektionale didesoxy-Fingerprint (biddF) ist unter den getesteten Systemen die effizienteste Methode zur Detektion seltener Mutationen

Der biddF zugrunde liegt der didesoxy-Fingerprint (ddF), eine als die möglicherweise effektivste Screening-Technologie bekannte Methode, die eine Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al., 1977) mit einer SSCP („single strand conformation polymorphism“, Orita et al., 1989a und b) verbindet (Shevchenko et al., 2000; Sarkar et al., 1992). In einer Sequenzreaktion mit einem ddNTP werden Abbruchfragmente kreiert, die in einer nativen PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Qualitative und quantitative Veränderungen zum Bandenmuster des Wildtyps implizieren Mutationen in der untersuchten DNA. Bei der biddF werden abweichend von der Sequenzierung zwei biotinylierte Primer in die Reaktion eingesetzt, so daß beide Stränge eines Templates parallel analysiert werden können (Shevchenko et al., 2000; Liu et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde die biddF kombiniert mit dem denaturierenden Fingerprint (dnF; Liu et al., 1998), indem die mit zwei Primern und einem Stopp-Nukleotid durchgeführte Reaktion auf einem denaturierenden

PAA-Gel aufgetrennt wurde. Da hierbei die Möglichkeit verloren geht, durch Sekundärstrukturen verursachte Änderungen im Laufverhalten der DNA zu detektieren, können nicht alle Mutationen über einen Ansatz mit einem einzigen Stopp-Nukleotid detektiert werden. Deshalb wurde jede Reaktion doppelt (mit ddATP und ddCTP oder ddTTP und ddGTP) durchgeführt um sicherzustellen, daß jede Basenveränderung erkannt wurde. Als Beispiel sei hier aufgeführt die Kontrolle Mut 5/6, die eine Transition A→T vom wt unterscheidet. Mit den Abbruch-Nukleotiden ddCTP oder ddGTP kann diese Mutante nicht detektiert werden. Wird ein zusätzlicher Ansatz mit ddTTP oder ddATP durchgeführt, so wird auch diese Mutante erkennbar.

Da über die Sensitivität der Methode zur Detektion mutanter DNA vor einem hohen Hintergrund an Wildtyp-DNA keine veröffentlichten Angaben bekannt sind, wurden für die vorliegende Arbeit diese Methode modifiziert und mit Hilfe der oben aufgeführten p53-Kontrollen wt, Mut 1/2, Mut 3/4, Mut 5/6 und del 12 etabliert und optimiert. Dazu wurden über PCR mit markierten Primern folgende biotinylierte Fragmente aus p53 E5-9 synthetisiert: für Mut 1/2 Exon 6+7; für Mut 3/4 Exon 8+9; für Mut 5/6 Exon 5-7; für del 12 Exon 6-9 und für den Wildtyp die Exons 5, 6+7, 8+9, 5-7 und 6-9. Es wurden Mischungsverhältnisse wt:mut 1:1, 10:1, 100:1 und 1000:1 hergestellt und in die biddF eingesetzt.

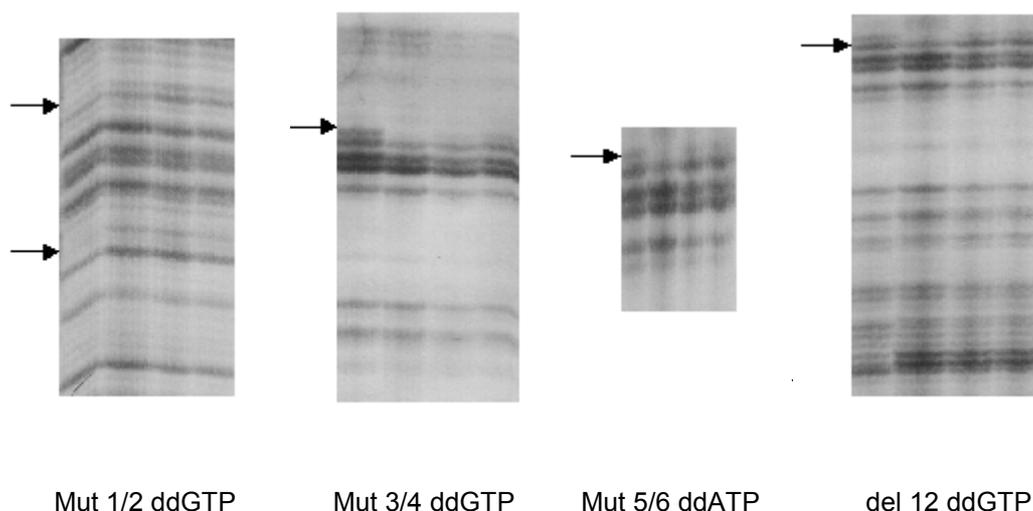


Abb.17 Beispielhafte Darstellung der Ergebnisse aus der biddF für die Kontrollmutanten. Dargestellt sind für jede Kontrolle vier Spuren einer PAA-Gelelektrophorese, ausgewertet über kolorimetrische Detektion. Aufgetragen wurden je (von links nach rechts): reine wt-DNA des entsprechenden Exons (siehe Text) sowie die Mischungsverhältnisse wt:mut 1:1, 10:1 und 100:1. → = Positionen mit Veränderungen im Bandenmuster zwischen wt und mut

Durch Veränderungen im Bandenmuster konnten alle Mutanten reproduzierbar über die biddF identifiziert werden. Mut 5/6 mit einem Austausch A→T im codierenden Strang konnte wie erwartet nur in der biddF mit ddATP oder ddTTP identifiziert werden, alle anderen Kontrollen waren bei Einsatz jeden ddNTPs erkennbar (siehe Abb.17). Die Darstellung der Mutante vor einem Hintergrund an wt-DNA ist bis zu einem Mischungsverhältnis von 100:1 eindeutig möglich.

Da diese Methode sowohl sensitiver als auch zuverlässiger in ihrer Reproduzierbarkeit war als die anderen getesteten (siehe Abb.18), wurde sie ausgewählt, um in dieser Arbeit nach Mutationen in p53 zu suchen.

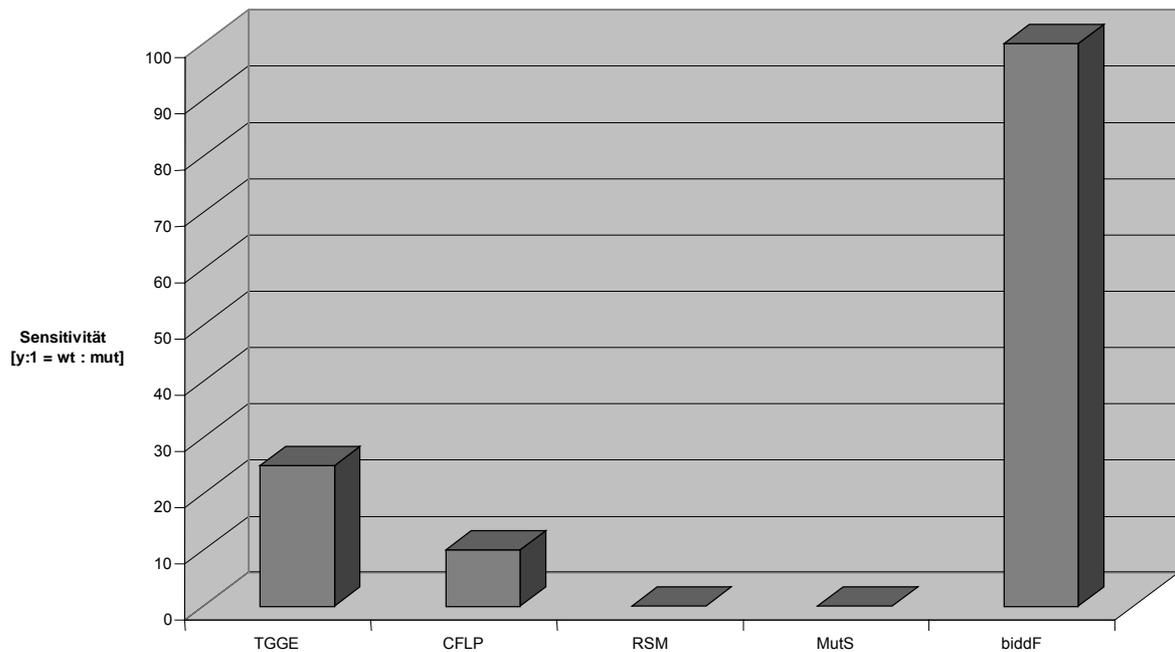


Abb.18 Darstellung der reproduzierbar ermittelten Sensitivitäten der getesteten Mutations-Detektions-Systeme

wt = Anzahl von Wildtyp-Molekülen; mut = Anzahl von mutanten Molekülen; y = Werte der y-Achse; die Sensitivität einer Methode wurde hierbei definiert durch ihre Fähigkeit, ein DNA-Molekül mit mutanter Sequenz vor einem Hintergrund von Wildtyp-Molekülen zu detektieren.

3.2 Detektion von Mutationen im p53 Exon 5-9 nach Tamoxifen-Exposition in der Ratte

Es wurden verschiedene Versuchsansätze durchgeführt: So wurden PCR-Produkte aus formalinfixierten, paraffinierten und immunhistochemisch gefärbten Leberzellen in die biddF eingesetzt. Hierbei wurden die Exons 5, 6+7 und 8+9 mit den sogenannten „nested“-Primern (siehe Kapitel „Material und Methoden“) amplifiziert (Bedingungen siehe Abb.10). Zum anderen wurde DNA aus Teilen schockgefrorener Lebern isoliert, ohne Anreicherung p53 immunhistochemisch positiver Zellen p53-Exon 5-9 per PCR synthetisiert und in der biddF untersucht. Hier wurden die Primer der Exons 5, 6+7 und 8+9 in getrennten biddF-Ansätzen eingesetzt. Die Ergebnisse werden im Folgenden tabellarisch dargestellt (siehe Tab.8). Für alle Ergebnisse wird die über die Kontrollen ermittelte Sensitivität von 100:1 (wt:mut) zugrunde gelegt, d.h. es war mindestens möglich, ein mutantes Allel neben 99 Wildtyp-Allelen zu detektieren.

Tier- nummer	Behand- lung/ Monate	bi-ddF						
		Paraffin			Gefrier			
		E5	E6+7	E8+9	E5	E6+7	E8+9	
1*	(m)	12	+	+	+	+	+	+
2*	(m)	12	+	+	+	+	+	+
3	(m)	6	+	+	+	+	+	+
4	(m)	6	+	+	+	(j)	+	+
5	(m)	9	+	+	+	+	+	+
6	(m)	9	+	(j)	+	+	(j)	+
7	(m)	12	+	(j)	+	+	(j)	+
8	(m)	12	+	(j)	+	(j)	+	+
8T	(m)	12				+	+	+
9*	(w)	12	+	+	+	+	+	+
10*	(w)	12	+	+	+	+	+	+
11	(w)	3	+	+	+	(j)	+	+
12	(w)	3	+	+	+	(j)	+	+
13	(w)	6	+	+	(j)	+		
14	(w)	6	+	+	+	(j)	+	(j)
15	(w)	9	+	+	+	(j)	+	+
16	(w)	9	+	+	+	+	+	+
17	(w)	12	+	(j)	+	+	+	+
18	(w)	12	+	(j)	+	+	+	+
18T	(w)	12				+	+	+

Tab.8 Darstellung der Ergebnisse der Studie mit Verabreichung von Tamoxifen an Ratten aus der biddF mit aus Lebern gewonnenen Proben

(m) = männlich; (w) = weiblich; T = DNA für die PCR direkt aus Tumormaterial gewonnen; * = Tiere der Kontrollgruppen; Paraffin = biddF auf PCR-Produkten aus fixierten, immunhistochemisch angefärbten Zellen, die aus Leberschnitten isoliert worden waren; Gefrier = biddF auf PCR-Produkten aus gefrorenem Lebergewebe, bei dem keine Selektion auf p53-Veränderungen stattgefunden hatte; + = biddF wurde durchgeführt; (j) = in der biddF wurden im Bandenmuster Unterschiede zum Wildtyp detektiert; alle dargestellten Ergebnisse wurden mindestens einmal reproduziert.

In den vom Paraffinschnitt durch Mikrodissektion entnommenen Zellen mit immunhistochemisch detektiertem p53 wurde für Exon 5 in 5 von 18 Tieren Veränderungen im Bandenmuster der biddF detektiert, was eine Mutation in 31% der Tiere im entsprechenden Bereich des p53-Genes impliziert. In Exon 6+7 fanden sich nur in 2 von 18 Fällen (=11%) Veränderungen. In Exon 8+9 sind in 44% der zu untersuchenden Tiere (8 von 18) Veränderungen aufgetreten. Tiernummer 6 und 7 wiesen dabei sowohl im Exon 5 als auch in Exon 8+9 Veränderungen auf (siehe auch Tab.8/10). Zwei der Proben wurden nicht untersucht, da für reines Tumorgewebe (TN 8T und 18T) keine Paraffinschnitte vorlagen. Alle dargestellten Ergebnisse wurden mindestens einmal reproduziert und waren jedesmal darstellbar. Durch die Auswahl von Zellen mit erhöhten, in der Immunhistochemie nachweisbaren p53-Konzentrationen durch Mikrodissektion, ist in diesem Versuch der Anteil an mutierten p53-Allelen im Vergleich zum Gesamtgewebe angehoben worden. Direkt im schockgefrorenen Lebergewebe, bei dem keine Anreicherung eventueller Mutationen durch Mikrodissektion vorgenommen worden war, konnten für Exon 5 16% Mutationen (3 von 19 Fällen) detektiert werden. In Exon 6+7 lagen keine, in Exon 8+9 26% (5 von 19 Fällen) Veränderungen vor (siehe Tab.8/10). Hier wurde nur Tiernummer 13 aufgrund von fehlendem tiefgefrorenem Zellmaterial nicht untersucht.

