

Funktionelle Charakterisierung neuer Isoformen des Tumorsuppressors p53

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Diplom-Biologin

Vilma Ulrike Franziska Graupner

aus Berlin

April 2008

Aus dem Institut für Molekulare Medizin
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff

Koreferent: Prof. Dr. Frank Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 16.06.2008

*Die Schlechten siegen, untergehn die Wackern,
Statt Myrten lobt man nur die dürren Pappeln,
Worein die Abendwinde tüchtig rappeln,
Statt stiller Glut lobt man nur helles Flackern.*

*Vergebens wirst du den Parnaß beackern
Und Bild auf Bild und Blum auf Blume stapeln,
Vergebens wirst du dich zu Tode zappeln, -
Verstehst du nicht, noch vor dem Ei zu gackern.*

*Auch mußt du wie ein Kampfstier dich behörnen,
Und Schutz- und Trutz-Kritiken schreiben lernen,
Und kräftig oft in die Posaune schmettern.*

*Auch schreibe nicht für Nachwelt, schreib für Pöbel,
Der Knalleffekt sei deiner Dichtung Hebel, -
Und bald wird dich die Galerie vergöttern.*

Heinrich Heine

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	1
Abkürzungen.....	4
1. Einleitung	7
1.1. Formen des Zelltods	7
1.2. Apoptose im Nematoden <i>Caenorhabditis elegans</i>	9
1.3. Caspasen – Schlüsselenzyme der Apoptose.....	10
1.4. Apoptosesignalwege.....	12
1.4.1. Todesrezeptor-vermittelte Apoptose.....	12
1.4.2. Mitochondrialer Apoptosesignalweg	15
1.5. Die Bcl-2-Proteinfamilie	16
1.6. Das Tumorsuppressorprotein p53	20
1.6.1. Die Regulation des Transkriptionsfaktors p53.....	22
1.6.2. Nicht-transkriptionelle Funktion von p53	25
1.6.3. p53-Isoformen.....	25
1.6.4. Die <i>p53</i> -Genfamilie: <i>p63</i> und <i>p73</i>	28
1.7. Seneszenz	30
1.8. Zielsetzung der Arbeit.....	32
2. Material und Methoden	33
2.1. Chemikalien und Reagenzien	33
2.2. Antikörper.....	35
2.3. Konstruktion von Reportergenplasmiden.....	36
2.4. Klonierung der Expressionsplasmide unterschiedlicher p53-Isoformen	38
2.5. PCR, DNA-Restriktion und Ligation.....	39
2.6. Transformation	40
2.7. Plasmidpräparation.....	41
2.8. Zellkultur.....	41
2.8.1. Zelllinien	41
2.8.2. Kultivierung.....	41
2.9. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	42
2.10. Kryokonservierung eukaryotischer Zellen.....	42
2.11. Inkubation mit Etoposid und Camptothecin.....	42
2.12. Bestrahlung	43
2.13. Applikation der Inhibitoren MG-132, QVD und CI-I	43
2.14. Transfektion.....	43

2.14.1.	Generierung stabiler klonaler RKO-Zelllinien.....	43
2.14.2.	Generierung stabiler MCF-7 bulk-Kulturen	43
2.14.3.	Transfektion zur transienten Genexpression	43
2.15.	Luciferase-Reportergenanalyse	44
2.16.	Proteinanalytische Methoden	45
2.16.1.	Gewinnung von Totalextrakten	45
2.16.2.	Gewinnung nukleärer Fraktionen	45
2.16.3.	Gewinnung mitochondrialer Fraktionen.....	46
2.16.4.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem BCA-Reagenz.....	46
2.16.5.	Immunpräzipitation	47
2.16.6.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	47
2.16.7.	Western Blot.....	48
2.16.8.	Immundetektion.....	48
2.17.	Gel-Retardations-Analyse	49
2.18.	Durchflußzytometrische Quantifizierung des zellulären DNA-Gehalts	50
2.19.	Immunfluoreszenz	51
2.20.	Nachweis der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Aktivität.....	51
3.	Ergebnisse	53
3.1.	Generierung stabiler klonaler Zelllinien zur Expression unterschiedlicher p53-Isoformen	53
3.2.	Die Isoformen p53 β und p53 γ werden weniger effizient durch das Proteasom abgebaut	57
3.3.	Einfluss der p53-Isoformen auf die Expression Apoptose- und Zellzyklusarrest-assoziiierter Proteine	59
3.4.	p53 β und p53 γ beeinflussen nicht die durch wtp53 induzierte Apoptose	62
3.5.	Einfluss der p53-Isoformen auf den Zellzyklusarrest.....	65
3.6.	p53 β und p53 γ haben keinen Einfluss auf Seneszenz in MCF-7-Zellen.....	67
3.7.	p53 β und p53 γ sind nicht an den Mitochondrien lokalisiert.....	68
3.8.	wtp53, p53 β und p53 γ sind im Nukleus lokalisiert	69
3.9.	Einfluss von p53 β und p53 γ auf die durch wtp53-induzierte Transgenexpression... ..	72
3.10.	DNA-Bindungsaktivität der p53-Isoformen.....	75
3.11.	Interaktion der p53-Isoformen miteinander	77
3.12.	Interaktion der p53-Isoformen mit Bindungspartnern	80
3.13.	bak ist ein Zielgen von p53	82

3.14.	Bindung von p53 an seine Konsensussequenz innerhalb der bak-Promotorregion.....	86
4.	Diskussion.....	89
4.1.	p53 wird durch Caspasen gespalten	90
4.2.	Verminderter Abbau von p53 β und p53 γ durch das Proteasom.....	91
4.3.	p53 β und p53 γ haben keinen Einfluss auf Apoptose- oder Zellzyklusarrest-relevante Proteine.....	93
4.4.	p53 β und p53 γ haben keinen Einfluss auf wtp53-induzierte Apoptose	95
4.5.	p53 β und p53 γ haben keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung.....	96
4.6.	Einfluss von p53 β und p53 γ auf Seneszenz.....	97
4.7.	p53 β und p53 γ haben keine Transkriptions-unabhängige Funktion	98
4.8.	Alle p53-Isoformen sind in unterschiedlichen Mengen im Nukleus und im Zytoplasma lokalisiert	99
4.9.	p53 β und p53 γ besitzen keine transaktivierende Funktion	100
4.10.	p53 β und p53 γ binden nicht an DNA	102
4.11.	p53 β und p53 γ sind Oligomerisierungs-defizient.....	102
4.12.	Abschließende Betrachtung zur Charakterisierung der p53-Isoformen.....	103
4.13.	bak ist ein Zielgen von p53	106
4.14.	Die Regulation des bak-Promotors: Ein Ausblick.....	108
5.	Zusammenfassung	109
6.	Referenzen.....	112
7.	Anhang.....	127

Abkürzungen

7-AAD	7-Aminoaktinomycin-D
Ac	Acetylierung
AIF	<i>apoptosis-inducing factor</i>
ANT	Adenin-Nukleotid-Transporter
APAF-1	<i>apoptotic protease-activating factor 1</i>
APO-1	<i>apoptosis receptor 1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	<i>alternative reading frame</i>
ARF-BP1	<i>ARF-binding protein 1</i>
AS	<i>alternative splice</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ataxia telangiectasia and Rad3-related protein</i>
Bad	<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>
Bak	<i>Bcl-2 antagonist / killer</i>
Bax	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-x _{L/S}	<i>Bcl-2 like 1 (long / short)</i>
BD	basische Domäne
Bfl-1	<i>Bcl-2-related gene expressed in fetal liver 1</i>
BH	Bcl-2 Homologie
Bid	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
Bik/Nbk	<i>Bcl-2 interacting killer / natural born killer</i>
Bim	<i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
Bmf	<i>Bcl-2-modifying factor</i>
Bok	<i>Bcl-2-related ovarian killer protein</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
CBP	<i>CREB binding protein</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i> (Cyclin-abhängige Kinase)
CED (3,4,9)	<i>cell death defective (3,4,9)</i>
c-FLIP _{S/L}	<i>cellular FLICE-inhibitory protein (short / long)</i>
Chk	<i>checkpoint kinase</i>
CI-I	Calpain-Inhibitor 1
CK1/2	Kaseinkinase 1/2
CKI	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i> (Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen)
CMV	Cytomegalovirus
COP1	<i>constitutively photomorphogenic 1</i>
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DBD	DNA-bindende Domäne
DcR	<i>decoy receptor</i>
DD	<i>death domain</i> (Todesdomäne)
DED	<i>death effector domain</i> (Todeseffektordomäne)
DFF/CAD	<i>DNA fragmentation factor / caspase-activated DNase</i>
DISC	<i>death-inducing signalling complex</i> (todesinduzierender Signalkomplex)
DKO	<i>double knockout</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DR	<i>death receptor</i> (Todesrezeptor)
DTT	Dithiothreitol
DYRK2	<i>dual-specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 2</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>

EDA1	Ektodysplasin A 1
EDAR	Ektodysplasin A Rezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-tetraessigsäure
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FKS	fötales Kälberserum
FLICE	<i>FADD-like Interleukin-1β-converting enzyme</i> (Caspase-8)
G	<i>gap</i> (Lücke)
GADD45	<i>growth arrest and DNA damage-inducible protein 45</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HDAC	<i>histone deacetylase</i>
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HIPK2	<i>homeodomain-interacting protein kinase 2</i>
Hrk/DP5	<i>Harakiri / death protein 5</i>
HRP	<i>horseradish-peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
I	Inosin
IAP	<i>inhibitor of apoptosis proteins</i>
ICAD	<i>inhibitor of CAD</i>
IgG	Immunglobulin G
IKK	<i>I-κB kinase</i>
I- κ B	<i>inhibitor of κ B</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KO	<i>knockout</i>
LB	Luria-Bertani
M	Methylierung
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
Mcl-1	<i>myeloid leukemia cell differentiation protein</i>
MDM2	<i>mouse double minute 2 protein</i>
MDP	Multidomänenprotein
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i>
MKK	<i>MAP kinase kinase</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N	Neddylierung
NC	Nitrozellulose
NES	nukleäres Exportsignal
NF- κ B	<i>nuclear factor κ B</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NGFR	<i>nerve growth factor receptor</i>
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
NP-40	Nonidet P-40, Nonylphenoxypolyethoxyethanol
NS	<i>normal splice</i>
P	Phosphorylierung
p53AIP1	<i>p53-regulated apoptosis-inducing protein 1</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
PCAF	<i>p300/CBP-associated factor</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
Pirh2	<i>p53-induced, RING-H2 domain containing</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRD	Prolin-reiche Domäne
PT	<i>permeability transition</i>
Pu	Purinbase
Puma	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
Py	Pyrimidinbase
Q-VD-OPH	N-(2-chinoyl)-valyl-aspartyl-(2,6-difluorophenoxy)-methyl-ke-ton
RE	<i>responsive element</i>

RGC	<i>ribosomal gene cluster</i>
RIP1	<i>receptor-interacting protein 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S	Synthese
SA	Seneszenz-assoziiert
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
Smac/Diablo	<i>second mitochondria-derived activator of caspases / direct IAP binding protein with low pI</i>
SU	Sumoylierung
TAD	transaktivierende Domäne
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
tBid	<i>truncated Bid</i> (gespaltenes Bid)
TD	Tetramerisierungsdomäne
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T _m	<i>melting temperature</i> (Anlagerungstemperatur)
TM	Transmembrandomäne
TNF	<i>tumour necrosis factor</i>
TNFR	<i>tumour necrosis factor receptor</i>
TOM	<i>translocase of the outer mitochondrial membrane</i>
TRADD	<i>TNFR-associated protein with death domain</i>
TRAF	<i>TNFR-associated factor</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAILR	TRAIL-Rezeptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton-X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Ub	Ubiquitylierung
VDAC	<i>voltage dependent anion channel</i>
wt	Wildtyp

1. Einleitung

Die Entwicklung multizellulärer Organismen bedarf einer präzise kontrollierten Balance zwischen Zellproliferation, Differenzierung und Zelltod. Die Regulation der Apoptose (Kerr *et al.* 1972), der am besten charakterisierten Form des programmierten Zelltods, ist ein wichtiger Aspekt, diese Balance zu erhalten. Sie stellt die Eliminierung überflüssiger oder geschädigter Zellen sicher, welche anderenfalls schädliche Auswirkungen auf den gesamten Organismus hätten. So spielt die Apoptose eine entscheidende Rolle bei der Embryonalentwicklung, bei der Differenzierung und Homöostase von Gewebe und der Reaktion auf Pathogene. Störungen der Apoptoseregulation können in verschiedenen Erkrankungen resultieren. Eine zu hohe Apoptoserate wird im Rahmen der T-Zelldepletion bei HIV-Infektionen oder neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Erkrankung beobachtet. Bei der Ausbildung maligner Tumore kommen zwei Aspekte zum Tragen: zum einen die unkontrollierte Zellproliferation und zum anderen die Inaktivierung von Zelltodsignalwegen.

1.1. Formen des Zelltods

Apoptose ist eine aktive Form des Zelltods, welche durch distinkte Signale und Signalwege reguliert ist und mit typischen morphologischen Veränderungen der Zelle einhergeht. Zu den klassischen Merkmalen gehören das Schrumpfen der Zelle, das Ausstülpfen der Zellmembran und die Chromatinkondensation. Die Zerstörung des Zytoskeletts führt zunächst zur Ausbildung von Ausstülpungen an der Zelloberfläche, die später als apoptotische Körperchen – membranumgebene Zellfragmente - abgeschnürt werden. Auch die Asymmetrie der Lipidverteilung in der Plasmamembran geht im Verlauf der Apoptose verloren und infolgedessen wird Phosphatidylserin, das in vitalen Zellen auf der Innenseite der Membran lokalisiert ist, von apoptotischen Zellen auch auf der Membranaußenseite präsentiert. Dies trägt zur Erkennung durch Makrophagen bei (Fadok *et al.* 1992). Apoptotische Zellen werden über Phagozytose aus dem Organismus entfernt, so dass eine Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe vermieden wird. Weiterhin werden Endonukleasen aktiviert, die chromosomale DNA in internukleosomale Fragmente, mit einer Größe von ca. 180 – 200 bp oder Vielfachen davon, spalten (Kerr *et al.* 1994). Die Aktivierung bestimmter Proteasen, der Caspasen, welche zelluläre Proteine spalten, ist ein zentraler biochemischer Aspekt der Apoptose.

Ebenso wie Apoptose ist auch Autophagie ein aktiver, regulierter Prozess, bei dem Zellbestandteile degradiert werden. Im Gegensatz zur Apoptose dient die Autophagie jedoch in erster Linie dem Überleben der Zelle, wenn Nährstoffe oder Wachstumsfaktoren limitiert sind. Unter diesen Bedingungen werden zelluläre Bestandteile (wie Proteine, Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum oder Ribosomen) in membranumgebenen Vesikeln, den

Autophagosomen, eingeschlossen. Die Membran des Autophagosoms fusioniert später mit dem Lysosom, wonach es durch die lysosomalen Proteasen zu einem Abbau der zellulären Bestandteile kommt. Die erzeugten Abbauprodukte werden der Zelle anschließend als Ausgangsstoffe des Stoffwechsels wieder zugeführt (Levine und Yuan 2005). Erst wenn die Limitierung von Wachstumsfaktoren dauerhaft anhält, geht die Zelle durch Autophagie zugrunde. Die Induktion von Apoptose durch Entzug von Wachstumsfaktoren kann durch Autophagie verhindert bzw. hinausgezögert werden (Boya *et al.* 2005). Autophagie kann aber auch als alternativer Zelltodsignalweg fungieren, wenn Apoptose durch den *knockout* essentieller Gene inhibiert ist (Shimizu *et al.* 2004).

Im Gegensatz zu Apoptose und Autophagie ist die Nekrose eine passive Form des Zelltods und wird meist durch schwere Schädigungen der Zelle verursacht, die ein kontrolliertes Absterben der Zelle über Mechanismen des programmierten Zelltods verhindern. Die Zellen und Zellorganellen schwellen infolge stark erhöhter Membranpermeabilität an, platzen und setzen ihr Zytoplasma frei, wodurch eine Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe hervorgerufen wird. Vor wenigen Jahren wurde der Begriff der programmierten Nekrose, Nekroptose, geprägt (Degterev *et al.* 2005). Nekroptose wurde bisher nach der Stimulation von Todesrezeptoren in Zellen beobachtet, die durch die Inhibierung von Caspasen nicht durch Apoptose zugrunde gehen, sondern vielmehr morphologische Charakteristika der Nekrose zeigen. Nekroptose wird daher in Fällen eines gestörten Apoptosesignalwegs Bedeutung zugemessen.

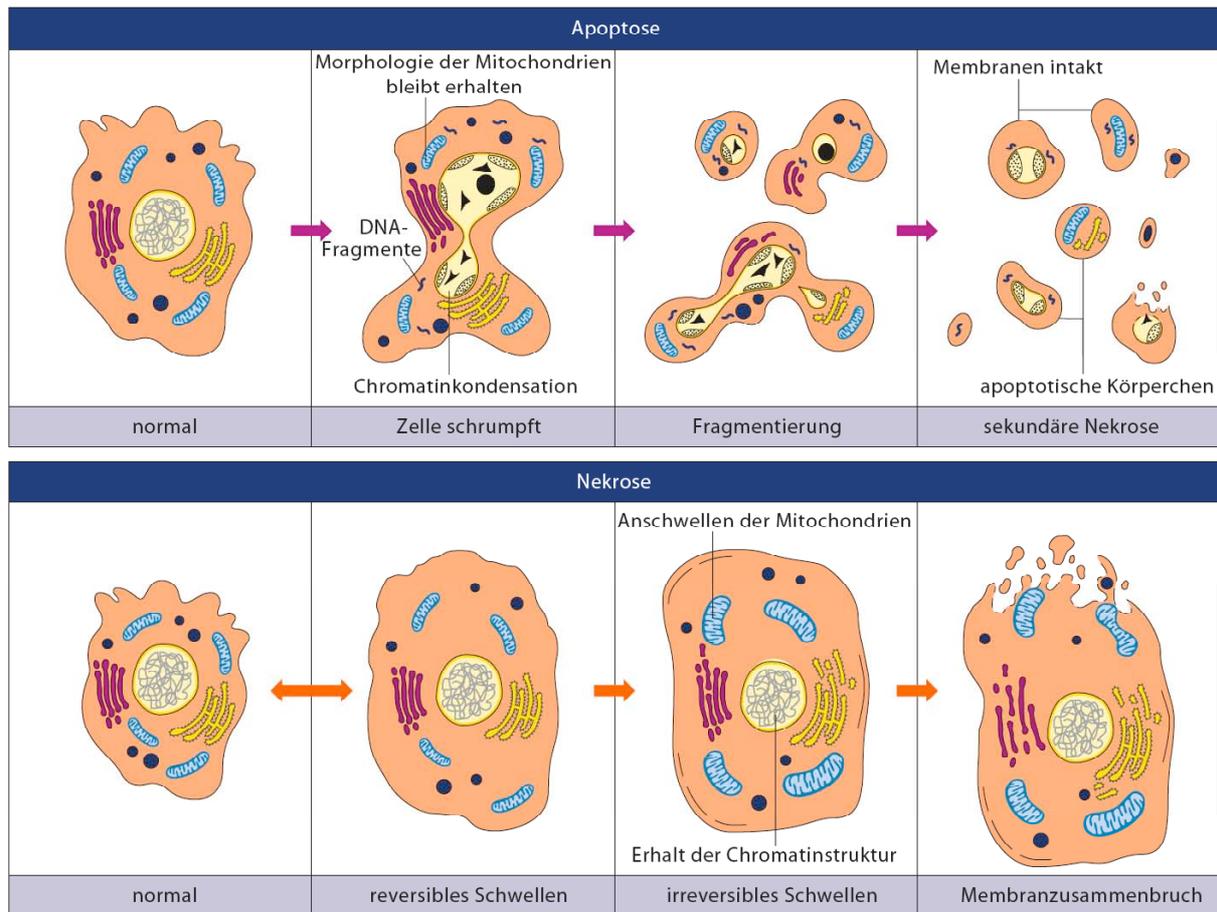


Abb. 1-1: Vergleich einer apoptotischen und einer nekrotischen Zelle.

Der obere Teil der Abbildung zeigt schematisch das Schrumpfen und das sich anschließende Abschnüren von Zellbestandteilen einer apoptotischen Zelle. Die apoptotischen Körperchen werden durch Phagozytose aus dem Organismus entfernt. Im unteren Teil ist eine nekrotische Zelle dargestellt, die infolge erhöhter Membranpermeabilität anschwillt und durch den Membranzusammenbruch ihr Zytoplasma freisetzt (entnommen aus „Apoptosis and Cell Proliferation“ von Roche Molecular Biochemicals).

1.2. Apoptose im Nematoden *Caenorhabditis elegans*

Die zentralen molekularen Komponenten der Apoptose wurden erstmalig durch genetische Studien am Nematoden *Caenorhabditis elegans* identifiziert. In *C. elegans* sterben während der Entwicklung zum adulten Organismus exakt 131 der 1090 somatischen Zellen durch Apoptose (Sulston *et al.* 1992). Apoptose spielt jedoch nicht nur in der Entwicklungsphase des Wurms eine Rolle, sie hat wie in jedem mehrzelligen Organismus auch in *C. elegans* die Aufgabe, durch Pathogene befallene Zellen zu eliminieren (Aballay und Ausubel 2001). Hierfür sind im wesentlichen die vier Genprodukte EGL-1, CED-9, CED-4 und CED-3 verantwortlich (Ellis *et al.* 1991; Horvitz *et al.* 1994). CED-9 wirkt durch seine Bindung an das Adapterprotein CED-4 anti-apoptotisch. EGL-1 ist ein pro-apoptotisches Protein, das durch seine Bindung an CED-9 dessen Komplex mit CED-4 aufhebt. Hierdurch freigesetztes CED-4 interagiert mit und aktiviert die Protease CED-3, welche durch Proteolyse ihrer Substrate Apoptose einleitet (Metzstein *et al.* 1998). CED-3 zeigt Homologie zu der in Säugern exprimierten Caspase-1 (Yuan *et al.* 1993) und das Protein CED-9 ist homolog zu Bcl-2, einem anti-apoptotischen Protein in Säugern (Hengartner und Horvitz

1994). Das Genprodukt EGL-1 entspricht in Säugerzellen den pro-apoptotischen BH3-only Proteinen, das Adaptermolekül CED-4 ist zu APAF-1 homolog. Diese Homologien legen eine Konservierung der Apoptosesignalwege von *C. elegans* bis zu Säugern nahe. EGL-1 wird durch CEP-1 positiv reguliert (Ou *et al.* 2007), vergleichbar mit der Induktion der BH3-only Proteine Puma (Nakano und Vousden 2001; Yu *et al.* 2001), Noxa (Oda *et al.* 2000a) und Bid (Sax *et al.* 2002) durch p53 in Säugern. Abb. 1-2 stellt den Apoptosesignalweg in *C. elegans* dem intrinsischen Signalweg in Säugern gegenüber.

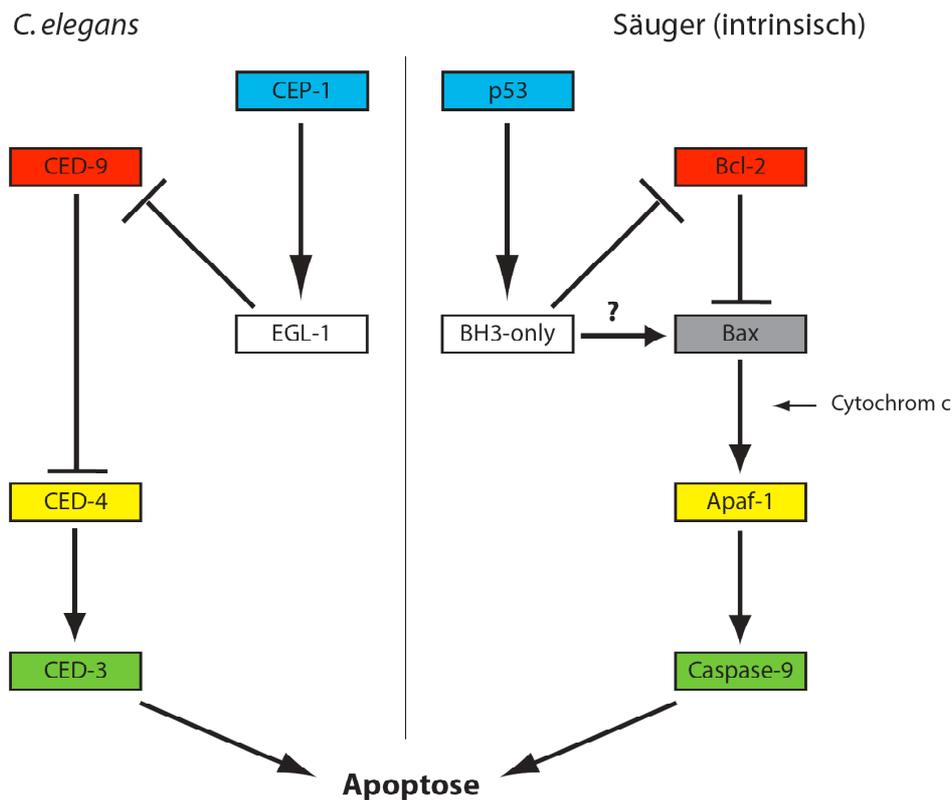


Abb. 1-2: Evolutionäre Konservierung von Apoptosesignalwegen.
Homologe Proteine sind durch gleiche Farbwahl und auf gleicher Höhe dargestellt.

1.3. Caspasen – Schlüsselenzyme der Apoptose

Alle charakteristischen Veränderungen der Apoptose werden durch intrazelluläre Proteasen der Caspase-Familie vermittelt, die eine Vielzahl von Substraten spalten. Caspasen sind jedoch nicht nur in den Apoptosesignalweg involviert, sondern prozessieren auch Zytokine, womit sie ebenso bei inflammatorischen Prozessen von Bedeutung sind (Thornberry und Lazebnik 1998). 1992 identifizierten zwei Gruppen unabhängig die humane Protease, die für die proteolytische Aktivierung von Interleukin-1 β verantwortlich ist und nannten diese Protease ICE (*interleukin-1 β -converting enzyme*, heute Caspase-1) (Cerretti *et al.* 1992; Thornberry *et al.* 1992).

Caspasen besitzen einen Cystein-Rest im aktiven Zentrum und hydrolysieren Zielproteine nach der Aminosäure Aspartat (Cysteinyl-Aspartase) (Alnemri *et al.* 1996). Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Substratspezifität. Das allgemeine Erkennungsmotiv der Caspasen ist

durch ein Tetrapeptid charakterisiert (P4-P3-P2-P1), an dessen P1-Position ein Aspartat Voraussetzung ist (Thornberry *et al.* 1997; Thornberry *et al.* 2000). Die an Position P4 bis P2 bevorzugten Aminosäuren sind durch die Primärstruktur der Caspasen und den damit einhergehenden molekularen Wechselwirkungen begründet.

Da eine unregulierte Caspase-Aktivität letal für die Zelle wäre, werden Caspasen in Form inaktiver Zymogene mit drei Domänen synthetisiert. Die inaktiven Zymogene (Procaspasen) verfügen über eine Prodomäne am Aminoterminal, sowie eine große (etwa 20 kDa) und eine kleine (etwa 10 kDa) Untereinheit (Fuentes-Prior und Salvesen 2004).

Im Rahmen der Apoptose unterscheidet man die apikalen Initiatorcaspasen von den distalen Effektorcaspasen. Zu den Initiatorcaspasen zählen Caspase-8, die humane Caspase-10, Caspase-9 und -2. Zu den Effektorcaspasen gehören Caspase-3, -7 und -6. Im Gegensatz zu den Effektorcaspasen werden die Initiatorcaspasen nicht durch proteolytische Spaltung aktiviert. Vielmehr liegen die Zymogene der Initiatorcaspasen als inaktive Monomere in der Zelle vor. Um aktiviert zu werden, müssen diese Monomere dimerisieren, wodurch eine Konformationsänderung hervorgerufen wird, welche in der Aktivierung der Initiatorcaspase resultiert (Stennicke *et al.* 1999; Boatright *et al.* 2003; Donepudi *et al.* 2003). Die Dimerisierung erfolgt an Multiproteinkomplexen, zu welchen die inaktiven Initiatorcaspase-Monomere über ihre lange N-terminale Prodomäne rekrutiert und so in enge räumliche Nähe gebracht werden. Nach der Rekrutierung an die Aktivierungsplattform erfolgt die Dimerisierung und Konformationsänderung der Procaspasen zur katalytisch aktiven Form. Die N-terminale Prodomäne wird proteolytisch entfernt, wodurch die Freisetzung der aktivierten Caspase ins Zytosol hervorgerufen wird (Chang *et al.* 2003). Die Spaltung von Initiatorcaspasen, welche während der Apoptose beobachtet werden kann, ist weder notwendig noch ausreichend für ihre Aktivierung, womöglich ist sie jedoch für die Stabilisierung des aktiven Dimers verantwortlich (Stennicke *et al.* 1999; Srinivasula *et al.* 2001). Im Gegensatz zum aktiven Dimer der Initiatorcaspase-8 mit zwei aktiven Zentren verfügt das aktive Caspase-9-Dimer lediglich über ein aktives Zentrum.

Im Unterschied zu den Initiatorcaspasen, die als inaktive Monomere in der Zelle vorliegen und zur Aktivierung nicht gespalten werden müssen, liegen die Effektorcaspasen bereits als inaktive Dimere in der Zelle vor (Pop *et al.* 2001; Kang *et al.* 2002; Boatright *et al.* 2003), die durch proteolytische Spaltung durch Initiatorcaspasen aktiviert werden (Chai *et al.* 2001; Riedl *et al.* 2001). Die Aktivierung erfolgt durch Spaltung in der Region zwischen großer und kleiner Untereinheit. Im Verlauf dieser Aktivierung wird weiterhin die kurze Prodomäne der Effektorcaspasen abgespalten, so dass aktive Effektorcaspasen ein Heterotetramer bilden (oder auch Homodimer von Heterodimeren), das sich aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten zusammensetzt (Walker *et al.* 1994; Wilson *et al.* 1994; Fuentes-Prior und Salvesen 2004) und über zwei aktive Zentren verfügt. So spalten die Initiatorcaspasen-8, -10

und –9 die Effektorcaspasen-3 und –7. Caspase-3 wiederum spaltet die Effektorcaspase-6 (Slee *et al.* 1999). Aufgrund der kanonischen Aktivierungsfolge wurde der Begriff der Caspase-Kaskade geprägt.

Aktive Effektorcaspasen spalten eine Vielzahl intrazellulärer Substrate und führen hierdurch zur Ausprägung des apoptotischen Phänotyps (Martin und Green 1995; Fischer *et al.* 2003). Die Spaltung zahlreicher Strukturproteine ist für die Reorganisation der Zellarchitektur während der Apoptose verantwortlich. Die typische DNA-Fragmentierung ist eine Folge der Aktivierung der Endonuklease CAD, die über die Degradation des Inhibitors ICAD eingeleitet wird (Liu *et al.* 1997; Enari *et al.* 1998; Sakahira *et al.* 1998; Liu *et al.* 1999b; Woo *et al.* 2004). Eine weitere charakteristische inaktivierende Spaltung ist die des nukleären Enzyms PARP, welches in DNA-Reparaturmechanismen involviert ist, durch Caspase-3 und –7 (Schreiber *et al.* 1992; Lazebnik *et al.* 1994).