Übereinstimmungen zwischen den Ergebnissen aus paraffin-fixierten, angereicherten bzw. gefrorenen, nicht angereicherten Proben fanden sich für die Veränderungen in Exon 5 für Tiernummer 6 und 7 und für Tiernummer 4 in Exon 8+9.

Im Anschluß wurden die biddF positiven Proben (d.h. die Proben mit verändertem Bandenmuster) sowie exemplarisch einige in der biddF negativen Proben einer Sequenzierung unterzogen. Es waren hierbei keine Veränderungen in der Basenabfolge des p53-Genes zu erkennen, d.h. alle untersuchten Proben wiesen die Wildtyp-Sequenz auf.

Wie eigene Sequenzierungen und solche durch Auftragsinstitute zeigten, ist ein Anteil einer Mutation von kleiner als 20% nicht mehr detektierbar (siehe Abb.11). In den untersuchten Proben liegt der Anteil an mutierter DNA gegenüber wt-DNA augenscheinlich unter 20%, so daß er nicht mehr über die Sequenzierung nachweisbar ist. Dies unterstreicht die Sensitivität der biddF für die Mutationsdetektion vor einem starken Hintergrund von Wildtyp-DNA.

3.3 Detektion von Mutationen im p53 Exon 5-8 nach Bromdeoxyuridin- bzw. Ethidiumbromid-Exposition in der Maus

Da die Immunhistochemie in diesen Studien keine Zellen mit akkumuliertem p53 erkennen ließ, konnte keine Anreicherung von potentiell mutierter p53-DNA durch Immunhistochemie und anschließender Mikrodissektion erreicht werden. Die biddF erfolgte daher mit PCR-Produkten für Exon 5+6 und Exon 7+8 aus DNA, die aus gefrorenem Lebergewebeteilen isoliert worden war. Die biddF wurde für Exon 5, 6, 7 und 8 einzeln durchgeführt. Auch hierbei wurde die Sensitivität von 100:1 (wt:mut), die wiederholt verifiziert wurde, zugrunde gelegt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 aufgeführt.

73 Tiere sind aus dieser Studie in der biddF insgesamt untersucht worden. Davon waren 27 Tiere der Kontrollgruppen, 25 mit BrdU behandelt und 21 mit EtBr behandelt. Die Mäuse der Kontrollgruppen und der EtBr-Gruppen wiesen weder nach regulärer Behandlungsdauer noch nach der Recovery im biddF-Bandenmuster nachweisbare Abweichungen gegenüber dem wt auf. In der BrdU-Gruppe fanden sich in Exon 5 keine, in Exon 6 in 12% (3 von 25) und in den Exons 7 und 8 in jeweils 4% (1 von 25) der Tiere Veränderungen (siehe Tab.9/10).

Gruppe (Geschlecht)	Anzahl der Tiere (bei Versuchsende)	Behandlungszeitraum/Wochen	Dosierung/ppm (Substanz)	Mutation (Exon)
1 (m)	7	13	0	-
2 (m)	6	13	80 (BrdU)	+ (E6)
3 (m)	5	13	100 (EtBr)	-
4 (w)	7	13	0	-
5 (w)	7	13	80 (BrdU)	-
6 (w)	7	13	100 (EtBr)	-
7 (m)	7	13 + 13	0	-
8 (m)	5	13 + 13	80 (BrdU)	+ (E7/E8)
9 (m)	4	13 + 13	100 (EtBr)	-
10 (w)	5	13 + 13	0	-
11 (w)	7	13 + 13	80 (BrdU)	+ (E6)
13 (w)	6	13 + 13	100 (EtBr)	-

Tab.9 Darstellung der Ergebnisse der Studie mit Ethidiumbromid/Bromdeoxyuridin an Mäusen aus der biddF

m = männlich; w = weiblich; 13 = 13 Wochen Behandlung; 13 + 13 = 13 Wochen Behandlung und anschließende 13 Wochen Recovery ohne Exposition; + = in der biddF wurden im Bandenmuster Unterschiede zum Wildtyp detektiert, wobei die betroffenen Exons in Klammern aufgeführt sind; - = in der biddF wurden im Bandenmuster keine Unterschiede zum Wildtyp detektiert; alle dargestellten Ergebnisse wurden mindestens einmal reproduziert.

In einer anschließenden Sequenzierung konnten keine Mutationen in den p53-Exons 5, 6, 7 und 8 dargestellt werden. Der Anteil an mutierter DNA in den Proben lag demnach erneut unter der Nachweisgrenze der Sequenzierung und kann nur über sensitivere Methoden wie die biddF detektiert werden.

Zur Zusammenfassung sind die gefundenen Inzidenzen an Mutationen in Tabelle 10 noch einmal aufgeführt.

Substanz	Mutationsinzidenzen in %									
	Paraffin			Gefrier						
	Ratte			Ratte			Maus			
	E5	E6+7	E8+9	E5	E6+7	E8+9	E5	E6	E7	E8
Tamoxifen	31%	11%	44%	16%	0%	26%				
Bromdeoxyuridin							0%	12%	4%	4%
Ethidiumbromid							0%	0%	0%	0%

Tab.10 Darstellung der gefundenen Mutationsinzidenzen aller untersuchten Tiere
 Paraffin = Ergebnisse der Untersuchung formalinfixierten Leber-Materials, bei dem eine Anreicherung potentiell mutierter p53-Allele durch Immunhistochemie und Mikrodissektion erreicht wurde; Gefrier = Ergebnisse der Untersuchung schockgefrorenen Leber-Materials ohne potentiell mutierte p53-Allele; die betroffenen Tiernummern sind in Tabelle 8 und

4. Diskussion

In über 50% aller Humantumore finden sich Mutationen oder eine veränderte Expression in Folge abgewandelten Stoffwechsels des Tumorsuppressors p53. p53 nimmt Einfluß auf verschiedene zentrale zelluläre Funktionen wie Zellzykluskontrolle, Apoptose oder genomische Integrität (Moll und Schramm, 1998; Soussi, 2000a; Soussi et al., 2000b). Eine Rolle spielt p53 auch bei der Induktion der Neoangiogenese zur Versorgung von Tumoren ab einer bestimmten Größe (Dameron et al., 1994; Nishimori et al., 1997; Rovinsky et al., 1998). Für verschiedene Krankheiten des Menschen, die durch Tumorentstehung charakterisiert sind, konnten für p53 z.B. Keimbahnmutationen bzw. Allelverlust (Li Fraumeni Syndrom), veränderte Degradation (Anogenitaltrakt-Karzinome), Sequestrierung im Cytoplasma (Brust-/Colonkarzinome) oder Verlust der Fähigkeit zur Apoptose-Induktion (Ataxia Teleangiectasia) gezeigt werden (Malkin et al., 1993; Scheffner et al., 1990; Moll et al., 1992; Fujiwara et al., 1993). In der Diagnostik und Therapie von Krebserkrankungen kommt p53 einige Bedeutung zu: in Abhängigkeit von der Art der p53-Mutationen erfolgt bei bestimmten Human-Malignomen die Auswahl der Therapie, da die Prognose für die Therapie mit Mutagenen (chemisch oder physikalisch) für Tumore mit p53-Mutationen deutlich schlechter ist als die für Tumore mit Wildtyp-p53 (Griffith et al., 1997). Tumorzellen mit p53-Mutationen haben häufig die Fähigkeit zur Induktion der Apoptose verloren und werden durch Bestrahlung oder Chemotherapie nicht abgetötet, so daß es zu weiterem, eventuell gefördertem Tumorwachstum kommt.

Bei Nagern zeigte sich ein Einfluß des p53-Genotyps auf die Tumorentstehung bei Untersuchungen an p53-hemizygoten, -heterozygoten und „knock-out“-Mäusen (ohne funktionelles p53-Allel), wobei mutierte bzw. ausgeschaltete p53-Allele gendosisabhängig zu erhöhter Tumorinzidenz führen (Donehower, 1992; Lavigueur et al., 1989). Auch die Involvierung von p53 in Kontrollmechanismen zur Verhinderung von Zellentartungen wie Apoptose und DNA-Reparatur konnte für Nager gezeigt werden (Merrit et al., 1994; Bjelogrljic et al., 1994). Anhand von vergleichbaren Beobachtungen in Tumoren bei Nagern und Menschen kann man auf eine vergleichbare Rolle von p53 in den die Karzinogenese fördernden Prozessen bei Mensch und Nager schließen. Dies macht, zusammen mit der hochgradigen Konservierung der DNA- und Proteinsequenz und seinem Status in der Prognostik, Diagnostik und Therapie von Krebs beim Menschen, p53 zu einem interessanten Kandidaten als Biomarker für die Tumorgenese. Hierfür kommen Gene wie p53 in Frage, die zu einer gelockerten Wachstumskontrolle bzw. vermehrtem Wachstum von Zellen führen und die häufig in frühen Stadien der Krebsentstehung verändert vorliegen.

In dieser Arbeit wurde zur Detektion früher neoplastischer Veränderungen in Ratten und Mäusen nach Mutationen im hochkonservierten Bereich des p53-Gens gesucht, wobei durch Vergleich verschiedener im Labor genutzter Methoden zur Mutationsdetektion ein Verfahren selektiert wurde, das eine möglichst hohe Sensitivität bei der Erkennung von mutanten DNA-Molekülen in genetisch inhomogenen Material vor einem hohen Hintergrund an Wildtyp-DNA aufzuweisen hat.

4.1 Immunhistochemische Darstellung von p53 in der Leber von Tamoxifen-behandelten Ratten und Bromdeoxyuridin- bzw. Ethidiumbromid behandelten Mäusen

In der p53-spezifischen Immunhistochemie werden die Zellen angefärbt, die p53-Akkumulationen enthalten. p53, das in der Zelle normalerweise eine geringe Halbwertszeit hat, akkumuliert zu in der Immunhistochemie detektierbaren Mengen, wenn der Proteinstoffwechsel, die Struktur des Genes oder das entsprechende Protein verändert wird (Maltzman und Czyzyk, 1984; Wagener, 1996).

5µm dicke Paraffinschnitte der Lebern von 18 Ratten, die 3, 6, 9 oder 12 Monate mit Tamoxifen behandelt worden waren sowie von 73 mit Ethidiumbromid oder Bromdeoxyuridin behandelten Mäusen (13 Wochen Behandlung mit oder ohne anschließenden 13 Wochen Recovery) wurden einer p53-spezifischen Immunhistochemie unterzogen. Auf den Leberschnitten der Mäuse war reproduzierbar kein p53 durch Immunhistochemie nachweisbar. Denkbar ist hierbei das Fehlen von Mutationen im p53-Gen, die eine verlängerte Halbwertszeit des Proteins hätten induzieren können, oder vorhandene Mutationen, die nicht zu erhöhter Stabilität des p53-Proteins geführt haben bzw. die z.B. durch Induktion von Stopp-Codons zu nicht funktionellen Proteinen führen. In den Hepatocyten der Ratten zeigte sich dagegen in fast allen behandelten Tieren und in einem Kontrolltier p53-spezifische Färbung (Signale) im Cytoplasma von Zellen, die häufig um Blutgefäße herum angeordnet waren. Diese Anordnung gefärbter Zellen ist möglicherweise bedingt dadurch, daß mit dem Blut transportierte Stoffe durch die an den Gefäßen liegenden Zellen zuerst aufgenommen werden und dann in das umliegende Gewebe gelangen. Eine Anhäufung p53-spezifischer immunhistochemischer Anfärbung in periportalen Bereichen der Rattenleber nach Exposition der Nager mit NNM wurde bereits beschrieben (Wirnitzer et al., 1995).

Im Auftreten von p53-Signalen zeigte sich, wie im Abschnitt Ergebnisse (3.1.1) dargestellt, eine Abhängigkeit von der Behandlungsdauer, wobei die 6 Monate lang behandelten Tiere die größte Anzahl positiv gefärbter Zellen aufzuweisen hatten. Dies kann darauf hinweisen, daß nach diesem Behandlungszeitraum in anderen Genen häufig Mutationen auftreten und p53 daraufhin aufgrund seiner natürlichen Funktion bei der Erkennung von DNA-Schäden stabilisiert und deshalb immunhistochemisch detektierbar wurde.

Die nukleäre Akkumulation von p53 muß nicht zwangsläufig die Folge einer Mutation sein. Vielmehr ist eine Stabilisierung und damit Anreicherung von p53 bekannt nach herabgesetzter Degradation als Folge von zellulärem Streß wie Hypoxie, Hitzeschock, DNA-Schäden, o.ä. (Prives und Hall, 1999), wobei die erhöhte p53-Konzentration zu einem Zellzyklusstopp oder zur Apoptose führen kann (siehe „Funktionen von p53“). Eine Akkumulation von p53 im Cytoplasma der Zelle wurde gezeigt nach Mutationsereignissen z.B. in der Kernlokalisationssequenz des p53-Gens (Moll et al., 1992), aber auch von Wechselwirkungen des Proteins mit anderen Proteinen wie z.B. MDM2 (Momand et al., 1992). Um nachzuweisen, ob es sich im vorliegenden Fall um Mutationsereignisse oder andere Prozesse handelte, wurde ein Detektionssystem zum Nachweis von seltenen p53-Mutationen vor einem hohen Hintergrund an Wildtyp-DNA in frühen Stadien der Hepatokarzinogenese entwickelt.

4.2 Der biddF als eine sensitive Methode zur Detektion unbekannter Mutationen vor einem wt-Hintergrund

Zur Mutationsdetektion sind nahezu ausschließlich Methoden beschrieben die entweder zur Untersuchung von Tumormaterial angewandt werden, in dem aufgrund eines klonalen Ursprungs der Zellen eine hohe Konzentration an mutierter DNA erwartet wird, und/oder die zur Detektion von Mutationen bekannter Art und Lokalisation dienen. Zur Detektion unbekannter Mutationen in frühen Stadien der Krebsentstehung sind in der Literatur bisher keine routinemäßig anwendbaren Methoden bekannt geworden. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche, z.T. routinemäßig genutzte Mutations-Detektions-Verfahren auf ihre Sensitivität bei der Detektion seltener Mutationen vor einem hohen Hintergrund an Wildtyp-Sequenzen untersucht. Dabei wurden Wildtyp und Mutante durch Unterschiede im Laufverhalten (SSCP), im Schmelzverhalten (TGGE), im Restriktionsmuster von renaturierten Einzelsträngen (CFLP) oder im Bandenmuster nach einer Sequenzreaktion (biddF) differenziert bzw. die mutante DNA durch Mikrodissektion, Bindung von Heteroduplices an ein Protein (MutS) oder selektive Restriktion durch Endonukleasen (RSM) im Verhältnis zum Wildtyp angereichert.

Zur Etablierung und Bestimmung der Sensitivitäten dieser Methoden wurden Wildtyp-Kontrollen sowie Kontrollmutanten mit verschiedenen Punktmutationen (Mut 1/2, Mut 3/4 und Mut 5/6) bzw. einer 12bp-Deletion (del 12) generiert. Mit Hilfe verschiedener Mischungsverhältnisse von wt:mut konnten die Methoden optimiert und Aussagen über die getesteten Systeme bezüglich ihrer Fähigkeit, seltene Mutationen zu detektieren, gemacht werden.

Im Vergleich zu den anderen getesteten Methoden erwies sich der biddF dabei als die Methode, die sich am besten zur Detektion seltener Mutationen in frühen neoplastischen Veränderungen eignete. Bei der angestrebten Anreicherung von Zellen mit akkumuliertem p53 durch Isolierung immunhistochemisch angefärbter Zellen aus Paraffinschnitten durch Mikrodissektion mit späterer PCR und Sequenzierung erwies sich die Auswertbarkeit der erhaltenen Sequenzen als nicht eindeutig. Die Sequenzierung der PCR-Produkte zeigte einen hohen Anteil an schwachen Zusatzbanden in jeder Spur des PAA-Gels. Dies deutet darauf hin, daß aus Formalin-fixierten paraffinierten Proben keine 100% spezifischen PCR-Produkte zu erhalten sind. Durch eine Quervernetzung der DNA mit Proteinen und ihre Fragmentierung ist das aus fixierten Zellen gewonnene Template für die PCR nicht optimal, es kommt zu einer verminderten Genauigkeit und Ausbeute (Ben-Ezra et al., 1991; Chalkley et al., 1971). Dies konnte auch in dieser Arbeit beobachtet werden, in der die PCR-Produkte aufgrund unspezifischer Nebenprodukte fast ausnahmslos über Gelelektion aufgereinigt werden mußten. Obwohl das zu untersuchende Material genetisch inhomogen war, was impliziert, daß Mutationen selten vorliegen und zudem noch keine Selektion bestimmter (die Zellteilung fördernde) Mutationsereignisse stattgefunden hat, wurden exemplarisch PCR-Produkte kloniert und die Klone sequenziert. Um die Anzahl statistisch zu sequenzierender Klone praktikabel zu gestalten, wurden einige PCR-Produkte mit potentiell angereicherten p53-Mutationen aus der Mikrodissektion immunhistochemisch positiver Hepatocyten kloniert. Es ergab sich nach Sequenzierung ein unübersichtliches Muster an

Sequenzalterationen, wobei in mehreren Klonen aus demselben PCR-Ansatz immer verschiedene Mutationen auftraten. Aufgrund dieser Problematik und der mit großem Zeit- und Kostenaufwand zu etablierenden und durchzuführenden PCR, erwies sich der Ansatz, das aus p53-positiv gefärbten Zellen erhaltene PCR-Produkt direkt zu sequenzieren, zur Detektion von Mutationen im p53-Gen als zu aufwendig und teuer und damit indiskutabel zur routinemäßigen Durchführung.

Die Alternative zur Nutzung Formalin-fixierten und paraffinierten Gewebes, die Immunhistochemie auf Gefrierschnitten, ergab keine eindeutig reproduzierbaren Ergebnisse. Dies kann auf eine Degradierung des p53-Proteins während der Fixierung oder nach dem Auftauen während der Immunhistochemie zurückzuführen sein. Die Abhängigkeit des p53-Nachweises über Immunhistochemie von der Art der Fixierung wurde auch von U. Martens und U. Stenius beschrieben. Sie zeigten, daß die p53-positive Färbung in Hepatocyten von Ratten, die mit Diethylnitrosamin behandelt worden waren, nach Perfusion mit Formalin und anschließender 24-stündiger Fixierung in Formalin am stärksten ausgeprägt und am gleichmäßigsten war. Bei konventioneller Formalinfixierung erwies sich die Färbung als schwächer, bei Formalin-unabhängiger Fixierung war p53 immunhistochemisch nicht detektierbar (Martens und Stenius, 1999). Da eine Anreicherung mutanter DNA über die Selektion von Zellen mit akkumuliertem und damit eventuell mutiertem p53 auf fixiertem Material und anschließende Sequenzierung eines PCR-Produktes ausgeschlossen worden war, wurden verschiedene Mutations-Detektions-Verfahren auf ihre Sensitivität zur Detektion weniger mutierter DNA-Moleküle vor einem hohen Hintergrund an Wildtyp-Molekülen getestet.

Eine viel genutzte Methode zur Detektion von Mutationen ist die TGGE, bei der Gemische aus Wildtyp und mutanter DNA nach Bildung von Heteroduplices aufgrund unterschiedlichen Schmelz- und Laufverhaltens in einem Temperaturgradienten getrennt und Mutanten detektiert werden können (Rosenbaum und Riesner, 1987). Der Einsatz dieser Methode zur Detektion von p53-Mutationen in genetisch homogenen Harnblasen-Karzinomen wurde publiziert (Schlechte et al., 2000). Zur Detektion seltener Mutationsereignisse in genetisch inhomogenem Material liegen hingegen keine bekannten Daten vor, so daß die Sensitivität zum Nachweis von seltenen Mutationen durch die TGGE in der vorliegenden Arbeit bestimmt wurde. Die Nachweisgrenze lag in dieser Arbeit je nach Mutation zwischen ca. 10% und 5% mutanter DNA (siehe auch Abb.14), so daß seltener vorliegende Mutationen, wie in frühen Stufen der Karzinogenese erwartet, über die TGGE nicht detektierbar wären. Durch die TGGE konnten zwei der konstruierten mutanten Kontrollen bis zu einem Mischungsverhältnis von bis zu 25:1 wt:mut erkannt werden. Aufgrund der zu geringen Sensitivität bei der Detektion seltener Mutationen und der fehlenden Fähigkeit, alle mutanten Kontrollen zu detektieren, wurde diese Methode als nicht geeignet zum Nachweis von p53-Mutationen in dem potentiell genetisch inhomogenen Material, das in dieser Arbeit untersucht werden sollte, bewertet. Dieselbe Nachweisgrenze wurde hier auch für den SSCP gezeigt (Daten nicht aufgeführt), der deswegen ebenfalls als nicht geeignet eingestuft wurde. Eine mögliche Erklärung für die relativ geringe Sensitivität dieser Methoden liegt in der Hintergrundfärbung, die bei jeder Probe erkennbar war (siehe Abb.14). Dieser Hintergrund, der auch durch vorherige

Aufreinigung der eingesetzten PCR-Produkte nicht zu verhindern war, verhindert die zuverlässige Detektion von Banden mit geringeren DNA-Mengen.

Der CFLP galt einige Zeit als schnelle und sensitive Methode zur Detektion von Mutanten (Brow et al., 1996; Sreevatsan et al., 1998a und b; Oldenburg und Siebert, 2000). Die verschiedenen Sekundärstrukturen, die einzelsträngige DNA-Fragmente mit Basenunterschieden nach De- und Renaturierung einnehmen, ist hierbei die Grundlage für ein unterschiedliches Bandenmuster für Wildtyp und Mutante im PAA-Gel nach Restriktion der DNA mit der Endonuklease Clevase, wobei Mutationen im p53-Gen in 97% genetisch homogener Klone reproduzierbar detektiert werden konnten (O'Connell et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte diese Sensitivität nicht bestätigt werden, da nur die Kontrolle del12 reproduzierbar nachgewiesen werden konnte, während Punktmutationen nicht eindeutig detektierbar waren. Bei einem Anteil von mutanter DNA in einem Gemisch mit Wildtyp-DNA lag die Nachweisgrenze für del12 bei 10%. Die Sensitivität zur Detektion von Mutanten in einem Gemisch mit Wildtyp-DNA dieser Methode wird dadurch herabgesetzt, daß Intensitätsunterschiede in einzelnen Banden nicht mehr erkennbar sind, sobald ein Gemisch an mutanter und Wildtyp-DNA vorliegt. Die fehlende Reproduzierbarkeit des CFLP läßt sich erklären durch die Instabilität des Enzyms Clevase, die nicht nur in dieser Arbeit sondern auch in anderen Arbeitsgruppen auffiel und dazu führte, daß die Firmen Qiagen und Roche ihre angebotenen CFLP Scanning Kits im Laufe dieser Arbeit vom Markt nahmen (persönliche Gespräche mit den Firmen Qiagen und Roche). All dies ließ den CFLP für die Nutzung zur Detektion seltener Mutationen in genetisch inhomogenen Material als nicht geeignet erscheinen.

Eine Möglichkeit, bekannte seltene Mutationen in einem Überschuß an Wildtyp-DNA zu detektieren, ist der RSM bei dem DNA mit Wildtypsequenz und einer Schnittstelle für eine Endonuklease durch ein Restriktionsenzym geschnitten wird, in der Erkennungssequenz mutierte DNA hingegen nicht. So können theoretisch große Teile der Wildtyp-DNA entfernt und die mutierte Sequenz angereichert werden (Parry et al., 1990; Jenkins et al., 1999). Die Sensitivität der Methode wurde in dieser Arbeit mit Hilfe von Mischungsverhältnissen generierter Wildtyp- und mutanter Kontrollen für Codon 12 und 13 des H-ras Gens der Ratte untersucht, wobei der Wildtyp eine Erkennungssequenz für eine Endonuklease enthielt, die in der entsprechenden Mutante durch eine gerichtet eingefügte Punktmutation für das Enzym unkenntlich gemacht worden war (nach Mitchell und Warshawsky, 1999). In einem Überschuß an Wildtyp-DNA war es nach zweifacher PCR und Verdau nicht möglich, in der anschließenden Sequenzierung den 10%igen Anteil an mutanter DNA zu detektieren. Dies weist darauf hin, daß Restriktionsendonukleasen nicht mit 100%iger Effizienz schneiden, sondern ein Rest wt-Sequenz in der Sequenzierung die Mutante überdeckt. Dies konnte belegt werden anhand von Proben, die keine mutante DNA enthielten. Nach einem Verdau war im Agarosegel in diesem Fall zwar keine für ungeschnittene DNA spezifische Bande mehr zu erkennen, eine anschließende PCR erbrachte allerdings ein für das ungeschnittene Fragment spezifisches PCR-Produkt, was bei 100%iger Schnitt-Effizienz der Endonuklease nicht der Fall hätte sein dürfen. Zusätzlich hat diese Methode den Nachteil, daß lediglich ca. 35% des konservierten Bereiches des p53-Gens (Exons 5-9) mit im Handel erhältlichen Restriktionsendonukleasen abzudecken wäre, womit eine Aussage über Mutationen in

diesem Bereich deutlich eingeschränkt ist. Aus diesen Gründen wurde der RSM als Methode zur Detektion unbekannter Mutationen in einem Überschuß an Wildtyp-Molekülen verworfen. Als Variante dieser Methode zur Detektion von Mutationen im p53-Gen (konservierter Bereich Exon 5-9) wurde in Erwägung gezogen, gegen den Verdau resistente DNA von der geschnittenen durch Gelelution zu trennen, und erst dann in die zweite PCR einzusetzen. Dabei würden geschnittene Fragmente in der PCR nicht mehr interferieren können. Da dies einen enormen Zeitaufwand mit sich gebracht hätte, sollten Mehrfachverdau mit Enzymen der gleichen Reaktionsbedingungen angesetzt werden. Ein großes Problem ergibt sich aber daraus, daß schon bei Mischungsverhältnissen wt:mut von 10:1 in Testansätzen keine erkennbare Bande ungeschnittener DNA im Gel zu detektieren war. Im Voraus ist nicht zu sagen, welche Konsensussequenzen Mutationen enthalten und welche nicht, d.h welche Enzyme schneiden und welche nicht. Folglich ist es nicht möglich zu vermuten, wo eine eventuelle Bande mit mutanter DNA im Gel positioniert wäre. Eine „Blindelution“ nach kb-Größe oder erwarteter Bande war daher nicht möglich. Dieser Denkansatz wurde daher nicht in ein Experiment zur Untersuchung des konservierten Bereiches des p53-Gens umgesetzt.