1.4. Apoptosesignalwege

Die Aktivierung der Caspasen und damit die Exekution des Zelltods kann durch zwei unterschiedliche Signalwege erfolgen. Man unterscheidet den extrinsischen, über Todesrezeptoren vermittelten Signalweg vom intrinsischen, der durch die Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie unter Beteiligung der Mitochondrien reguliert wird. Der Todesrezeptor-Signalweg kann parakrin durch Todesliganden anderer Zellen oder autokrin aktiviert werden. Dabei übertragen die Todesrezeptoren nach Bindung ihrer Liganden das zytotoxische Signal von der Zelloberfläche ins Zytoplasma. Bei der intrinsisch vermittelten Apoptose führen hingegen intrazelluläre Stresssignale über die Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie zum Zelltod.

1.4.1. Todesrezeptor-vermittelte Apoptose

Bisher wurden acht Rezeptoren mit intrazellulärer Todesdomäne charakterisiert: TNFR1 (DR1), CD95 (APO-1, Fas, DR2), DR3 (APO-3), TRAILR1 (APO-2, DR4), TRAILR2 (DR5), DR6, Ektodysplasie A Rezeptor (EDAR) und NGFR (Bhardwaj und Aggarwal 2003; French und Tschopp 2003; Wajant 2003). Sie alle gehören zur TNF-Rezeptor-Familie. Die Todesliganden der jeweiligen Rezeptoren sind: TNFR1: TNF α ; CD95: FasL; DR3: VEGI; TRAILR1 und TRAILR2: TRAIL; EDAR: EDA1 und NGFR: NGF. Der Ligand des Rezeptors DR6 wurde bislang noch nicht identifiziert. Die Bindung des Liganden an seinen Rezeptor führt zur Trimerisierung des Todesrezeptors. Im Anschluss daran werden unterschiedliche Proteine an die intrazellulären Todesdomänen (DD: death domain) der Rezeptoren rekrutiert. Man unterscheidet zwei Arten von Signalkomplexen, die sich intrazellulär am Todesrezeptor ausbilden können. Am CD95 Rezeptor, TRAILR1 und TRAILR2 kann sich der sogenannte todesinduzierende Signalkomplex (DISC: death inducing signalling complex) ausbilden (Kischkel *et al.* 1995). Im DISC erfolgt die Aktivierung der Caspase-8, welche durch die

Spaltung spezifischer Substrate Apoptose in der Zelle auslöst. Die Stimulation der Rezeptoren TNFR1, DR3, DR6 und EDAR führt zur intrazellulären Bindung alternativer Proteine, welche sowohl apoptotische als auch Überlebenssignale weiterleiten.

Die Aktivierung des CD95 Rezeptors und der TRAIL Rezeptoren durch deren Interaktion mit ihren Liganden führt zur Bindung des Proteins FADD über dessen DD an die intrazellulären DD des Rezeptors. FADD verfügt weiterhin über eine Todeseffektordomäne (DED: death effector domain), an die über homophile Interaktion durch ihre beiden DEDs die Procaspase-8 sowie humane Procaspase-10 gebunden werden (Scaffidi *et al.* 1997; Wang *et al.* 2001; Sprick *et al.* 2002). Gemeinsam bilden diese Komponenten den Multiproteinkomplex DISC. Die hohe lokale Konzentration an Procaspasen-8 und -10 innerhalb des DISC führt zu deren Konformationsänderung und Aktivierung, welche in der Formierung eines Caspase-8- bzw. Caspase-10-Heterotetramers bestehend aus je zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten resultiert (Medema *et al.* 1997; Martin *et al.* 1998; Muzio *et al.* 1998; Salvesen und Dixit 1999). Die Heterotetramere werden ins Zytoplasma entlassen, wo Caspase-8 durch die Spaltung der Effektorcaspase-3 die Caspase-Kaskade initiiert. Inwiefern Caspase-10 in Abwesenheit von Caspase-8 Apoptose auslösen kann, wird derzeit kontrovers diskutiert.

Die Caspase-Aktivierung am DISC wird durch die zu Caspase-8 homologen Proteine c-FLIP_L und c-FLIP_S negativ reguliert. c-FLIP_L und c-FLIP_S besitzen ebenso wie die Procaspasen-8 und -10 jeweils zwei DEDs, über die sie an FADD binden können. Sie unterscheiden sich jedoch voneinander dahingehend, dass c-FLIP_L zusätzlich über eine Protease-ähnliche Domäne verfügt, welche homolog zu Caspase-8 ist (Irmler *et al.* 1997). Allerdings sind bei c-FLIP_L mehrere Aminosäuren, die für die Protease-Aktivität bedeutsam sind, mutiert, inklusive des Cystein-Restes, der in der Caspase das aktive Zentrum bildet. Während die anti-apoptotische Wirkung von c-FLIP_S weitreichend akzeptiert ist (Kirchhoff *et al.* 2000a; Kirchhoff *et al.* 2000b), wird die Funktion von c-FLIP_L kontrovers diskutiert. c-FLIP_L kann mit Procaspase-8 interagieren, sie somit in den DISC rekrutieren und ihre Aktivierung induzieren, wodurch c-FLIP_L in diesem Fall eine pro-apoptotische Funktion zukommt (Chang *et al.* 2002b; Micheau *et al.* 2002). Es konnte auch gezeigt werden, dass c-FLIP_L im DISC durch Caspase-8 gespalten wird (Scaffidi *et al.* 1999). Da c-FLIP_L jedoch selbst keine Proteaseaktivität besitzt, wird ihm eine anti-apoptotische Funktion durch die Bildung eines inaktiven Komplexes mit Caspase-8 zugeschrieben (Krueger *et al.* 2001). Welche Funktion durch c-FLIP_L in der Zelle ausgeübt wird, hängt vom Expressionsniveau der Proteine ab, wobei sich eine Überexpression von c-FLIP_L anti-apoptotisch auswirkt (Irmler *et al.* 1997; Chang *et al.* 2002b).

Basierend auf dem Ausmaß der DISC-Ausbildung werden Zellen in sogenannte Typ-I- und Typ-II-Zellen unterschieden (Scaffidi *et al.* 1998). In Typ-I-Zellen führt die Bindung eines

Todesliganden an seinen Rezeptor zur starken Ausbildung des DISC mit einer hohen Konzentration an Caspase-8. Die aktivierte Caspase-8 prozessiert direkt nachgeschaltete Effektorcaspasen sehr effektiv. In Typ-II-Zellen wird nach Aktivierung der Todesrezeptoren weniger DISC gebildet, dementsprechend weniger Caspase-8 prozessiert und das Apoptosesignal bedarf einer zusätzlichen Verstärkung. In diesem Fall wird das pro-apoptotische Bcl-2-Familienmitglied Bid von Caspase-8 zu tBid (*truncated* Bid) gespalten und der intrinsische Apoptosesignalweg ausgelöst. In Typ-II-Zellen ist die Todesrezeptorvermittelte Apoptose deshalb auch durch anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie hemmbar (Scaffidi *et al.* 1998).

Die Stimulation des TNF Rezeptors 1 durch $\text{TNF}\alpha$ führt zur raschen Ausbildung eines membrangebundenen Komplexes (Komplex I), der von TNFR1, den beiden ebenfalls über eine DD verfügenden Proteinen TRADD und der Kinase RIP1, sowie von TRAF2 und c-IAP1 gebildet wird (Ashkenazi und Dixit 1998; Chen und Goeddel 2002). Die Ausbildung des Komplexes I zieht eine Aktivierung des IKK-Komplexes, der aus $\text{IKK}\alpha$, β und γ besteht, nach sich (Zhang *et al.* 2000). IKK bewirkt die indirekte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch die Phosphorylierung und damit einhergehende Degradation des NF- κ B Inhibitors I- κ B (Karin und Lin 2002). Die Aktivierung von NF- κ B durch $\text{TNF}\alpha$ induziert die Expression einer Reihe anti-apoptotisch wirkender Proteine, unter anderem c-FLIP, c-IAP1 und 2, TRAF1 und TRAF2 (Varfolomeev und Ashkenazi 2004). TRAF2 aktiviert JNK durch die MAP-Kinase MKK7 (Chen und Goeddel 2002). JNK phosphoryliert anschließend c-Jun, wodurch die Aktivität des Transkriptionsfaktors AP-1 stimuliert wird. AP-1 kontrolliert die Expression von Genen, die für die Proliferation, Differenzierung und Apoptose wichtig sind. Die Formation des Komplexes I ist transient, da er posttranslationalen Modifikationen unterworfen ist, die zu seiner Dissoziation vom TNFR1 führen. Nach der Dissoziation vom Rezeptor geht Komplex I im Zytoplasma in Komplex II über, der von TRAF2, RIP1 und TRADD gebildet wird. Daran bindet das Adapterprotein FADD und hierüber wiederum Caspase-8 (Hsu *et al.* 1996; Varfolomeev *et al.* 1996; Thomas *et al.* 2002). In Apoptose-resistenten Zellen sind große Mengen des anti-apoptotischen Proteins c-FLIP_L, dessen Transkription durch NF- κ B reguliert wird, in Komplex II vorhanden (Wang *et al.* 1998; Micheau *et al.* 2001). Ist jedoch die durch Komplex I hervorgerufene NF- κ B-Induktion gestört und ineffektiv, wird nicht ausreichend c-FLIP transkribiert und später bei der Ausbildung von Komplex II die Aktivierung der Caspase-8 unzureichend inhibiert. In diesem Fall wirkt sich eine $\text{TNF}\alpha$ -Stimulation apoptotisch aus.

Die Notwendigkeit der Komplex II-Bildung bei TNFR1-Stimulation erklärt die unterschiedliche Kinetik der Apoptoseinduktion verglichen mit der bei der Stimulation des CD95-Rezeptors. Im letzteren Fall bindet FADD direkt an die DD von CD95 und rekrutiert die Procaspasen-8 und -10. Nach Stimulation des TNFR1 wird FADD hingegen erst in einem

zweiten Schritt an das Adapterprotein TRADD gebunden, wenn dieses vom Rezeptor dissoziiert. FADD-Mutanten, die nicht mehr an die DD von CD95, aber dennoch an TRADD und Caspase-8 binden können, sind resistent gegenüber FasL-induzierter nicht jedoch TNF α -induzierter Apoptose (Thomas *et al.* 2002).

Die Signalwege, die durch DR3 und DR6 induziert werden, sind weniger gut charakterisiert. Jedoch bindet auch in diesen Fällen TRADD an die intrazelluläre DD des Rezeptors, rekrutiert weitere Proteine und es kommt zur Aktivierung des NF- κ B- und JNK-Signalweges (Bhardwaj und Aggarwal 2003).

Todesliganden können aber nicht nur mit ihrem Todesrezeptor, sondern auch mit sogenannten *Decoy*-Rezeptoren (DcR) interagieren, die jedoch nicht über eine (funktionelle) DD verfügen und somit das Apoptosesignal nicht in das Zytoplasma weiterleiten. Bislang sind vier *Decoy*-Rezeptoren bekannt: TRAILR3 (DcR1), TRAILR4 (DcR2), DcR3 und Osteoprotegrin (OPG) (Bhardwaj und Aggarwal 2003).

1.4.2. Mitochondrialer Apoptosesignalweg

Intrazelluläre Stresssignale, ausgelöst z.B. durch DNA-Schäden, aktivieren den intrinsischen bzw. mitochondrialen Apoptosesignalweg. Der zentrale Wendepunkt des intrinsischen Apoptosesignalweges ist die Freisetzung von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum. Diese wird von Mitgliedern der Bcl-2-Proteinfamilie reguliert und resultiert schließlich in der Aktivierung der Caspasen, welche durch Spaltung zahlreicher Substrate den apoptotischen Phänotyp hervorrufen.

Die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie (z.B. Bcl-2, Bcl-x_L) binden in vitalen Zellen die pro-apoptotischen Multidomänenproteine (z.B. Bax, Bak), wodurch letztere in ihrer Funktion gehemmt sind. Dieser Hemmung wirken BH3-only Proteine (z.B. Bik, Bad), eine zweite Untergruppe der pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine, entgegen. Die BH3-only Proteine fungieren als intrazelluläre Stresssensoren, die nach Zellschädigung aktiviert werden. Sie binden an anti-apoptotische Bcl-2-Proteine (O'Connor *et al.* 1998; Letai *et al.* 2002; Hinds *et al.* 2003; Chen *et al.* 2005b; Certo *et al.* 2006) und verdrängen so die pro-apoptotischen Multidomänenproteine aus ihrer hemmenden Bindung. Die nun freigesetzten Proteine Bax und Bak durchlaufen anschließend eine Konformationsänderung und bilden in der äußeren Mitochondrienmembran Homooligomere aus (Hsu *et al.* 1997; Griffiths *et al.* 1999; Wei *et al.* 2000; Antonsson *et al.* 2001; Mikhailov *et al.* 2001; Nechushtan *et al.* 2001).

In vitro können Bax-Oligomere Protein-freie Liposomen permeabilisieren und damit den Durchtritt von Cytochrom c (Antonsson *et al.* 2000; Saito *et al.* 2000; Roucou *et al.* 2002) und sogar noch größerer Moleküle ermöglichen (Kuwana *et al.* 2002). Die Mitochondrien enthalten neben Cytochrom c weitere pro-apoptotische Moleküle wie z.B. AIF, Smac/Diablo und Omi/HtrA2. Man nimmt an, dass diese durch Homooligomerisierung und Kanalbildung der Proteine Bax und Bak in der äußeren Mitochondrienmembran aus dem

Intermembranraum ins Zytoplasma freigesetzt werden. Die strukturelle Ähnlichkeit der Multidomänenproteine der Bcl-2-Proteinfamilie mit dem porenformenden Diphtheria-Toxin (Muchmore *et al.* 1996) legt eine vergleichbare porenbildende Aktivität nahe.

Ein weiterer Mechanismus, der die Zerstörung der mitochondrialen Membranintegrität zur Folge hat, ist die Öffnung der PT-Pore (*permeability transition pore*). Der PT-Komplex ist ein unspezifischer Ionenkanal der Mitochondrien, der von VDAC (*voltage dependent anion channel*) in der äußeren mitochondrialen Membran und ANT (Adenin-Nukleotid-Transporter) in der inneren Membran gebildet wird. Während der Apoptose öffnet sich die PT-Pore und erlaubt den Einstrom von Ionen in die Mitochondrien, wodurch es zum Anschwellen der Matrix und Zusammenbruch der äußeren Membran kommt.

Das aus den Mitochondrien freigesetzte und damit zytosolische Cytochrom c bindet an die WD40-Domäne (Zou *et al.* 1997) des Adapterproteins APAF-1 und löst dadurch dessen Konformationsänderung aus, die in der Exposition der CARD (*caspase recruitment domain*) von APAF-1 resultiert (Hu *et al.* 1998; Srinivasula *et al.* 1998). Nach der Konformationsänderung wird ein heptamerer APAF-1-Komplex gebildet, der durch die Bindung von (d)ATP an die nun zugängliche CARD von APAF-1 stabilisiert wird und zugleich die Bindung des korrespondierenden CARD-Motivs der Prodomäne von Caspase-9 an die entsprechende Domäne von APAF-1 ermöglicht (Saleh *et al.* 1999; Zou *et al.* 1999; Cain *et al.* 2000; Jiang und Wang 2000). Der Multiproteinkomplex bestehend aus einem APAF-1-Heptamer, sowie Cytochrom c und Caspase-9 wird Apoptosom genannt (Acehan *et al.* 2002). Innerhalb des Apoptosoms stehen die Procaspase-9-Moleküle untereinander in engem räumlichen Kontakt, der ihre Aktivierung durch Konformationsänderung hervorruft (Wang 2001; Shi 2006). Aktive Caspase-9 setzt nun wiederum die Caspase-Kaskade in Gang: sie spaltet und aktiviert die Effektorcaspasen-3 und -7, die ihrerseits Substrate proteolytisch spalten und so den charakteristischen apoptotischen Phänotyp hervorrufen.

Smac/Diablo und Omi/HtrA2 tragen zum Zelltod bei, indem sie an Caspaseinhibitoren wie IAPs binden und diese hemmen (Du *et al.* 2000; Verhagen *et al.* 2000; Suzuki *et al.* 2001; Verhagen *et al.* 2002), AIF transloziert in den Zellkern und führt dort zu einer Caspase-unabhängigen Fragmentierung der DNA (Susin *et al.* 1999; Joza *et al.* 2001; Yu *et al.* 2002). Ebenso wie AIF ist auch EndoG eine in den Mitochondrien lokalisierte Endonuklease, welche nach Apoptoseinduktion in den Zellkern transloziert und dort zur Degradation der DNA beiträgt (Li *et al.* 2001).

1.5. Die Bcl-2-Proteinfamilie

Das *bcl-2*-Gen, das namensgebend für eine ganze Proteinfamilie ist, wurde in folliculären B-Zell-Lymphomen entdeckt, welche eine t(14;18) Chromosomentranslokation besitzen. Diese Translokation stellt *bcl-2* unter die Kontrolle des Promotors der schweren Kette der Immunglobuline auf Chromosom 14, was in der Überexpression des anti-apoptotischen Bcl-

2-Proteins resultiert (Tsujiimoto *et al.* 1984). Im Gegensatz zu allen zuvor identifizierten Onkogenen, reguliert Bcl-2 vorrangig Zelltod und nicht Zellproliferation (Vaux *et al.* 1988).

Derzeit sind über 20 Bcl-2-Familienmitglieder in Säugern bekannt, welche innerhalb der sogenannten BH-Domänen (Bcl-2-Homologie-Domänen) über Sequenzhomologien untereinander verfügen. Die Mitglieder dieser Proteinfamilie werden in pro-apoptotische und anti-apoptotische Proteine unterteilt (Abb. 1-3). Die pro-apoptotischen Proteine lassen sich weiterhin in Bax-ähnliche Multidomänenproteine und BH3-only Proteine untergliedern. Durch konservierte α -helikale Strukturmodule besitzen die anti-apoptotischen Proteine und die pro-apoptotischen Bax-ähnlichen Proteine weiterhin Strukturhomologie. Die sogenannten BH3-only Proteine zeigen weder untereinander noch zu den Multidomänen-Bcl-2-Proteinen eine ausgeprägte strukturelle Homologie, einzig ihre BH3-Domäne vermittelt Sequenzhomologie untereinander und mit Ausnahme von A1/Bfl-1, das über keine BH3-Domäne verfügt, zu allen anderen Familienmitgliedern. Eine Sonderstellung unter den BH3-only Proteinen nimmt Bid ein, da Bid im Gegensatz zu den übrigen Mitgliedern dieser Untergruppe über die konservierten α -helikalen Strukturmodule verfügt und damit als einziges BH3-only Protein auch strukturelle Homologie zu den Multidomänen-Bcl-2-Proteinen zeigt. Diese Besonderheit spiegelt sich in einer ebenso speziellen Funktion von Bid wider.

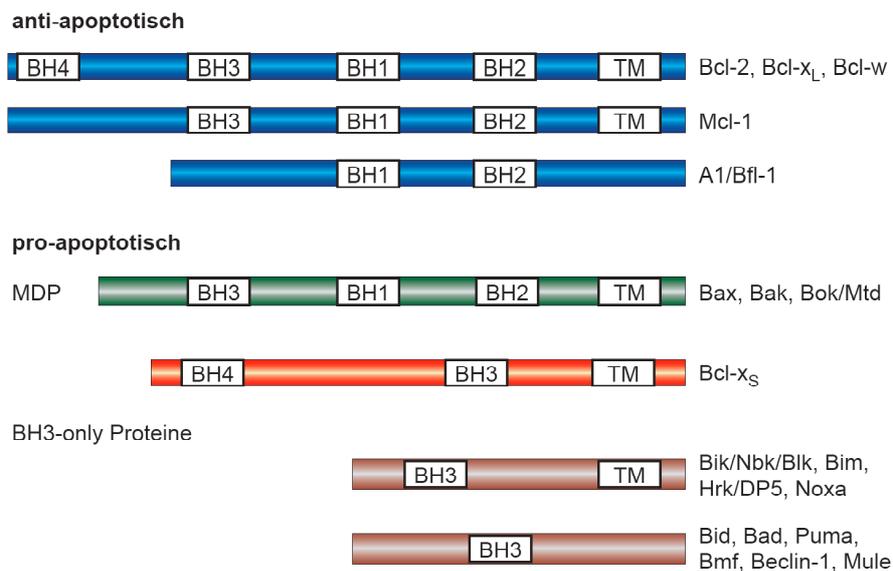


Abb. 1-3: Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie in Säugern.

Die Abbildung zeigt schematisch die wichtigsten Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie und ihre Unterteilung in anti-apoptotische und pro-apoptotische Mitglieder. Die pro-apoptotischen Proteine werden zusätzlich in Bax-ähnliche Multidomänenproteine und BH3-only Proteine unterteilt. Murines Noxa besitzt eine zweite BH3-Domäne. Durch alternatives Spleißen im ersten Exon des *bcl-x*-Gens entstehen Bcl-x_L und Bcl-x_S, zwei Proteine unterschiedlicher Größe und Wirkung (Boise *et al.* 1993; Reed 1999). Innerhalb der pro-apoptotischen Proteine lässt sich Bcl-x_S aufgrund seiner Sequenz keiner Untergruppe zuordnen.

BH: Bcl-2-Homologie; MDP: Multidomänenprotein; TM: Transmembrandomäne

Bcl-2 ist ein membrangebundenes Protein, das in der äußeren Mitochondrienmembran, der Kernmembran und der Membran des endoplasmatischen Retikulums nachgewiesen werden kann (Monaghan *et al.* 1992; Krajewski *et al.* 1993; Lithgow *et al.* 1994). Die Proteine Bcl-x_L, Bcl-w und Mcl-1 hingegen sind hauptsächlich zytoplasmatisch und nur teilweise an

den Mitochondrien lokalisiert (Hsu *et al.* 1997; Hausmann *et al.* 2000; O'Reilly *et al.* 2001; Kaufmann *et al.* 2003; Nijhawan *et al.* 2003; Wilson-Annan *et al.* 2003). Sie translozieren während der Apoptose zu den Mitochondrien. Das pro-apoptotische Bax-ähnliche Protein Bak ist ebenso wie Bcl-2 ein membrangebundenes Protein, das in der äußeren Mitochondrienmembran und in der ER-Membran lokalisiert ist. Bax ist hingegen in gesunden Zellen zytoplasmatisch lokalisiert und nur transient an die Mitochondrien gebunden (Wolter *et al.* 1997; Hsu und Youle 1998; Griffiths *et al.* 1999). Die vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation von Bax und Bcl-w ist in der Bindung ihrer hydrophoben C-terminalen Transmembrandomäne in der durch die Domänen BH1, BH2 und BH3 gebildeten hydrophoben Spalte begründet (Suzuki *et al.* 2000; Hinds *et al.* 2003). Erst nach Exposition der Transmembrandomäne können die Proteine mit intrazellulären Membranen interagieren.

Bei der Induktion der intrazellulären Stressantwort z.B. durch DNA-Schaden oder den Entzug von Wachstumsfaktoren verhalten sich die BH3-only Proteine wie Sensoren, die die Zellschädigungen registrieren und ein pro-apoptotisches Signal an die Multidomänen-Bcl-2-Proteine weiterleiten. Strukturelle Studien belegen, dass die BH1-, BH2- und BH3-Domänen der anti-apoptotischen Proteine eine hydrophobe Spalte an der Oberfläche bilden, in welche die BH3-Domäne, eine amphipathische α -Helix, der BH3-only Proteine binden kann (Sattler *et al.* 1997; Petros *et al.* 2000; Liu *et al.* 2003). Durch diese Bindung wird die anti-apoptotische Wirkung der Proteine neutralisiert. Die Bindungsaffinitäten der verschiedenen BH3-only Proteine für die anti-apoptotischen Familienmitglieder sind sehr unterschiedlich. Diejenigen BH3-only Proteine, die alle anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder binden, wie tBid, Bim und Puma, induzieren effizienter Apoptose als BH3-only Proteine, die nur an einige der anti-apoptotischen Bcl-2-Proteine binden (Abb. 1-4) (Chen *et al.* 2005b).

BH3-only Proteine

	tBid	Bim	Puma	Bad	Bik	Noxa	Hrk	Bmf
anti-apoptotisch	Bcl-2							
	Bcl-xL							
	Bcl-w							
	Mcl-1							
	A1/Bfl-1							

Abb. 1-4: Interaktionsmuster zwischen BH3-only Proteinen und anti-apoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern.

Rot bedeutet Bindung mit hoher Affinität, orange mit geringer Affinität und grün bedeutet, dass keine Interaktion der Proteine nachzuweisen ist (Certo *et al.* 2006; Deng *et al.* 2007). Über das Bindungsverhalten einiger BH3-only Proteine herrscht Uneinigkeit. So zeigten Chen *et al.* (2005) beispielsweise, dass Noxa nicht nur Mcl-1, sondern auch A1/Bfl-1 bindet.

BH3-only Proteine sind im intrazellulären Apoptosesignalweg oberhalb der pro-apoptotischen Multidomänenproteine Bax und Bak angesiedelt, da sie in Zellen, die weder Bax noch Bak exprimieren, keine Apoptose induzieren können (Cheng *et al.* 2001; Zong *et*

al. 2001). Bax und Bak scheinen bei der Reaktion auf viele Stresssignale eine redundante Funktion zu besitzen, da der Verlust eines Gens kaum Auswirkungen auf die Apoptoseinduktion hat, wohingegen der Verlust beider Gene die Apoptose dramatisch hemmt (Lindsten *et al.* 2000; Wei *et al.* 2001).

Das derzeit favorisierte Verdrängungsmodell postuliert, dass die pro-apoptotischen Multidomänenproteine in gesunden Zellen durch Bindung an anti-apoptotische Proteine in ihrer Funktion gehemmt sind. So ist gezeigt, dass Bak an Mcl-1 und Bcl-x_L bindet (Cuconati *et al.* 2003; Willis *et al.* 2005), wohingegen Bax durch Mcl-1, Bcl-2, Bcl-x_L und Bcl-w gehemmt werden kann (Willis *et al.* 2007). BH3-only Proteine binden nach Stressinduktion an die anti-apoptotischen Proteine (Letai *et al.* 2002; Hinds *et al.* 2003; Chen *et al.* 2005b) und neutralisieren deren Funktion. Hierdurch werden Bax und Bak aus ihrer hemmenden Bindung entlassen, nehmen ihre aktive Konformation ein und bilden in der äußeren Mitochondrienmembran Homooligomere aus (Hsu und Youle 1998; Griffiths *et al.* 1999; Antonsson *et al.* 2001; Griffiths *et al.* 2001; Nechushtan *et al.* 2001). Die beschriebene Wirkungsweise der BH3-only Proteine klassifiziert sie als sogenannte Sensitivierer.

Aktuell wird ein zweites Modell für die Funktion der BH3-only Proteine diskutiert. In diesem Modell sind BH3-only Proteine in Sensitivierer und Aktivatoren unterteilt. Die Aktivatoren werden in gesunden Zellen durch Bindung an anti-apoptotische Bcl-2-Proteine in ihrer Funktion gehemmt und aus dieser Bindung erst entlassen, wenn Sensitivierer-BH3-only Proteine nach einem Apoptosestimulus an die anti-apoptotischen Proteine binden und die Aktivatoren dadurch aus ihrer Bindung freisetzen. Die Aktivatoren interagieren dann direkt mit den pro-apoptotischen Multidomänenproteinen und induzieren deren pro-apoptotische Wirkung (Kuwana *et al.* 2002; Letai *et al.* 2002; Certo *et al.* 2006; Oh *et al.* 2006; Walensky *et al.* 2006). Zu den Aktivator-BH3-only Proteinen zählen Bid und Bim (Letai *et al.* 2002; Cartron *et al.* 2004; Kuwana *et al.* 2005; Certo *et al.* 2006). Puma wird zumeist die Funktion eines Sensitivierer-BH3-only Proteins zugeschrieben, eine Wirkung als Aktivator jedoch nicht ausgeschlossen (Cartron *et al.* 2004; Kim *et al.* 2006; Deng *et al.* 2007). Möglicherweise kann Puma beide Funktionen ausüben.

Das Modell von Aktivator-BH3-only Proteinen, die direkt mit pro-apoptotischen Multidomänenproteinen interagieren, wurde durch Beobachtungen etabliert, die zeigten, dass das BH3-Peptid von Bim und Bid in der Lage ist, gemeinsam mit Bax aber in Abwesenheit anti-apoptotischer Proteine künstliche Liposomen zu permeabilisieren (Kuwana *et al.* 2005). Diese Annahme wurde durch Studien von Deng *et al.* (2007) weiter erhärtet, in welchen drei apoptotische Blockaden für den intrazellulären Apoptosesignalweg postuliert wurden. Eine Blockade von Bax/Bak konnte weder durch Sensitivierer noch durch Aktivatoren überwunden werden. Eine Blockade der Aktivatoren durch Überexpression anti-apoptotischer Bcl-2-Proteine konnte durch Zugabe von Sensitivierern oder Aktivatoren

aufgehoben werden und die Blockade von Aktivatoren aufgrund des Verlustes ihrer Expression konnte ausschließlich durch die Zugabe von Aktivator-BH3-Peptiden überwunden werden (Deng *et al.* 2007).

Das direkte Aktivierungsmodell wird aktuell durch Studien in Frage gestellt, die zeigen, dass BH3-Peptide nicht an Bak und nicht an Bax, welches keine Konformationsänderung vollzogen hat, binden können. Nach der Konformationsänderung von Bax sind Bid und Bim in der Lage, selbiges zu binden (Willis *et al.* 2007). Allerdings ist die Bindungsaffinität von Bim und Bid für Bax (Mikromolar) sehr viel geringer als für anti-apoptotische Multidomänenproteine (Nanomolar). Zudem konnte Apoptose durch Noxa und das BH3-Mimetikum ABT-737 in MEF-Zellen, die durch Bim/Bid DKO und zusätzliche siRNA-Expression nur noch geringe Mengen des potentiellen Aktivator-BH3-only Proteins Puma exprimieren, effizient induziert werden (Willis *et al.* 2007). Diese Studien unterstützen das Verdrängungsmodell. Bei diesem besteht allerdings eine Diskrepanz zwischen der postulierten konstitutiven Interaktion von Bax bspw. mit Bcl-2 und deren überwiegend unterschiedlicher subzellulärer Lokalisation. Während Bcl-2 an intrazellulären Membranen lokalisiert ist, befindet sich Bax hauptsächlich als inaktives Monomer im Zytosol. Trotzdem könnten geringe Mengen von Bax, deren BH3-Domäne exponiert ist, an den Mitochondrien durch die Bindung an anti-apoptotische Bcl-2-Proteine gehemmt sein. Größere Mengen von Bax befinden sich als inaktive Monomere mit verborgener BH3- und Transmembrandomäne im Zytosol (Hsu und Youle 1998; Suzuki *et al.* 2000). Die Bindung eines Sensitivierer-BH3-only Proteins an das anti-apoptotische Bcl-2-Protein setzt Bax, dessen BH3-Domäne exponiert ist, am Mitochondrium frei. Diese Bax-Moleküle können nun mit den inaktiven zytosolischen Bax-Monomeren interagieren und deren mit ihrer Aktivierung einhergehende Konformationsänderung induzieren (diskutiert in Adams und Cory 2007).