Das Protein MutS, ein Bestandteil des DNA-Reparaturapparates von *E.coli*, der natürlicher Weise für die Detektion von Mutationen und deren Korrektur zuständig ist, ist in der Lage, ungepaarte Basen zu erkennen und zu binden (Lahue et al., 1989; Su et al., 1986). Diese Fähigkeit kann genutzt werden zur Trennung mutanter DNA von Wildtyp-DNA indem Heteroduplices, durch De- und Renaturierung gebildet, von MutS gebunden und Homoduplices entfernt werden. Theoretisch erhält man so Heteroduplices, die aus jeweils einem Strang mit Wildtyp- und einem Strang mit mutierter Sequenz bestehen, so daß der Anteil mutierter DNA auf 50% angehoben und dadurch in einer Sequenzierung detektierbar wird. Schon die Versuche zur Etablierung des Systems mit unterschiedlichen Membranen und Blockade-Reagenzien zeigten, daß nicht nur Hetero- sondern mit ähnlicher Effizienz auch Homoduplices durch MutS gebunden werden (siehe Abb.16), was durch den Einsatz reiner Wildtyp-Proben gezeigt werden konnte, so daß beim Einsatz verschiedener Verdünnungen von wt:mut bis zu 1000:1 keine Anreicherung mutierter DNA erreicht werden konnte. Um unspezifische DNA-Bindung direkt an die Membran völlig ausschließen zu können, wurde MutS mit den Heteroduplices in Lösung komplexiert und anschließend an die Membran gebunden. Auch dieses Vorgehen brachte keine Erhöhung der Effizienz. Deshalb wurde dieser Assay nicht zur Detektion seltener Mutationsereignisse eingesetzt. Eine mögliche Erklärung für die unspezifische Bindung von Homoduplices an MutS besteht darin, daß das Protein in vivo nicht allein sondern im Komplex mit mehreren anderen Proteinen agiert. Es besteht die Möglichkeit, daß MutS alleine in vitro nicht ausreichend ist, um durch spezifische Bindung Heteroduplices von Homoduplices zu trennen.

Als das am besten geeignete System für die Suche nach p53-Mutationen vor einem hohen Hintergrund an Wildtyp-DNA erwies sich der biddF, bei dem eine Sequenzreaktion mit zwei Primern, biotinylierten Nukleotiden und einem Stopp-Nukleotid durchgeführt und auf einem PAA-Gel ausgewertet wird. Mit Hilfe der Wildtyp- und der vier verschiedenen mutanten Kontrollen wurde die Reproduzierbarkeit des Versuches getestet und eine Nachweisgrenze für den Fingerprint von

bis zu 1% mutanter DNA gezeigt (siehe auch Abb.17). Für dieses Nachweissystem erwies es sich als vorteilhaft, sogenannte „nested“ Primer für die Reaktion einzusetzen, die ein etwas kleineres Fragment aus einem vorhandenen PCR-Fragment amplifizieren. Dies schaltete das Auftreten unspezifischer Zusatzbanden aus. Zudem mußte der Einsatz von biotinylierten Primern für jedes Fragment in Erwägung gezogen werden, da die Intensität der Banden nach kolorimetrischer Detektion abhängig von der Anzahl eingesetzter biotinylierter Primer ist. Für einige der untersuchten Fragmente erwies es sich als vorteilhaft, die Intensität der Entwicklung herabzusetzen, indem nur ein oder kein Primer biotinyliert eingesetzt wurde, damit Banden sich nicht gegenseitig überdeckten.

Da der biddF im Vergleich zu den anderen getesteten Mutations-Detektions-Systemen der sensitivste (Abb.18) und außerdem reproduzierbar war, wurde er zur Untersuchung der Lebern von Tamoxifen-behandelten Ratten und Ethidiumbromid- bzw. Bromdeoxyuridin-behandelten Mäusen auf p53-Mutationen ausgewählt. Eine anschließende Sequenzanalyse ist zur Charakterisierung der über die biddF gefundenen Mutation nur möglich, wenn in mehr als 20% des untersuchten Materials eine Mutation vorliegt, da die Sensitivität der Sequenzierung die Darstellung geringerer Anteile an mutanter DNA nicht zuläßt.

4.3 Induktion von p53-Mutationen durch Tamoxifen in der Leber der Ratte

Tamoxifen ist ein Östrogen-Analogon, das in der Humanmedizin zur Brustkrebsbekämpfung eingesetzt wird und in der Diskussion war zur prophylaktischen Nutzung bei für Brustkrebs prädisponierten Frauen. Vor der prophylaktischen Nutzung eines Therapeutikums müssen Risiko und Nutzen anders abgewägt werden als in der Krebsbekämpfung, weswegen Langzeit-Kanzerogenitätsstudien durchgeführt wurden, in denen das bereits als Therapeutikum zur Behandlung des Brustkrebs auf dem Markt befindliche Tamoxifen als potentes Hepatokarzinogen identifiziert wurde (Hard et al., 1993).

Östrogene gehören zu den Steroidhormonen die von endokrinen Drüsen freigesetzt und durch zirkulierende Körperflüssigkeiten in ihre Zielorgane transportiert werden. Hormon-Analoga können physiologisch vorkommende Hormone in ihrer Wirkung ersetzen, indem sie mit oft höherer Affinität an die entsprechenden Rezeptoren binden und spezifische Hormonantworten auslösen (Agonisten). Im Gegensatz dazu binden antagonistisch wirkende Hormon-Analoga an die entsprechenden Rezeptoren, ohne eine spezifische Reaktion auszulösen (Spindler, 1997). Tamoxifen kann je nach Spezies und Gewebe sowohl agonistisch als auch antagonistisch wirken (Wogan, 1997; Spindler, 1997). Aufgrund seiner Östrogen-antagonistischen Eigenschaften im Brustgewebe wird es klinisch zur Chemotherapie bei Frauen nach einer Brustkrebs-Erkrankung eingesetzt (Jordan, 1995; Vancutsem et al., 1994), wobei die agonistische Wirkung im Uterus Zellwachstum stimuliert, die Bildung von Progesteronrezeptoren induziert und so zur Tumorentstehung führen kann (Jordan, 1995; Spindler, 1997; National Toxicology Program, 2000). Nach verschiedenen Studien an Ratten und Beobachtungen an mit Tamoxifen behandelten Frauen

wurde dieses Anti-Östrogen als potentes Karzinogen in der Ratte und im Menschen klassifiziert (Vancutsem et al., 1994; National Toxicology Program, 2000).

In dieser Arbeit wurden karzinogene Effekte von Tamoxifen am Beispiel des p53-Gens in der Rattenleber in frühen Stadien der Krebsentstehung untersucht. Sowohl die Untersuchung des hochkonservierten Bereichs von p53 in Formalin-fixiertem, paraffiniertem und immunhistochemisch gefärbtem als auch in gefrorenem Lebergewebe mit Hilfe der biddF zeigte, daß die Gabe von Tamoxifen in der Leber von Ratten zu Sequenzveränderungen im p53-Gen führt. Rund 61% der untersuchten Tiere zeigten in mindestens einem Exon in der biddF einen Unterschied im Bandenmuster im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle, 39% zeigten keine Auffälligkeiten in den untersuchten Genabschnitten, darunter alle Tiere der Kontrollgruppe. Im Formalin-fixierten, paraffinierten Gewebe, aus dem p53-positiv gefärbte Zellen zur Untersuchung isoliert worden waren, waren für 31% der Tiere in Exon 5, für 11% in Exon 6+7 und für 44% in Exon 8+9 Unterschiede im Bandenmuster zu detektieren. Die in gefrorenem Lebergewebe ohne Anreicherung auf p53-veränderte Zellen gefundenen Mutationsinzidenzen sind dagegen mit 16% Veränderungen im Bandenmuster der biddF in Exon 5, 26% in Exon 8+9 und keinen in Exon 6+7 geringer (siehe Tab.10). Im direkten Vergleich zeigen 61% der untersuchten Tiere in Formalin-fixiertem, paraffiniertem Gewebe Hinweise auf Mutationen, im gefrorenen Lebergewebe hingegen 39%. Dies belegt eine erfolgreiche Anreicherung mutierter p53-DNA über die Mikrodissektion immunhistochemisch angefarbter Leberzellen.

Es zeigten sich Unterschiede in der Anzahl und Lokalisation gefundener Mutationen in Formalin-fixiertem und paraffiniertem bzw. gefrorenem Lebergewebe, was auf die unterschiedliche Art der Gewinnung der DNA für die PCR zurückzuführen sein dürfte. Aus den gefrorenen Lebern wurde nach dem Zufallsprinzip Gewebe zur DNA-Isolierung entnommen, ohne gezielt auf Bereiche mit potentiell verändertem p53 zurückzugreifen, d.h. es fand keine Anreicherung mutierter DNA gegenüber Wildtyp-DNA statt. So wurden teilweise zufällig so viele Zellen mit p53-Mutationen eingesetzt, daß ihr Anteil über der Nachweisgrenze der biddF lag, während der Anteil in anderen Fällen unterhalb der Grenze lag. Zudem muß eine Mutation im p53-Gen nicht zwangsläufig eine erhöhte Halbwertszeit des Proteins, seine Akkumulation und damit die Nachweisbarkeit in der Immunhistochemie nach sich ziehen, sondern kann auf andere Weise zu Funktionsverlust führen. Vorzustellen wäre hierbei der Verlust der DNA-Bindungsfähigkeit durch Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne, Veränderungen in der Tetramerisierungsdomäne mit folgender Verhinderung der Bildung funktioneller Tetramere oder ähnliche Konformationsveränderungen. Ebenso besteht die Möglichkeit, daß p53 trotz einer auftretenden Mutation voll funktionsfähig bleibt und nicht akkumuliert, wenn es aufgrund der veränderten Basenabfolge nicht zu einem Aminosäureaustausch im fertigen Protein kommt (stille Mutation). In Betracht gezogen werden muß außerdem, daß nicht das gesamte p53-Gen sondern nur der hochkonservierte Bereich mit Exon 5-9 untersucht wurde, so daß in den nicht untersuchten Bereichen Mutationen vorliegen können, die in dieser Arbeit nicht detektiert wurden. Nach immunhistochemischer Behandlung war, wie schon erwähnt, die Möglichkeit gegeben, Zellen mit potentiell verändertem p53 so

auszuwählen, daß der Hintergrund an Wildtyp-DNA herabgesetzt werden konnte. Dies führt zu einer höheren Wahrscheinlichkeit bei der Detektion vorhandener Sequenzveränderungen.

Bei einem Tier der Kontrollgruppe konnte sowohl ein Tumor, als auch p53-Akkumulation im Leberparenchym in der Immunhistochemie gesehen werden. In der biddF wurde, wie bei allen Kontrolltieren, dabei kein Hinweis auf eine veränderte p53-Sequenz gefunden. Es ist daher möglich, daß p53 aufgrund seiner normalen zellulären Funktionen (Zellzykluskontrolle, Sicherstellung der genomischen Integrität, Einleitung von Apoptose o.ä.; siehe „Funktionen von p53“) in den Zellen akkumulierte, ohne in den untersuchten Sequenzen mutiert zu sein.

Interessant ist, daß sowohl in der Immunhistochemie als auch bei den Mutationsinzidenzen eine Abhängigkeit vom Behandlungszeitraum zu beobachten war. In beiden Fällen lag durchschnittlich nach 6-monatigem Behandlungszeitraum die größte Zahl von p53-positiv gefärbten Zellen bzw. p53-Mutationen in den Exons 6+7 und 8+9 vor. Während bei der Immunhistochemie die Anzahl positiv gefärbter Zellen über 9 Monate bis zu 12 Monaten kontinuierlich abnahm, war die Anzahl gefundener Mutationen nach 9 Monaten geringer als in den vorigen Behandlungszeiträumen und stiegen nach 12-monatiger Behandlung erneut an. Für Exon 5 sah der Verlauf des Auftretens von Mutationen etwas anders aus. Während in den ersten 6 Monaten keine Mutationen zu detektieren waren, stieg ihre Anzahl bis hin zu 12 Monaten Behandlung kontinuierlich an. Aufgrund einer zu geringen Anzahl an Daten zu dieser interessanten Beobachtung in dieser Arbeit als auch fehlender Vergleichs-Daten in der Literatur, die zudem fast ausschließlich auf Versuchen an genetisch homogenen Tumormaterial beruhen, ist eine Interpretation hierzu schwierig. Über die Art der beobachteten Mutationen kann hier keine Aussage gemacht werden, da es aufgrund der mangelnden Sensitivität der Sequenzierung nicht möglich war, Informationen über die Basenabfolge der mutierten p53-Exons zu erhalten.

Tamoxifen konnte bestätigt werden als potentes Karzinogen mit Tumoren in 17%, sowie p53-Mutationen in 61% der untersuchten Tiere, wobei diese Mutationen auch in frühen Stadien der Karzinogenese nachgewiesen werden konnte. Schon in früheren Versuchen wurde in Ratten gezeigt, daß eine Behandlung mit Tamoxifen zu Hepatokarzinomen führt (Vancutsem et al., 1994), wobei ein Auftreten von p53-Mutationen in 50% der untersuchten Tiere gefunden wurde. Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen, die an genetisch homogenem Tumormaterial erfolgten, wurden in dieser Arbeit Mutationen im p53-Gen bereits nach 3-monatiger Behandlungsdauer bei 11% und nach 6-monatiger Behandlung bei 17% der Tiere gefunden, bevor sichtbare Tumore entstanden sind. Die in Tumoren gefundenen Mutationen sind Ergebnis von Selektionsmechanismen, die der Zelle Wachstumsvorteile erbrachten, und die in Vorstufen der Tumorentstehung nicht deutlich nachweisbar sein müssen. In dieser Arbeit ist es gelungen, über den biddF durch eine hohe Sensitivität Mutationen nachzuweisen, bevor weitere Sequenzveränderungen und Selektion zur Tumorentstehung geführt haben.

4.4 Induktion von p53-Mutationen durch Bromdeoxyuridin und Ethidiumbromid in der Leber der Maus

Da Tamoxifen in der Maus nicht hepatokarzinogen wirkt, wurde in diesem Tierexperiment die, von internationalen Richtlinien zur Abschätzung des karzinogen Potentials von zu untersuchenden Substanzen geforderte zweite Spezies (die Maus) mit den als mutagen geltenden, im Labor als Marker zur Visualisierung von DNA genutzten, DNA-Farbstoffen Bromdeoxyuridin (BrdU) und Ethidiumbromid (EtBr) behandelt.

Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlängen 254 nm oder 300 nm, eine Eigenschaft, die zur Detektion von Nukleinsäuren in Agarosegelen genutzt wird (Ibelgauffs, 1993). Es ist außerdem die Verwendung als Antiparasitikum und Antiprotazoikum bei Tieren bekannt. Ethidiumbromid ist als giftig und mutagen klassifiziert, wobei dies nur durch Versuche an Zellkulturen bedingt gezeigt werden konnte (National Toxicology Program, 2001). Bromdeoxyuridin ist ein Thymidin-Analogon, das anstelle der Methylgruppe des Thymidins ein Brom-Atom enthält. BrdU kann während DNA-Synthese oder -Reparatur anstelle des Thymidins in die DNA eingebaut werden und wird wegen dieser Eigenschaft in verschiedenen biologischen Laborversuchen eingesetzt (z.B. Selektion von Wildtyp- und mutierten Zellen; Lokalisation von Orten vermehrter DNA-Synthese in Zellen (Ibelgauffs, 1993)). BrdU ist ebenfalls nach Zellkulturversuchen als giftig und mutagen sowie als bedingt teratogen in Labortieren klassifiziert worden (National Toxicology Program, 2001).

In dieser Arbeit wurden die mutagenen Effekte von Bromdeoxyuridin und Ethidiumbromid nach einer 13-wöchigen Expositionszeit, mit oder ohne anschließender 13-wöchiger „Recovery“ (13+13 Wochen), auf das p53-Gen in den Lebern von Mäusen untersucht. Nach diesen Versuchsdauern konnte bei keinem der eingesetzten Tiere der Kontroll- und Behandlungsgruppen die Entstehung von Tumoren beobachtet werden. Für die mit EtBr behandelten Tiere konnten außerdem keine Veränderungen in der p53-Sequenz mittels biddF detektiert werden. Hieraus läßt sich schließen, daß EtBr in der eingesetzten Dosierung entweder keine p53-Mutationen in Hepatocyten der Maus induziert oder nach dieser Behandlungsdauer nur so wenig Mutationseignisse vorliegen, daß ihre Menge unter der Nachweisgrenze des biddFs von 1% mutierter DNA liegt. Es wurde gezeigt, daß Ethidiumbromid nach Interkalierung in die DNA DNA-Replikation und RNA-Synthese hemmt (Ibelgauffs, 1993). Wird eine Mutation aber nicht durch DNA-Replikation und folgende Zellteilungen fixiert, sondern statt dessen z.B. repariert, so ist sie nicht detektierbar, was eine weitere Erklärung für das Fehlen von p53-Mutationen nach EtBr-Exposition sein könnte. Erstaunlich ist hier auch die Diskrepanz zwischen der in Zellkulturen festgestellten in vitro-Mutagenität und der scheinbar fehlenden in vivo-Kanzerogenität nach 13- oder 13+13-wöchiger Behandlung.

In einem Fünftel der mit Bromdeoxyuridin behandelten Tiere (5/25) waren p53-Mutationen zu detektieren (siehe Tab.9), wobei diese innerhalb des relativ kurzen Behandlungszeitraums nicht zur Tumorentstehung führten. Es wird ausgeschlossen, daß es sich hierbei um zufällige Ereignisse handelt, da in den Kontrollgruppen und in den mit EtBr behandelten Gruppen keine Unterschiede im biddF-Bandenmuster gefunden wurden. Es handelt es sich demnach eindeutig um einen

Behandlungseffekt. Hierbei ist kein deutlicher Unterschied in der Mutationshäufigkeit im Vergleich der 13 Wochen-Gruppe mit der 13+13-Wochen-Gruppe festzustellen. In der Literatur ist beschrieben, daß die Initiation nicht zwangsläufig zu Tumorentstehung führt, da eine Reparatur der gesetzten DNA-Schäden erfolgen kann und es zudem einer Mehrzahl an Mutationsereignissen bedarf, um zu einer Entartung von Zellen zu führen. In der eventuell anschließenden Promotion und Progression erfolgt die schrittweise Weiterentwicklung zu einer malignen Zelle. Dabei führt eine Erholungsphase nicht unbedingt zu einer Veränderung im Genom der Zelle, was eine Begründung sein kann für den fehlenden Unterschied der gefundenen Mutationshäufigkeiten zwischen den Gruppen mit bzw. ohne „Recovery“ (Schulte-Hermann, 1985). Ein Unterschied zwischen diesen beiden BrdU-Behandlungsgruppen war nur in der Verteilung der Mutationen auf die einzelnen Exons des p53-Gens zu erkennen, wobei für eine statistisch eindeutige Aussage weitere Experimente notwendig werden. Eine Aussage zu Unterschieden in der Art oder Lokalisation der Mutationen kann aufgrund der zu geringen Sensitivität der Sequenzierung nicht gemacht werden.

Für Ethidiumbromid wurde mit der eingesetzten Methode und in den untersuchten Genabschnitten kein Hinweis auf Mutagenität *in vivo* gefunden, im Gegensatz zu den oben bereits erwähnten Versuchen an Zellkulturen *in vitro*. Dies belegt den viel diskutierten Unterschied zwischen Zellkultur und dem Gesamtorganismus und weist auf den Zusammenhang zwischen Mutationsinduktion und Proliferation bzw. Progression hin. Im Organismus wirken im Gegensatz zur Zellkultur viele Faktoren wie Nährstoffversorgung, hormonelle Regulation u.a. auf eine einzelne Zelle ein, und es kann darüber z.B. zu einer effektiven DNA-Reparatur kommen, so daß Mutationen nicht fixiert werden und nicht zur Tumorentstehung beitragen können. Es werden andere Substanzen beschrieben, die *in vitro* mutagen, *in vivo* aber nicht karzinogen sind, wobei in diesem Zusammenhang die Begriffe Genotoxizität und „relevante“ Genotoxizität geprägt wurden (Cunningham und Matthews, 1995; Ashby und Tinwell, 1995). Für Bromdeoxyuridin konnte die in Zellkulturen gefundene Mutagenität im untersuchten Gen *in vivo* hingegen bestätigt werden. Der Unterschied zwischen beiden, mit der DNA wechselwirkenden Substanzen in Hinsicht auf ihre Mutagenität *in vivo* könnte aus der unterschiedlichen Art dieser Wechselwirkungen resultieren. Da die Interkalierung von Ethidiumbromid in die DNA auch im Laborversuch ein reversibler Prozeß ist (Ibelgauffs, 1997) besteht die Möglichkeit, daß auch in den Zellen eines Organismus Systeme vorhanden sind, die das EtBr aus der DNA wieder entfernen können oder zur Apoptose, ausgelöst durch die entstandenen sterischen Veränderungen, führen und so DNA-Schäden und deren Folgen bis hin zur Tumorentwicklung *in vivo* verhindern. Bromdeoxyuridin hingegen wird während der DNA-Synthese in den neuen DNA-Strang anstelle von Thymidin integriert. Wenn der Unterschied zwischen den beiden Basen nicht auffällt und nicht repariert wird, kann BrdU während der DNA-Synthese auch mit anderen Basen paaren und diese Sequenzunterschiede können im Laufe weiterer Zellteilungen weitergegeben und die Mutation so fixiert werden. In der Folge kann es zur Karzinogenese kommen.

4.5 p53 als Marker für die Tumorentstehung

Der Tumorsuppressor p53 wird dadurch, daß er an vielen zellulären Prozessen mit entscheidendem Einfluß auf das Zellwachstum wie Zellzykluskontrolle, Apoptose u.ä. beteiligt ist und in vielen Tumorarten des Menschen verändert vorliegt (Moll und Schramm, 1998; Soussi, 2000a; Soussi et al, 2000b), zu einem interessanten Kandidaten als Marker in der frühen Diagnose der Karzinogenese. Sowohl Protein (Proteindomänen II-IV) als auch Gen (Exons 5-8) sind bei Säugern hochgradig konserviert (Soussie et al., 1990; Prives, 1994), und das Protein weist in den verschiedenen Spezies vergleichbare Funktionen auf (siehe Kapitel „Einleitung“), beides für Tumormarker wichtige Charakteristika.

In dieser Arbeit ließen sich Hinweise auf die Nutzbarkeit von p53 als Tumormarker erkennen. In den Tamoxifen-behandelten Ratten ließ sich p53 schon in frühen Stadien der Tumorentwicklung, nach 3-monatiger Behandlung, immunhistochemisch nachweisen. Bis zu einer Behandlungsdauer von 6 Monaten nahm die Anzahl immunhistochemisch positiver Zellen in Leberschnitten behandelte Ratten zu, während nach 9 Monaten die ersten Neoplasien auftraten. p53 scheint demnach bei der induzierten Karzinogenese in der Rattenleber eine Rolle zu spielen. Dies wird durch die Beobachtung einer erhöhten Anzahl an p53-Mutationen im konservierten Bereich des Gens parallel zur Akkumulation des Proteins in den Zellen unterstützt. In diesem Fall könnte die Aussage zutreffen, daß eine p53-Akkumulation in den Hepatocyten bzw. das Auftreten von p53-Mutationen im konservierten Bereich des Gens nach 3-monatiger Behandlung mit Tamoxifen in der Entstehung von Neoplasien im späteren Verlauf des Versuches resultiert.

In der Maus lag eine andere Situation vor. Nach 13 bzw. 13+13 Wochen Versuchsdauer waren in BrdU-behandelten Tieren p53-Mutationen zu detektieren, die nicht mit einer Akkumulation des Proteins korreliert werden konnten. In weiteren Versuchen muß geklärt werden, ob längere Expositionszeiten zur Tumorentstehung aufgrund von verändertem p53 führen, wobei Tumorgewebe meist genetisch homogen ist und so eine Sequenzanalyse ermöglichen könnte.

Für Ethidiumbromid konnten im untersuchten Genabschnitt und mit der gewählten Methode keine p53-Mutationen detektiert werden. Auch hierfür müßte der Versuch über einen längeren Zeitraum erneut durchgeführt werden, um eine eindeutige Aussage zur Kanzerogenität sowie über die Rolle von p53 in diesem Prozeß z.B. mit Hilfe von Sequenzanalysen des p53-Gens in eventuell entstandener Tumore zu ermöglichen. Die Bestätigung von EtBr als nicht karzinogen in diesen weiteren Versuchen würde ebenfalls für p53 als Tumor-Marker sprechen, da bei einer nicht karzinogenen Substanz keine Veränderungen im konservierten Bereich des Gens zu erwarten sind. Dieser Sachverhalt konnte in anderen, noch nicht veröffentlichten Doktorarbeiten in dieser Arbeitsgruppe mit als nicht-kanzerogen klassifizierten Substanzen gezeigt werden.

In dieser Arbeit konnte eine Methode etabliert werden, mit der die Detektion seltener Mutationsereignisse in genetisch inhomogenen Material bis zu einer Nachweisgrenze von 1% mutanter DNA ermöglicht wird. Mit Anwendung dieser Methode auf die vorliegenden Versuche konnte gezeigt werden, daß die frühe Detektion von p53-Mutationen ein wertvolles Werkzeug sein

könnte, um Tumore in frühen Entwicklungsstadien voraussagen zu können. Damit wäre p53 ein sinnvoller Kandidat zur Nutzung als Tumormarker.

5. Ausblick

Die Prüfung verschiedener Substanzen hinsichtlich ihrer Wirkungen und Nebenwirkungen auf den Menschen wird von Richtlinien der internationalen Zulassungsbehörden geregelt und ist Aufgabe der Toxikologie. Hierzu sind, nachdem eine Substanz in der sogenannten „Standard Battery for Genotoxicity Testing“ (verschiedene Genotoxizitätsstudien) als unbedenklich eingestuft wurde, auch Tierversuche zur Abschätzung ihrer Kanzerogenität in vivo nötig (ICH S2B, 1996; ICH4, 1997). Es werden zeit- und kostenintensive Studien durchgeführt, die in der Öffentlichkeit meist kritisch gesehen werden. Daher ist es wünschenswert Methoden zu entwickeln, die Tierversuche abkürzen und Zeit, Arbeitskraft sowie Kosten einsparen können. Dazu würde die Etablierung von Markergenen bzw. ihrer Genprodukte, die in frühen Stadien der Krebsentstehung eine Rolle spielen, und der Nachweis einer positiven Korrelation zwischen Markern und Tumorgenese beitragen. Sind hierbei, nach einer relativ kurzen Behandlungsdauer der Tiere mit der zu testenden Substanz, spezifische Veränderungen in einem oder mehreren dieser Markergene festzustellen, so sollte dies auf eine spätere Tumorentwicklung in diesen Tieren hinweisen. Optimal wäre die zuverlässige Detektion dieser Veränderungen im peripheren Blut der Tiere, eine Möglichkeit der Untersuchung, die auch auf den Menschen z.B. zum Biomonitoring nach Schadstoffexposition im Beruf, nach Unfällen o.ä. anwendbar wäre.