Da Bak in gesunden Zellen ein membrangebundenes Protein ist, wohingegen Bax vorwiegend zytosolisch vorliegt (Wolter *et al.* 1997), wird die Aktivierung beider Proteine wahrscheinlich unterschiedlich reguliert. Es ist denkbar, dass Bak indirekt durch Sensitivierer-BH3-only Proteine aktiviert wird, Bax hingegen direkt durch Aktivatoren. Obwohl bisher die BH3-only Proteine Bid, Bim und eventuell Puma den Aktivatoren zugerechnet werden, ist eine direkte Interaktion mit Bax am besten für tBid etabliert (Kuwana *et al.* 2002; Kuwana *et al.* 2005; Oh *et al.* 2006; Walensky *et al.* 2006). Dies spiegelt die Sonderstellung von Bid innerhalb der Untergruppe der BH3-only Proteine wider, da Bid als einziges BH3-only Protein über die konservierten α -helikalen Bereiche verfügt, die eine Strukturhomologie zu den Multidomänen-Bcl-2-Proteinen darstellen.

1.6. Das Tumorsuppressorprotein p53

Das Tumorsuppressorprotein p53 wurde 1979 von mehreren Gruppen unabhängig entdeckt (Lane und Crawford 1979; Linzer und Levine 1979). Seine Wirkung als

Tumorsuppressor wird p53 vorrangig aufgrund seiner Funktion als Transkriptionsfaktor zugeschrieben, welche in Apoptose, Zellzyklusarrest, Seneszenz oder DNA-Reparatur resultieren kann. In jüngster Zeit werden auch Transkriptions-unabhängige Funktionen von p53 diskutiert (Chipuk und Green 2006). Seine besondere Bedeutung wird durch die Tatsache, dass p53 in etwa der Hälfte der humanen Tumoren mutiert ist, deutlich (Hollstein *et al.* 1991; Caron de Fromental und Soussi 1992; Olivier *et al.* 2002; Soussi *et al.* 2005).

Das p53-Protein besteht aus mehreren funktionellen Domänen. Am N-Terminus befinden sich zwei transaktivierende Domänen (TAD1 und TAD2) (Abb. 1-5). TAD1 und TAD2 interagieren mit dem basalen Transkriptionsapparat. Man nimmt an, dass TAD1 vorrangig in die Transaktivierung von Zellzyklusarrestgenen involviert ist, TAD2 hingegen in die von pro-apoptotischen Genen (Zhu *et al.* 1998; Zhu *et al.* 2000). An TAD2 schließt sich eine Prolin-reiche Domäne (PRD) an. Sie beeinflusst zahlreiche Protein-Protein-Interaktionen (Zilfou *et al.* 2001; Dornan *et al.* 2003). Der Prolin-reichen Domäne wird Bedeutung für die pro-apoptotische Aktivität von p53 zugemessen, da Mutanten, deren PRD deletiert ist, zwar Zellzyklusarrest, nicht jedoch Apoptose induzieren können (Roth *et al.* 2000; Baptiste *et al.* 2002). Diese Beobachtung bestätigt die Charakterisierung von TAD2 als eine für die Transaktivierung pro-apoptotischer Gene bedeutende Domäne, da einige Autoren TAD2 und PRD als eine Domäne zusammenfassen (Harms und Chen 2006). In der DNA-bindenden Domäne befinden sich die häufigsten Tumor-assoziierten p53-Mutationen (über 90% aller p53-Mutationen in humanen Tumoren), eine Tatsache, welche die zentrale Funktion von p53 als Sequenz-spezifischer Transkriptionsfaktor hervorhebt. Der DBD schließt sich ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) an. Innerhalb der C-terminalen basischen Domäne sind zwei weitere NLS (NLS II: AS 370 – 377; NLS III: AS 380 – 386) beschrieben (Shaulsky *et al.* 1990). Im Anschluss an NLS I folgt die Tetramerisierungsdomäne (TD). Erst als Tetramer bindet p53 effektiv an DNA (Chene 2001). Den C-Terminus bildet die basische Domäne (BD). Besonders die basische Domäne ist posttranslationalen Modifikationen unterworfen (Abb. 1-6). Sie vermittelt Sequenz-unspezifische DNA-Bindung und trägt zur Erkennung von DNA-Schäden bei (Bakalkin *et al.* 1994; Jayaraman und Prives 1995; Lee *et al.* 1995; Reed *et al.* 1995; Kim und Deppert 2006; Liu und Kulesz-Martin 2006). Des Weiteren verstärken posttranslationale Modifikationen der basischen Domäne die Sequenz-spezifische DNA-Bindung durch die DBD (Gu und Roeder 1997; Sakaguchi *et al.* 1998; Luo *et al.* 2004). Zudem verfügt p53 über zwei nukleäre Exportsignale (NES) (Zhang und Xiong 2001). Die NLS und NES erlauben p53 eine Translokation zwischen Zytoplasma und Nukleus (Liang und Clarke 1999; Scoumanne *et al.* 2005). Da p53 als Tetramer zu groß ist, um passiv durch Kernporen zu diffundieren, bedarf es der Export- und Importsignale.

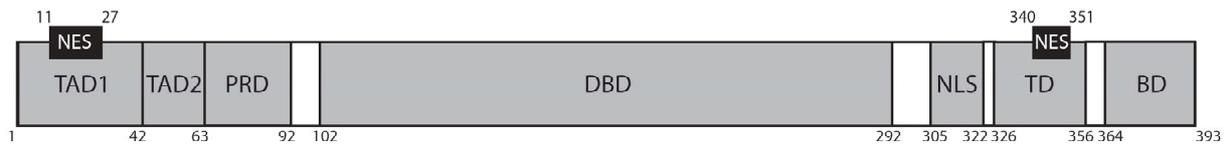


Abb. 1-5: Die Domänenorganisation von p53 (human).

TAD1: AS 1-42; TAD2: AS 43-63; PRD: AS 64-92; DBD: AS 102-292; NLS: AS 305-322; TD: AS 326-356; BD: AS 364-393; NES: AS 11-27 und 340-351

TAD: transaktivierende Domäne; PRD: Prolin-reiche Domäne; DBD: DNA-bindende Domäne; NLS: nukleäres Lokalisationssignal; TD: Tetramerisierungsdomäne; BD: basische Domäne; NES: nukleäres Exportsignal

1.6.1. Die Regulation des Transkriptionsfaktors p53

p53 wird vorrangig infolge von DNA-Schäden aktiviert. Durch die Transaktivierung spezifischer Zielgene ruft p53 unterschiedliche Zellantworten wie Apoptose, Zellzyklusarrest oder Seneszenz hervor. Dabei spielt die Schwere des Schadens eine entscheidende Rolle. Welche Gene durch p53 aktiviert werden hängt einerseits vom p53-Expressionsniveau in der Zelle und andererseits von spezifischen posttranslationalen Modifikationen ab (Abb. 1-6). Die genauen Mechanismen, die zur spezifischen Transaktivierung unterschiedlicher Zielgene führen, sind bisher jedoch kaum verstanden.

Es sind weit mehr als 100 Zielgene von p53 bekannt. Zu den besonders gut untersuchten gehört der Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen p21, dessen Expression zum Zellzyklusarrest führt (el-Deiry *et al.* 1993; Xiong *et al.* 1993). Ebenso ist die p53-abhängige Regulation der Gene *14-3-3 σ* (Hermeking *et al.* 1997) und *GADD45* (Kastan *et al.* 1992) für den Zellzyklusarrest bedeutsam. Die pro-apoptotischen Proteine Bax (Miyashita und Reed 1995), Puma (Nakano und Vousden 2001; Yu *et al.* 2001), Noxa (Oda *et al.* 2000a), Bid (Sax *et al.* 2002) und APAF-1 (Fortin *et al.* 2001; Moroni *et al.* 2001) werden ebenso positiv durch p53 reguliert. Für den extrinsischen Signalweg sind der Rezeptor Fas, sowie TRAILR1 und TRAILR2 als Zielgene von p53 beschrieben (Michalak *et al.* 2005). Zusätzlich zu seiner Funktion als transkriptioneller Aktivator reguliert p53 die Transkription einiger Gene negativ. So verhindert die Interaktion von p53 mit Transkriptionsfaktoren in einigen Fällen deren Aktivierung bestimmter Promotoren (Maiyar *et al.* 1997; Lee *et al.* 1999; Subbaramaiah *et al.* 1999; Li und Lee 2001; Kim *et al.* 2003; Gu *et al.* 2004; St Clair *et al.* 2004; Zhu *et al.* 2005). Die p53-regulierte Repression von Chk1, Cdc2, Cyclin A2, Cyclin B1 oder Survivin kann ein indirekter Effekt durch die Transaktivierung von *p21* sein (Gottifredi *et al.* 2001; Hoffman *et al.* 2002; Lohr *et al.* 2003).

p53 selbst wird vorrangig auf posttranslationaler Ebene reguliert und weniger auf transkriptioneller Ebene. In gesunden Zellen verfügt p53 nur über eine kurze Halbwertszeit, da es durch die E3-Ubiquitin-Ligase MDM2 ubiquityliert und somit für den proteasomalen Abbau markiert wird (Freedman *et al.* 1999). Die Relevanz dieser Ubiquitin-Ligase für die p53-Regulation belegen Studien an MDM2 KO Mäusen. Diese Mäuse weisen durch unkontrollierte p53-Mengen einen embryonal letalen Phänotyp auf. Durch einen zusätzlichen KO von p53 wird die Letalität aufgehoben (Jones *et al.* 1995; Montes de Oca Luna *et al.*

1995). Obwohl MDM2 mit der N-terminalen Domäne von p53 interagiert (Chen *et al.* 1993; Picksley *et al.* 1994), ubiquityliert es p53 an dessen C-Terminus. Die 6 Lysinreste in humanem p53, welche durch MDM2 ubiquityliert werden, sind K370, K372, K373, K381, K382 und K386 (Nakamura *et al.* 2000; Rodriguez *et al.* 2000; Olsson *et al.* 2007). Sie sind alle in der basischen Domäne lokalisiert. Die Interaktion von MDM2 mit p53 führt nicht nur zur Ubiquitylierung und Destabilisierung von p53, sondern wirkt aufgrund der Bindung von MDM2 im Bereich der Transaktivierungsdomäne auch negativ auf die Interaktion von p53 mit dem basalen Transkriptionsapparat (Momand *et al.* 1992; Thut *et al.* 1997). Der Grad der Ubiquitylierung von p53 entscheidet nicht nur über dessen Abbau, sondern auch seine Lokalisation. Monoubiquityliertes p53 wird ins Zytoplasma exportiert (Boyd *et al.* 2000; Geyer *et al.* 2000), wo polyubiquityliertes p53 durch das Proteasom degradiert wird (Li *et al.* 2003; Carter *et al.* 2007). Die Intensität der p53-Ubiquitylierung ist von der MDM2-Konzentration in der Zelle abhängig. MDM2 wird nach Stressinduktion durch p14^{ARF} negativ reguliert (Pomerantz *et al.* 1998; Zhang *et al.* 1998; Honda und Yasuda 1999), wodurch wiederum p53 stabilisiert und aktiviert wird. Außerdem phosphoryliert die Kinase ATM, die nach DNA-Schaden aktiviert wird, MDM2, das dadurch deaktiviert wird (Khosravi *et al.* 1999; Maya *et al.* 2001). Die Expression von MDM2 wird durch p53 selbst positiv reguliert (Wu *et al.* 1993), wodurch hohe p53-Mengen in der Zelle zu einer negativen Regulationsschleife führen.

Zwischen p53-Ubiquitylierung und p53-Acetylierung besteht ein Zusammenhang, da beide Modifikationen z.T. an identischen Lysin-Resten erfolgen (Gu und Roeder 1997; Sakaguchi *et al.* 1998; Liu *et al.* 1999a). Zellulärer Stress führt zur p53-Acetylierung durch die Histonacetylasen p300/CBP (Gu und Roeder 1997) und PCAF (Sakaguchi *et al.* 1998) und fördert damit die transaktivierende Funktion von p53 möglicherweise durch die Bindung transkriptioneller Koaktivatoren (Jayaraman und Prives 1999; Barlev *et al.* 2001; Ito *et al.* 2001). Die Acetylierung der Lysin-Reste verhindert zugleich deren Ubiquitylierung (Li *et al.* 2002). MDM2 reguliert die p53-Acetylierung durch Hemmung der Acetyltransferaseaktivität von p300 und CBP negativ (Kobet *et al.* 2000; Ito *et al.* 2001). Ito *et al.* (2002) wiesen zusätzlich eine (indirekte) Interaktion zwischen MDM2 und der Deacetylase HDAC1 nach und zeigten, dass MDM2 durch HDAC1 die Deacetylierung von p53 bewirkt und p53 damit wieder zugänglich für Ubiquitylierungen macht (Ito *et al.* 2002).

Neben MDM2 sind weitere Ubiquitin-E3-Ligasen von p53 beschrieben: COP1 (Dornan *et al.* 2004), Pirh2 (Leng *et al.* 2003) und ARF-BP1/Mule (Chen *et al.* 2005a). Inwiefern diese Enzyme entscheidend in die Regulation von p53 involviert sind, ist bislang nicht geklärt.

Abgesehen von Ubiquitylierung und Acetylierung beeinflusst die Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten speziell am N- und C-Terminus die Aktivität von p53 in besonderem Maße. Mehrere Kinasen modifizieren p53 abhängig vom Stressesstimulus. Zu diesen Kinasen zählen ATM, ATR, Chk1, Chk2, CK1, CK2, JNK, p38 MAPK, HIPK2 und

DYRK2. Die Phosphorylierung von p53 wirkt sich positiv auf dessen Proteinstabilität aus und beeinflusst dessen Interaktion mit anderen Proteinen oder der DNA. Einige Aminosäuren sind konstitutiv phosphoryliert (T55 und S376/378) und werden nach DNA-Schädigung dephosphoryliert (Waterman *et al.* 1998; Appella und Anderson 2001; Bode und Dong 2004). Die Phosphorylierung von p53 an S15, T18 und S20 in der Transaktivierungsdomäne ist am besten charakterisiert. So wird S15 durch ATM nach γ -Bestrahlung phosphoryliert, jedoch nicht nach UV-Bestrahlung (Banin *et al.* 1998; Canman *et al.* 1998; Khanna *et al.* 1998; Waterman *et al.* 1998). Die Phosphorylierung an S15 wird mit p53-abhängiger Transaktivierung, Zellzyklusarrest und Apoptose in Verbindung gebracht (Fiscella *et al.* 1993; Shieh *et al.* 1997; Khanna *et al.* 1998). Die Phosphorylierung der Aminosäuren T18 und S20 hängt von der initialen Phosphorylierung an S15 ab (Dumaz *et al.* 1999; Saito *et al.* 2003). Die Phosphorylierung von T18 (ATM) und S20 (Chk1, Chk2) (Saito *et al.* 2002; Wang *et al.* 2004) interferiert wiederum mit der Bindung von MDM2 an p53, wodurch die Ubiquitylierung am C-Terminus verhindert und p53 stabilisiert wird (Chehab *et al.* 1999; Unger *et al.* 1999a; Unger *et al.* 1999b; Hirao *et al.* 2000). Die Kinasen HIPK2 (Rinaldo *et al.* 2007) und DYRK2 (Taira *et al.* 2007) phosphorylieren p53 nach schwerem, irreparablen DNA-Schaden an Serin 46, wodurch spezifisch die Expression pro-apoptotischer Gene wie *p53AIP1* induziert wird (Oda *et al.* 2000b). S392 innerhalb der basischen Domäne wird durch p38 MAPK oder Kaseinkinase 2 nach UV-Bestrahlung phosphoryliert, jedoch nur sehr ineffizient nach γ -Bestrahlung (Keller *et al.* 1999; Kapoor *et al.* 2000; Keller *et al.* 2001). Diese Phosphorylierung stabilisiert das p53-Tetramer (Sakaguchi *et al.* 1997).

Durch die Interaktion von stabilisiertem und aktiviertem p53 mit spezifischen Kofaktoren, induziert p53 nach Bindung an seine Konsensussequenz auf der DNA die Transkription von Zielgenen (Barlev *et al.* 2001; Xing *et al.* 2001; Lee *et al.* 2002; An *et al.* 2004; Hsu *et al.* 2004) und ruft so Apoptose, Zellzyklusarrest oder Seneszenz hervor.

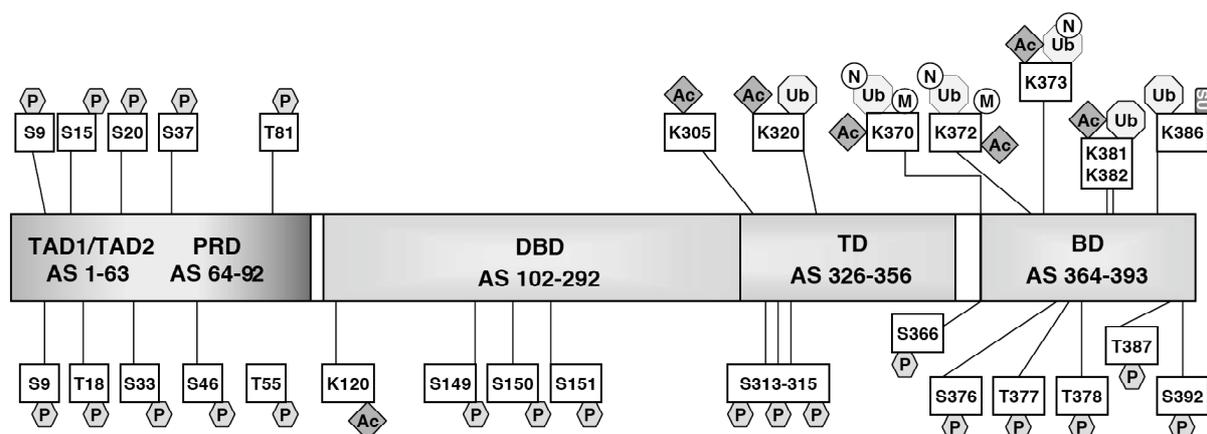


Abb. 1-6: Posttranslationale Modifikationen von humanem p53 (entnommen und adaptiert aus Olsson *et al.* (2007)).

P: Phosphorylierung; Ac: Acetylierung; Ub: Ubiquitylierung; M: Methylierung; N: Neddilyerung; SU: Sumoylierung

1.6.2. Nicht-transkriptionelle Funktion von p53

Neben der anerkannten Funktion als Transkriptionsfaktor deutet eine zunehmende Zahl von Studien darauf hin, dass p53 auch eine Transkriptions-unabhängige Rolle in der Apoptose spielt. So verhindern p53-Mutationen, die zum Verlust seiner transkriptionellen Aktivität führen, die p53-induzierte Apoptose nicht (Chipuk *et al.* 2003; Dumont *et al.* 2003). Zudem induziert p53 in Gegenwart von Bax in zellfreien Extrakten direkt die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (Schuler *et al.* 2000). Aktuelle Arbeiten lassen vermuten, dass p53 direkt mit der mitochondrialen Apoptose-Maschinerie interagiert und möglicherweise eine den BH3-only Proteinen verwandte pro-apoptotische Aktivität besitzt (Marchenko *et al.* 2000; Sansome *et al.* 2001). p53 transloziert an die Mitochondrien und bindet dort direkt an Bcl-x_L und Bcl-2 (Mihara *et al.* 2003; Erster und Moll 2004; Tomita *et al.* 2006). In diesem Modell fungiert p53 ähnlich wie BH3-only Proteine als Sensitivierer und trägt so zur Freisetzung von Bax und Bak aus ihrer inaktivierenden Bindung an anti-apoptotische Bcl-2-Proteine bei. Ein anderes Modell bezieht das p53-Zielprotein Puma in die Transkriptions-unabhängigen Effekte von p53 ein. Demnach verdrängt Puma p53 aus seinem Komplex mit Bcl-2, wonach das freigesetzte p53 direkt an Bax bindet und dessen pro-apoptotische Aktivität induziert (Chipuk *et al.* 2005). Ein ähnlicher Mechanismus wurde auch für die Aktivierung von Bak beschrieben: Durch eine direkte Interaktion von p53 mit Bak wird dessen Bindung an Mcl-1 aufgehoben (Leu *et al.* 2004).

Obgleich eine den BH3-only Proteinen ähnliche Funktion von p53 ein attraktives Modell darstellt, ist es mit mehreren Befunden nicht vereinbar. So ist die p53-induzierte Apoptose in Puma-defizienten Fibroblasten blockiert (Yu *et al.* 2003). Zudem kann Puma auch unabhängig von p53 direkt die Bindung von Bcl-x_L an Bax aufheben (Ming *et al.* 2006). Weiterhin führt die Überexpression von Puma in p53-defizienten MEFs zur Cytochrom c-Freisetzung aus den Mitochondrien (Kim *et al.* 2006). In anderen Zellsystemen verhinderte die Deletion der p53-Konsensussequenz im *puma*-Promotor Apoptose nach DNA-Schädigung (Wang *et al.* 2007). In einer weiteren Studie wurde die p53-Translokation an die Mitochondrien durch Bestrahlung induziert, jedoch ohne dadurch Apoptose auslösen zu können (Essmann *et al.* 2005). Eine Transkriptions-unabhängige Funktion von p53 bleibt daher sehr umstritten und scheint im Vergleich zu seiner Funktion als Transkriptionsfaktor von geringer Bedeutung zu sein.

1.6.3. p53-Isoformen

1985, sechs Jahre nach der erstmaligen Beschreibung des Tumorsuppressors p53, wurde eine alternative Spleißvariante in Mäusen identifiziert (Wolf *et al.* 1985; Arai *et al.* 1986). Alternatives Spleißen des primären p53-Transkripts innerhalb des Introns 10 führt zur Bildung zweier mRNAs und auch zur Expression beider p53-Isoformen auf Proteinebene – NSp53 (*normal splice*) und ASp53 (*alternative splice*). Die letzten 26 C-terminalen

Aminosäuren von NSp53 sind in ASp53 durch 17 alternative Aminosäuren ersetzt, wodurch es zum Verlust der basischen Domäne kommt, die Oligomerisierungsdomäne bleibt hingegen erhalten (Arai *et al.* 1986). Der alternative C-Terminus in ASp53 führt zu einer konstitutiven Sequenz-spezifischen DNA-Bindungsaktivität (Han und Kulesz-Martin 1992; Kulesz-Martin *et al.* 1994). ASp53 ist in der Lage, p53-Zielgene zu aktivieren (Wu *et al.* 1994; Almog *et al.* 2000). Außerdem existiert eine murine N-terminal verkürzte Spleißvariante, die p44 genannt wird (Maier *et al.* 2004).

1987 wurde schließlich eine alternative Spleißvariante des humanen *p53*-Gens identifiziert (Matlashewski *et al.* 1987), die durch alternatives Spleißen innerhalb des zweiten Introns entsteht und $\Delta 40p53$ (auch p47 oder $\Delta Np53$) genannt wird. Diese Spleißvariante ist N-terminal um 39 Aminosäuren verkürzt und beginnt mit dem 40. Codon (ATG). $\Delta 40p53$ kann nicht nur durch alternatives Spleißen von Intron 2 entstehen, sondern auch durch alternative Initiation der Translation (Courtois *et al.* 2002; Yin *et al.* 2002). Flaman *et al.* (1996) beschrieben ein drittes humanes p53-Transkript, welches durch alternatives Spleißen innerhalb von Intron 9 entsteht und dementsprechend p53i9 genannt wurde. Diese Spleißvariante kodiert ein verkürztes Protein mit nur 341 Aminosäuren, dessen letzte 10 C-terminale Aminosäuren aus Intron 9 stammen. Diesem C-terminal verkürzten p53i9-Protein fehlt u.a. die Oligomerisierungsdomäne und seine transkriptionelle Aktivität ist *in vivo* stark reduziert (Flaman *et al.* 1996). Felix *et al.* (1992) und Chow *et al.* (1993) hatten diese humane p53-Spleißvariante bereits in Krebszellen von Leukämie-Patienten bzw. in der T-lymphoblastoiden Leukämie-Zelllinie Molt-4 beschrieben. Zusätzlich zu den drei bekannten humanen p53-Transkripten identifizierten Bourdon *et al.* (2005) sechs weitere bis dahin unbekannte p53-Isoformen. Konsistent mit der Nomenklatur der p63- und p73-Isoformen benannten sie die p53i9-Isoform in p53 β um. Durch alternatives Spleißen in Intron 9 entstehen zwei C-terminal verkürzte p53-Isoformen. Das bereits beschriebene p53 β (p53i9) und p53 γ . Genau wie p53 β ist auch p53 γ um 62 Aminosäuren verkürzt und besitzt daher keine Oligomerisierungsdomäne, verfügt aber über 15 alternative C-terminale Aminosäuren. Zusätzlich zu der N-terminal verkürzten Isoform $\Delta 40p53$ entsteht durch einen internen Promotor in Intron 4 eine zweite N-terminal verkürzte p53-Isoform, welche an Codon 133 (ATG) initiiert wird: $\Delta 133p53$. Dieser Isoform fehlt die gesamte Transaktivierungsdomäne, die Prolin-reiche Domäne und ein Teil der DNA-bindenden Domäne. Die Kombination aller N-terminalen und C-terminalen Spleißvarianten ergibt neun humane p53-Isoformen (Abb. 1-7).

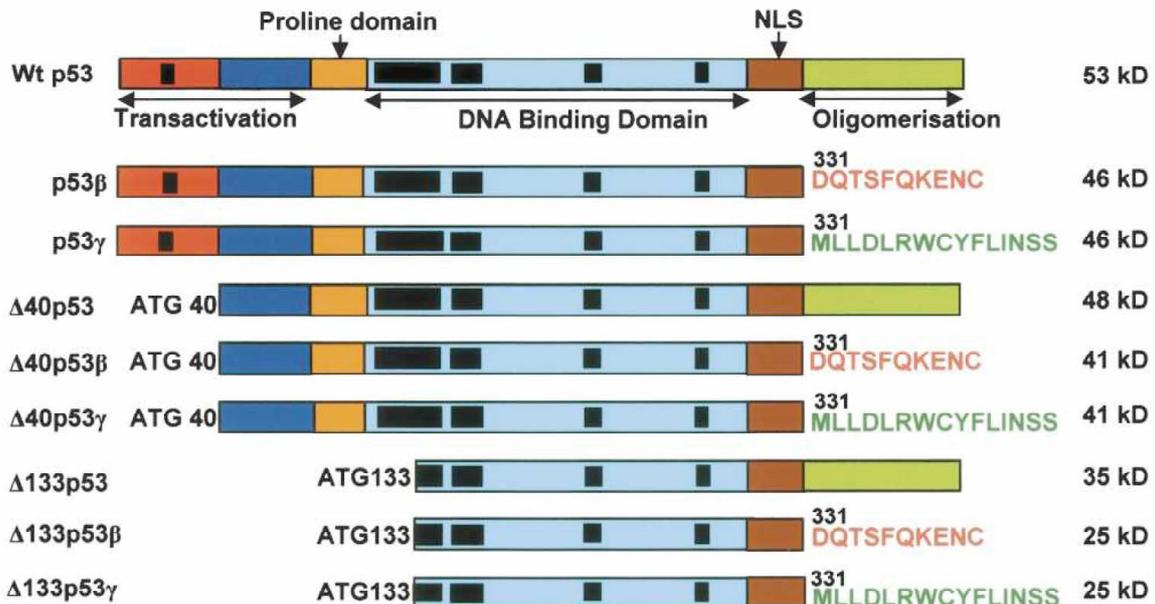


Abb. 1-7: p53-Proteinisoformen, die theoretisch durch den humanen *p53*-Genlokus kodiert sind (entnommen aus Bourdon *et al.* (2005)).

$\Delta 40p53$ enthält noch einen Teil der N-terminalen Transaktivierungsdomäne und kann daher nach Transfektion Genexpression durch die zweite Transaktivierungsdomäne, die zwischen den Aminosäuren 43 und 63 lokalisiert ist, induzieren (Zhu *et al.* 1998; Zhu *et al.* 2000; Harms und Chen 2005). Jedoch konnte auch ein dominant-negativer Effekt von $\Delta 40p53$ gegenüber *wtp53* ($p53\alpha$) nachgewiesen werden, wodurch es dessen transkriptionelle Aktivität und damit $p53$ -induzierte Apoptose hemmt (Courtois *et al.* 2002; Ghosh *et al.* 2004). Obwohl $\Delta 40p53$ über die Lysin-Reste, die von MDM2 ubiquitiniert werden, verfügt, führt der Verlust seines N-Terminus und der damit einhergehende Verlust der Interaktionsstelle zwischen $p53$ und MDM2 dazu, dass $\Delta 40p53$ nicht durch MDM2 ubiquityliert wird und deshalb im Vergleich zu *wtp53* über eine längere Halbwertszeit verfügt (Scrabble *et al.* 2005).

Bourdon *et al.* (2005) zeigten, dass $p53\beta$ mit *wtp53* interagiert und selektiv an $p53$ -regulierte Promotoren bindet und deren Transaktivierung durch *wtp53* positiv beeinflussen kann. Die Expression von *wtp53* und $p53\beta$ führt zu einer mäßigen Erhöhung der *wtp53*-induzierten Apoptose. Die N-terminal verkürzte Spleißvariante $\Delta 133p53$ hemmt hingegen die durch *wtp53* induzierte Apoptose (Bourdon *et al.* 2005). Eine andere Studie zeigt, dass die Expression von *wtp53* das $p53$ -regulierbare PG13-Promotorkonstrukt induziert, aber die Expression von $\Delta 133p53$, $\Delta 133p53\beta$ oder $p53\beta$ hingegen keinen Einfluss auf die PG13-Promotorinduktion hat. Die Expression von *wtp53* und $\Delta 133p53$ hat mit zunehmender Menge an $\Delta 133p53$ einen hemmenden Effekt auf die $p53$ -induzierte Transaktivierung, was auf den dominant-negativen Effekt von $\Delta 133p53$ zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu hat die Expression von $\Delta 133p53\beta$ oder $p53\beta$ gemeinsam mit *wtp53* keinen Einfluss auf die durch

wtp53 induzierte Transaktivierung (Murray-Zmijewski *et al.* 2006). Konsistent mit der Analyse der transkriptionellen Aktivität hat die Expression von wtp53 und $\Delta 133p53\beta$ keinen signifikanten Einfluss auf die durch wtp53-induzierte Apoptose. So übt $\Delta 133p53\beta$ im Gegensatz zu $\Delta 133p53$ keinen dominant-negativen Effekt aus (Murray-Zmijewski *et al.* 2006).

1.6.4. Die *p53*-Genfamilie: *p63* und *p73*

Im Genom von Säugern sind drei Mitglieder der *p53*-Genfamilie bekannt (*p53*, *p63* und *p73*), wohingegen für Invertebraten nur ein Familienmitglied beschrieben ist. Dies legt den Schluss nahe, dass die homologen Gene *p53*, *p63* und *p73* in Säugern durch Triplikation eines Genlokus entstanden sind (Yang *et al.* 2002).

Im Jahre 1997 bzw. 1998 wurden zwei Gene mit großer Sequenzhomologie zu *p53* identifiziert: *p73* und *p63* (Kaghad *et al.* 1997; Yang *et al.* 1998). Sowohl vom humanen als auch vom murinen *p63*-Gen sind drei alternativ gespleißte Carboxy-terminale Isoformen bekannt (α , β , γ). Zudem kann *p63* von einem alternativen Promotor innerhalb des dritten Introns transkribiert werden (Yang *et al.* 1998). Die transaktivierenden Isoformen (TAp63) werden durch die Transkription ausgehend von dem Promotor, der sich vor Exon 1 befindet, gebildet. Der alternative Promotor innerhalb von Intron 3 führt zur Expression Amino-terminal verkürzter Isoformen ($\Delta Np63$), die nicht über die Transaktivierungsdomäne verfügen. Zusammen ergibt die Kombination aus C-terminalen Spleißvarianten und der Verwendung eines internen alternativen Promotors sechs *p63*-Isoformen (TAp63 α , TAp63 β , TAp63 γ , $\Delta Np63\alpha$, $\Delta Np63\beta$, $\Delta Np63\gamma$) (Murray-Zmijewski *et al.* 2006).

Aufgrund der großen Sequenzhomologie in der DNA-bindenden Domäne von *p53*, *p63* und *p73* können die TAp63-Isoformen DNA an *p53*-Konsensussequenzen (*p53RE*) binden und die Transkription der entsprechenden Zielgene aktivieren. Diese Zielgene sind in Zellzyklusarrest oder Apoptose involviert, weshalb die TAp63-Isoformen auch als *p53*-ähnlich bezeichnet werden. *p63* besitzt aber auch eine eigene Konsensussequenz (*p63RE*) (Osada *et al.* 2005; Sasaki *et al.* 2005; Scoumanne *et al.* 2005; Ortt und Sinha 2006), die sich von dem *p53RE* (el-Deiry *et al.* 1992) unterscheidet (Tab. 1-1). Diese spezifische Konsensussequenz erlaubt die Transaktivierung von Zielgenen, die unabhängig von *p53* reguliert werden. Die $\Delta Np63$ -Isoformen können DNA an *p53RE* binden und einen dominant-negativen Effekt auf *p53*, *p73* und TAp63 ausüben, indem sie um DNA-Bindungsstellen konkurrieren oder durch direkte Proteininteraktion (Benard *et al.* 2003). Andererseits aktivieren $\Delta Np63$ -Isoformen die Transkription spezifischer Zielgene, welche von den TAp63-Isoformen nicht reguliert werden (Dohn *et al.* 2001; Wu *et al.* 2003; Helton *et al.* 2006). Obwohl den $\Delta Np63$ -Isoformen die typische Transaktivierungsdomäne der TAp63-Isoformen fehlt, können sie dennoch mittels ihrer alternativen N-terminalen Sequenz eine

transaktivierende Funktion auf spezifische Zielgene ausüben (Helton *et al.* 2006). Genetische Studien an transgenen Mäusen haben gezeigt, dass p63 für die Entwicklung des Epithelgewebes und der Gliedmaßen essentiell ist (Yang *et al.* 1998; Mills *et al.* 1999).

Von p73 sind sogar sieben alternativ gespleißte C-terminale Isoformen beschrieben (α , β , γ , δ , ϵ , ζ , η) (Melino *et al.* 2003; Moll und Slade 2004) und vier alternativ gespleißte N-terminale Isoformen (Stiewe *et al.* 2002). Wie p63 kann auch p73 ausgehend von einem alternativen Promotor innerhalb von Intron 3 transkribiert werden. Die Isoformen mit transaktivierender Funktion (TAp73) werden an dem Promotor initiiert, der sich vor Exon 1 befindet. Der alternative, in Intron 3 gelegene Promotor führt zur Expression N-terminal verkürzter Isoformen (Δ Np73), denen die Transaktivierungsdomäne fehlt. Zwei weitere N-terminal verkürzte Spleißvarianten entstehen durch alternatives Spleißen von Exon 2 (ex2p73) bzw. Exon 2 und 3 (ex2/3p73). Den sogenannten ex2p73-Isoformen fehlt ein Teil der N-terminalen Transaktivierungsdomäne, während den ex2/3p73-Isoformen ebenso wie den Δ Np73-Isoformen die gesamte N-terminale Transaktivierungsdomäne fehlt (Murray-Zmijewski *et al.* 2006). Rechnerisch ergeben sich aus der Kombination der alternativen N- und C-terminalen Spleißvarianten 28 p73-Isoformen. Bisher sind auf Proteinebene aber nur 14 p73-Isoformen beschrieben (Murray-Zmijewski *et al.* 2006).

Ebenso wie TAp63 können auch die TAp73-Isoformen DNA an p53RE binden und die Expression von Zielgenen induzieren. Vergleichbar mit der Transaktivierung durch p53 induziert TAp73 an p53RE Gene, die in die Zellzyklus- und Apoptoseregulation involviert sind. Für einige C-terminal alternativ gespleißte TAp73-Isoformen konnte eine differentielle transaktivierende Funktion gezeigt werden (De Laurenzi *et al.* 1998). Ähnlich wie die N-terminal verkürzten p63-Isoformen können auch die Δ Np73-Isoformen DNA an p53RE binden und einen dominant-negativen Effekt auf p53, p63 und TAp73 ausüben, indem sie um DNA-Bindungsstellen konkurrieren oder durch direkte Proteininteraktion (Benard *et al.* 2003; Melino *et al.* 2003). Auf diese Weise zeigen die N-terminal verkürzten Isoformen anti-apoptotische Wirkung. Einige Δ Np73-Isoformen aktivieren direkt die Transkription spezifischer Zielgene, welche nicht durch die TAp73-Isoformen reguliert sind (Liu *et al.* 2004). Es existieren zudem Hinweise auf eine spezifische p73-Konsensussequenz (p73RE), so dass einige Zielgene zwar von p73 nicht jedoch von p53 reguliert werden (Sasaki *et al.* 2005; Osada *et al.* 2006) (Tab. 1-1).

Mäuse, die keine p73-Isoform exprimieren, leiden an Defekten in der Gehirnentwicklung, pflanzen sich nicht fort, zeigen jedoch keine gesteigerte Tendenz zur Krebsentstehung (Yang *et al.* 2000). Während der Gehirnentwicklung in Mäusen sind Δ Np73-Isoformen vorherrschend (Pozniak *et al.* 2000). Sie wirken durch ihren dominant-negativen Effekt der p53-induzierten Rückbildung neuronalen Gewebes entgegen. Der Entzug von NGF führt einerseits zur Induktion von p53 und andererseits zu einem Rückgang der Δ Np73-

Expression (Pozniak *et al.* 2000). Die N-terminal verkürzten p73-Isoformen Δ Np73, ex2p73 und ex2/3p73, für die anti-apoptotische Funktionen beschrieben sind, werden in vielen Krebsarten vermehrt exprimiert (Fillippovich *et al.* 2001; Casciano *et al.* 2002; Concin *et al.* 2004).

Protein	Konsensussequenz	Referenz
p53	5' Pu Pu Pu C A/T A/T G Py Py Py 3'	El-Deiry <i>et al.</i> 1992
p63	5' A/T A/T A C A/T T G T A/T T 3'	Ortt und Sinha 2006
	5' Pu Pu Pu C G T G Py Py Py 3'	Osada <i>et al.</i> 2005
	5' C C C G C C C G C G G G C G C C C A C C 3' gemeinsam mit der p53-Konsensussequenz	Osada <i>et al.</i> 2006
p73	5' C C C G C C C G C G G G C G C C C A C C 3' gemeinsam mit der p53-Konsensussequenz	Osada <i>et al.</i> 2006

Tab. 1-1: p53-, p63- und p73-Konsensussequenzen.

1.7. Seneszenz

Neben Apoptose und Zellzyklusarrest kann p53 auch Seneszenz induzieren. Auch die Seneszenz ist das Resultat eines aktiven Prozesses, dem ein genetisches Programm zugrunde liegt. Bereits 1965 beschrieb Leonard Hayflick das limitierte replikative Potential humaner Fibroblasten in Kultur (Hayflick 1965). Seither ist die endliche Teilungsrate nicht-immortalisierter Zellen als das Hayflick-Limit bekannt. Seneszenten Zellen zeichnen sich durch folgende Charakteristika aus: sie befinden sich im permanenten Zellzyklusarrest, sind vital, metabolisieren, besitzen eine vergrößerte Zelloberfläche und ein vergrößertes Volumen und zeigen verstärkte Aktivität der sauren β -Galaktosidase, welche als Marker für Seneszenz verwendet wird (Dimri *et al.* 1995).

Man unterscheidet zwei Arten der Seneszenz: replikative, im Zuge des Alterungsprozesses auftretende Seneszenz und Stress-induzierte, prämaturre Seneszenz. Die replikative Seneszenz wird durch die Verkürzung der Telomere in proliferierenden Zellen, die keine Telomerase exprimieren, hervorgerufen, wohingegen Stress-induzierte Seneszenz das Resultat einer Zellschädigung ist. Ähnlich der Apoptose ist auch Seneszenz ein Mechanismus, der die unkontrollierte Proliferation von Zellen verhindert und somit ein Prozess der Tumorsuppression. Die Auslösung von Apoptose oder Seneszenz ist abhängig vom Zelltyp, der spezifischen Expression von Onkogenen, pro- und anti-apoptotischen Proteinen und der Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren (Smogorzewska und de Lange 2002).

Replikative Seneszenz wird hauptsächlich durch p53 und dessen Zielgen *p21* vermittelt (Saretzki *et al.* 1999). Funktionelle Telomere sind während der DNA-Replikation und für die

korrekte Aufteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen während der Mitose von entscheidender Bedeutung. Chromosomen ohne Telomerenden sind der Gefahr der Degradation oder Rekombination ausgesetzt. Sie können mit anderen Chromosomenden oder an DNA-Doppelstrangbrüche durch das zelluläre DNA-Reparatursystem fusioniert werden, was wiederum zu Translokationen oder intrachromosomalen Brüchen führt, da dizentrische Chromosomen während der Anaphase auseinandergezogen werden können (Lundblad 2000; Chan und Blackburn 2002; Gisselsson 2003). Die Verkürzung der Telomere im Zuge der Replikation oder eine Fehlfunktion Telomer-assoziiierter Proteine setzt ähnliche Mechanismen wie die Schädigung der DNA in Gang, durch welche Reparatur-Enzyme aktiviert werden. Zu den aktivierten Proteinen zählen phosphorylierte Histone H2AX und Kinasen wie ATM, ATR, DNA-Proteinkinasen, Chk1 und Chk2 (Takai *et al.* 2003; Gire *et al.* 2004; Herbig *et al.* 2004). Die Phosphorylierung und Aktivierung der Kinasen Chk1 und Chk2 durch ATM/ATR resultiert wiederum in der Phosphorylierung und damit einhergehender Aktivierung von p53. Die Kinase ATM phosphoryliert aber auch MDM2, das hierdurch deaktiviert wird und folglich p53 nicht länger für den proteasomalen Abbau markiert (Bode und Dong 2004). Nach einem DNA-Schaden erfolgt zudem die Aktivierung von p14^{ARF} (p19^{ARF} in der Maus), welches MDM2 inhibiert und somit indirekt zu einer Stabilisierung von p53 beiträgt. Die p53-vermittelte Transaktivierung von p21, einem Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen (CKI) (vorrangig Hemmung von CDK2), resultiert im Arrest der Zelle im Zellzyklus. Ein weiterer CKI – p16^{INK4a} – hemmt CDK 4 und 6 und führt somit zur Hypophosphorylierung bzw. Aktivierung von pRb (Collins und Sedivy 2003). Hypophosphoryliertes pRb verhindert seinerseits das Voranschreiten der Zelle im Zellzyklus durch die Hemmung des Transkriptionsfaktors E2F, welcher u.a. für die Expression von Cyclin E und Cyclin A verantwortlich ist.

Stress-induzierte Seneszenz wird ebenfalls durch p53 oder den p16/pRb-Signalweg vermittelt. Hypophosphoryliertes bzw. aktives pRb kann indirekt zu epigenetischer Genkontrolle durch Histon- und DNA-Methylierung und der daraus resultierenden Stilllegung der betroffenen Chromosomenabschnitte führen (Robertson und Wolffe 2000; Nielsen *et al.* 2001; Rountree *et al.* 2001; Vandel *et al.* 2001; Narita *et al.* 2003).

Obgleich ein permanenter Zellzyklusarrest unkontrolliertes Zellwachstum und damit Tumorentstehung verhindern kann, besteht die Gefahr einer malignen Transformation oder anderer alterungsbedingter Veränderungen des umliegenden Gewebes, da seneszente Zellen bestimmte Proteine sekretieren. Der sekretorische Phänotyp seneszenten Zellen ähnelt dem von Fibroblasen, die einen Entzündungsprozess durchlaufen (Grinnell 2003). Die Proteine, die von seneszenten Zellen sekretiert werden, unterscheiden sich abhängig vom Zelltyp. Am besten charakterisiert sind Fibroblasten von Säugern, welche verschiedene Matrixmetalloproteasen, epitheliale Wachstumsfaktoren und inflammatorische Zytokine

sekretieren (Krtolica *et al.* 2001; Chang *et al.* 2002a; Krtolica und Campisi 2002). Seneszente Fibroblasten schaffen dadurch lokal im umliegenden Gewebe Bedingungen, die das Wachstum epithelialer Zellen begünstigen (Krtolica *et al.* 2001; Roninson 2002; Dilley *et al.* 2003).

1.8. Zielsetzung der Arbeit

Bourdon *et al.* (2005) identifizierten zusätzlich zu den bereits beschriebenen drei humanen p53-Isoformen sechs weitere. Die Autoren präsentierten in ihrer Studie, dass p53 β an den *p21*- und *bax*-Promotor bindet und unter Stressbedingungen die Transaktivierung des *bax*-Promotors durch wtp53 positiv reguliert. Es wurde zudem eine Interaktion zwischen diesen beiden Isoformen nachgewiesen. Da p53 β durch alternatives Spleißen nicht mehr über die C-terminale Tetramerisierungsdomäne verfügt, ist dies eine interessante Beobachtung.

Aufgrund der Aktualität der Entdeckung zusätzlicher humaner p53-Isoformen existieren bisher kaum funktionelle Studien über diese Isoformen und deren zugrunde liegenden molekularen Mechanismen. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, die beiden p53-Isoformen p53 β und p53 γ hinsichtlich ihres Einflusses auf Apoptose, Zellzyklusarrest und Seneszenz funktionell zu charakterisieren. Da in einer Studie von Essmann *et al.* (2005) zwar die Translokation von p53 an die Mitochondrien gezeigt werden konnte, allerdings in Abwesenheit von Apoptose, war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit zu ergründen, ob möglicherweise die beiden p53-Isoformen p53 β und p53 γ direkt für eine Apoptoseinduktion über den mitochondrialen Signalweg verantwortlich sein könnten.

Zusätzlich zu der funktionellen Charakterisierung der p53-Isoformen p53 β und p53 γ wurde nach weiteren Zielgenen von wtp53 innerhalb der Bcl-2-Proteinfamilie gesucht. Nach der Identifizierung dreier potentieller p53-Bindungsstellen in der Promotorsequenz des *bak1*-Genlokus war es die Aufgabe, diese Bindungsstellen in ein Reporter-genplasmid zu klonieren, sie einzeln und in Kombination zu mutieren und in einer Reporter-genanalyse die p53-induzierte Transaktivierung und die Bedeutung jeder einzelnen Bindungsstelle zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Reagenzien

Sofern nicht anders verzeichnet, wurden die Chemikalien von der Karl Roth GmbH & Co., Karlsruhe bezogen.

Substanz	Hersteller
[γ - ³² P]ATP	GE Healthcare, München
7-AAD	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
anti-Flag-Agarose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
ATP	AppliChem GmbH, Darmstadt
Autoradiographiefilme	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
BCA Reagenz	Pierce / Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Calpain-Inhibitor 1	Biomol, Plymouth, PA, USA
Camptothecin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Complete Protease Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Cocktail Tabletten	
DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DMEM	PAA Laboratories, Cölbe
ECL-Lösung	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Ethanol	Merck / VWR International GmbH, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Etoposid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
FKS	Biowest, Nuaille, Frankreich
Flag-Peptid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Fugene 6 Transfektionsreagenz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
G418-Sulfat	PAA Laboratories, Cölbe
Glycylglycin	Fluka Analytical, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Isopropanol	Merck / VWR International GmbH, Darmstadt
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Luciferin	Biaffin GmbH & Co KG, Kassel
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt
McCoy's 5A Medium	PromoCell, Heidelberg
Methanol	Merck / VWR International GmbH, Darmstadt
MG-132	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

NaF	Merck / VWR International GmbH, Darmstadt
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
NP-40	Calbiochem, Merck / VWR International GmbH, Darmstadt
p53-Konsensusoligonukleotid	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
PBS	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin / Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe
Pepstatin A	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PMSF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Poly[d(IC)]	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
ProbeQuant G-50 Micro Säulen	GE Healthcare, München
Protein-G-Sepharose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Q-VD-OPH	MP Biomedicals, Irvine, CA, USA
RPMI 1640	PAA Laboratories, Cölbe
T4 Polynukleotid-Kinase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Triton-X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypanblaulösung	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin / EDTA	PAA Laboratories, Cölbe
Tween 20	Merck / VWR International GmbH, Darmstadt
Whatmanpapier	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel

2.2. Antikörper

Primäre Antikörper		Spezies	Verdünnung	Hersteller
Aktin	monoklonal AC-74	Maus	1:5000	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Bak-NT	polyklonal	Kaninchen	1:1000	Upstate (Lake Placid, NY, USA)
Bax-NT	polyklonal	Kaninchen	1:1000	Upstate
Caspase-3	polyklonal	Ziege	1:1000	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
Flag	polyklonal	Kaninchen	1:1000	Sigma
MDM2	monoklonal IF2	Maus	1:1000	Calbiochem (Darmstadt)
p21	monoklonal SX118	Maus	1:1000	BD Pharmingen (Heidelberg)
p53	monoklonal DO-1	Maus	1:2000	Calbiochem
p53	monoklonal PAb421	Maus	1:1000	Calbiochem
p53	polyklonal (FL-393)	Kaninchen	1:1000	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
PARP	monoklonal C2-10	Maus	1:1000	BD Pharmingen
Tom20	monoklonal 29	Maus	1:1000	BD Transduction Laboratories (Heidelberg)
Sekundäre Antikörper			Verdünnung	Hersteller
HRP-konjugiertes Kaninchen anti-Ziege IgG			1:5000	Calbiochem
HRP-konjugiertes Ziege anti-Kaninchen IgG			1:5000	Promega (Mannheim)
HRP-konjugiertes Ziege anti-Maus IgG			1:5000	Promega

2.3. Konstruktion von Reportergenplasmiden

Zur Untersuchung der p53-abhängigen Regulation der *bak*-Expression wurden verschiedene Reportergenplasmide zur Expression der vom Glühwürmchen (*Photinus pyralis*) kodierte Luciferase konstruiert. Das Ausgangsplasmid pGL3-Basic wurde von Promega (Mannheim) erworben und ist dadurch gekennzeichnet, dass es die Luciferase kodierende cDNA enthält, jedoch keinen Promotor. Die Insertion des zu untersuchenden Promotorbereiches erlaubt die Analyse seines Einflusses auf die Expression der Luciferase.

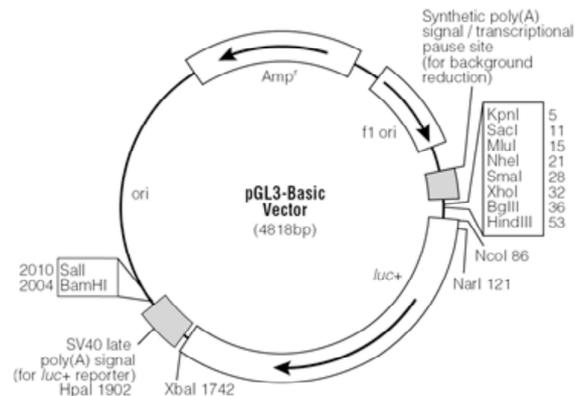


Abb. 2-1: Karte des Vektors pGL3-Basic (entnommen von Promega).

Um den Einfluss der drei potentiellen p53-Bindungsstellen (p53-BS) auf die Expression des Reportergens zu untersuchen, wurden insgesamt 5 unterschiedliche Vektoren kloniert. Allen Vektoren ist gemein, dass sie den gesamten in Abb. 3-23 dargestellten Sequenzabschnitt des *bak*-Promotors enthalten. In Tab. 2-1 sind die Merkmale der 5 Vektoren wiedergegeben.

Vektor	Merkmal
pGL3-Basic+p53-BS	Wildtyp <i>bak</i> -Promotorkonstrukt
pGL3-Basic+mutp53-BS1	p53-Bindungsstelle 1 ist mutiert
pGL3-Basic+mutp53-BS2	p53-Bindungsstelle 2 ist mutiert
pGL3-Basic+mutp53-BS3	p53-Bindungsstelle 3 ist mutiert
pGL3-Basic+mutp53-BS	alle 3 p53-Bindungsstellen sind mutiert

Tab. 2-1: Merkmale der 5 Reportergenkonstrukte zur Untersuchung der p53-abhängigen Luciferase-Expression.

Durch die Wahl entsprechender PCR-Primer wurden einerseits Basenpaarsubstitutionen eingeführt, die nach El-Deiry *et al.* (1992) eine p53-Bindung an die DNA-Sequenz verhindern. Andererseits wurden Restriktionsschnittstellen für die Enzyme Xho I (vorwärts) und Hind III (rückwärts) eingefügt. Die exakten Basensubstitutionen sind den Primersequenzen in Tab. 2-2 zu entnehmen.

Vektor	Primer
pGL3-Basic+p53-BS	<u>vorwärts</u> : 5' CCG CTCGAG ACAGCCGCCCTGCCTGCC 3' <u>rückwärts</u> : 5' CCC AAGCTT CCCCGACTTCCTGGGCTTG 3'
pGL3-Basic+mutp53-BS1	<u>vorwärts</u> : 5' CCG CTCGAG ACAGCCGCCCTGCCTGCCTGGGA GGTGGGGTGGGGAAAGTGGGCGGGAA AATTCCTGGGACT TGCCACCCAGATCATCCTACAGGCTG 3' <u>rückwärts</u> : 5' CCC AAGCTT CCCCGACTTCCTGGGCTTG 3'
pGL3-Basic+mutp53-BS2	<u>vorwärts</u> : 5' GGTGGGGAAGGGGAAGCTCAAGG AATTCCTGG GAAGTCTGC 3' <u>rückwärts</u> : 5' GCAGAA CTCCAGGAAATCCTTGAGCTTCCC CTTCCCCACC 3'
pGL3-Basic+mutp53-BS3	<u>vorwärts</u> : 5' CCG CTCGAG ACAGCCGCCCTGCCTGCC 3' <u>rückwärts</u> : 5' CCC AAGCTT CCCCGACTTCCTGGGCTTGCTGG GCCCCGATGAATGTTGCCAGGGATA AATTCCTGGCAAGTC CCTGGA 3'
pGL3-Basic+mutp53-BS	<u>vorwärts</u> : 5' CCG CTCGAG ACAGCCGCCCTGCCTGCCTGGGA GGTGGGGTGGGGAAAGTGGGCGGGAA AATTCCTGGGACT TGCCACCCAGATCATCCTACAGGCTG 3' <u>rückwärts</u> : 5' CCC AAGCTT CCCCGACTTCCTGGGCTTGCTGG GCCCCGATGAATGTTGCCAGGGATA AATTCCTGGCAAGTC CCTGGA 3'

Tab. 2-2: Verwendete Primer zur Klonierung der angegebenen Vektoren.

Die Restriktionsschnittstellen der Enzyme Xho I und Hind III sind fettgedruckt, die Basensubstitutionen rot hinterlegt.

Die zur Klonierung des Vektors pGL3-Basic+p53-BS verwendete DNA-Matrize stammt aus einer humanen Genombibliothek. Der bei RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH, Berlin) erworbene Klon (Klonnummer RPCIP704J10291Q) trägt im Vektor pCYPAC2 ein 122 kb großes Fragment, welches den gesamten *bak1*-Genlokus beinhaltet. Zur Generierung des Vektors pGL3-Basic+p53-BS wurde der in Abb. 3-23 dargestellte Sequenzbereich mit Hilfe der in Tab. 2-2 angegebenen Primer amplifiziert und das resultierende PCR-Produkt nach Restriktion in den Vektor pGL3-Basic (Abb. 2-1) ligiert. Zur Klonierung der drei Vektoren pGL3-Basic+mutp53-BS1, -2 bzw. -3 wurde der Vektor pGL3-Basic+p53-BS als Matrize verwendet. Die Mutagenese der p53-Bindungsstelle 2 wurde mit dem Mutagenese-Kit von Stratagene (Amsterdam, Niederlande) durchgeführt. Bei der PCR zur Klonierung des Vektors pGL3-Basic+mutp53-BS, in dem alle 3 p53-Bindungsstellen mutiert sind, diente der Vektor pGL3-Basic+mutp53-BS2 als Matrize. In Abb. 2-2 ist exemplarisch die Karte des Vektors pGL3-Basic+p53-BS gezeigt.

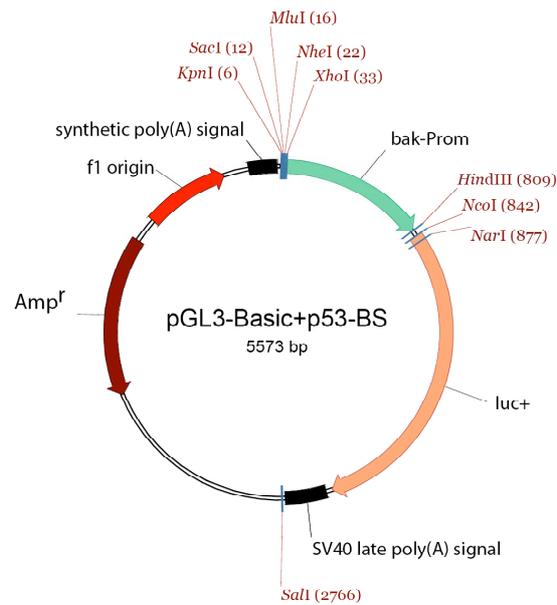


Abb. 2-2: Vektorkarte von pGL3-Basic+p53-BS.

2.4. Klonierung der Expressionsplasmide unterschiedlicher p53-Isoformen

Da für die beiden p53-Isoformen p53 β und p53 γ bisher keine kommerziellen Antikörper zur Verfügung stehen, wurde an das 5'-Ende der cDNA dieser p53-Isoformen eine Flag-Sequenz angefügt, die der spezifischen Detektion der jeweiligen Isoform diene. Des Weiteren wurde die Flag-Sequenz ebenso am 5'-Ende der cDNA für die p53 α -Isoform (im Folgenden Wildtyp p53 - wtp53 - genannt) hinzugefügt, um für die zellbiologischen Untersuchungen eine entsprechende Kontrolle zur Verfügung zu stellen. Expressionsplasmide mit unmarkierter cDNA der drei p53-Isoformen wurden freundlicherweise von Jean-Christophe Bourdon (Universität Dundee, Dundee, Großbritannien) bereitgestellt. Durch PCR mit entsprechenden Primern wurde die Flag-Sequenz an das 5'-Ende der jeweiligen cDNA angefügt und zudem Restriktionsschnittstellen für die Enzyme Hind III (vorwärts) und Xho I (rückwärts) geschaffen. Die folgende Tabelle gibt die in der PCR verwendeten Primer wieder. Der angegebene Vorwärts-Primer wurde für die Klonierung aller drei Isoformen verwendet.

DNA-Konstrukt	Primer
Flag-p53wt	<u>vorwärts:</u> 5' CCC AAGCTT ATGGACTACAAAGACGATGACGATAAAGA GGAGCCGCAGTCAGATC 3' <u>rückwärts:</u> 5' CCG CTCGAG TCAGTCTGAGTCAGGCCCTT 3'
Flag-p53 β	<u>rückwärts:</u> 5' CCG CTCGAG TCAACAATTTTCTTTTGAAGCT 3'
Flag-p53 γ	<u>rückwärts:</u> 5' CCG CTCGAG TTACGACGAGTTTATCAGGAAG 3'

Tab. 2-3: Verwendete Primer zur Klonierung Flag-markierter p53-Isoformen.

Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme Hind III und Xho I sind fettgedruckt, die Flag-Sequenz ist rot dargestellt.

Nach Restriktion mit den Enzymen Hind III und Xho I wurden die PCR-Produkte in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen, Karlsruhe) ligiert, um die Vektoren zur Expression von Flag-p53wt, - β bzw. - γ zu erhalten (Abb. 2-3).

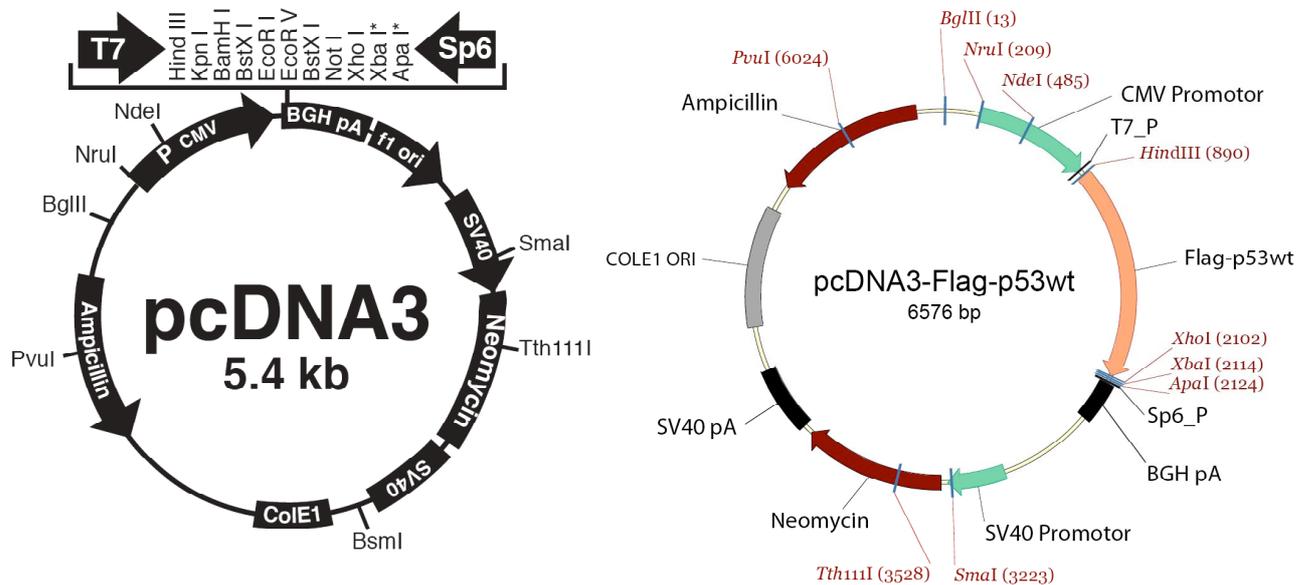


Abb. 2-3: Karte des Ausgangsvektors pcDNA3 (links; entnommen von Invitrogen) und exemplarisch die Karte des Vektors pcDNA3-Flag-p53wt (rechts).