In dieser Arbeit wurde der Tumorsuppressor p53 auf seine Tauglichkeit als Tumormarker untersucht. Es zeigten sich Hinweise auf seine Rolle in der Hepatokarzinogenese bei Ratte und Maus, wobei die Erhebung weiteren Datenmaterials zur Untermauerung dieser Beobachtungen notwendig ist. Die Untersuchungen beschränkten sich in dieser Arbeit auf die Leber als primäres Targetorgan vieler krebserregender Stoffe. Deshalb sind Untersuchungen an weiteren Organen sowie an Blutzellen der behandelten Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten der Exposition nötig. Ferner sollten weitere Tumorsuppressorgene oder Onkogene untersucht werden, wie z.B. H-ras, K-ras, mdm2 oder Gene, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind.

Des Weiteren wäre es sinnvoll und interessant, Methoden zur Verfügung zu haben, die die Anreicherung unbekannter Mutationen in einem Überschuß an Wildtyp-DNA bis zu einem Verhältnis ermöglicht, das eine Charakterisierung der Mutanten über Sequenzierung erlaubt und damit Rückschlüsse auf Mechanismen der Tumorentstehung zuläßt.

Die Entwicklung von Tumormarkern ist ein vielfältiges und sowohl für Medizin als auch für Industrie interessantes Forschungsgebiet, das in der Prognostik und Therapie von Krebserkrankungen des Menschen schon einen wichtigen Raum einnimmt und dessen Fortschritt auch in Zukunft von Bedeutung sein wird.

6. Zusammenfassung

Krebserkrankungen sind weltweit eine der häufigsten Krankheits- und Todesursachen des Menschen. Deshalb ist die Forschung zur Krebsentstehung und –therapie ein wichtiger Zweig in Medizin und Industrie.

In der Tumorentstehung spielen eine Vielzahl an Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen eine Schlüsselrolle, indem sie wachstumsregulierende Prozesse verändern. Ein aktuelles Beispiel ist der Tumorsuppressor p53, der in über 50% der beim Menschen vorkommenden Tumore durch Mutationen oder veränderte Genexpression eine Rolle spielt und durch seine Interaktion mit Proto-Onkogenprodukten oder Tumoviren zur Krebsentstehung führen kann. In nicht mutiertem Zustand ist p53 in der Zelle als Transkriptionsfaktor in Mechanismen zur Zell-Zyklus-Kontrolle, Apoptose, Wahrung der genomischen Integrität, Neoangiogenese u.s.w.. Für die Bedeutung von p53-Mutationen in der Karzinogenese bei Mensch und Labornager gibt es eine Vielzahl an in Studien untersuchten Beispielen (siehe Kapitel „p53 in der Kanzerogenese“).

Der Schwerpunkt in dieser Arbeit lag auf der frühen und empfindlichen Detektion seltener Mutationen in genetisch inhomogenen Material mit einem hohen Hintergrund an Wildtypsequenz. Um in diesen frühen Stadien der Tumorentwicklung Aussagen über vorhandene Mutationen in bestimmten Genen machen zu können, sollte über den Vergleich mehrerer auf dem Markt verfügbarer Mutations-Detektions-Systeme das ermittelt werden, das die größte Sensitivität in der Detektion von mutierten Molekülen vor einem hohen Hintergrund an Wildtyp-Sequenz aufzuweisen hat. Aufgrund seiner großen Relevanz in der Humankanzerogenese und seiner Attraktivität als Kandidat für die Etablierung als Krebsmarker wurde p53 als Target für die folgenden Untersuchungen ausgewählt.

In dieser Arbeit wurde die Wirkung des in der Brustkrebsbekämpfung eingesetzten Therapeutikums Tamoxifen, das in der Ratte als potentes Karzinogen bekannt ist, auf das p53-Gen in Hepatocyten der Ratte sowie der Einfluß der nach in vitro-Untersuchungen als mutagen eingestuft DNA-„Farbstoffe“ Bromdeoxyuridin und Ethidiumbromid auf p53 in den Hepatocyten von Mäusen untersucht. Hierbei lag der Schwerpunkt, im Gegensatz zu den meisten publizierten Untersuchungen an genetisch homogenem Tumormaterial, in dem selektierte Mutationen oft klonal vorliegen, auf genetisch inhomogenen Material aus der frühen Hepatokanzerogenese, in dem Mutationsereignisse nur vereinzelt erwartet werden können.

Weitere Ziele waren, Aussagen über die Eignung von p53 als Tumormarker in der frühen Hepatokarziogenese zu erhalten, sowie die Untersuchung der Kanzerogenität von BrdU sowie EtBr in vivo. Auch die Veränderung der Häufigkeit und der Verteilung von Mutationsereignissen in Abhängigkeit von der Expositionsdauer sollte an den mit Tamoxifen behandelten Ratten beobachtet werden. Mit dem biddF wurde in dieser Arbeit ein System optimiert und etabliert, das mit seiner Sensitivität die Detektion von 1% mutierter DNA sicher und reproduzierbar ermöglicht. Mit seiner Hilfe lassen sich Mutationsereignisse in genetisch inhomogenen Material aus frühen Stadien der Karzinogenese identifizieren.

Durch p53-spezifische Immunhistochemie, die p53-Protein mit erhöhter Halbwertszeit in Zellen nachweisen kann, wurde nach Tamoxifen-Behandlung von Ratten eine von der Expositionsdauer abhängige intrazelluläre Akkumulation von p53 in Hepatocyten festgestellt. Mit Hilfe des biddFs konnten in 61% der untersuchten Tiere p53-Mutationen in der konservierten Region des Gens detektiert werden, wobei hier nach vorheriger Mikrodissektion immunhistochemisch p53-positiver Zellen Mutationen mit höherer Wahrscheinlichkeit gefunden werden konnten. Tamoxifen stellte sich in dieser Arbeit erneut als potentes Karzinogen dar, wobei eventuell zu Neoplasien führende Mutationsereignisse schon in frühen Stadien der Karzinogenese, d.h. nach 3-monatiger Exposition, mit dem biddF detektierbar waren.

Bei den mit Ethidiumbromid behandelten Mäusen waren weder in der p53-spezifischen Immunhistochemie noch durch die Mutationsdetektion im p53-Gen Auffälligkeiten zu beobachten. Die in Zellkulturen beobachtete Mutagenität von EtBr konnte in diesem Versuch in vivo also nicht bestätigt werden.

Nach der Behandlung mit Bromdeoxyuridin wurden, entgegen fehlender p53-Akkumulation in Hepatozyten von Mäusen, mittels biddF für 25% der behandelten Tiere Mutationen im konservierten Bereich des p53-Gens zu detektieren. Dies weist auf Veränderungen im p53-Gen hin, die nicht zu einer verlängerten Halbwertszeit des Proteins und seiner immunhistochemischen Detektierbarkeit nach intrazellulärer Akkumulation führen.

Anhand dieser Ergebnisse läßt sich feststellen, daß p53-Veränderungen in genetisch inhomogenem DNA-Material aus frühen Stadien der Tumorentstehung über biddF detektierbar sind. Führen diese p53-Mutationen zu verlängerter Halbwertszeit des Proteins, so kann p53 auch immunhistochemisch in der prä-Kanzerogenese nachgewiesen werden. Liegt keine Mutagenität der eingesetzten Substanz vor, so werden auch in der biddF keine Sequenzveränderungen detektiert. Die genaue Charakterisierung der gefundenen Mutationen via Sequenzierung war in dieser Arbeit aufgrund der geringen Sensitivität von wt:mut \leq 5:1 nicht möglich.

7. Literaturverzeichnis

Amundson S.A., Myers T.G., Fornace A.J. Jr.: *Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress.*
Oncogene 17, 3287-3299 (1998)

Agarwal M.L., Taylor W.R., Chernov M.V., Chernova O.B., Stark G.R.: *The p53 network.*
The Journal of Biological Chemistry 273, 1-4 (1998)

Ashby J., Tinwell H.: *Letter to the editor: dosing regimen for transgenic mouse mutation assays: the dangers of facing in two directions at the same time.*
Environmental Molecular Mutagenesis 25, 266-268 (1995)

Babic I., Andrew S.E., Jirik F.R.: *MutS interaction with mismatch and alkylated base containing DNA molecules detected by optical biosensor.*
Mutation Research 372, 87-96 (1996)

Bates S., Vousden K.H.: *Mechanisms of p53-mediated apoptosis.*
Cellular and Molecular Life Sciences 55, 28-37 (1999)

Bellanneé-Chantelot C., Beaufils S., Hourdel V., Lesage S., Morel V., Dessinain N., Le Gall I., Cohen D., Dausset J.: *Search for DNA sequence variations using a MutS-based technology.*
Mutation Research Genomics 382; 35-43 (1997)

Ben-Ezra J., Johnson D.A., Rossi J., Cook N., Wu A.J.: *Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction.*
Journal of Histochemistry and Cytochemistry 39, 351-354 (1991)

BioGenex
<http://www.biogenex.com>, (2000)

Biospektrum: *Paul Ehrlich- und Ludwig Darmstaedter-Preis für Krebsforscher: p53, der Wächter des Erbgutes.*
Biospektrum 2/1998, 16, Spektrum Akademischer Verlag

Bjelogrlic N.M., Mäkinen M., Stenbäck F., Vähäkangas K.: *Benzo(a)pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-DNA adducts and increased p53 protein in mouse skin.*
Carcinogenesis 15, 771-774 (1994)

Bogler, O.: *p53 and transcription.*
<http://www.bogler.net/lab/p53transcription.html> (2001)

Bringold F., Serrano M.: *Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence.*
Experimental Gerontology 35, 317-329 (2000)

Brow M.A., Oldenburg M.C., Lyamichev V., Heisler L.M., Lyamicheva N., Hall J.G., Eagan N.J., Olive D.M., Smith L.M., Fors L., Dahlberg J.E.: *Differentiation of bacterial 16S rRNA genes and intergenic regions and Mycobacterium tuberculosis katG genes by structure-specific endonuclease cleavage.* Journal of Clinical Microbiology 34, 3129-3137 (1996)

Buckbinder L., Talbott R., Velasco-Miguel S., Takenaka I., Faha B., Seizinger B.R., Kley N., Bunz F., Dutriaux A., Lengauer C., Waldman T., Zhou S., Brown J.P., Sedivy J.M., Kinzler K.W.: *Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53.*
Nature 377, 646-649 (1995)

Bunz F., Dutriaux A., Lengauer C., Waldman T., Zhou S., Brown J.P., Sedivy J.M., Kinzler K.W., Vogelstein B.: *Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage.*
Science 282,1497-501 (1998)

Bursch W., Lauer B., Timmermann-Trosiener I.: *Controlled death (apoptosis) of normal and putative preneoplastic cells in rat liver following withdrawal of tumor promoters.* Carcinogenesis 5, 453-558 (1984)

Chalkley R., Hunter C.: *Histone-histone propinquity by aldehyde fixation of chromatin.* Proceedings of the National Academy of Science USA 72, 1304-1308 (1975)

Chang J., Kim D.-H., Lee S.W., Choi K.Y., Sung Y.C.: *Transactivation ability of p53 transcriptional activation domain is directly related to the binding affinity to TATA-binding protein.* The Journal of Biological Chemistry 270, 25014-25019 (1995a)

Chang F., Syrjänen S., Syrjänen K.: *Implications of the p53 tumor-suppressor gene in clinical oncology.* Journal of Clinical Oncology 13, 1009-1022 (1995b)

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

Cho Y., Gorina S., Jeffrey P.D., Pavletich N.P.: *Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations.* Science 265, 346-355 (1994)

Culotta E., Koshland D. E. Jr.: *p53 sweeps through cancer research.* Science 262, 1958-1961 (1993)

Crook T., Tidy J.A., Vousden K.H.: *Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and transactivation.* Cell 67, 547-556 (1991)

Cunningham, M.L., Matthews H.B.: *Cell proliferation as a determining factor for the carcinogenicity of chemicals: studies with mutagenic carcinogens and mutagenic non-carcinogens.* Toxicological Letters 82/83, 9-14 (1995)

Current Protocols in Molecular Biology
John Wiley & Sons, Inc. (1995)

Dameron K.M., Volpert O.V., Tainsky M.A., Bouck N.: *The p53 tumour suppressor gene inhibits angiogenesis by stimulating the production of thrombospondin.* Cold Spring Harbour Symposium on Quantitative Biology 59, 483-489 (1994)

DeLeo A.B., Jay G., Appella E., Dubois G.C., Law L.W., Old L.J.: *Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse.* Proceedings of the National Academy of Science USA 76, 2420-2424 (1979)

DIE ZEIT, Nr.38, 15. September 1995, S.45: *Das Wächtergen.*

Donehower L.A., Harvey M., Slagle B.L., MacArthur M.J., Montgomery jr. C.A., Butel J.S., Bradley A.: *Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumors.* Nature 356, 215-221 (1992)

Dragon E.A. (Roche Molecular Systems): *Polymerase Chain Reaction.*
www.sciam.com/1998/0598issue/0598working.html, (1999)

Duchaud E., Ridet A., Delic Y., Cundari E., Moustacchi E., Rosselli F.: *Radio-induced apoptosis is impaired in individuals homozygous and heterozygous for the Ataxia Telangiectasia gene(s).* Comptes Rendues de l'Academie des Sciences Serie III-Life Sciences 317, 983-989 (1994)