2.5. PCR, DNA-Restriktion und Ligation

Zur Durchführung der PCR wurde der AccuPrime Pfx DNA-Polymerase-Kit von Invitrogen verwendet. Dieser beinhaltet die Pfx DNA-Polymerase aus *Thermococcus spec.*, welche über eine korrekturlesende 3'-5' Exonukleaseaktivität verfügt und sich deshalb besonders für Klonierungen eignet. Die Anlagerungstemperatur der Primer an die DNA-Matrize wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$T_m = (A + T) \times 2 + (G + C) \times 4$$

Eine Ausnahme bildete die Berechnung der Anlagerungstemperatur bei Verwendung des Mutagenese-Kits von Stratagene. Hierfür wurde die Temperatur nach folgender Formel berechnet:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - \%Fehlpaarung$$

Dabei ist N die Primerlänge in Basen und die Werte für %GC und %Fehlpaarung sind ganze Zahlen. Es wurden jeweils 10 parallele PCR-Ansätze mit dem Gerät GeneAmp PCR System 9700 von Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) durchgeführt, um die Ausbeute an PCR-Produkt zu erhöhen. Nach der Reaktion wurden die Ansätze vereint und 1/10 des Volumens in einem analytischen Agarosegel aufgetrennt, welches mit Ethidiumbromid versetzt war. Es wurden ausschließlich 1%-ige Agarosegele verwendet. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte durch eine dreifache Phenol/Chloroform-Extraktion. Dazu wurde jeweils ein Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) hinzugegeben, die Probe gemischt, 5 min bei 4°C und 20.000 x g zentrifugiert und anschließend die obere,

wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach zweimaliger Wiederholung der Extraktion wurde die DNA durch Zugabe von einem Zehntel des Volumens 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,8 – 5,2) und dem 2,5-fachen Volumen Ethanol abs. gefällt. Im Anschluss an die Sedimentierung der DNA durch Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 20.000 x g wurde die DNA einmal mit 70%-iger Ethanollösung gewaschen und nachfolgend in H₂O resuspendiert. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe eines Photometers (BioPhotometer, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) anhand der Absorption der Lösung bei 260 nm. Als Grundlage diente der Bezug:

$$1 A_{260} \text{ Einheit doppelsträngiger DNA} = 50 \mu\text{g/ml}$$

1 µg PCR-Produkt wurde nachfolgend in einem analytischen Agarosegel aufgetrennt. Für den Fall, dass neben dem gewünschten Produkt noch weitere Nebenprodukte vorhanden waren, wurde das PCR-Produkt in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt und danach mit dem Jetsorb Gel Extraktionskit von Genomed (Löhne) aufgereinigt. Die Methode beruht auf der Bindung von DNA an Glasmilch. Einer Gelextraktion schloß sich eine Kontrolle durch die Auftragung der DNA auf ein analytisches Agarosegel an.

Restriktionen von DNA wurden mit Enzymen und dazugehörigen Puffern der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main) durchgeführt. Die endonukleären Spaltungen wurden bei 37°C für 2 h bei Kontrollreaktionen und über Nacht bei Klonierungsansätzen durchgeführt. Das Ergebnis der Restriktion wurde anschließend in einem analytischen Agarosegel sichtbar gemacht. Für Klonierungen folgte die Auftrennung der DNA in einem präparativen Agarosegel mit anschließender Extraktion.

Ligationen wurden mit T4 DNA-Ligase der Firma Promega bei 15°C über Nacht durchgeführt.

2.6. Transformation

LB-Medium	auf 1000 ml	LB-Agar	auf 1000 ml
10 g	Trypton / Pepton	10 g	Trypton / Pepton
5 g	Hefeextrakt	5 g	Hefeextrakt
5 g	NaCl	5 g	NaCl
		15 g	Agar

Transformationen des *Escherichia coli* Stammes DH5α wurden mittels Hitzeschock durchgeführt. Dazu wurde die DNA zu den Zellen pipettiert, die Ansätze 10 min auf Eis inkubiert, anschließend für 2 min bei 42°C und abschließend nochmals 2 min auf Eis. Darauf folgte die Zugabe von 300 µl LB-Medium und eine Inkubation der Ansätze für 45 min bei 37°C unter Schütteln. Die Selektion transformierter Bakterien erfolgte auf LB-Agarplatten, die mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt waren, über Nacht bei 37°C.

2.7. Plasmidpräparation

P1 (Resuspensionspuffer)		P2 (Lysepuffer)		P3 (Neutralisierungspuffer)
50 mM	Tris/HCl, pH 8,0	200 mM	NaOH	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
10 mM	EDTA, pH 8,0	1 %	SDS	
100 µg/ml	RNase A			

Für eine Plasmid-Mini-Präparation wurden 3 ml LB-Übernachtskultur für 1 min bei 4°C und 20.000 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden in 300 µl Puffer P1 resuspendiert, 300 µl Puffer P2 hinzugegeben, gemischt und der Ansatz zur Lyse für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 300 µl Puffer P3 hinzupipettiert, gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 20.000 x g, um Zelltrümmer, Proteine und genomische DNA zu sedimentieren. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene Plasmid-DNA durch Zugabe von 600 µl Ethanol abs. und Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C für 30 min präzipitiert. Die Plasmid-DNA wurde mit 70%-iger Ethanollösung gewaschen und anschließend in H₂O aufgenommen. Plasmid-DNA wurde im präparativen Maßstab mit Hilfe des QIAfilter Plasmid Maxi Kits der Firma Qiagen (Hilden) aus 200 ml Übernachtskultur gewonnen. Im Anschluss an jede Plasmidpräparation folgte eine Konzentrationsbestimmung und eine Kontrollrestriktion der DNA mit nachfolgender Analyse durch ein Agarosegel. Die Sequenz klonierter DNA wurde mittels Sequenzierung durch den Sequenzierservice der MWG Biotech AG (Ebersberg) ermittelt.

2.8. Zellkultur

2.8.1. Zelllinien

Folgende humane Zelllinien wurden verwendet: die Zervixkarzinomzelllinie HeLa (Scherer *et al.* 1953), die Mammakarzinomzelllinie MCF-7 (Soule *et al.* 1973) und die beiden Kolonkarzinomzelllinien RKO (Brattain *et al.* 1984) und HCT116 (Brattain *et al.* 1981). Die Ausgangszelllinie HCT116 und ihr p53-defizientes Derivat HCT116/p53KO wurden freundlicherweise von Bert Vogelstein (Johns Hopkins Universität, Baltimore, USA) zur Verfügung gestellt (Bunz *et al.* 1998). Alle Zelllinien wachsen adhärent als Monolayer.

2.8.2. Kultivierung

HCT116-Zellen wurden in McCoy's 5A Medium kultiviert, RKO-Zellen in DME Medium mit 4,5 g/l Glukose und die Zelllinien HeLa und MCF-7 in RPMI 1640 Medium. Allen Medien war zu 10% hitzeinaktiviertes FKS (Inaktivierung bei 56°C für 30 min), 100 E/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5% und 90% relativer Luftfeuchte. Zwei- bis dreimal pro Woche wurden die konfluenten

Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin und 0,02% EDTA in PBS) bei 37°C abgelöst und auf 1/10 verdünnt.

2.9. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Die Zellzahl und die Vitalität der Zellen wurde mikroskopisch mit einem Neubauer-Hämocytometer und Trypanblaulösung (0,4% Trypanblau in 0,85%-iger Kochsalzlösung) bestimmt. Lebende Zellen mit intakter Membran nehmen keinen Farbstoff auf. Zellen mit permeabilisierter Zellmembran werden durch Trypanblau hingegen blau angefärbt.

Nachdem sich die adhärennten Zellen durch Inkubation mit Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche gelöst hatten, wurde das für die Zelllinie geeignete Medium hinzugegeben und die Zellsuspension bis auf 1/10 des Volumens in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Der verbleibende Teil der Zellsuspension wurde in eine neue Zellkulturflasche zu Medium gegeben und wie bereits beschrieben kultiviert. Ein geringer Teil der Zellsuspension im Zentrifugenröhrchen wurde 1:10 mit Trypanblaulösung verdünnt, in ein Hämocytometer überführt und gezählt.

2.10. Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Die Kryokonservierung eukaryotischer Zellen wird mit DMSO als Gefrierschutzmittel durchgeführt. DMSO verhindert die Ausbildung von Wasserkristallen während des Einfrierens, wodurch eine Zerstörung von Membranen vermieden wird.

1×10^7 Zellen wurden 5 min bei 500 x g und 4°C sedimentiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in 10 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml RPMI 1640 (ohne Zusätze) aufgenommen. Anschließend wurde 1 ml Einfriermedium (80% FKS und 20% DMSO) langsam zugegeben, gemischt und die Suspension auf zwei Einfriereröhrchen verteilt. Die Zellen wurden zunächst für 0,5 h bei -20°C gelagert, anschließend über Nacht bei -80°C aufbewahrt und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Beim Auftauen wurde die Zellsuspension in 10 ml des für die Zelllinie geeigneten Mediums überführt und 5 min bei 500 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in Medium aufgenommen und wie beschrieben kultiviert.

2.11. Inkubation mit Etoposid und Camptothecin

Einen Tag vor Versuchsbeginn wurden $4,2 \times 10^4$ Zellen/cm² (RKO), $2,1 \times 10^4$ Zellen/cm² (MCF-7) bzw. $3,1 \times 10^4$ Zellen/cm² (HCT116) ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Kulturmedium gegen frisches, mit Etoposid (50 oder 100 µM) oder Camptothecin (0,2 oder 1 µM) versetztes Medium ausgetauscht und die Zellen bis zur Zellernte darin inkubiert.

2.12. Bestrahlung

Zellsuspensionen wurden in Zentrifugenröhrchen in dem Gerät Gammacell 1000 Elite von Nordion International Inc. (Fleurus, Belgien) mit einer Dosis von 20 Gy bestrahlt. Dieses Gerät nutzt das künstliche Isotop ^{137}Cs mit einer Halbwertszeit von ungefähr 30 Jahren als Quelle für Gammastrahlung.

2.13. Applikation der Inhibitoren MG-132, QVD und CI-I

Zellen wurden wie unter 2.11 beschrieben ausgesät und am darauffolgenden Tag 5 μM des Proteasominhibitors MG-132 für 6 h in den Kulturüberstand gegeben.

Im Falle des Breitband-Caspase-Inhibitors QVD und des Calpain-Inhibitors CI-I wurden RKO- und HCT116-Zellen mit einer Dosis von 20 Gy bestrahlt bzw. für 24 h in Gegenwart von 1 μM Camptothecin kultiviert und parallel 10 μM CI-I oder 20 μM QVD appliziert.

2.14. Transfektion

2.14.1. Generierung stabiler klonaler RKO-Zelllinien

Pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte wurden 4×10^5 Zellen mit je 1 μg DNA (pcDNA3 (Mock), pcDNA3-Flag-p53wt, pcDNA3-Flag-p53 β bzw. pcDNA3-Flag-p53 γ) durch das Fugene 6 Transfektionsreagenz der Firma Roche (Mannheim) nach Herstellerangaben transfiziert. Der Vektor pcDNA3 trägt das Gen, das für die Resistenz gegen das Antibiotikum Geneticin kodiert, so dass die Selektion transfizierter Zellen möglich war. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA aus den Platten abgelöst und gezählt. Es wurden 1×10^5 , 5×10^4 bzw. 1×10^4 Zellen in 15 cm-Kulturschalen ausgebracht und in Gegenwart von 1 mg/ml G418 kultiviert. Das Selektionsmedium wurde zweimal wöchentlich gewechselt und nach ca. 3 Wochen wurden Klone ausgewählt und unter Selektion propagiert. Die Analyse der Transgenexpression erfolgte mittels Western Blot.

2.14.2. Generierung stabiler MCF-7 bulk-Kulturen

Je 2×10^5 MCF-7-Zellen wurden pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte wie unter 2.14.1 beschrieben mit den Expressionsvektoren für verschiedene Flag-markierte p53-Isoformen und dem Leervektor transfiziert. Die Zellen wurden in Gegenwart von 0,8 mg/ml G418 kultiviert und die Transgenexpression der bulk-Kulturen mittels Western Blot analysiert.

2.14.3. Transfektion zur transienten Genexpression

Transiente Transfektionen für die Durchführung von Reporteranalysen wurden in 6-Loch-Platten vorgenommen. Pro Vertiefung wurden 3×10^5 p53-defiziente HCT116-Zellen (HCT116/p53KO) bzw. 1×10^5 HeLa-Zellen ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit 0,5 μg des Luciferase-Reporterplasmids und unterschiedlichen Mengen an

Expressionsvektor der p53-Isoformen bzw. TAp63 α und TAp73 α transfiziert. Die transfizierte DNA-Menge wurde in jedem Ansatz durch Zugabe eines Leervektors (pRK5) konstant gehalten. Das p53-induzierbare Reportergenplasmid prMinRGC-luc wurde von Florian Kühnel (Medizinische Hochschule Hannover, Hannover) zur Verfügung gestellt (Kühnel *et al.* 2004). In den Vektor pGL2-Basic (Promega) wurde vor die cDNA der Luciferase eine DNA-Sequenz bestehend aus einer 13-fachen Wiederholung des RGC-Motivs (p53-Erkennungssequenz) und dem CMV_{mini}-Promotorelement kloniert. Das Reportergenplasmid pGL3-Bax-luc wurde von Lienhard Schmitz zur Verfügung gestellt (Institut für Biochemie, Justus-Liebig-Universität, Giessen) und enthält die humane *bax*-Promotorsequenz am 5'-Ende der cDNA der Luciferase im Vektor pGL3-Basic (Promega) (Friedlander *et al.* 1996).

Als Transfektionsreagenz diente Fugene 6 von Roche.

2.15. Luciferase-Reporteranalyse

Lysepuffer		Reaktionspuffer	
25 mM	Glycylglycin, pH 7,8	15 mM	Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,8
15 mM	MgSO ₄	25 mM	Glycylglycin, pH 7,8
4 mM	EGTA, pH 8,0	15 mM	MgSO ₄
1 mM	DTT	4 mM	EGTA, pH 8,0
1 %	Triton-X-100	1 mM	DTT
		2 mM	ATP

48 h nach der Transfektion wurden die Zellen durch Abschaben geerntet und für 5 min bei 500 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 150 μ l Lysepuffer resuspendiert und für 5 min auf Eis lysiert. Unlösliche Bestandteile wurden nachfolgend für 5 min bei 20.000 x g und 4°C sedimentiert und 10 μ l des klaren Lysats zu 100 μ l Reaktionspuffer in eine Vertiefung einer weißen 96-Loch-Platte mit flachem Boden pipettiert. Die Messung erfolgte in einem MicroLumat Plus LB 96V Luminometer von Berthold Technologies (Bad Wildbad) nach Injektion von 100 μ l einer Luciferin-Lösung (0,3 mg/ml). Gemessen wurde die Lichtemission für 30 s nach einer 1,6 s dauernden Verzögerung nach der Injektion des Luciferins. Die erhaltenen Messwerte wurden auf den Proteingehalt der Zelllysate normiert.

2.16. Proteinanalytische Methoden

2.16.1. Gewinnung von Totalextrakten

Puffer T

10 mM	Tris/HCl, pH 7,5
150 mM	NaCl
1 %	Triton-X-100
2 mM	MgCl ₂
5 mM	EDTA, pH 8,0
1 Tablette	Protease Inhibitoren (pro 50 ml)

Der Zellkulturüberstand wurde gesammelt und die adärenten Zellen in Trypsin/EDTA bei 37°C abgelöst. Die Zellen wurden mit dem Überstand wieder vereinigt und für 5 min bei 500 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und danach in Puffer T resuspendiert. Die Lyse erfolgte für 15 min auf Eis. Unlösliche Bestandteile wurden bei 20.000 x g und 4°C für 5 min sedimentiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.16.2. Gewinnung nukleärer Fraktionen

Puffer A

10 mM	HEPES, pH 7,9
5 mM	MgCl ₂
250 mM	Saccharose
0,2 mM	PMSF
5 mM	NaF
1 µg/ml	Aprotinin
0,5 µg/ml	Leupeptin
100 ng/ml	Pepstatin A
10 mM	β-Mercaptoethanol

Puffer B

10 mM	HEPES, pH 7,9
25 %	Glycerin
1,5 mM	MgCl ₂
0,1 mM	EDTA
0,2 mM	PMSF
5 mM	NaF
1 µg/ml	Aprotinin
0,5 µg/ml	Leupeptin
100 ng/ml	Pepstatin A
10 mM	β-Mercaptoethanol

Die Zellen wurden wie unter 2.16.1 beschrieben geerntet und nach dem Waschen in PBS in Puffer A resuspendiert. Nun wurde NP-40 zu einer finalen Konzentration von 0,1% hinzugegeben und die Zellsuspension durch Trockeneis eingefroren, anschließend auf Eis aufgetaut und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Zellkerne wurden für 5 min bei 20.000 x g und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und als zytoplasmatische Fraktion im Western Blot analysiert. Die Zellkerne wurden in Puffer B resuspendiert und NaCl zu einer finalen Konzentration von 400 mM zugegeben. Diese Suspension wurde für 30 min auf Eis

inkubiert, anschließend durch Trockeneis eingefroren und auf Eis wieder aufgetaut. Unlösliche Bestandteile wurden für 15 min bei 20.000 x g und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und als nukleäre Fraktion im Western Blot analysiert.

2.16.3. Gewinnung mitochondrialer Fraktionen

Puffer H

20 mM	HEPES, pH 7,0
10 mM	KCl
2 mM	MgCl ₂
1 mM	EDTA
1 Tablette	Protease Inhibitoren (pro 50 ml)

Zur Gewinnung Mitochondrien-angereicherter Fraktionen wurden die Zellen wie unter 2.16.1 beschrieben geerntet und in Puffer H gewaschen. Anschließend wurden sie erneut in Puffer H resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und durch mehrmaliges Aufziehen durch eine Kanüle (ca. 10 – 30 x) aufgeschlossen. Durch Anfärben eines Aliquots der Zellsuspension mit Trypanblaulösung und anschließender Mikroskopie wurde die Effizienz der Zelllyse abgeschätzt. Intakte Zellen und Kerne wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 800 x g und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Mitochondrien durch Zentrifugation für 20 min bei 20.000 x g und 4°C sedimentiert. Der resultierende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und als zytoplasmatische Fraktion im Western Blot analysiert. Die Mitochondrien wurden wie unter 2.16.1 beschrieben in Puffer T lysiert und als mitochondriale Fraktion ebenfalls im Western Blot analysiert.

2.16.4. Konzentrationsbestimmung von Proteinen mit dem BCA-Reagenz

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des BCA-Analyse Kits der Firma Pierce (Bonn). Die Methode beruht auf einer Komplexbildung zwischen Cu²⁺-Ionen und Proteinen in alkalischem Milieu, die eine Reduktion der Cu²⁺-Ionen zu Cu⁺-Ionen gestattet. Das Natriumsalz der Bicinchoninsäure (BCA) bildet einen 2:1 Komplex mit den Cu⁺-Ionen. Dabei entsteht ein stabiles rotes Chromophor mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm.

In einer Mikrotiterplatte wurden jeweils 200 µl BCA-Lösung (Reagenz A/Reagenz B: 50/1) zu 5 µl Proteinlösung gegeben, 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Absorption bei 560 nm gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer BSA-Eichgeraden, deren Proteinkonzentration von 0 bis 5 µg/µl reichte.

2.16.5. Immunpräzipitation

Puffer IP		5 x SDS-Probenpuffer	
300 mM	NaCl	300 mM	Tris/HCl, pH 6,8
0,5 %	NP-40	3 %	β -Mercaptoethanol
20 mM	Tris/HCl, pH 7,5	40 %	Glycerin
2 mM	MgCl ₂	2 %	SDS
5 mM	EDTA, pH 8,0	0,05 %	Bromphenolblau
1 Tablette	Protease Inhibitoren (pro 50 ml)		

Die Zellen wurden wie unter 2.16.1 beschrieben geerntet und nach dem Waschen in PBS in Puffer IP für 15 min auf Eis lysiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 20.000 x g und 4°C abgetrennt und die Proteinkonzentration des Überstandes bestimmt. Gleiche Volumina mit einer Proteinkonzentration von 2 µg/µl wurden über Nacht bei 4°C in einem Überkopfschüttler entweder unter Zugabe von 1 µg anti-p53 Antikörper (PAb421) bzw. anti-MDM2 Antikörper (IF2) oder von 50 µl anti-Flag-Agarose inkubiert. Ansätze mit freiem Antikörper wurden am nächsten Tag mit Protein-G-Sepharose versetzt und für weitere 2 h im Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Protein-G-Sepharose bzw. anti-Flag-Agarose wurden durch Zentrifugation für 2 min bei 7000 x g und 4°C sedimentiert, der Überstand abgenommen und aufbewahrt. Die Sepharose bzw. Agarose wurde zweimal mit je 1 ml Puffer IP gewaschen. Die Elution präzipitierter Proteine erfolgte entweder durch Resuspension der Protein-G-Sepharose in SDS-Probenpuffer und Erhitzen auf 95°C für 5 min oder durch Zugabe von Flag-Peptid zur Flag-Agarose. Für die Verdrängungsreaktion wurde das Flag-Peptid auf 100 µg/ml in Puffer IP verdünnt und das fünffache Volumen des Säulenmaterials hinzugegeben. Die Ansätze wurden für 30 min bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert, die Agarose wie oben beschrieben sedimentiert und der Überstand, der die präzipitierten Proteine enthält, zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.16.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Sammelgel	40% Acrylamid	0,5 M Tris/HCl,	H ₂ O	10% SDS	10% APS	TEMED	Laufpuffer (pH 8,3)	
	[ml]	pH 6,8 [ml]	[ml]	[µl]	[µl]	[µl]		
5%	0,375	0,38	2,185	30	30	3	25 mM	Tris
Trenngel	40% Acrylamid	1,5 M Tris/HCl,	H ₂ O	10% SDS	10% APS	TEMED	0,1 %	SDS
	[ml]	pH 8,8 [ml]	[ml]	[µl]	[µl]	[µl]	200 mM	Glycin
8%	2	2,5	5,3	100	100	8		
10%	2,5	2,5	4,8	100	100	4		
12%	3	2,5	4,3	100	100	4		
16%	4	2,5	3,3	100	100	4		

Die 40%-ige Acrylamidlösung enthielt Acrylamid/Bisacrylamid in einem Verhältnis von 29:1.

Bei der SDS-PAGE werden denaturierte Proteine durch die Anlagerung des hydrophoben Moleküls Natriumdodecylsulfat mit einer negativen Ladung versehen und anschließend durch Anlegen eines elektrischen Feldes im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die hier angewandte Methode geht auf Laemmli (1970) zurück.

Die Proteinlösungen wurden im Verhältnis 5:1 mit dem 5 x SDS-Probenpuffer (2.16.5) versetzt und 5 min auf 95°C erhitzt. Es wurden je 20 µg Protein pro Spur aufgetragen und bei 180 V für ca. 1 h im elektrischen Feld getrennt. Das relative Molekulargewicht der Proteine wurde durch Vergleich ihrer Wanderungstrecke mit der von Standardproteinen ermittelt.

2.16.7. Western Blot

Tankblot-Transferpuffer

39 mM	Glycin
48 mM	Tris
0,037 %	SDS
20 %	Methanol

Nach der gelelektrophoretischen Trennung wurden die Proteine aus der Acrylamidmatrix nach dem Tankblot-Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Zwei Whatman-Filterpapiere (je 2 mm dick) und die Nitrozellulose-Membran wurden in Transferpuffer getränkt, ebenso die zur Blot-Apparatur gehörenden Schwämme und die einzelnen Komponenten in folgender Reihenfolge in der Blotapparatur positioniert:

Anode – Schwamm, Whatmanpapier, NC-Membran, Gel, Whatmanpapier, Schwamm – Kathode
Zum Übertragen der Proteine auf die Nitrozellulose-Membran wurde eine Stromstärke von 200 mA für 3 h angelegt.

2.16.8. Immundetektion

Blockpuffer		Antikörperpuffer		Waschpuffer	
1 x	PBS	1 x	PBS	1 x	PBS
0,05 %	Tween 20	0,05 %	Tween 20	0,05 %	Tween 20
3 %	Magermilchpulver	4 %	BSA		

Nach dem Transfer der Proteine wurden ungesättigte Bindungsstellen auf der Nitrozellulose-Membran durch Inkubation in Blockpuffer für 45 min bei Raumtemperatur unter Schütteln abgesättigt. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper (verdünnt in Antikörperpuffer) inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Membran 3 x 20 min in Blockpuffer gewaschen und eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (verdünnt in Antikörperpuffer) inkubiert. Abschließend wurde die Membran 3 x 20 min in Waschpuffer gewaschen.

Die sekundären Antikörper sind mit Meerrettich-Peroxidase markiert, welche die Oxidation von Luminol katalysiert und damit eine Lichtemission auslöst. Demnach erfolgte die Detektion der Proteine durch Inkubation der Membran in einer luminolhaltigen ECL-Lösung (Amersham, Freiburg) (Reagenz 1 und Reagenz 2 wurden 1:1 miteinander gemischt) für 1,5 min und anschließender Exposition eines Autoradiographiefilms.

2.17. Gel-Retardations-Analyse

p53-Konsensusoligonukleotid (Santa Cruz Biotechnology)	5' TACAGAACATGTCTAAGCATGCTGGGGACT 3' 3' ATGTCTTGACAGATTCGTACGACCCCTGA 5'
p53-PK	5' CTCGAGGGGCATGTCCGGGCATGTCCCTCGAG 3' 3' GAGCTCCCCGTACAGGCCCGTACAGGGAGCTC 5'
p53-BS3	5' CTCGAGGGGCCTGGCCAGGCATGTATCTCGAG 3' 3' GAGCTCCCCGGACCGGTCCGTACATAGAGCTC 5'
mutp53-BS3	5' CTCGAGGGG ACTTGCCAGGAATTT ATCTCGAG 3' 3' GAGCTCCCC TGAACGGTCCTTAA ATAGAGCTC 5'
Totex-Puffer	
20 mM HEPES	natives 4%-iges Polyacrylamidgel
350 mM NaCl	10,5 ml Acrylamid (30%)
1 mM MgCl ₂	56,5 ml H ₂ O
0,5 mM EDTA, pH 8,0	7,5 ml 5 x TBE
0,1 mM EGTA, pH 8,0	0,5 ml 10% APS
1 % NP-40	75 µl TEMED
0,5 mM DTT	
1 Tablette Protease Inhibitoren (pro 50 ml)	
5 x Bindepuffer	
62,5 mM HEPES	5 x TBE
50 % Glycerin	450 mM Tris
0,5 mM EDTA, pH 8,0	450 mM Borsäure
5 mM DTT	10 mM EDTA, pH 8,0

Die 30%-ige Acrylamidlösung enthielt Acrylamid/Bisacrylamid in einem Verhältnis von 37,5:1.

Die Gel-Retardations-Analyse, bzw. EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) erlaubt Rückschlüsse auf die Interaktion von Proteinen mit DNA. Im Allgemeinen verwendet man wegen der geringen Nachweisgrenze radioaktiv markierte DNA, welche in ihrer Migration während der Elektrophorese durch die Bindung eines Proteins retardiert wird.

Um die Wechselwirkung verschiedener p53-Isoformen mit der p53-Konsensussequenz zu untersuchen, wurde ein doppelsträngiges p53-Konsensusoligonukleotid von Santa Cruz Biotechnology bezogen und unter Verwendung von [γ -³²P]ATP und T4 Polynukleotid-Kinase an seinen freien 5'-Hydroxylgruppen radioaktiv markiert. Dazu wurden 50 µCi [γ -³²P]ATP (GE Healthcare, München), 90 ng Oligonukleotid und 10 E T4 Polynukleotid-Kinase (Roche)

in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Oligonukleotide über Sephadex-G-50-Säulen (GE Healthcare) aufgereinigt. Die Markierungseffizienz wurde mittels eines Szintillationszählers bestimmt (Tri-Carb 2100 TR, Canberra-Packard GmbH, Dreieich). Um die Bindung von p53 an dessen Konsensussequenz in der *bak*-Promotorregion zu untersuchen, wurden sechs einzelsträngige Oligonukleotide bei der MWG Biotech AG, Ebersberg synthetisiert, welche nach der Bindung an das jeweils komplementäre Oligonukleotid die drei doppelsträngigen Oligonukleotide p53-PK, p53-BS3 und mutp53-BS3 ergeben. Dabei stellt das Oligonukleotid p53-PK eine ideale p53-Konsensussequenz dar, das Oligonukleotid p53-BS3 repräsentiert die in der *bak*-Promotorregion vorhandene Sequenz der dritten potentiellen p53-Bindungsstelle und das Oligonukleotid mutp53-BS3 enthält Mutationen, die eine p53-Bindung an diese DNA-Sequenz unterbinden (Mutationen in der Tabelle durch Fettdruck hervorgehoben) (el-Deiry *et al.* 1992). Die radioaktive Markierung dieser Oligonukleotide wurde wie bereits beschrieben durchgeführt.

Die Zellen wurden wie unter 2.16.1 beschrieben geerntet und in Totex-Puffer für 15 min auf Eis lysiert. 10 µg der Volllystate wurden für 10 min mit 3 µg Poly[d(IC)] (Roche) in einem Gesamtvolumen von 13 µl auf Eis vorinkubiert, um unspezifische Proteinbindungen an DNA abzusättigen. Die Bindung an das radioaktiv markierte Oligonukleotid fand in Gegenwart von 5 µg BSA und 4 µl des 5 x Bindepuffers in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 20 min bei Raumtemperatur statt. Im Anschluss daran wurden 0,8 µg anti-Flag-Antikörper bzw. 1 µg des anti-p53-Antikörpers PAb421 zu den entsprechenden Proben gegeben und alle Ansätze für weitere 30 min bei 4°C inkubiert. Die Protein-DNA-Komplexe wurden in 0,5 x TBE-Puffer in einem nativen 4%-igen Polyacrylamid-Gel für 3 h bei 180 V getrennt. Anschließend wurde das Gel auf Whatmanpapier unter Vakuum bei 80°C für 45 min getrocknet und die radioaktiv markierten Komplexe mittels Autoradiographie sichtbar gemacht.

2.18. Durchflußzytometrische Quantifizierung des zellulären DNA-Gehalts

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Analyse einer Zellsuspension auf Einzelzellniveau. Die Grundlage hierfür bilden Streulicht und Fluoreszenzeigenschaften der Zellen. Es stand ein FACS-Calibur der Firma Becton Dickinson zur Verfügung, das mit einem Argon-Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm ausgestattet ist. Des Weiteren verfügt das Gerät über drei Detektoren, die Fluoreszenzlicht unterschiedlicher Wellenlänge erfassen (FL1 = 530/30 nm, FL2 = 585/42 nm und FL3 = 670/LP).

Die Zellen wurden nach den angegebenen Zeitpunkten wie unter 2.16.1 beschrieben geerntet und nach dem Waschen in PBS in eiskaltem 70%-igen Ethanol in PBS für 3 h fixiert. Die Zellen wurden bei 800 x g und 4°C für 5 min sedimentiert, 1 x in PBS gewaschen und anschließend in PBS, dem 10 µg/ml 7-AAD zugesetzt war, resuspendiert. Nach Inkubation der Zellen für 30 min bei 4°C im Dunkeln wurden sie erneut zentrifugiert, in PBS

resuspendiert und im Durchflußzytometer analysiert. Der in die DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff 7-AAD hat ein Emissionsmaximum bei ca. 650 nm; die Analyse des relativen zellulären DNA-Gehalts erfolgte also im FL3-Kanal. Das Programm Cell Quest Pro von Becton Dickinson wurde verwendet, um die Zellen aufgrund ihres relativen DNA-Gehaltes den Zellzyklusphasen G₀/G₁, S und G₂/M zuzuordnen oder sie als hypodiploid zu kategorisieren.

2.19. Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden RKO-Zellen in 12-Loch-Platten auf Deckgläsern ausgesät und am nächsten Tag mit den Expressionsvektoren für Flag-p53wt, Flag-p53 β und Flag-p53 γ mit dem Fugene 6 Transfektionsreagenz (Roche) transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurde das Medium entfernt, die Zellen 1 x mit PBS gewaschen und anschließend in 3,7% Formaldehyd in PBS für 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Nachfolgend wurden die Zellen für 30 min in Blockpuffer (4% BSA, 0,05% Saponin in PBS) inkubiert. Die primären Antikörper gegen Tom20 (aus der Maus) und Flag (aus dem Kaninchen) wurden 1:500 in Blockpuffer verdünnt und über Nacht bei 4°C zu den Zellen gegeben. Im Anschluss wurden die Proben für 1 h in Blockpuffer gewaschen und die sekundären Alexafluor488- bzw. Alexafluor594-gekoppelten anti-Maus und anti-Kaninchen Antikörper (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) in einer finalen Konzentration von 0,4 μ g/ml in PBS für 2 h zugegeben. Die Präparate wurden nachfolgend in PBS mit 100 ng/ml DAPI für 10 min inkubiert, wiederum zweimal in PBS gewaschen und die Proben schließlich in Fluoreszenz-stabilisierendem Eindeckelmedium (DAKO Corporation, Carpinteria, USA) auf Objektträgern fixiert. Die Analyse erfolgte mit einem konfokalen Laserscanning Mikroskop (Leica TCS SP2 AOBS, Leica Microsystems, Wetzlar) unter Verwendung geeigneter Anregungswellenlängen (405 nm, 488 nm und 594 nm).

2.20. Nachweis der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Aktivität

β -Galaktosidase-Färbelösung

2 mM	MgCl ₂
150 mM	NaCl
5 mM	K ₄ [Fe(CN) ₆]
5 mM	K ₃ [Fe(CN) ₆]
40 mM	Na-Zitrat, pH 6,0
1 mg/ml	X-Gal

MCF-7-Zellen wurden mit einer Dosis von 20 Gy bestrahlt, in 6-Loch-Platten ausgesät und 5 Tage später aufgearbeitet. Dazu wurde der Kulturüberstand abgenommen, die Zellen in

PBS gewaschen und für 5 min fixiert (2% Formaldehyd, 0,2% Glutaraldehyd in PBS). Anschließend wurden die Ansätze nochmals mit PBS gewaschen und je 1 ml β -Galaktosidase-Färbelösung pro Vertiefung der Platte zugegeben. Nach der Inkubation der Ansätze über Nacht bei 37°C in Abwesenheit von CO₂ wurde die Färbelösung abgenommen, 1 x mit PBS gewaschen und die Blaufärbung der Zellen an einem Mikroskop (Axiovert 135, Zeiss) dokumentiert.

3. Ergebnisse

3.1. **Generierung stabiler klonaler Zelllinien zur Expression unterschiedlicher p53-Isoformen**

Angeregt wurde die vorliegende Arbeit durch die kürzliche Identifikation sechs weiterer humaner Isoformen von p53 (Bourdon *et al.* 2005). Um den Einfluss der Isoformen p53 α (wtp53), p53 β und p53 γ auf p53-regulierte Signalwege wie Apoptose, Zellzyklusarrest und Seneszenz analysieren zu können, wurde ein Zellsystem gesucht, in dem wtp53 endogen auf Proteinebene exprimiert ist, jedoch keine der Isoformen p53 β und p53 γ . Die Proteinexpression von p53 β wurde bereits in folgenden humanen Zelllinien beschrieben: MCF-7, U2OS, 293, SW620 (p53 α ist mutiert) und T47D (p53 α ist mutiert) (Bourdon *et al.* 2005; Murray-Zmijewski *et al.* 2006), die daher für die Generierung eines Modellsystems nicht in Betracht gezogen wurden.

Auf der Grundlage dieser Überlegungen wurden die beiden wtp53 exprimierenden humanen Kolonkarzinomzelllinien RKO und HCT116 bezüglich der endogenen Proteinexpression der Isoformen p53 β und p53 γ mittels Western Blot getestet. Als Positivkontrolle für die p53 β -Expression sollte die Zelllinie MCF-7 (casp-3), in welcher Caspase-3 reexprimiert ist, dienen (Janicke *et al.* 1998).

Die p53-Expression wurde in Kontrollansätzen und in Lysaten von Zellen nach der Induktion von DNA-Strangbrüchen durch Inkubation in Gegenwart des Topoisomerase-I-Inhibitors Camptothecin oder durch γ -Bestrahlung analysiert. Der p53-Expressionsstatus der Zelllinien wurde mit dem anti-p53-Antikörper DO-1, dessen Bindungsepitop von Aminosäure 21-25 reicht, analysiert. Aufgrund dieses N-terminalen Epitops ist der Antikörper in der Lage, wtp53, p53 β und p53 γ zu detektieren. Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese lassen sich die Isoformen p53 β und p53 γ aufgrund ihres geringen Unterschieds im Molekulargewicht nicht voneinander trennen. Als weitere Positivkontrolle für die Laufhöhe von p53 β (und damit auch für p53 γ) diente ein Lysat von HCT116/p53KO-Zellen, welche für 48 h mit einem p53 β -Expressionsplasmid (ohne Markierung) transfiziert worden waren. Abb. 3-1 zeigt das Ergebnis der Analyse des p53-Expressionsprofils in den Zelllinien RKO, HCT116 und MCF-7 (casp-3).

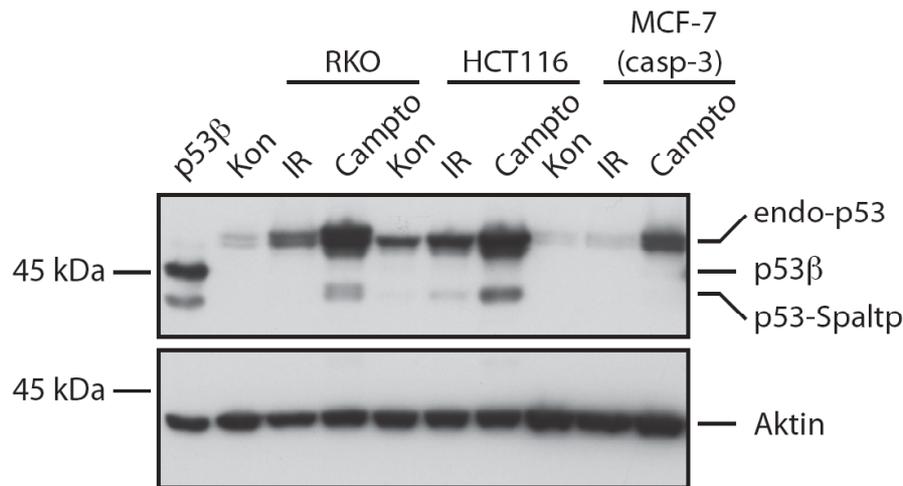


Abb. 3-1: Analyse der p53 β - und p53 γ -Expression in den Zelllinien RKO, HCT116 und MCF-7 (casp-3).

Western Blot Analyse des p53-Expressionsstatus in RKO-, HCT116- und MCF-7 (casp-3)-Zellen, die für 24 h in Ab- (Kon) oder Anwesenheit von Camptothecin (Campto; 1 μ M) kultiviert wurden bzw. 24 h nach γ -Bestrahlung (IR; 20 Gy). Als Größenstandard für p53 β und p53 γ diente der Nachweis der Expression von transgenem p53 β in p53-defizienten HCT116-Zellen (erste Spur). p53 wurde durch den Antikörper DO-1 nachgewiesen, der Nachweis von Aktin diente als Ladekontrolle.

endo-p53: endogenes p53; p53-Spaltp: p53-Spaltprodukt

Die Induktion von DNA-Strangbrüchen durch γ -Bestrahlung oder durch Inkubation mit Camptothecin führte in den Zelllinien RKO und HCT116 wie erwartet zur Stabilisierung von endogen exprimiertem p53. Besonders deutlich war dies in allen getesteten Zelllinien (RKO, HCT116 und MCF-7 (casp-3)) nach der Zugabe von Camptothecin. Die vielfach beschriebene Stabilisierung von p53 nach γ -Bestrahlung war in der Zelllinie MCF-7 (casp-3) unter den verwendeten experimentellen Bedingungen nicht nachweisbar.

Die spezifische Proteinbande bei ca. 45 kDa im Lysat der mit einem p53 β -Expressionsplasmid transfizierten HCT116/p53KO-Zellen belegte, dass C-terminal verkürzte p53-Isoformen erfolgreich mit dem Antikörper DO-1 nachgewiesen werden können. Die transgene Expression von p53 β in HCT116/p53KO-Zellen zeigte zudem, dass diese Isoform aufgrund ihres geringeren Molekulargewichtes im Polyacrylamidgel schneller migriert als wtp53. In keinem der getesteten Lysate war eine Bande mit vergleichbarer Wanderungsgeschwindigkeit nachweisbar. Dies war überraschend, da Bourdon *et al.* (2005) in der Zelllinie MCF-7 die Expression von p53 β nachwies.

Des Weiteren wurde in Lysaten von RKO- und HCT116-Zellen, die nach der Induktion eines DNA-Schadens gewonnen wurden, eine zusätzliche Bande mit einem geringeren relativen Molekulargewicht als 45 kDa detektiert. Durch das N-terminale Erkennungsmotiv des Antikörpers DO-1 konnte ausgeschlossen werden, dass diese Proteinbande die N-terminal verkürzten Isoformen Δ 40p53 oder Δ 133p53 repräsentiert. Vielmehr wurde vermutet, dass es sich hierbei um ein N-terminales Spaltprodukt von endogenem p53 handelt.

Da p53 sowohl durch Caspasen (Sayan *et al.* 2006) als auch durch Calpain (Kubbutat und Vousden 1997) gespalten werden kann, wurde in einem nächsten Experiment untersucht, ob die in Abb. 3-1 beobachtete p53-Spaltform durch Caspasen oder Calpain verursacht ist. Dazu wurden RKO- und HCT116-Zellen γ -bestrahlt oder für 24 h in Gegenwart von Camptothecin inkubiert. Parallel wurden analoge Proben unter Zugabe des Calpain-Inhibitors I oder des Breitband-Caspase-Inhibitors QVD generiert. Die Zellen wurden nach einer Inkubation von 24 h geerntet und für die Western Blot Analyse aufgearbeitet (Abb. 3-2).

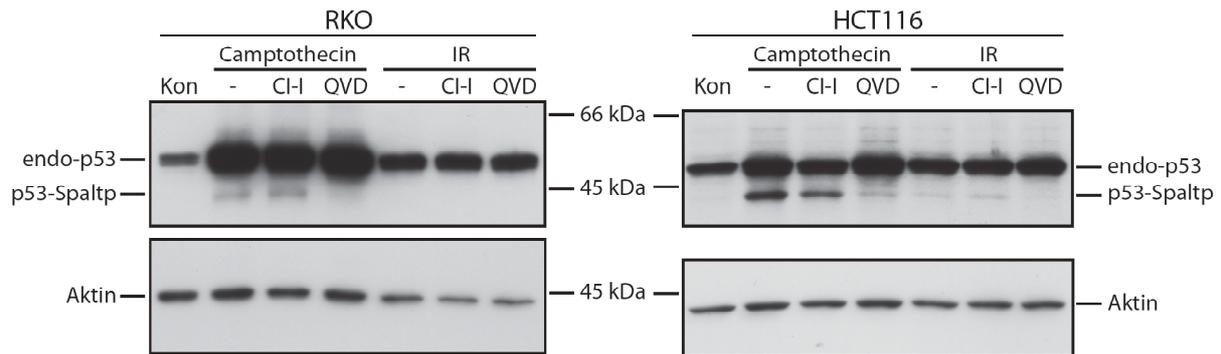


Abb. 3-2: p53 wird durch Caspasen gespalten.

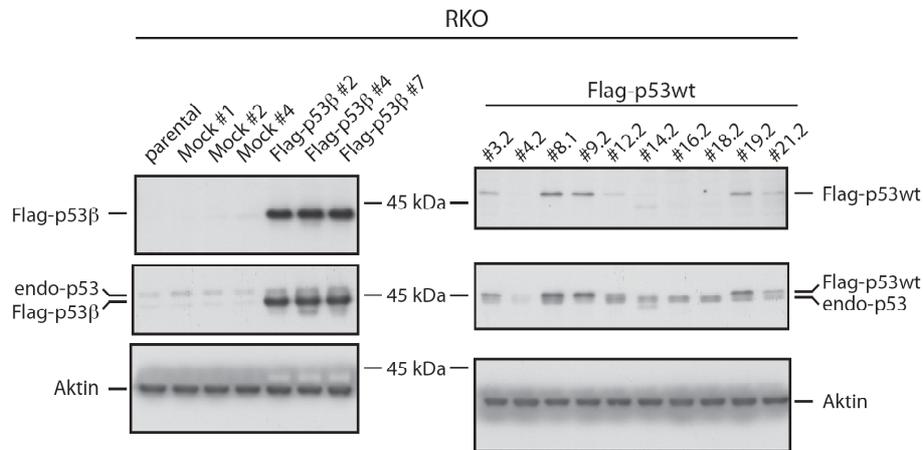
Western Blot Analyse der p53-Expression in RKO- und HCT116-Zellen, die für 24 h in Ab- (Kon) oder Anwesenheit von Camptothecin (1 μ M) kultiviert wurden bzw. 24 h nach γ -Bestrahlung (IR; 20 Gy). Die bestrahlten bzw. mit Camptothecin kultivierten Zellen wurden parallel für 24 h in Ab- oder Anwesenheit des Calpain-Inhibitors I (CI-I; 10 μ M) oder des Breitband-Caspase-Inhibitors QVD (20 μ M) inkubiert. p53 wurde mit dem Antikörper DO-1 detektiert, der Nachweis von Aktin diente als Ladekontrolle.

In Lysaten der Kontrollansätze konnte exklusiv eine wtp53 repräsentierende Proteinbande detektiert werden. Die Bande des putativen p53-Spaltproduktes wurde vorrangig in Zelllysaten nach Camptothecin-Zugabe und in geringerem Maße in Lysaten γ -bestrahlter Zellen nachgewiesen. Die Zugabe des Calpain-Inhibitors I resultierte in einer marginal verminderten Bandenintensität des Spaltproduktes, wohingegen die Zugabe des Breitband-Caspase-Inhibitors QVD die p53-Spaltung nahezu vollständig blockierte.

In RKO-, HCT116- und MCF-7 (casp-3)-Zellen konnten die Isoformen p53 β und p53 γ auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden. Da allerdings für die Zelllinie MCF-7 die Proteinexpression von p53 β gezeigt worden war (Bourdon *et al.* 2005) und die Proteinexpression von Δ 40p53 β und Δ 133p53 β in der Zelllinie HCT116/p53KO beschrieben ist (Murray-Zmijewski *et al.* 2006), in welcher das zweite p53-Exon beider Allele durch sequenzielle homologe Rekombination und Insertion von Antibiotika-Resistenzgenen zerstört wurde (Bunz *et al.* 1998), wurde die humane Kolonkarzinomzelllinie RKO ausgewählt, um in diesen Zellen die Flag-markierten Proteine p53 β und p53 γ stabil zu exprimieren. Neben Flag-p53 β und Flag-p53 γ exprimierenden RKO-Klonen sollten als adäquate Kontrolle ebenso RKO-Klone generiert werden, welche zusätzlich zu endogenem wtp53 auch Flag-markiertes wtp53 exprimieren. Zu diesem Zweck wurden RKO-Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert und Klone durch Selektion mit G418 für mehrere Wochen propagiert. Die gewonnenen klonalen Zelllinien wurden schließlich mittels Western Blot

hinsichtlich der Transgenexpression analysiert. Die Detektion der Proteine im Western Blot erfolgte mit dem anti-p53-Antikörper DO-1 und zudem durch den Nachweis des Flag-Epitops mit einem anti-Flag-Antikörper (Abb. 3-3 und Abb. 3-4).

A)



B)

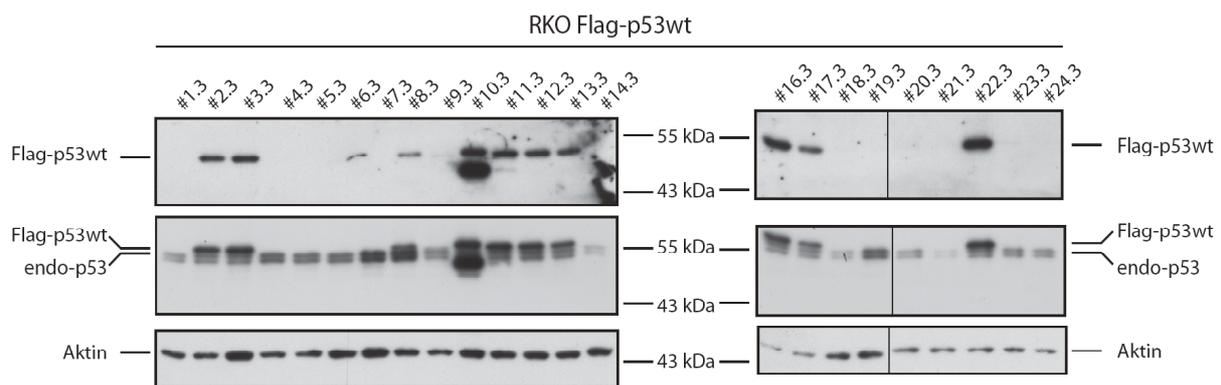
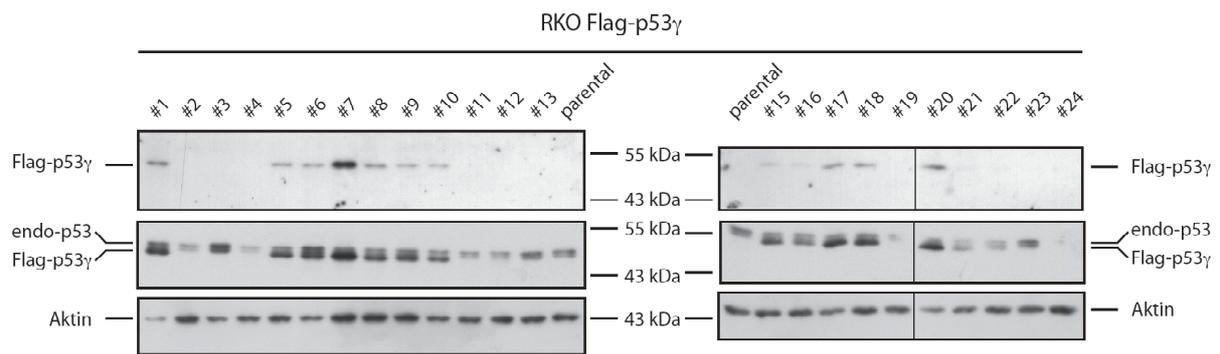


Abb. 3-3: Expression von Flag-p53wt und Flag-p53 β in RKO-Zellen.

Von den gekennzeichneten RKO-Klonen wurden Proteinlysate im Western Blot auf die Expression von Flag-p53wt und Flag-p53 β mittels eines anti-Flag-Antikörpers (jeweils oberer Blot) und des anti-p53-Antikörpers DO-1 (jeweils mittlerer Blot) analysiert. A) zeigt das Ergebnis für parentale sowie Mock-, Flag-p53wt- und Flag-p53 β -transfizierte RKO-Zelllinien, B) zeigt das Ergebnis für klonale RKO Flag-p53wt-Zelllinien. Der Nachweis von Aktin diente jeweils der Ladekontrolle.

Die Detektion eines Flag-markierten Proteins durch Verwendung des anti-Flag-Antikörpers und einer zusätzlichen p53-spezifischen Proteinbande in den entsprechenden Lysaten durch den anti-p53-Antikörper DO-1 wies die Transgenexpression in einigen RKO-Klonen nach. Flag-markiertes wtp53 besitzt ein größeres Molekulargewicht als unmarkiertes endogenes wtp53 und war daher oberhalb der Proteinbande für endogenes wtp53 nachzuweisen. Das Molekulargewicht von Flag-p53 β (bzw. Flag-p53 γ) ist geringer als das von wtp53 und daher wurde die Proteinbande unterhalb der für endogenes wtp53 detektiert.

Das Auftreten einer Proteinbande mit geringerem relativen Molekulargewicht in den RKO-Klonen Flag-p53wt #14.2 und #10.3, wobei #14.2 negativ und #10.3 positiv für Flag-p53wt-Expression ist, war unerwartet und diese beiden Klone wurden daher für die sich anschließenden zellbiologischen Untersuchungen nicht in Betracht gezogen.

Abb. 3-4 zeigt das Ergebnis der Analyse von RKO Flag-p53 γ -Klonen.**Abb. 3-4: Expression von Flag-p53 γ in RKO-Zellen.**

Die Expression von Flag-p53 γ in verschiedenen klonalen RKO-Zelllinien wurde mittels Western Blot und der Verwendung eines anti-Flag-Antikörpers (jeweils oberer Blot) und des anti-p53-Antikörpers DO-1 (jeweils mittlerer Blot) analysiert. Der Nachweis von Aktin diente der Ladekontrolle.

In einigen Lysaten der RKO Flag-p53 γ -Klone war durch die Verwendung eines anti-Flag-Antikörpers die Expression eines Flag-markierten Proteins nachzuweisen. Diese Ergebnisse wurden durch die Verwendung des anti-p53-Antikörpers DO-1 bestätigt, da dieser Antikörper in den entsprechenden Lysaten zusätzlich zu endogenem wtp53 eine Proteinbande mit geringerem relativen Molekulargewicht detektierte, die in diesen Klonen Flag-p53 γ repräsentiert.

Für die nachfolgenden Experimente wurden die folgenden Zelllinien bzw. Klone ausgewählt: RKO parental, Mock #1 und #4, Flag-p53wt #8.1, #9.2 und #19.2, Flag-p53 β #2, #4 und #7 und Flag-p53 γ #1, #7 und #20. Da die Experimente mit verschiedenen Zelllinien, die jeweils eine der transgenen p53-Isoformen exprimieren, zu vergleichbaren Ergebnissen führten, sind im Folgenden repräsentative Resultate wiedergegeben. Ebenso führten die Analysen in den Zelllinien RKO parental, Mock #1 und Mock #4 zu übereinstimmenden Ergebnissen, welche daher auch repräsentativ wiedergegeben werden.

3.2. Die Isoformen p53 β und p53 γ werden weniger effizient durch das Proteasom abgebaut

Bisher war die Analyse der Transgenexpression der RKO-Klone unter Standard-Zellkulturbedingungen erfolgt. Um Aussagen über die Regulation der transgen exprimierten Isoformen, sowie des endogen exprimierten wtp53 treffen zu können, wurde im Folgenden die Expression der jeweiligen Proteine unter Stressbedingungen analysiert. Daher wurden entweder durch γ -Bestrahlung oder Inkubation der Zellen in Gegenwart des Topoisomerase-II-Inhibitors Etoposid DNA-Schäden induziert.

Die RKO-Klone wurden unter Kontrollbedingungen oder in Anwesenheit von Etoposid für 24 h kultiviert bzw. 24 h nach γ -Bestrahlung für eine Western Blot Analyse aufgearbeitet. Die Detektion von p53 erfolgte erneut mit dem anti-p53-Antikörper DO-1, der wegen seiner

Spezifität für ein N-terminales Epitop neben wtp53 auch die beiden Isoformen p53 β und p53 γ detektiert (Abb. 3-5).

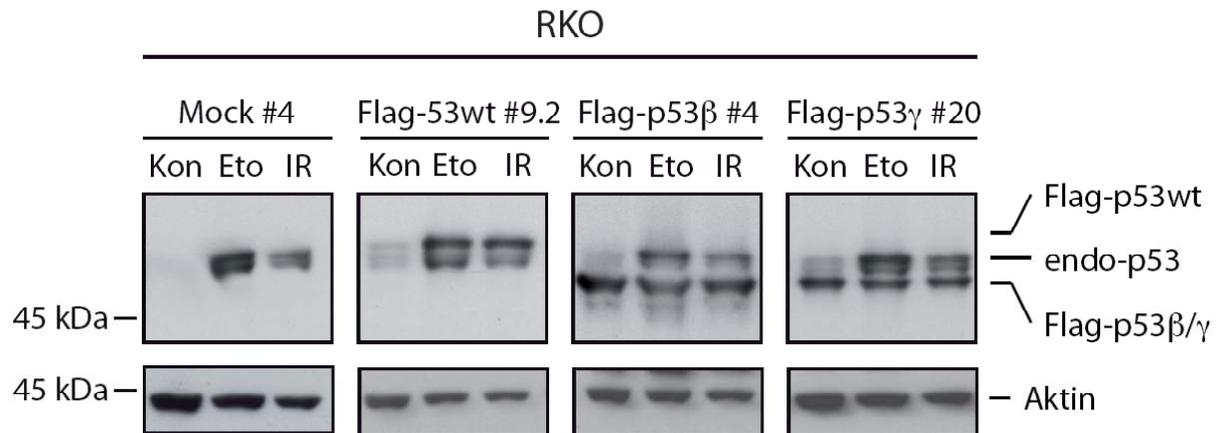


Abb. 3-5: Expression unterschiedlicher p53-Isoformen unter Kontroll- und Stressbedingungen. Die RKO-Klone blieben entweder unbehandelt (Kon), wurden für 24 h in Anwesenheit von 50 μ M Etoposid (Eto) kultiviert oder 24 h nach γ -Bestrahlung (IR; 20 Gy) für die Western Blot Analyse aufgearbeitet. Die Detektion von p53 erfolgte mit dem anti-p53-Antikörper DO-1, der Nachweis von Aktin diente als Ladekontrolle.

Endogenes wtp53 war unter Kontrollbedingungen wie erwartet kaum nachzuweisen. Interessanterweise galt diese Beobachtung auch für die transgene wtp53-Isoform, die unter der Kontrolle des CMV-Promotors transkribiert wird. Nach der Induktion eines DNA-Schadens waren sowohl endogenes als auch transgenes wtp53 gut detektierbar. Besonders markant war die Stabilisierung von wtp53 nach der Inkubation mit Etoposid. Im Gegensatz zu wtp53 konnten die transgen exprimierten Isoformen Flag-p53 β und Flag-p53 γ bereits in Kontrolllysaten deutlich nachgewiesen werden. Die Inkubation der Zellen mit Etoposid oder γ -Bestrahlung führte nicht zu einer Verstärkung der jeweiligen Bandenintensität. Das Expressionsniveau der Isoformen p53 β und p53 γ wurde durch DNA-Schädigung nicht beeinflusst.

Die Ursache der differentiellen Expression von wtp53 und der beiden Isoformen p53 β und p53 γ wurde im folgenden Experiment untersucht. Obwohl die Transgene Flag-p53wt/ β/γ unter der Kontrolle des CMV-Promotors stehen und dementsprechend in gleichem Maße transkribiert werden sollten, war ihr Expressionsniveau unter Kontrollbedingungen sehr unterschiedlich. Die hohe Proteinmenge an Flag-p53 β und Flag-p53 γ in Kontrollansätzen aufgrund einer transkriptionellen Regulation der Expression ist deshalb unwahrscheinlich und weist auf eine posttranslationale Regulation hin.

Dies stimmt mit dem weithin akzeptierten Modell der Regulation von p53 überein, welche primär auf posttranslativem Ebene und weniger auf transkriptioneller Ebene erfolgt. In vitalen Zellen verfügt p53 nur über eine kurze Halbwertszeit, da es durch MDM2 an mehreren C-terminalen Lysinresten (K370, K372, K373, K381, K382, K386) ubiquityliert und damit für den proteasomalen Abbau markiert wird (Rodriguez *et al.* 2000). Diese Lysinreste

sind in p53 β und p53 γ , die aufgrund alternativen Spleißens nur bis einschließlich Aminosäure 331 mit wtp53 übereinstimmen, nicht vorhanden.

Um zu klären, inwieweit das Expressionsniveau der transgenen Isoformen Flag-p53 β und Flag-p53 γ durch proteasomalen Abbau beeinflusst wird, wurden die RKO-Klone für 6 h in Ab- oder Anwesenheit des Proteasominhibitors MG-132 inkubiert und die gewonnenen Zelllysate im Western Blot analysiert. Das Expressionsniveau von transgenem und endogenem p53 wurde durch Detektion mit einem anti-Flag-spezifischen und dem anti-p53-Antikörper DO-1 untersucht (Abb. 3-6).

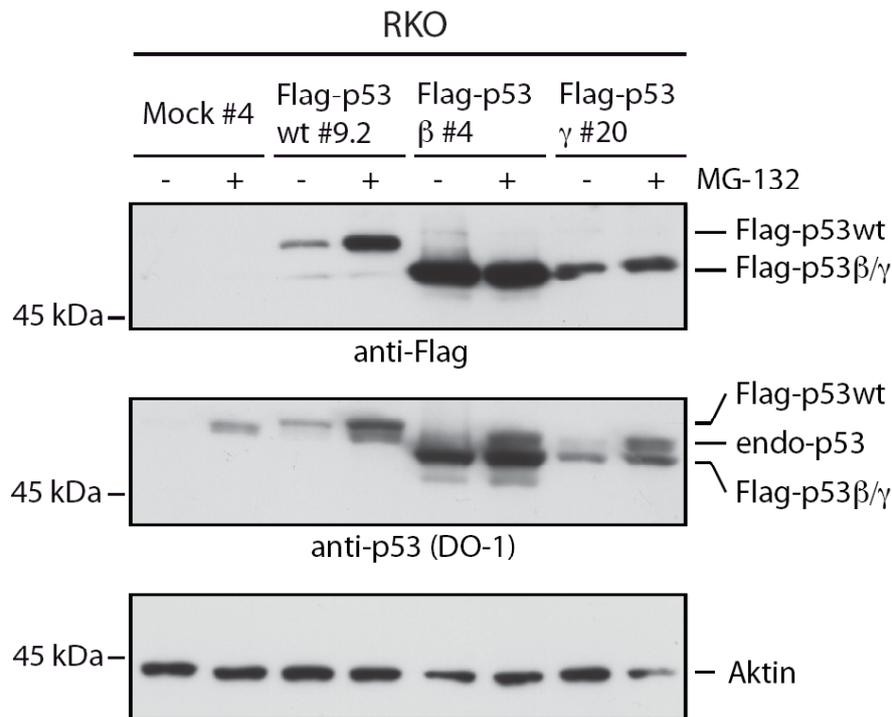


Abb. 3-6: p53 β und p53 γ werden weniger effizient durch das Proteasom degradiert als wtp53.

Die RKO-Klone wurden für 6 h in Ab- oder Anwesenheit von 5 μ M MG-132 kultiviert und das Expressionsniveau der p53-Isoformen anschließend mittels Western Blot und der angegebenen Antikörper analysiert. Der Nachweis von Aktin diente der Ladekontrolle.

Die Bandenintensität von endogenem wtp53 nahm in allen RKO-Klonen infolge der Inkubation der Zellen mit MG-132 zu. Gleiches galt für das transgen unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimierte Flag-markierte wtp53, welches nach Zugabe des Proteasominhibitors verstärkt nachgewiesen wurde. Die Flag-markierten Isoformen p53 β und p53 γ hingegen waren bereits in Kontrollansätzen deutlich nachzuweisen und die jeweilige Bandenintensität wurde durch die Zugabe von MG-132 kaum erhöht.

3.3. *Einfluss der p53-Isoformen auf die Expression Apoptose- und Zellzyklusarrest-assoziiierter Proteine*

Das Tumorsuppressorprotein p53 wird durch DNA-Schäden aktiviert und ruft als Transkriptionsfaktor unterschiedliche Reaktionen der Zelle wie Apoptose, Zellzyklusarrest oder Seneszenz hervor. Durch den Nachweis Apoptose- bzw. Zellzyklusarrest-relevanter

Proteine sollte ein möglicher Einfluss der Isoformen p53 β und p53 γ auf die Aktivität von wtp53 als Transkriptionsfaktor in diesen essentiellen Signalwegen analysiert werden.