- 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., Vogelstein B.: *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression.* Cell 75, 817-825 (1993)
- Fischer S.G., Lerman L.S.: *DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory.* Proceedings of the National Academy of Science USA 80, 1579-1583 (1983)
- Fisher D.E.: *Apoptosis in cancer therapie: Crossing the threshold.* Cell 78, 539-542 (1994)
- Frontiers in Bioscience: *p53*
<http://www.bioscience.org/news/newindex.htm>, (2001)
- Fujiwara T., Grimm E.A., Mukhopadhyay T., Cai D.W., Owen-Schaub L.B., Roth J.: *A retroviral wildtype p53 expression vector penetrates human lung cancer spheroids and inhibits growth by inducing apoptosis.* Cancer Research 53, 4129-4133 (1993)
- Funk J.O., Kind P.: *Zellzykluskontrolle, genetische Instabilität und Krebs.* Hautarzt 48, 157-165 (1997)
- Gorina S., Pavletich N.P.: *Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2.* Science 274, 1001-1005 (1996)
- Grafström R.C., Norén U.G., Zheng X., Elfving A., Sundqvist K.: *Growth and transformation of human oral epithelium in vitro.*
 In: Müller-Hermelink, Neumann HG, Dekant (eds): Recent Results in Cancer Research. Risk and Progression Factors in Carcinogenesis. 275-306 (1996)
- Griffith S.D., Clarke A.R., Healy L.E., Ross G., Ford A.M., Hooper M.L., Wyllie A.H., Greaves M.: *Absence of p53 promotes propagations of mutant cells following genotoxic damage.* Oncogene 9, 603-609 (1997)
- Gu W., Roeder A.G.: *Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain.* Cell 90, 595-606 (1997)
- HHMI 1995 Annual Report: Biomedical Research:p53
<http://www.hhmi.org/communic/annrep/research/p53.htm>, (2001)
- Hainaut P., Soussi T., Shomer B., Hollstein M., Greenblatt M., Hovig E., Harris C.C., Montesano R.: *Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: update compilation and future prospects.* Nucleic Acids Research 25, 151-157 (1997)
- Harbour J.W., Dean D.C.: *Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis.* Nature Cell Biology 2, E65-67 (2000)
- Hard G.C., Iatropoulos M.J., Jordan K.: *Major difference in the hepatocarcinogenicity and DNA adduct forming ability between toremifene and tamoxifen in female Crl:CD(BR) rats.* Cancer Research 53, 4534-4541 (1993)
- Harris C.C.: *p53: At the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment.* Science 262, 1980-1981 (1993)
- Harris C.C.: *p53: At the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment.* CIIT Activities 15, 1-6 (1995)

Harris C.C.: *The 1995 Walter Hubert Lecture-molecular epidemiology of human cancer: insights from the mutational analysis of the p53 tumour-suppressor gene.*
British Journal of Cancer 73, 261-269 (1996)

Hartwell L.H., Weinert T.A.: *Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events.*
Science 246, 629-634 (1989)

Hartwell L.H., Kastan M.B.: *Cell cycle control and cancer.*
Science 266, 1821-1828 (1991)

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

Hayflick L.: *Current theories of biological aging.*
Federation Proceedings 34, 9-13 (1975)

Helmes S.: *Analyse von Hodgkin-Zellen in B-Zell chronischer lymphatischer Leukämie mittels Einzelzell-PCR und Untersuchungen zur Etablierung der Einzelzell-PCR von Zellen aus Formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten Biopsaten.*
Inaugural-Dissertation zur Erlangung eines Doktorgrades der Veterinärmedizin an der freien Universität Berlin, Journal-Nr.2062 (1997)

Hermeking H., Funk J.O., Reichert M., Ellwart J.W., Eick D.: *Abrogation of p53-induced cell cycle arrest by c-Myc: evidence for an inhibitor of p21^{WAF1/CIP1/SDI1}.*
Oncogene 11, 1409-1415 (1995)

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

Hulla J.E., Schneider R.P.: *Structure of the rat p53 tumor suppressor gene.*
Nucleic Acids Research 21, 713-717 (1993)

Hulla J.E., Schneider R.P.: *Structure of the rat p53 tumor suppressor gene.*
Datenbank EM_RO, Code RNP53S1 bis RNP53S8
Rattus norvegicus tumor suppressor (p53), gene exon 1 (bis exon 11)

Hunter T., Pines J.: *Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors com of age.*
Cell 79, 573-582 (1994)

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

Hupp T.R., Sparks A., Lane D.P.: *Small peptides activate the latent sequence-specific DNA binding function of p53.*
Cell 83, 237-245 (1995)

Ibelgaufits, H.: *Gentechnologie von A-Z (Studienausgabe)*
VCH Verlag (1993)

ICH S2B *Genotoxicity: a standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals.*
Fourth international conference on harmonisation (Oktober, 1996)

ICH4 *Carcinogenicity: testing for carcinogenicity of pharmaceuticals.*
Fourth international conference on harmonisation (Juni, 1997)

Jacks T., Weinberg R.A.: *Cell-cycle control and its watchman.*
Nature 381, 643-644 (1996)

- Jackson P., Mastrangelo I., Reed M., Tegtmeyer P., Yardley G., Barrett J.: *Synergistic transcriptional activation of the MCK promotor by p53: tetramers link separated DNA response elements by DNA looping.*
Oncogene 16, 283-292 (1998)
- Jay G., Khoury G., DeLeo A.B., Dippold W.G., Old L.J.: *p53 transformation-related protein: detection of an associated phosphotransferase activity.*
Proceedings of the National Academy of Science USA 78, 2932-2936 (1981)
- Jayaraman L., Prives C.: *Activation of p53 sequence-specific DNA binding by short single strands of DNA requires the p53 C-terminus.*
Cell 81, 1021-1029 (1995)
- Jeffrey P.D., Gorina S., Pavletich N.P.: *Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms.*
Science 267, 1498-1502 (1995)
- Jenkins G.J.S., Suzen H.S., Sueiro R.A., Parry J.M.: *Review: The restriction site mutation assay: a review of the methodology development and the current status of the technique.*
Mutagenesis 14, 439-448 (1999)
- Jolly C.J., Klix N., Neuberger M.S.: *Rapid methods for the analysis of immunoglobulin gene hypermutation: an application to transgenic and gene targeted mice.*
Nucleic Acids Research 25, 1913-1919 (1997)
- Jordan C.: *Tamoxifen for breast cancer prevention.*
Society for Experimental Biology and Medicine (Minireview), 144-149 (1995)
- Kannan K., Amariglio N., Rechavi G., Jakob-Hirsch J., Kela I., Kaminski N., Getz G., Domany E., Givol D.: *DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53.*
Oncogene 20, 2225-2234 (2001)
- Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I., Khorana H.G.: *Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases.*
Journal of Molecular Biology 56, 341-361 (1971)
- Knudson A.G.: *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.*
Proceedings of the National Academy of Science USA 68, 820-823 (1971)
- Knudson A.G.: *Two-event carcinogenesis: roles of oncogenes and antioncogenes.*
In: S.H.Moolgavkar (ed.), Scientific Issues in Quantitative Cancer Risk Assessment, 32-48 (1990)
- Ko L.J., Prives C.: *p53: Puzzle and paradigm.*
Genes and Development 10, 1054-1072 (1996)
- Kubbutat M.H.G., Jones S.N., Vousden K.H.: *Regulation of p53 stability by Mdm2.*
Nature 387, 299-303 (1997)
- Lahue R.S., Au K.G., Modrich P.: *DNA mismatch correction in a defined system.*
Science 245, 160-164 (1989)
- Lane D.P., Crawford L.V.: *T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells.*
Nature 278, 261-263 (1979)
- Lassus P., Ferlin M., Piette J., Hibner U.: *Anti-apoptotic activity of low levels of wild-type p53.*
EMBO Journal 15, 4566-4573 (1996)
- Lavigne A., Maltby V., Mock D., Rossant J., Pawson T., Bernstein A.: *High incidence of lung, bone and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene.*
Molecular and Cellular Biology 9, 3982-3991 (1989)

Levine A.J., Momand J., Finlay C.A.: *The p53 tumor suppressor gene.*
Nature 351, 453-456 (1991)

Levine A.J.: *p53, the cellular gatekeeper for growth and division.*
Cell 88, 323-331 (1997)

Lin J., Wu X., Chen J., Chang A., Levine A.J.: *Functions of the p53 protein in growth regulation and tumor suppression.*
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 59, 215-223 (1994)

Linden M.D., Nathanson S.D., Zarbo R.J.: *Evaluation of anti-p53 antibody staining. Quality control and technical considerations.*
Applied Immunohistochemistry 2, 218-224 (1994)

Linden M.D. , Nathanson S.D., Zarbo R.J.: *Evaluation of anti-p53 antibody staining immunoreactivity in benign tumors and nonneoplastic tissues.*
Applied Immunohistochemistry 3, 232-238 (1995)

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

Lishanski A., Ostrander E.A., Rine J.: *Mutation detection by mismatch binding protein, MutS, in amplified DNA: Application to the cystic fibrosis gene.*
Proceedings of the National Academy of Science 91, 2674-2678 (1994)

Liu J., Su F., Chen D., Shiloh A., Gu W.: *Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis.*
Nature 408, 377-381 (2000)

Liu Q., Feng J., Sommer S.S.: *Bi-directional dideoxy fingerprinting (Bi-ddF): a rapid method for quantitative detection of mutations in genomic regions of 300-600 bp.*
Human Molecular Genetics 5, 107-114 (1996)

Liu X., Miller C.W., Koeffler P.H., Berk A.J.: *The p53 activation domain binds the TATA box-binding polypeptide in Holo-TFIID, and a neighbouring p53 domain inhibits transcription.*
Molecular and Cellular Biology 13, 3291-3300 (1993)

Macleod K.: *Tumor suppressor genes.*
Current Opinion in Genetics & Development 10, 81-93 (2000)

Malkin D.: *p53 and the Li Fraumeni syndrome.*
Cancer Genetics and Cytogenetics 66, 83-92 (1993)

Maltzman W., Czyzyk L.: *UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells.*
Molecular and Cellular Biology 4, 1689-1694 (1984)

Marks F: *Chemical carcinogenesis. The multistage approach.*
Interdisciplinary Sciences Review 14, 233 ff., (1989)

Maxam A.M., Gilbert W.: *A new method for sequencing DNA.*
Proceedings of the National Academy of Science 74, 560-564 (1977)

Merrit A.J., Potten C.S., Kemp C.J., Hickmann J.A., Balmain A., Lane D.P., Hall P.A.: *The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice.*
Cancer Research 54, 614-617 (1994)

Mitchell K.R., Warshawsky D.: *Frequent Ha-ras mutations in murine skin and liver tumors induced by 7H-Dibenzo[c,g]carbazole.*
Molecular Carcinogenesis 25, 107-112 (1999)

Moll U.M., Riou G., Levine A.J.: *Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion.*
Proceedings of the National Academy of Science USA 89, 7262-7266 (1992)

Momand J., Zambetti G.P., Olson D.C., George D., Levine A.J.: *The mdm2-oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation.*
Cell 69, 1237-1245 (1992)

Mullis K.B., Faloona F., Scharf S.J., Saiki R.K., Horn G.T., Erlich H.A.: *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.*
Cold Spring Harbour Symposium on Quantitative Biology 51, 263-273 (1986)

Myers R.M., Fischer S.G., Lerman L.S., Maniatis T.: *Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis.*
Nucleic Acids Research 13, 3131-3145 (1985a)

Myers R.M., Fischer S.G., Lerman L.S., Maniatis T.: *Modification of the melting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis.*
Nucleic Acids Research 13, 3111-3129 (1985b)

National Toxicology Program: *Ethidium Bromide.*
http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/Results_Status/Resstate/M940107.Html (2001)

National Toxicology Program: *The 9th report on carcinogens' (RoC) listing of Tamoxifen as a known human carcinogen.*
<http://ntp-server.niehs.nih.gov/NewHomeRoc/TamoxFacts.html> (2000)

NCBI Genes and disease Map
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/disease/chr17-20.html> (2001)

Nelson M., McClelland M.: *Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes.*
Methods in Enzymology 216, 279-303 (1992)

Nishimori H., Shiratsuchi T., Urano T., Kimura Y., Kiyono K., Tatsumi K., Yoshida S., Ono M., Kuwano M., Nakamura Y., Tokino T.: *A novel brain-specific p53-target gene, BAI1, containing thrombospondin type 1 repeats inhibits experimental angiogenesis.*
Oncogene 15, 2145-2150 (1997)

Oldenburg M.C., Siebert M.: *New Cleavase[®] Fragment Length Polymorphism method improves the mutation detection assay.*
BioTechniques 28, 351-357 (2000)

Oren M.: *Regulation of the p53 tumor suppressor protein.*
The Journal of Biological Chemistry 274, 36031-36034 (1999)

Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T.: *Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms.*
Proceedings of the National Academy of Science 86, 2766-2770 (1989a)

Orita M., Suzuki Y., Sekiya T., Hayashi K.: *Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction.*
Genomics 5, 874-879 (1989b)