Hierzu wurden die klonalen RKO-Zelllinien für 24 h in Ab- oder Anwesenheit von Etoposid inkubiert bzw. 24 h nach γ -Bestrahlung für eine Western Blot Analyse aufgearbeitet. Der Nachweis der beiden Proteine Bax und Bak diente der Untersuchung des Einflusses der p53-Isoformen auf die Transaktivierung von Genen, deren Genprodukte pro-apoptotisch wirken. Der Nachweis von p21, einem Protein involviert in die Zellzyklusregulation und zudem ein p53-Zielgen, sollte Aufschluss über den Einfluss der Isoformen p53 β und p53 γ auf die p53-vermittelte Zellzyklusregulation geben. Als weiteres p53-Zielgen wurde die Expression von MDM2 untersucht, welches durch Ubiquitylierung den Abbau von p53 reguliert. Dadurch sollte geklärt werden, inwiefern die starke Expression von Flag-p53 β und Flag-p53 γ auch in Kontrollansätzen (Abb. 3-5) mit der Expression von MDM2 korreliert. Schließlich sollte der Nachweis der beiden Proteine Caspase-3 und PARP, einem Substrat von Caspase-3, und deren proteolytischer Spaltung, Aufschluss darüber geben, inwiefern sich eine mögliche Interaktion der Isoformen p53 β und p53 γ mit wtp53 auf die Transduktion des Apoptosesignals auswirkt (Abb. 3-7).

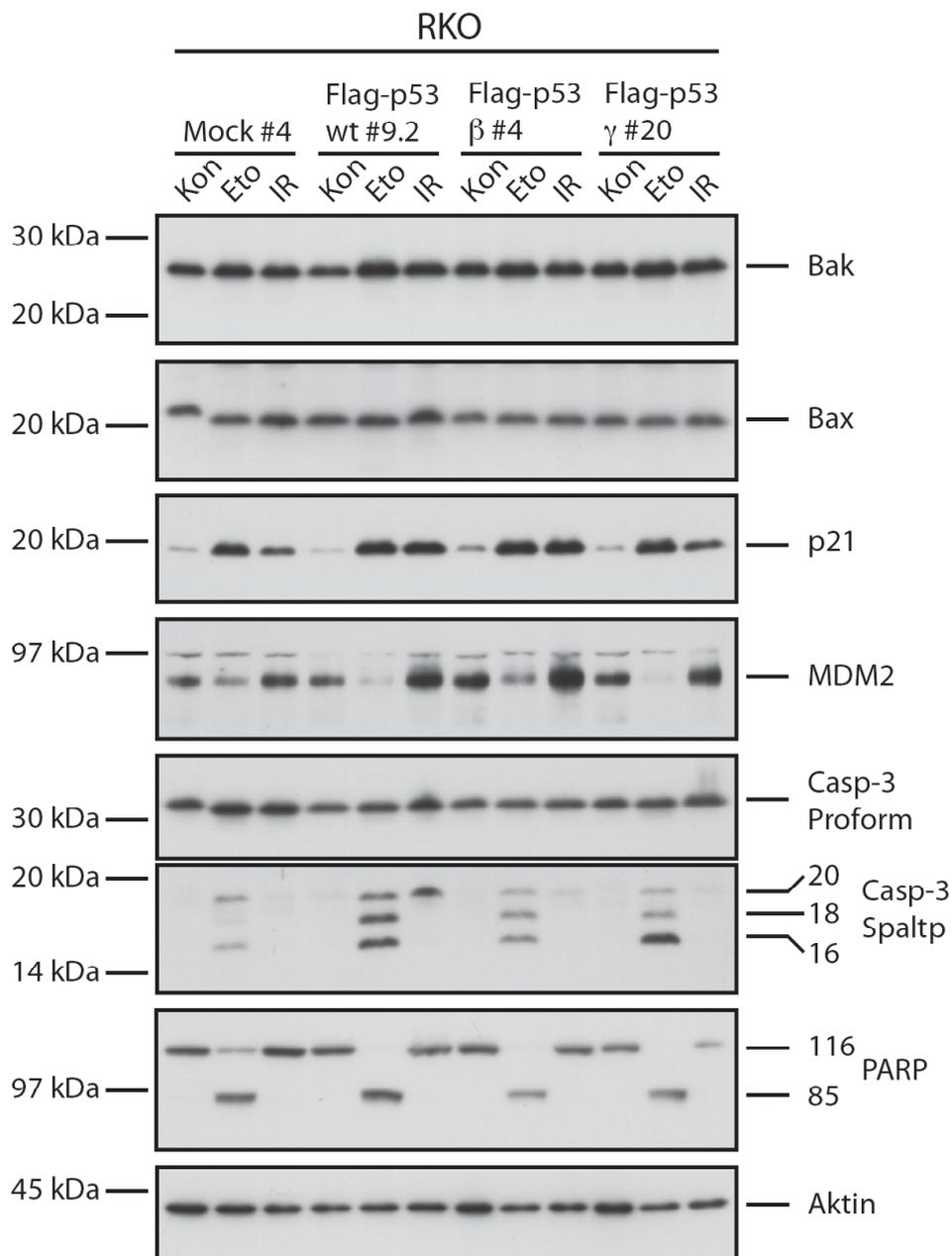


Abb. 3-7: Expression Apoptose- und Zellzyklus-relevanter Proteine in RKO-Klonen.

RKO-Klone blieben unbehandelt (Kon), wurden für 24 h in Anwesenheit von 50 μ M Etoposid (Eto) kultiviert bzw. 24 h nach γ -Bestrahlung (IR; 20 Gy) für die Western Blot Analyse und den Nachweis der angegebenen Proteine aufgearbeitet. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von Aktin.

Obwohl *bax* im Menschen als Zielgen von p53 beschrieben ist (Miyashita und Reed 1995) und auch *bak* – wie später noch dargelegt wird (3.13) – ein Zielgen von p53 im Menschen ist, ließ sich deren Transaktivierung durch wtp53 auf Proteinebene nicht nachvollziehen. Die Bandenintensität blieb für beide Proteine in allen Ansätzen und Klonen annähernd konstant, so dass eine Beeinflussung der Transkription von *bax* und *bak* durch die p53-Isoformen p53 β und p53 γ , ebenso wie durch wtp53 auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden konnte.

Die Expression des CDK-Inhibitors p21 war nach DNA-Schädigung und damit einhergehender Aktivierung von wtp53 in allen Zelllinien deutlich und in vergleichbarem Maße erhöht. Diese Induktion stand im Einklang mit der erwarteten Regulation durch wtp53

und wurde nicht nachweisbar durch p53 β und p53 γ beeinflusst. Ebenso wirkte sich die erhöhte Proteinmenge an wtp53 in Flag-p53wt überexprimierenden Klonen nicht detektierbar auf die Induktion der p21-Transkription aus.

Die geringste MDM2-Proteinmenge wurde in allen Klonen jeweils in den mit Etoposid behandelten Ansätzen nachgewiesen. Da MDM2 in allen Zelllinien vergleichbar exprimiert war, konnte ein Verlust der MDM2-Expression in Flag-p53 β - und Flag-p53 γ -Klonen als Erklärung für die starke Transgenexpression unter Kontrollbedingungen ausgeschlossen werden.

Der Nachweis der Proteine Caspase-3 und PARP zeigte schließlich, dass 24 h nach Induktion eines DNA-Schadens die Proteine in den Proben prozessiert waren, welche aus Etoposid-inkubierten Zellen gewonnen wurden. Diese Prozessierung korrelierte mit der Stabilisierung von endogenem wtp53, welche bei Stressinduktion durch Etoposid besonders deutlich war (Abb. 3-5). Obwohl sich die Expression von Flag-p53wt nicht auf die Transaktivierung von p21 auswirkte, korrelierte die erhöhte Menge an wtp53 in Flag-p53wt exprimierenden Zellen mit einer verstärkten Aktivierung der Caspase-3 und damit einhergehender Spaltung von PARP.

3.4. *p53 β und p53 γ beeinflussen nicht die durch wtp53 induzierte Apoptose*

Nachdem die Expressionsanalyse pro-apoptotischer Proteine bzw. des CDK-Inhibitors p21 im Western Blot keinen Hinweis auf einen Einfluss der Isoformen p53 β und p53 γ auf die transaktivierende Funktion von wtp53 ergeben hatte, wurde in weiteren Untersuchungen ihr potentieller Einfluss auf DNA-Fragmentierung – ein finales Ereignis in der Apoptosesignalkaskade – analysiert. Zu diesem Zweck wurden die RKO-Klone in Ab- oder Anwesenheit von Camptothecin bzw. Etoposid inkubiert oder γ -bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten der relative DNA-Gehalt im Durchflußzytometer bestimmt. Hypodiploide Zellen wurden dabei als apoptotisch klassifiziert und die spezifische Apoptoserate durch Subtraktion der in Kontrollansätzen ermittelten Werte errechnet (Abb. 3-8 und Abb. 3-9).

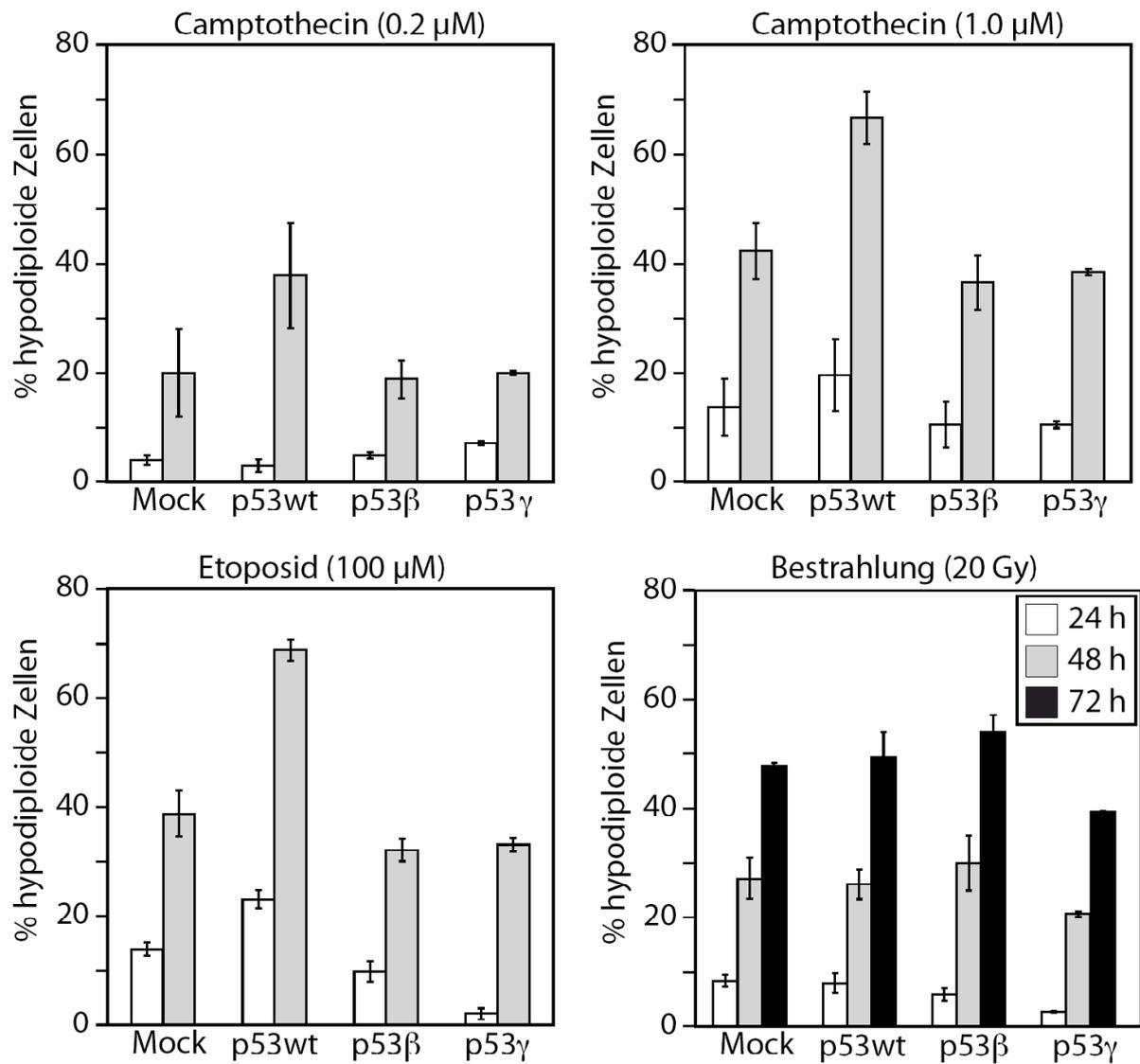


Abb. 3-8: Die Expression von p53β oder p53γ hat keinen Einfluss auf die Apoptoseinduktion.

Die RKO-Klone wurden den angegebenen DNA-schädigenden Substanzen ausgesetzt und zu den gekennzeichneten Zeitpunkten zur durchflußzytometrischen Analyse des relativen DNA-Gehalts aufgearbeitet. Gezeigt sind die Mittelwerte der spezifischen relativen Menge [%] hypodiploider Zellen dreier unabhängiger Experimente mit Standardabweichung jeweils eines Klons.

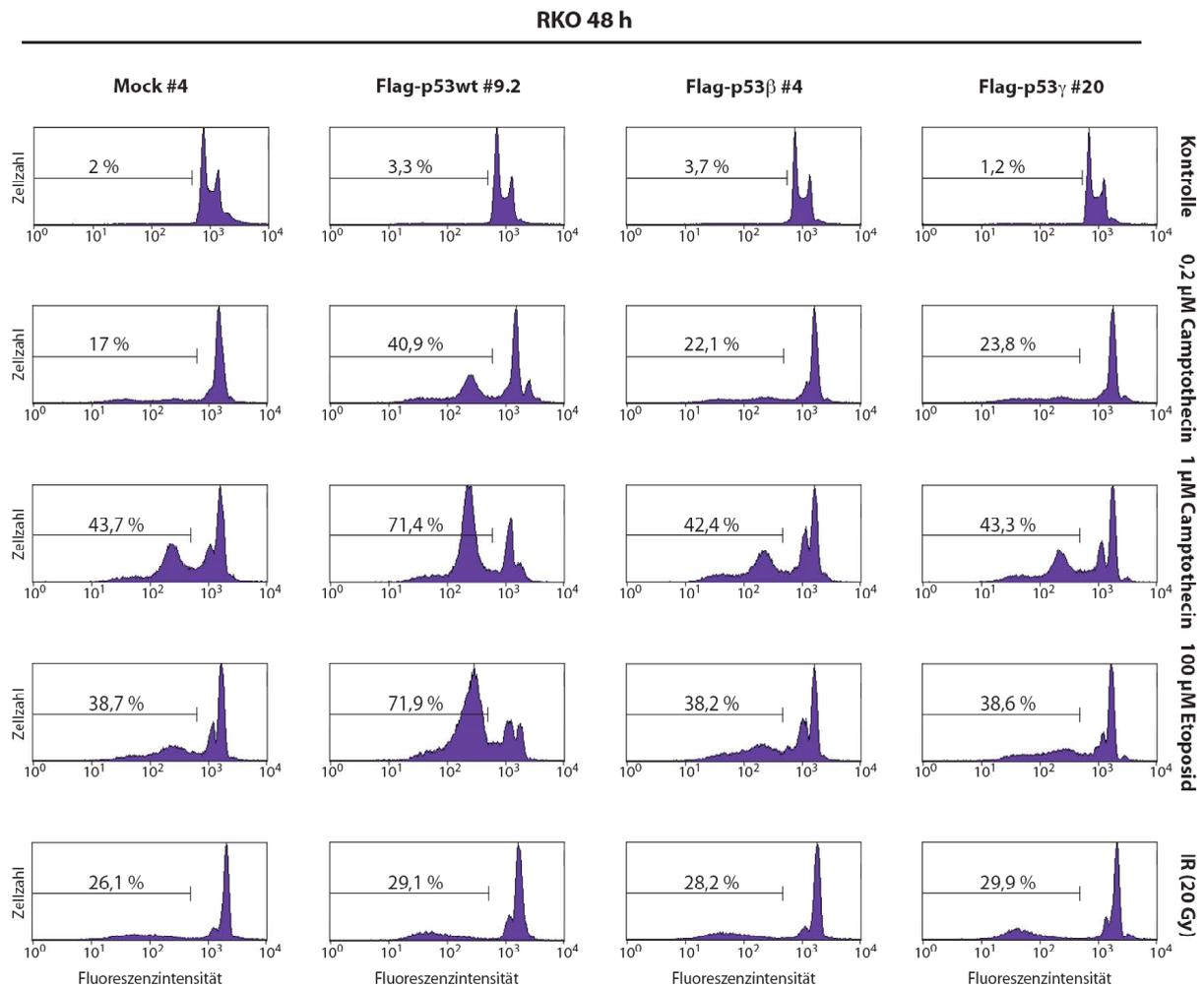


Abb. 3-9: Repräsentative Histogramme der durchflußzytometrischen Analyse des relativen DNA-Gehalts.

Die durchflußzytometrische Analyse zur Untersuchung des Einflusses der p53-Isoformen auf die durch γ -Bestrahlung und Zytostatika induzierte Apoptose zeigte, dass Zellen, die zusätzlich transgenes Flag-p53wt überexprimieren, eine erhöhte Apoptoserate nach DNA-Schädigung durch Zytostatika aufwiesen (Abb. 3-8 und Abb. 3-9). Dieses Ergebnis war konsistent mit der Beobachtung, dass Caspase-3 und damit einhergehend auch PARP besonders effizient in Etoposid behandelten Flag-p53wt überexprimierenden Zellen prozessiert wurden (Abb. 3-7). Die Kultivierung in Gegenwart von 0,2 μ M Camptothecin für 48 h steigerte die spezifische Apoptoserate von durchschnittlich 20% in Mock-Klonen auf 37,9% in Flag-p53wt exprimierenden Zellen (Abb. 3-8). Die Inkubation mit 1 μ M Camptothecin für 48 h führte zu einer Erhöhung des Anteils hypodiploider Zellen von durchschnittlich 42,3% (Mock) auf 66,6% (Flag-p53wt). Nach Kultivierung in Gegenwart von 100 μ M Etoposid für 48 h waren durchschnittlich 68,8% der Flag-p53wt-Zellen apoptotisch im Vergleich zu 38,8% der Mock-transfizierten Zellen.

Die Applikation der Zytostatika Camptothecin und Etoposid für 48 h rief in Mock-transfizierten und Flag-p53 β oder Flag-p53 γ exprimierenden RKO-Zellen vergleichbare spezifische Apoptoseraten hervor.

Im Gegensatz zur Inkubation der Zellen mit Zytostatika führte γ -Bestrahlung zu keinem Zeitpunkt zu einem nennenswerten Unterschied in der spezifischen Apoptoserate zwischen Mock-transfizierten, Flag-p53wt-exprimierenden und Flag-p53 β -exprimierenden Zellen. Lediglich Zellen, welche Flag-p53 γ überexprimieren, zeigten zu allen drei Zeitpunkten eine im Vergleich leicht verminderte Apoptoserate.

3.5. Einfluss der p53-Isoformen auf den Zellzyklusarrest

Da beschrieben ist, dass p53 durch differentielle Induktion von Zielgenen je nach Schwere der Zellschädigung Apoptose oder Zellzyklusarrest zwecks DNA-Reparatur einleiten kann, wurde der Frage nachgegangen, ob die Isoformen p53 β und p53 γ die prozentuale Verteilung vitaler Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen beeinflussen. Die Einteilung der Zellen in die Zellzyklusphasen erfolgte auf der Grundlage der durchflußzytometrischen Analyse des relativen zellulären DNA-Gehaltes.

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 3.4 beschrieben behandelt und aufgearbeitet. Da eine Arretierung im Zellzyklus vorrangig nach mildem Stress und kurzen Zeiträumen erfolgt, wurde die Verteilung der RKO-Zelllinien auf die Zellzyklusphasen nach 24 h analysiert und die Auswirkung der geringeren der beiden verwendeten Camptothecin-Konzentrationen (0,2 μ M) ausgewertet. Weil die Ergebnisse für die jeweils drei analysierten Klone vergleichbar waren, ist je ein repräsentatives Ergebnis dargestellt (Abb. 3-10).

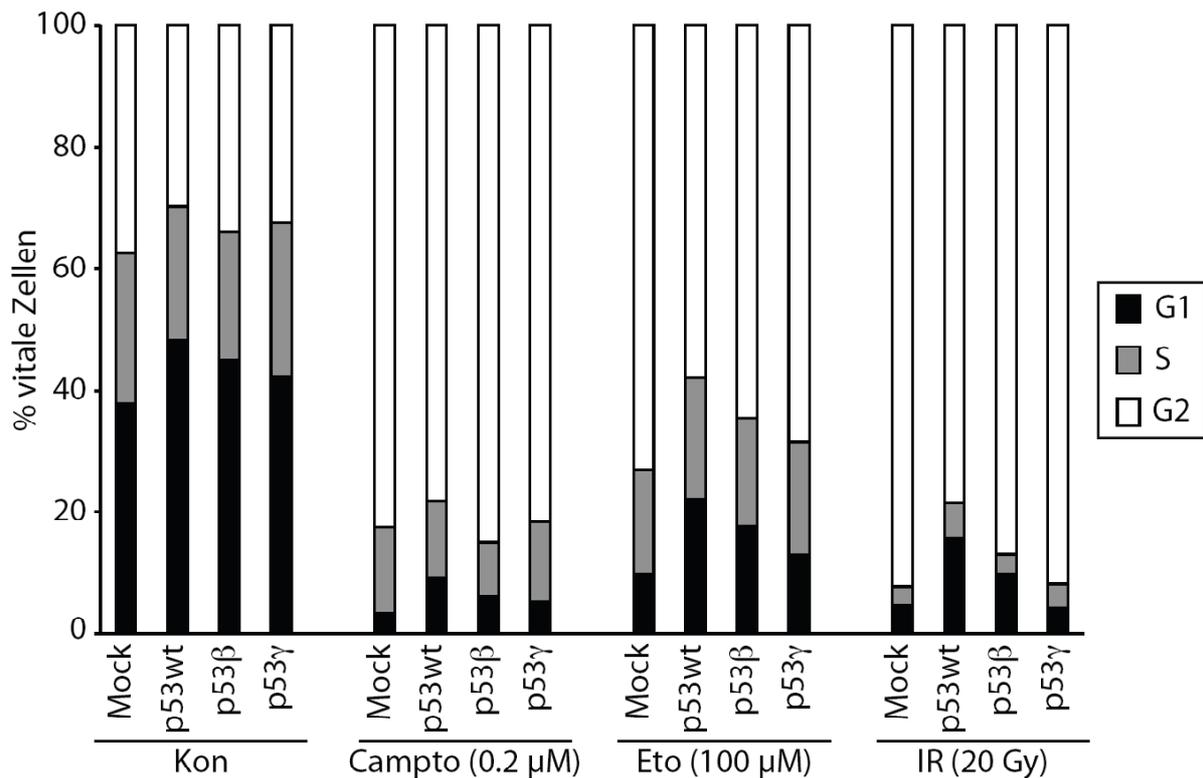


Abb. 3-10: Die Expression von p53β bzw. p53γ beeinflusst nicht die Zellzyklusverteilung.

Die RKO-Klone blieben unbehandelt (Kon) oder wurden in Gegenwart von Camptothecin (Campto; 0,2 μM) bzw. Etoposid (Eto; 100 μM) kultiviert oder γ -bestrahlt (IR; 20 Gy) und nach 24 h für die durchflußzytometrische Analyse des relativen zellulären DNA-Gehalts aufgearbeitet. Der Prozentsatz vitaler Zellen in den Zellzyklusphasen G1, S und G2 wurde bestimmt. Das Diagramm repräsentiert die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente; auf die Darstellung der Standardabweichung wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

Alle analysierten RKO-Zelllinien zeigten eine vergleichbare Verteilung auf die Zellzyklusphasen in Kontrollansätzen, mit etwa 40% der vitalen Zellen in der G1-, 20% der Zellen in der S- und ca. 40% der Zellen in der G2-Phase. Auch eine Kultivierung der Zellen in Anwesenheit von Camptothecin führte zu einer vergleichbaren Zellzyklusverteilung bei allen Zelllinien. Im Unterschied zu den Kontrollansätzen befand sich nun der überwiegende Teil vitaler Zellen (ca. 80%) in der G2-Phase. Ein vergleichbarer Anteil G2-arretierter Zellen wurde durch γ -Bestrahlung induziert, die Inkubation mit Etoposid führte ebenfalls zu einem G2-Arrest, allerdings weniger stark ausgeprägt.

Eine leicht differierende Verteilung im Zellzyklus war nach γ -Bestrahlung und Etoposid-Zugabe in Flag-p53wt überexprimierenden Zellen im Vergleich zur Mock-Linie zu beobachten. Die Verminderung der relativen Anzahl vitaler Zellen in der G2-Phase Flag-p53wt überexprimierender Zellen könnte durch die Apoptosesensitivierung dieser Zellen (Abb. 3-8 und Abb. 3-9) aufgrund ihrer verstärkten wtp53-Expression zumindest bei Stressinduktion durch Etoposid hervorgerufen werden. Die Klone, die die Isoformen Flag-p53β bzw. Flag-p53γ überexprimieren, zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Zellzyklusverteilung im Vergleich zur Mock-transfizierten Kontrolllinie nach Etoposid-Zugabe und γ -Bestrahlung.

3.6. *p53 β* und *p53 γ* haben keinen Einfluss auf Seneszenz in MCF-7-Zellen

Die Kultivierung der RKO-Klone in Gegenwart von Camptothecin bzw. Etoposid, ebenso wie die γ -Bestrahlung der Zellen führten zu einer effizienten Apoptoseinduktion, die nach 96 h im Zelltod von nahezu 100% aller untersuchten Zellen resultierte. Diese Beobachtung legte den Schluss nahe, dass p53 in der humanen Kolonkarzinomzelllinie RKO keine Seneszenz induziert und – zumindest in diesem Zellsystem – diese Form des permanenten Zellzyklusarrests durch die Isoformen p53 β und p53 γ nicht positiv reguliert wird.

Um einen möglichen Einfluss dieser p53-Isoformen auf die Induktion von Seneszenz direkt untersuchen zu können, wurden MCF-7-Zellen ausgewählt, für die gezeigt worden war, dass γ -Bestrahlung Seneszenz induziert (Essmann *et al.* 2004). Diese Zelllinie hatte zudem in eigenen Analysen keine Proteinexpression von p53 β und p53 γ gezeigt (Abb. 3-1).

Vergleichbar mit der Generierung stabiler klonaler RKO-Zelllinien, welche Flag-p53wt/ β / γ überexprimieren, wurden stabile MCF-7 bulk-Kulturen generiert, welche transgen die jeweilige Flag-markierte p53-Isoform exprimieren (Abb. 3-11).

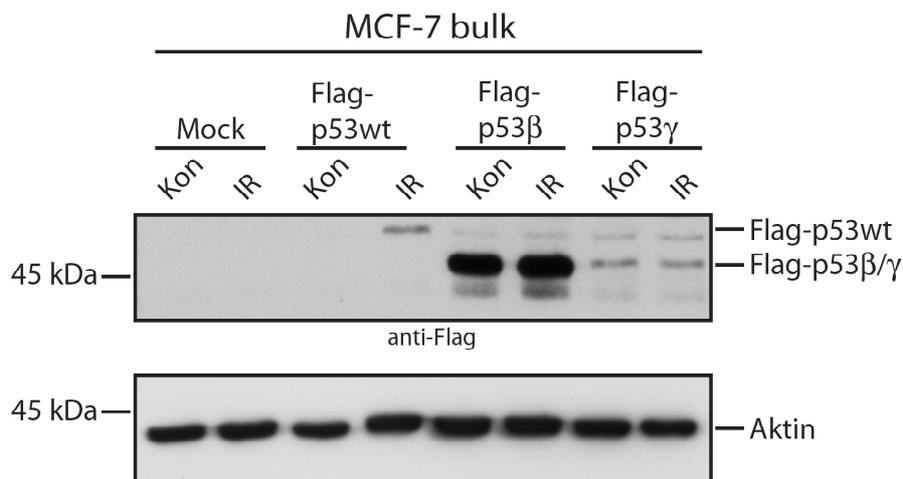


Abb. 3-11: Transgenexpression in MCF-7 bulk-Kulturen.

MCF-7 bulk-Zellen zur Expression von Flag-p53wt, Flag-p53 β , Flag-p53 γ und die Kontrollzellen MCF-7 Mock blieben unbehandelt (Kon) oder wurden γ -bestrahlt (IR; 20 Gy) und 24 h später mittels Western Blot analysiert. Die Transgenexpression wurde durch die Verwendung eines anti-Flag-Antikörpers detektiert. Der Nachweis von Aktin diente der Ladekontrolle.

Die Western Blot Analyse der Transgenexpression mit einem anti-Flag-Antikörper zeigte, dass Flag-p53 β und Flag-p53 γ wie in den entsprechenden RKO-Klonen bereits unter Kontrollbedingungen stabil exprimiert waren. Flag-p53wt konnte hingegen ausschließlich nach Induktion eines DNA-Schadens und damit einhergehender Proteinstabilisierung nachgewiesen werden, in Kontrollansätzen wurde Flag-p53wt, wie bereits in RKO-Klonen beobachtet, effizient degradiert.

Zur Analyse eines Einflusses der p53-Isoformen auf die Induktion von Seneszenz in MCF-7-Zellen wurden die vier bulk-Zelllinien γ -bestrahlt und nach 120 h die Aktivität saurer β -Galaktosidase, einem Marker seneszenten Zellen, nachgewiesen (Abb. 3-12).

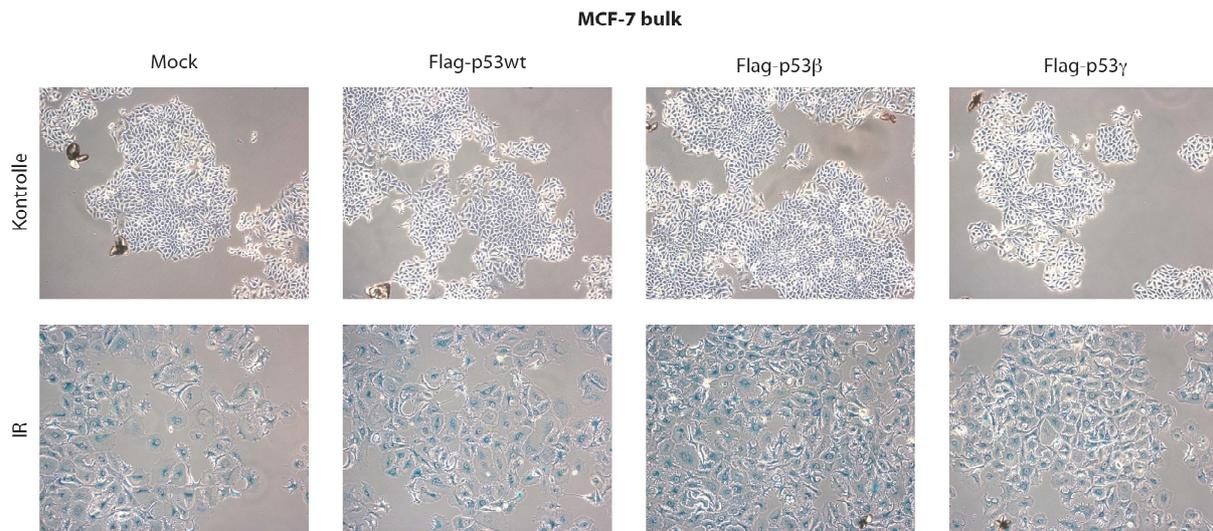


Abb. 3-12: p53 β und p53 γ beeinflussen nicht den seneszenten Phänotyp von MCF-7-Zellen nach IR.

MCF-7 bulk-Kulturen blieben entweder unbehandelt oder wurden γ -bestrahlt (IR; 20 Gy). 120 h später wurden die Zellen für den Nachweis der SA- β -Galaktosidase-Aktivität gefärbt und bei 10-facher Vergrößerung fotografiert.