- Parry J.M., Shamsher M., Skibinski D.O.F.: *Restriction site mutation analysis, a proposed methodology for the detection and study of DNA base changes following mutagen exposure.* Mutagenesis 5, 209-212 (1990)
- Parsons B., Heflich R.H.: *Evaluation of MutS as a tool for direct measurement of point mutations in genomic DNA.* Mutation Research 374, 277-285 (1997)
- Pitot H.C.: *The dynamics of carcinogenesis: Implications for human risk.* CIIT Activities Vol.13 No.6, 1-7 (1993)
- Polyak K., Waldman T., He T.C., Kinzler K.W., Vogelstein B.: *Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest.* Genes and Development 10, 1945-1952 (1996)
- Poremba C., Bankfalvi A., Dockhorn-Dworniczak B.: *Das Tumorsuppressorgen p53.* Pathologie 17, 181-188 (1996)
- Prisco M., Hongo A., Rizzo M.G., Sacchi A., Baserga R.: *The insulin-like growth factor I receptor as a physiologically relevant target of p53 in apoptosis caused by interleukin-3 withdrawal.* Molecular and Cellular Biology 17, 1084-1092 (1997)
- Prives C.: *How loops, β sheets, and α helices help us to understand p53.* Cell 78, 543-546 (1994)
- Prives C., Hall P.A.: *The p53 pathway.* Journal of Pathology 187, 112-126 (1999)
- Roberts R.A., Nebert D.W., Hickmann J.A., Richburg J.A., Goldsworthy T.L.: *Symposium overview: perturbation of the mitosis/apoptosis balance: a fundamental mechanism in toxicology.* Fundamental Applications of Toxicology 38, 107-115 (1997)
- Rosenbaum V., Riesner D.: *Temperature-gradient gel electrophoresis. Thermodynamic analysis of nucleic acids and proteins in purified form and in cellular extracts.* Biophysical Chemistry 26, 235-246 (1987)
- Roth J., Dobbstein M., Freedman D.A., Shenk T., Levine A.J.: *Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein.* EMBO Journal 17, 554-564 (1998)
- Rothmann T., Hengstermann A., Whitaker N.J., Scheffner M., zur Hausen H.: *Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells.* Journal of Virology 72, 9470-9478 (1998)
- Rovensky Y.A.: *Cellular and molecular mechanisms of tumor invasion.* Biochemistry (Moscow) 63, 1029-1043 (1998)
- Sakaguchi K., Herrera J.E., Saito S., Miki T., Bustin M., Vassilev A., Anderson CW., Appella E.: *DNA damage activates p53 through a phosphorylation acetylation cascade.* Genes and Development 12, 2831-2841 (1998)
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.: *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proceedings of the National Academy of Science 74, 5463-5467 (1977)
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A.: *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.* Science 239, 487-491 (1988)

- Sarkar G., Yoon H.S., Sommer S.S.: *Dideoxy fingerprinting (ddF): a rapid and efficient screen for the presence of mutations.*
Genomics 13, 441-443 (1992)
- Scheffner M., Werness B.A., Huibregtse J.M., Levine A.J., Howley P.M.: *The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus type 16 and 18 promotes the degradation of p53.*
Cell 63, 1129-1136 (1990)
- Schulte-Hermann R.: *Tumor promotion in the liver.*
Archives of Toxicology 57, 147-158 (1985)
- Shai J.W., Werbin H., Funk W.D., Wright W.E.: *Cellular and molecular advances in elucidating p53 function.*
Mutation Research 277, 163-171 (1992)
- Sheffield V.C., Cox D.R., Lerman L.S., Myers R.M.: *Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes.*
Proceedings of the National Academy of Science 86, 232-236 (1989)
- Shevchenko Y.O., Bale S.J., Compton J.G.: *Mutation screening using automated bidirectional dideoxy fingerprinting.*
BioTechniques 28, 134-138 (2000)
- Sionov R.V., Haupt Y.: *The cellular response to p53: the decision between life and death.*
Oncogene 18, 6145-6157 (1999)
- Soussi T., Caron de Fromental C., May P.: *Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution.*
Oncogene 5, 945-952 (1990)
- Soussi T., Legros Y., Lubin R., Ory K., Schlichtholz B.: *Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review.*
International Journal of Cancer 57, 1-9 (1994)
- Soussi T.: http://perso.curie.fr/Thierry.Soussi/p53_mutation.html, (2001)
- Soussi T.: *The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation.*
Annals of the New York Academy of Sciences 910, 121-137 (2000a)
- Soussi T., Dehouche K., Bérout C.: *p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis.*
Human Mutation 15, 105-113 (2000b)
- Speir E., Modali R., Huang E.S., Leon M.B., Shawl F., Finkel T., Epstein S.E.: *Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis.*
Science 265, 391-394 (1994)
- Spindler K.-D.: *Vergleichende Endokrinologie.*
Georg Thieme Verlag GmbH (1997)
- Sreevatsan S., Bookout J.B., Ringpis F.M., Mogazeh S.L., Kreiswirth B.N., Pottathil R.R., Barathur R.R.: *Comparative evaluation of cleavase fragment length polymorphism with PCR-SSCP and PCR-RFLP to detect antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis.*
Molecular Diagnosis 3, 81-91 (1998a)
- Sreevatsan S., Bookout J.B., Ringpis F.M., Pottathil M.R., Marshall D.J., De Arruda M., Murvine C., Fors L., Pottathil R.M., Barathur R.R.: *Algorithmic approach to high-throughput molecular screening for alpha interferon-resistant genotypes in hepatitis C patients.*
Journal of Clinical Microbiology 36, 1895-1901 (1998b)

Stanbridge E.J.: *Human tumor suppressor genes*.
Annual Reviews of Genetics 24, 615-657 (1990)

STRATAGENE: PCR-Script™ Amp Cloning Kit Instruction Manual, p. 1 (1998a)

STRATAGENE: <http://www.stratagene.com/pcr/perscript1.htm>, July (2000a)

Stryer L.: *Biochemie*.
Spektrum Akademischer Verlag GmbH (1994)

Stuitje A.R., Veltkamp E., van den Elzen P.J., Nijkamp H.J.: *In vitro construction of deletion mutants of the bacteriocinogenic plasmid Clo DF13*.
Nucleic Acids Research 5, 1801-1820 (1978)

Su S.-S., Modrich P.: *Escherichia coli mutS-encoded protein binds to mismatched DNA base pairs*.
Proceedings of the National Academy of Science 83, 5057-5061 (1986)

Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski DP., Penninger J.M., Kroemer G.: *Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor*.
Nature 397, 441-446 (1999)

Su S.-S., Lahue R.S., Au K.G., Modrich P.: *Mispair specificity of methyl-directed DNA mismatch correction in vitro*.
The Journal of Biological Chemistry 263, 6829-6835 (1988)

Szekely L., Selivanova G., Magnusson K.P.: *EBNA5, an Epstein Barr virus encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma p53 proteins*.
Proceedings of the National Society of Science USA 90, 5455-5459 (1993)

Taq PCR Handbuch
QIAGEN, 1997

The Role of p53 in the Cell Cycle and its Link to Cancer.
<http://attila.stevens-tech.edu/chembio/spinel/index.htm> (2001)

THIRD WAVE TECHNOLOGIES: <http://www.twt.com/reagentinsert.html>, July (2000)

Truant R., Xiao H., Ingles C.J., Greenblatt J.: *Direct interaction between the transcriptional activation domain of human p53 and the TATA box-binding protein*.
The Journal of Biological Chemistry 268, 2284-2287 (1993)

Ullrich S.J., Anderson C.W., Mercer W.E., Appella E.: *The p53 tumor suppressor protein, a modulator of cell proliferation*.
The Journal of Biological Chemistry 267, 15259-15262 (1992a)

Ullrich S.J., Mercer W.E., Appella E.: *Human wild-type p53 adopts a unique conformational and phosphorylation state in vivo during growth arrest of glioblastoma cells*.
Oncogene 7, 1635-1643 (1992b)

Vancutsem P.M., Lazarus P., Williams G.M.: *Frequent and specific mutations of the rat p53 gene in hepatocarcinomas induced by tamoxifen*.
Cancer Research 54, 3864-3867 (1994)

Varmus H., Weinberg R.A.: *Gene und Krebs. Biologische Wurzeln der Krebsentstehung*.
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg (1994)

Vogelstein B., Kinzler K.W.: *p53 function and dysfunction*.
Cell 70, 523-526 (1992)

Vogelstein B., Kinzler K.W.: *X-rays strike p53 again.*
Nature 370, 174-175 (1994)

Wagener C.: *Einführung in die molekulare Onkologie, Veränderung und Wirkung von Tumorgenen und Tumorproteinen.*
Thieme Verlag (1996)

Wagner R., Debbie P., Radman M.: *Mutation detection using immobilized mismatch binding protein (MutS).*
Nucleic Acids Research 23, 3944-3948 (1995)

Wang X.W., Forrester K., Yeh H.: *Hepatitis B virus x protein inhibits p53 sequence specific DNA binding, transcriptional activity and association with transcription factor ERCC3.*
Proceedings of the National Academy of Science USA 91, 2230-2234 (1994)

Wang X.W., Yeh H., Schaeffer L., Roy R., Moncollin V., Egly J.M.: *p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity.*
Nature Genetics 10, 188-195 (1995)

Wartell R.M., Hosseini S., Powell S., Zhu J.: *Detecting single base substitutions, mismatches and bulges in DNA by temperature gradient gel electrophoresis and related methods.*
Journal of Chromatography A 806, 169-185 (1998)

Watzinger F., Mayr B., Haring E., Lion T.: *High sequence similarity within ras exons 1 and 2 in different mammalian species and phylogenetic divergence of the ras gene family.*
Mammalian Genome 9, 214-219 (1998)

Weinberg R.A.: *Wie Krebs entsteht.*
Spektrum der Wissenschaft Spezial 5, 7-17 (1996)

Weiner M.P., Costa G.L., Schoettlin W., Cline J., Mathur E., Bauer J.C.: *Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction.*
Gene 151, 119-123 (1994)

Werner H., Karnieli E., Rauscher F.J.III, LeRoith D.: *Wild type and mutant p53 differentially regulate transcription of insulin-like growth factor I receptor gene.*
Proceedings of the National Academy of Science USA 93, 8318-8323 (1996)

WHO/ Sikora K.: *Developing a global strategy for cancer.*
http://www.who.int/ncd/cancer/publications/abstracts/abs9810_28.html (2001)

Williams C., Pontén F., Moberg C., Söderkvist P., Uhlén M., Pontén J., Sitbon G., Lundeberg J.: *A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens.*
American Journal of Pathology 155, 1467-1471 (1999)

Wirnitzer U., Enzmann H., Rosenbruch M., Bomhard E.M.: *Accumulation of p53 protein in chemically induced oval cells during early stages of rodent hepatocarcinogenesis.*
Carcinogenesis 16, 697-701 (1995)

Wogan G.N.: *Review of the toxicology of tamoxifen.*
Seminars in Oncology 24, 5184-5197 (1997)

Wyllie A.H.: *Apoptosis and carcinogenesis.*
European Journal of Cell Biology 73, 189-197 (1997)

Wu Y., Hayes V.M., Osinga J., Mulder I.M., Loomann M.W.G., Buys C.H.C.M., Hofstra R.M.W.: *Improvement of fragment and primer selection for mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis.*
Nucleic Acids Research 26, 5432-5440 (1998)

Wulfert, M.: *Prion research with TGGE; The TGGE-System. A fast method for differentiation between wild type and mutant DNA of the human prion protein gene.*
http://www.biometra.de/pages/inhalt/inhalt_applications_i_0198.htm (2001)

Yin Y., Tainsky M.A., Bischoff F.Z., Strong L.C., Wahl G.M.: *Wildtype p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles.*
Cell 70, 937-948 (1992)

Zambetti G.P., Bargonetti J., Walker K., Prives C., Levine A.J.: *Wild-type p53 mediates positive regulation of gene expression through a specific DNA sequence element.*
Genes & Development 6, 1143-1152 (1992)

zur Hausen H.: *Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis.*
Journal of the National Cancer Institute 92, 690-698 (2000)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Identifizierung und Charakterisierung molekularbiologischer Veränderungen am Beispiel des Tumorsuppressors p53 in der Tamoxifen- bzw. Bromdeoxyuridin-induzierten Karzinogenese im Labornager“ selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich habe die vorgelegte Dissertation weder in dieser noch in ähnlicher Form bei einer anderen Fakultät eingereicht.

Lebenslauf

Name: Virginia Marossek

Adresse: Jägerhofstraße 110
42119 Wuppertal

Geburtsdatum: 05.02.1972

Geburtsort: Wuppertal

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Konfession: evangelisch

Schulbildung:

08 1978 – 06 1982 Grundschole in Wuppertal

08 1982 – 06 1991 Städtisches Gymnasium Sedanstraße in Wuppertal

Studium:

10 1991 – 09 1992 Studium der Fachrichtung Chemie (Schwerpunkt Biotechnologie)
an der FH Niederrhein, Krefeld

10 1992 – 09 1998 Studium der Fachrichtung Biologie (Diplom) an der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf;

14.02.1995 Diplomvorprüfung

28.05.1998 Diplomprüfung

Thema der Diplomarbeit „Die Rolle der zeitabhängig veränderten p53 Expression bei
Tamoxifen-induzierter Hepatokanzerogenese im Nagetier“

Promotion:

10 1998 – 11 2001 Dissertation am Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf; Prof. Dr. W. Kunz und im Pharmaforschungszentrum
der Bayer AG, Wuppertal, Priv.-Doz. Dr. H.-W. Vohr

Thema der Dissertation „Identifizierung und Charakterisierung molekularbiologischer
Veränderungen am Beispiel des Tumorsuppressors p53 in der
Tamoxifen- bzw. Bromdeoxyuridin-induzierten Karzinogenese im
Labornager“