Die γ -Bestrahlung der MCF-7-Zellen induzierte in annähernd 100% der Zellen jeder bulk-Kultur die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase, welche durch die Blaufärbung der Zellen nachzuweisen war. Zudem verfügten γ -bestrahlte Zellen im Vergleich zu den Kontrollen über eine stark vergrößerte Zelloberfläche, einem weiteren für seneszente Zellen charakteristischen Merkmal.

3.7. *p53 β und p53 γ sind nicht an den Mitochondrien lokalisiert*

Die Translokation von wtp53 an die Mitochondrien und seine Interaktion mit Bcl-2-Proteinen ist ein Mechanismus, durch den wtp53 Apoptose unabhängig von seiner Funktion als Transkriptionsfaktor forciert. Obwohl diese Transkriptions-unabhängige Funktion von wtp53 neben seiner unumstrittenen Rolle als Transkriptionsfaktor bislang kontrovers diskutiert wird, sollte im Folgenden untersucht werden, ob die p53-Isoformen p53 β und p53 γ möglicherweise auf diese Weise einen Einfluss auf die Apoptoseinduktion ausüben. Zu diesem Zweck wurde überprüft, ob p53 β und p53 γ an den Mitochondrien lokalisiert sind.

Die RKO-Klone blieben unbehandelt oder wurden für 24 h in Anwesenheit von Etoposid inkubiert und anschließend Mitochondrien-angereicherte Fraktionen isoliert. Im Western Blot wurden die resultierenden zytoplasmatischen und mitochondrialen Fraktionen durch die Verwendung eines anti-Flag-Antikörpers auf Transgenexpression analysiert (Abb. 3-13).

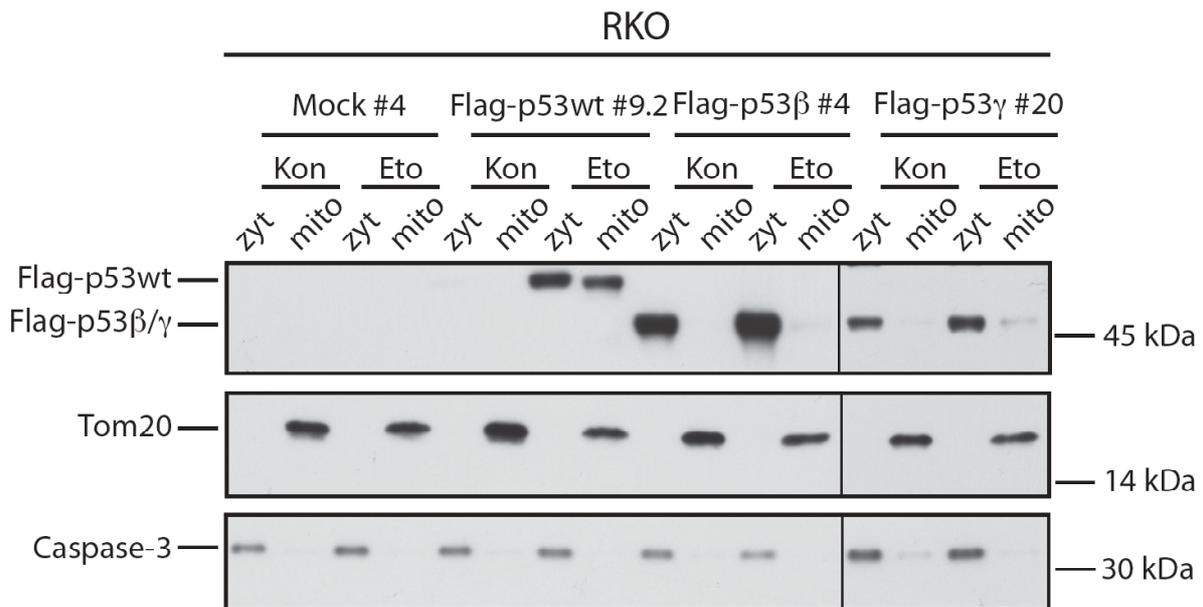


Abb. 3-13: p53β und p53γ translozieren nicht wie wtp53 an die Mitochondrien.

Die Lokalisation Flag-markierter p53-Isoformen in zytoplasmatischen (zyt) und mitochondrialen (mito) Fraktionen un behandelter (Kon) und Etoposid-inkubierter (Eto; 50 μM) RKO-Klone wurde nach 24 h mittels Western Blot und der Verwendung eines anti-Flag-Antikörpers analysiert. Die Reinheit der Fraktionen wurde durch den Nachweis von Markerproteinen (Zytosol: Caspase-3; Mitochondrien: Tom20) bestätigt.

Ein Flag-markiertes Transgen war nicht in Lysaten der Mock-transfizierten RKO-Zelllinie nachzuweisen. Zudem bestätigte die Detektion von Flag-p53wt ausschließlich in Etoposid-behandelten, die von Flag-p53β sowie Flag-p53γ hingegen sowohl in unbehandelten als auch in behandelten Proben, die stabile Expression dieser beiden Isoformen unabhängig vom Stressstimulus im Gegensatz zu der von wtp53. Die Identität der Mitochondrien-angereicherten und zytoplasmatischen Fraktion konnte durch den Nachweis von Tom20, einem mitochondrialen Membranprotein, und zytoplasmatischer Caspase-3 bestätigt werden.

Durch Etoposid-Zugabe wurde Flag-p53wt stabilisiert und konnte sowohl in der zytoplasmatischen als auch der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu waren Flag-p53β und Flag-p53γ fast ausschließlich in der zytoplasmatischen Fraktion lokalisiert und eine Kolokalisation mit den Mitochondrien konnte erst nach sehr langer Exposition des Autoradiographiefilms detektiert werden.

Aufgrund dieses Ergebnisses ist eine Beteiligung der Isoformen p53β und p53γ an p53-vermittelter Transkriptions-unabhängiger Apoptose an den Mitochondrien sehr unwahrscheinlich und eine weitere Untersuchung möglicher Interaktionen mit Bcl-2-Familienproteinen wurde deshalb nicht länger in Betracht gezogen.

3.8. wtp53, p53β und p53γ sind im Nukleus lokalisiert

Das Protein wtp53 (p53α) verfügt über drei nukleäre Lokalisationssignale (NLS I - III). Durch alternatives Spleißen sind die beiden Isoformen p53β und p53γ C-terminal verkürzt, wodurch sie lediglich über NLS I (AS 305 - 322) verfügen, wohingegen NLS II und NLS III in

ihrer Sequenz nicht mehr vorhanden sind. Es konnte deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass p53 β und p53 γ aufgrund unzureichender nukleärer Lokalisation keinen Einfluss auf die durch wtp53-vermittelte Apoptose ausüben, da die nukleäre Lokalisation Voraussetzung für die Funktionalität von Transkriptionsfaktoren ist. In folgenden Experimenten wurde daher die Lokalisation dieser Isoformen durch subzelluläre Fraktionierung und Immunfluoreszenz analysiert.

Für die Gewinnung nukleärer Fraktionen blieben die RKO-Zelllinien entweder unbehandelt oder wurden für 24 h in Anwesenheit von Etoposid kultiviert. Anschließend wurden nukleäre und zytoplasmatische Fraktionen isoliert, welche nachfolgend im Western Blot auf die Expression des Flag-markierten Transgens mittels eines anti-Flag-Antikörpers untersucht wurden (Abb. 3-14).

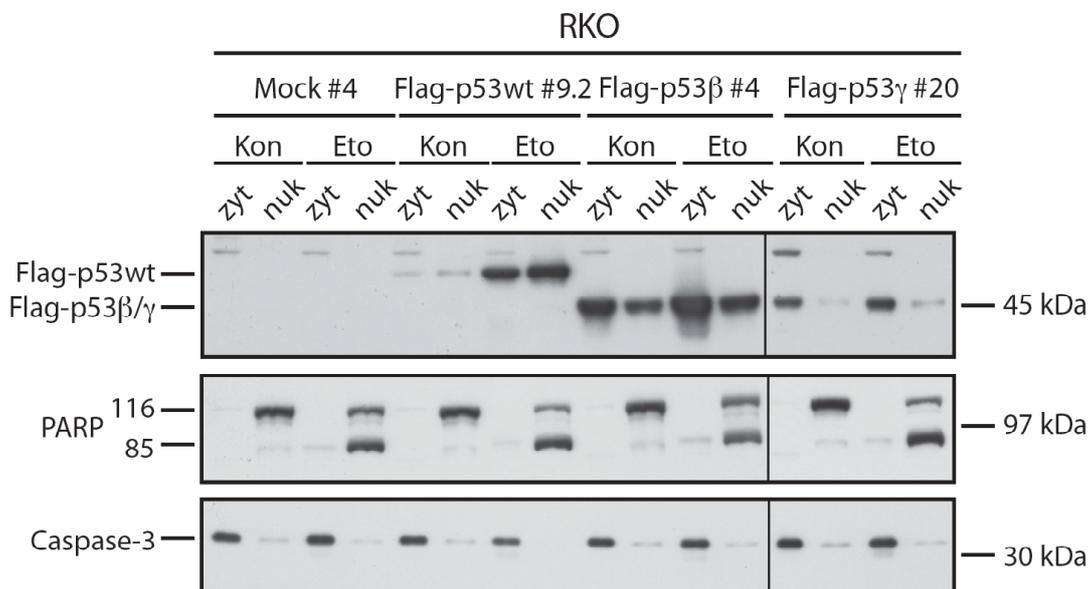


Abb. 3-14: p53-Isoformen sind sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma lokalisiert.

Die Lokalisation Flag-markierter p53-Isoformen in der zytoplasmatischen (zyt) und nukleären (nuk) Fraktion wurde mittels Western Blot und der Verwendung eines anti-Flag-Antikörpers analysiert. Die RKO-Zelllinien wurden zuvor für 24 h unter Kontrollbedingungen (Kon) oder in Gegenwart von 50 μ M Etoposid (Eto) kultiviert. Die Identität der nukleären und zytoplasmatischen Fraktionen wurde durch den Nachweis von PARP bzw. Caspase-3 überprüft.

Jede der analysierten p53-Isoformen war sowohl in der zytoplasmatischen als auch der nukleären Fraktion lokalisiert. Allerdings wurde Flag-p53 γ vorrangig in der zytoplasmatischen Fraktion detektiert.

Im Einklang mit bereits dargestellten Resultaten (Abb. 3-5 und Abb. 3-13) zeigte auch diese Western Blot Analyse, dass Flag-p53wt erst durch die Induktion eines DNA-Schadens stabilisiert wurde, wohingegen Flag-p53 β und Flag-p53 γ bereits in Kontrollansätzen stabil exprimiert waren. Das nukleäre Protein PARP diente der Identifizierung der nukleären Fraktion. Neben seiner Funktion als Markerprotein war die Spaltung von PARP zudem ein Indikator für Apoptose. Diese Spaltung konnte in nukleären Fraktionen aller nach Etoposid-Applikation generierten Proben nachgewiesen werden. Die Detektion der PARP-Spaltung

auch in Zellen ohne Transgen-Expression war ein Hinweis darauf, dass vorrangig endogenes wtp53 für diese Spaltung verantwortlich war. Der Nachweis des Proteins Caspase-3 diente der Identifizierung der zytoplasmatischen Fraktion.

Die Analyse der Lokalisation der Proteine Flag-p53wt/ β / γ wurde auch mit Hilfe der Immunfluoreszenz durchgeführt. Hierzu wurden parentale RKO-Zellen transient mit den Expressionsvektoren pcDNA3-Flag-p53wt, pcDNA3-Flag-p53 β bzw. pcDNA3-Flag-p53 γ transfiziert und nach 24 h fixiert und gefärbt. Die Detektion der Transgene erfolgte mit Hilfe eines anti-Flag-Antikörpers und zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation wurden die Mitochondrien mit einem anti-Tom20-Antikörper nachgewiesen, sowie die Zellkerne durch Anfärben der DNA mit DAPI sichtbar gemacht (Abb. 3-15).

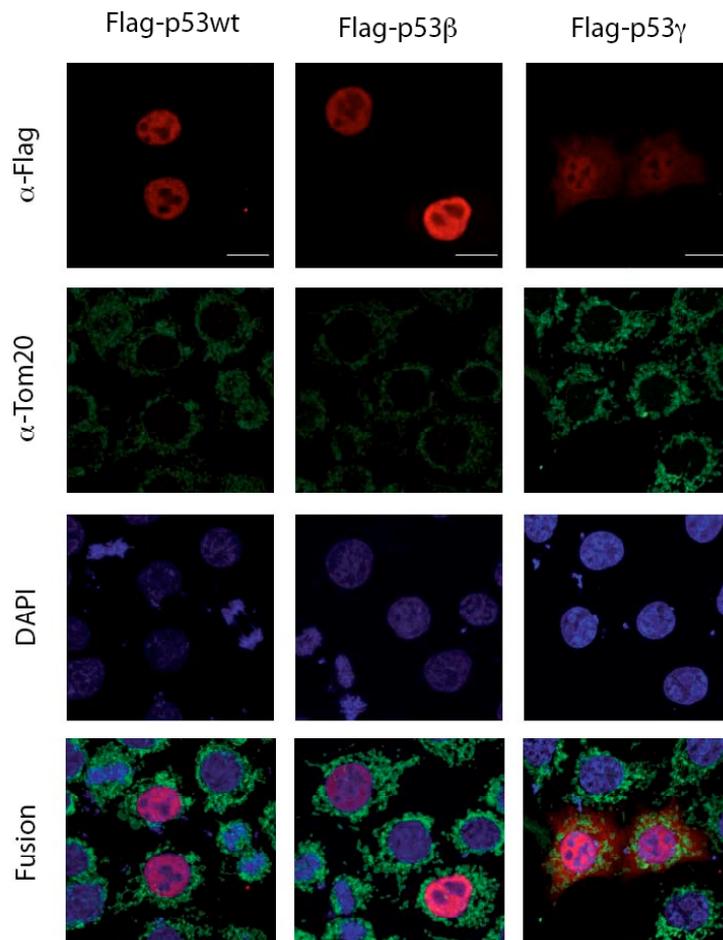


Abb. 3-15: Nachweis der subzellulären Lokalisation von p53-Isoformen durch Immunfluoreszenz.

Die drei Flag-markierten p53-Isoformen wurden in transient transfizierten RKO-Zellen mit einem anti-Flag-Antikörper (rot) nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde das mitochondriale Protein Tom20 (grün) und DNA mit dem Farbstoff DAPI (blau) gefärbt. Der Balken entspricht 11,9 μ m.

Die Proteine Flag-p53wt und Flag-p53 β wurden im Zellkern nachgewiesen, Flag-p53 γ sowohl im Kern als auch im Zytoplasma. Die Lokalisation der Proteine konnte anhand der Anfärbung der DNA durch den Farbstoff DAPI und der Sichtbarmachung der Mitochondrien durch den Nachweis des Proteins Tom20 subzellulären Kompartimenten zugeordnet werden. Die distinkte, nicht überlappende Rot- und Grünfärbung Flag-p53 γ transfizierter Zellen in der

Fusion zeigte, dass zytoplasmatisch lokalisiertes Flag-p53 γ nicht mit den Mitochondrien kolokalisiert. Die konfokale Laserscanning Mikroskopie weist Kolokalisationen durch eine Farbänderung (im Falle von rot und grün zu gelb) nach. Eine interne Negativkontrolle für die Färbung des anti-Flag-Antikörpers war durch die transiente Transfektion gegeben, da nicht alle Zellen positiv für die Expression der Transgene waren.

3.9. Einfluss von p53 β und p53 γ auf die durch wtp53-induzierte Transgenexpression

Basierend auf dem Nachweis von Flag-p53 β und Flag-p53 γ im Nukleus war eine Interaktion mit wtp53 und Beeinflussung dessen transaktivierender Funktion denkbar. Da Western Blot Analysen mitunter nicht sensitiv genug sind, um einen Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf die Expression ihrer jeweiligen Zielgene zu detektieren, wurden im Folgenden Reporteranalysen zur Untersuchung des transaktivierenden Potentials der p53-Isoformen durchgeführt. So hatte der Nachweis von Bax in Abb. 3-7 nicht auf eine Transaktivierung durch wtp53 schließen lassen, obwohl humanes *bax* als Zielgen von p53 bekannt ist (Miyashita und Reed 1995).

Daher wurde die Transaktivierung der Luciferaseexpression ausgehend von einem *bax*-Promotorkonstrukt, sowie einem Promotorkonstrukt, welches 13 Kopien des *ribosomal gene clusters* (RGC) – einer p53-Konsensussequenz – und den CMV_{mini}-Promotor enthält, analysiert. Für diese Analysen wurden p53-defiziente HCT116-Zellen transient mit den Luciferase-Reporterplasmiden und unterschiedlichen Kombinationen der Expressionsplasmide verschiedener p53-Isoformen transfiziert, nach 48 h aufgearbeitet und die Luciferaseaktivität luminometrisch gemessen. Eine basale Transaktivierung der Luciferaseexpression wurde durch parallele Ansätze mit dem Vektor pGL3-Basic, der keine Promotorsequenz am 5'-Ende der Luciferase-cDNA enthält, bestimmt. Zudem wurde der Wert, der allein aus der Transfektion des Reporterplasmids ohne zusätzliche Transfektion eines p53-Expressionsvektors resultierte, gleich 1 gesetzt und alle anderen Werte wurden als Vielfache davon angegeben (Abb. 3-16).

Konsequenz eines zusätzlichen Verlusts der Tetramerisierungsdomäne, wie er in den beiden p53-Isoformen $\Delta 133p53\beta$ und $\Delta 133p53\gamma$ zu beobachten ist, zu analysieren, wurden die bereits in Abb. 3-16 beschriebenen Reportergenplasmide verwendet und die in Abb. 3-17 angegebenen Kombinationen von Expressionsplasmiden der verschiedenen p53-Isoformen transfiziert.

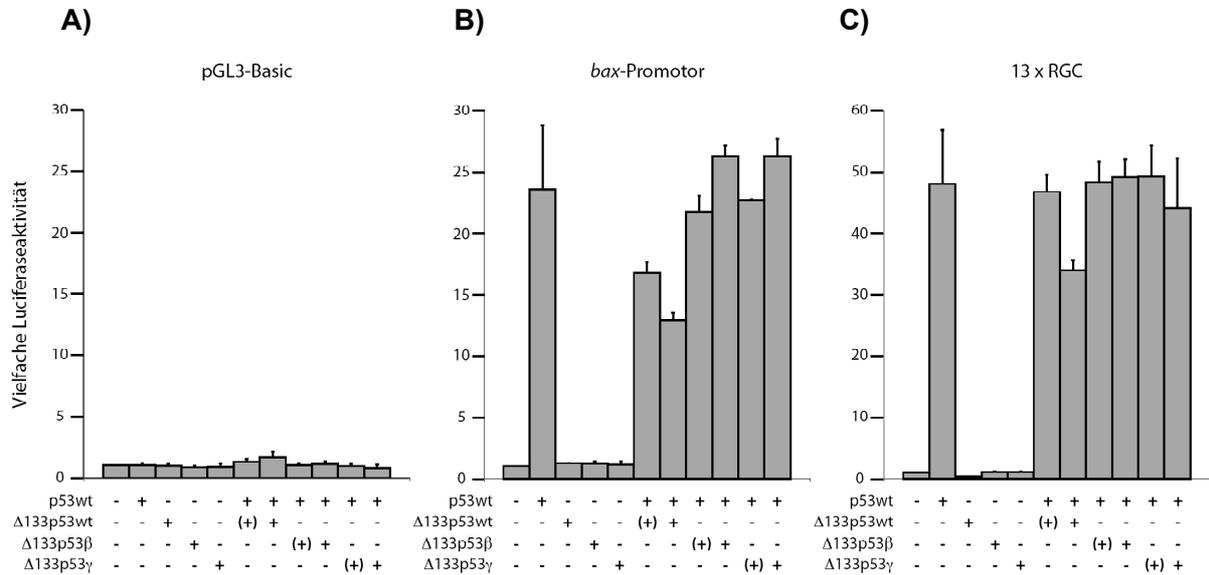


Abb. 3-17: $\Delta 133p53\beta$ und $\Delta 133p53\gamma$ heben den dominant-negativen Effekt von $\Delta 133p53$ auf.

HCT116/p53KO-Zellen wurden mit verschiedenen Reportergenplasmiden und Expressionsplasmiden unterschiedlicher p53-Isoformen transfiziert und nach 48 h für die Analyse der Luciferaseaktivität aufbereitet. (+) entspricht 0,1 μ g, + entspricht 0,5 μ g. Gezeigt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente mit Standardabweichung. Die gemessenen Werte wurden auf gleiche Proteinmengen normiert.

Die Expression der p53-Isoformen $\Delta 133p53$, $\Delta 133p53\beta$ und $\Delta 133p53\gamma$ allein bewirkte keine (unspezifische) Transaktivierung (Abb. 3-17 A - C). Die Kotransfektion von 0,5 μ g wtp53 und 0,1 μ g $\Delta 133p53$ bewirkte eine Reduktion der Luciferaseaktivität von 23,6-fach für 0,5 μ g wtp53 allein auf 16,8-fach ausgehend vom *bax*-Promotorkonstrukt (Abb. 3-17 B). Die Transfektion von wtp53 und $\Delta 133p53$ im Verhältnis 1:1 reduzierte die Transaktivierung weiter auf das 12,9-fache. Die Kotransfektion von wtp53 mit $\Delta 133p53\beta$ und $\Delta 133p53\gamma$ in unterschiedlichen Verhältnissen beeinflusste die durch wtp53 induzierte Transkription nicht relevant.

Bei der Verwendung des RGC-Promotorkonstrukts steigerte die Expression von wtp53 die gemessene Luciferaseaktivität auf das 48-fache des Grundwertes. Die Expression von wtp53 gemeinsam mit 1/5 der Menge an $\Delta 133p53$ konnte die Luciferaseaktivität kaum hemmen. Die Transfektion von 0,5 μ g $\Delta 133p53$ gemeinsam mit 0,5 μ g wtp53 reduzierte hingegen die Luciferaseaktivität deutlich auf das 34-fache. Die Expression von $\Delta 133p53\beta$ oder $\Delta 133p53\gamma$ gemeinsam mit wtp53 in unterschiedlichen Verhältnissen beeinflusste die durch wtp53 induzierte Transaktivierung nicht signifikant (Abb. 3-17 C).

3.10. DNA-Bindungsaktivität der p53-Isoformen

Da dokumentiert werden konnte, dass p53 β und p53 γ z.T. im Zellkern lokalisiert sind (Abb. 3-14 und Abb. 3-15), konnte der bislang nicht nachgewiesene Einfluss dieser Isoformen auf die Transaktivierung von Reportergenen ausgehend von p53-induzierbaren Promotoren und auf die durch wtp53 induzierten Stressantworten wie Apoptose, Zellzyklusarrest und Seneszenz nicht auf ihre Abwesenheit im Nukleus zurückgeführt werden. Daher wurde mittels eines EMSAs untersucht, ob p53 β und p53 γ in der Lage sind, an DNA zu binden.

Dazu wurde ein Oligonukleotid bestehend aus der p53-Konsensussequenz radioaktiv markiert. Die klonalen RKO-Zelllinien wurden für 24 h unter Kontrollbedingungen oder in Anwesenheit von Etoposid kultiviert und die anschließend generierten Lysate mit dem p53-Konsensusoligonukleotid inkubiert. Um die Identität des Proteins im Protein/DNA-Komplex zu verifizieren, wurde parallel ein Teil der Lysate mit einem anti-Flag-Antikörper inkubiert. Die Spezifität der Bindung wurde mit Hilfe einer Verdrängungsreaktion überprüft: Das Lysat Flag-p53wt überexprimierender Zellen, in denen durch Zugabe von Etoposid endogenes wtp53 und transgenes Flag-p53wt stabilisiert waren, wurde in Gegenwart des radioaktiv markierten Oligonukleotids, des anti-Flag-Antikörpers und des unmarkierten Oligonukleotids inkubiert. Als weitere Kontrollen wurden das radioaktiv markierte Oligonukleotid allein und nach Inkubation mit dem Lysat von p53-negativen HCT116-Zellen verwendet. Alle Proben wurden im nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend die Migration des radioaktiven Oligonukleotids durch Autoradiographie sichtbar gemacht (Abb. 3-18).

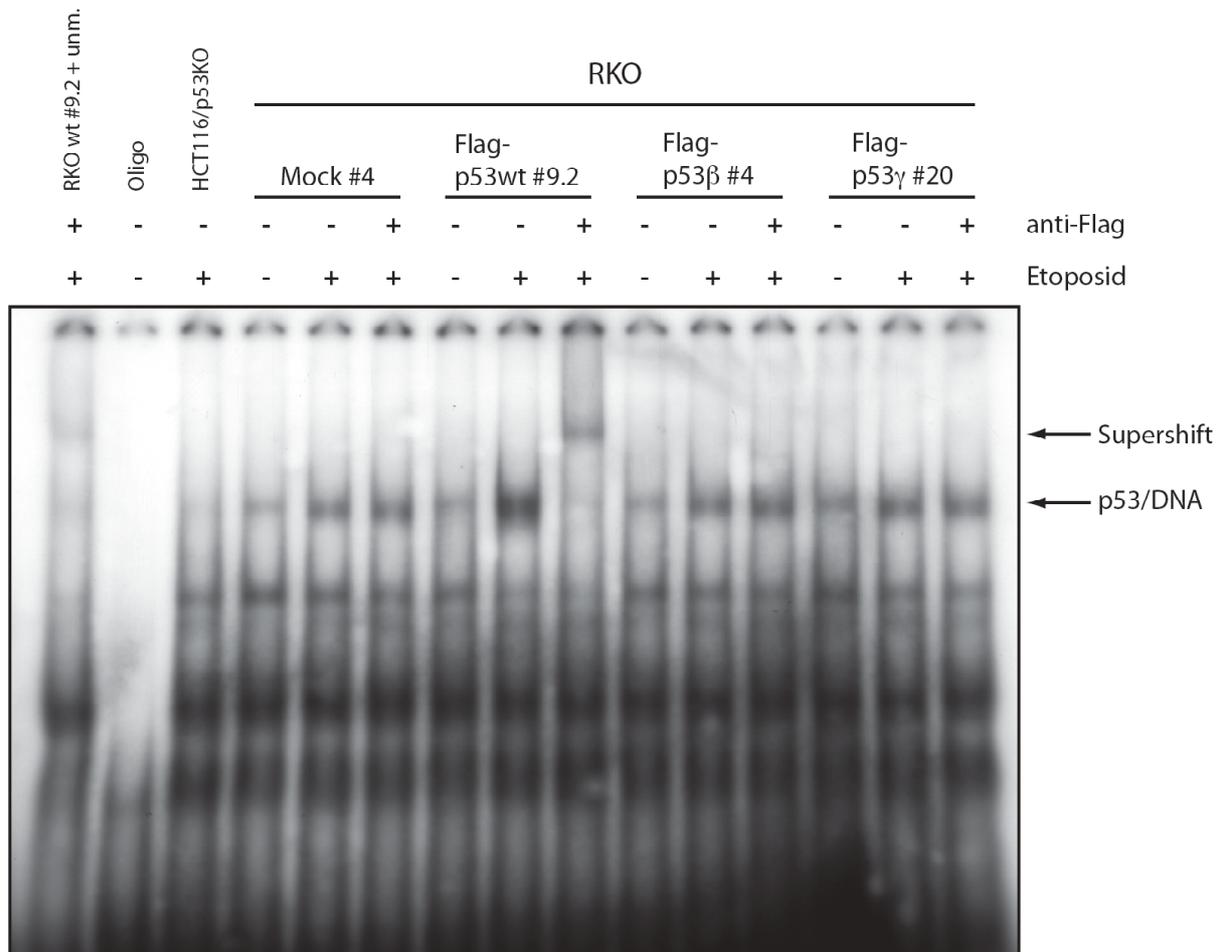


Abb. 3-18: EMSA zur Analyse der DNA-Bindefähigkeit von p53 β und p53 γ .

Lysate der RKO-Klone, die entweder in Ab- oder Anwesenheit von 50 μ M Etoposid für 24 h kultiviert worden waren, und das Lysat Etoposid-behandelter HCT116/p53KO-Zellen wurden mit einem radioaktiven p53-Konsensusoligonukleotid inkubiert. In der ersten Spur ist die Verdrängungsreaktion durch unmarkiertes Oligonukleotid (unm.) gezeigt, in der zweiten Spur wurde das radioaktive Oligonukleotid ohne Zelllysat aufgetragen. Die Formation eines p53/DNA-Komplexes und die Induktion eines Supershifts durch Inkubation mit einem anti-Flag-Antikörper sind gekennzeichnet.

In den Proben aller RKO-Klone konnte ein p53/DNA-Komplex nachgewiesen werden, zu dem es in p53-defizienten HCT116-Zellen auf gleicher Höhe kein Pendant gab. Die Intensität dieses Komplexes nahm nach p53-Stabilisierung durch Induktion eines DNA-Schadens durch Etoposid in allen RKO-Klonen zu. Diese Intensivierung war in Proben Flag-p53wt überexprimierender Zellen besonders deutlich, da in diesen Zellen die Menge an wtp53 erhöht ist. Trotz starker Expression von Flag-p53 β und Flag-p53 γ war im Vergleich zu den Proben der Mock-transfizierten Zelllinie kein Einfluss auf die Bandenintensität des p53/DNA-Komplexes erkennbar. Dies ließ auf die Abwesenheit dieser Isoformen im p53/DNA-Komplex schließen.

Durch die Inkubation der mit Etoposid behandelten Proben mit einem anti-Flag-Antikörper konnte die Identität der p53-Isoform im p53/DNA-Komplex verifiziert werden. Eine Reduktion der Migrationsgeschwindigkeit wurde ausschließlich in der Flag-p53wt enthaltenden Probe durch Zugabe des anti-Flag-Antikörpers hervorgerufen. Die Zugabe des Antikörpers zu

Lysaten von RKO Flag-p53 β - und Flag-p53 γ -Zellen nach Inkubation mit Etoposid beeinflusste die Wanderungsgeschwindigkeit des Protein/DNA-Komplexes nicht. Dieses Resultat belegte, dass der p53/DNA-Komplex von endogenem wtp53 und transgenem Flag-p53wt gebildet wurde. Weder Flag-p53 β noch Flag-p53 γ konnten in diesem Komplex nachgewiesen werden.

Nicht radioaktiv markiertes p53-Konsensusoligonukleotid konkurrierte mit der radioaktiven DNA um die Bindung an wtp53, folglich nahm die Bandenintensität in Spur 1 ab.

3.11. Interaktion der p53-Isoformen miteinander

p53 bindet als Tetramer an DNA und übt in dieser Form seine transaktivierende Funktion aus. Daher sollten Koimmunpräzitationen Aufschluss über das Potential der p53-Isoformen zur Interaktion miteinander geben.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene Immunpräzitationen durchgeführt. Einerseits wurde wtp53 mit Hilfe des anti-p53-Antikörpers PAb421, dessen Bindungsepitop zwischen den Aminosäuren 371 und 380 liegt, präzipitiert. Aufgrund dieses C-terminalen Epitops bindet der Antikörper ausschließlich endogenes wtp53 und transgenes Flag-markiertes wtp53, nicht jedoch die Isoformen Flag-p53 β und Flag-p53 γ . Die anschließende Western Blot Analyse mit einem anti-Flag-Antikörper sollte nachweisen, ob Flag-p53 β und Flag-p53 γ mit endogenem wtp53 kopräzipitiert werden. Um wtp53 zu stabilisieren, wurden die Zellen vor der Immunpräzitation für 24 h in Gegenwart von Etoposid inkubiert.

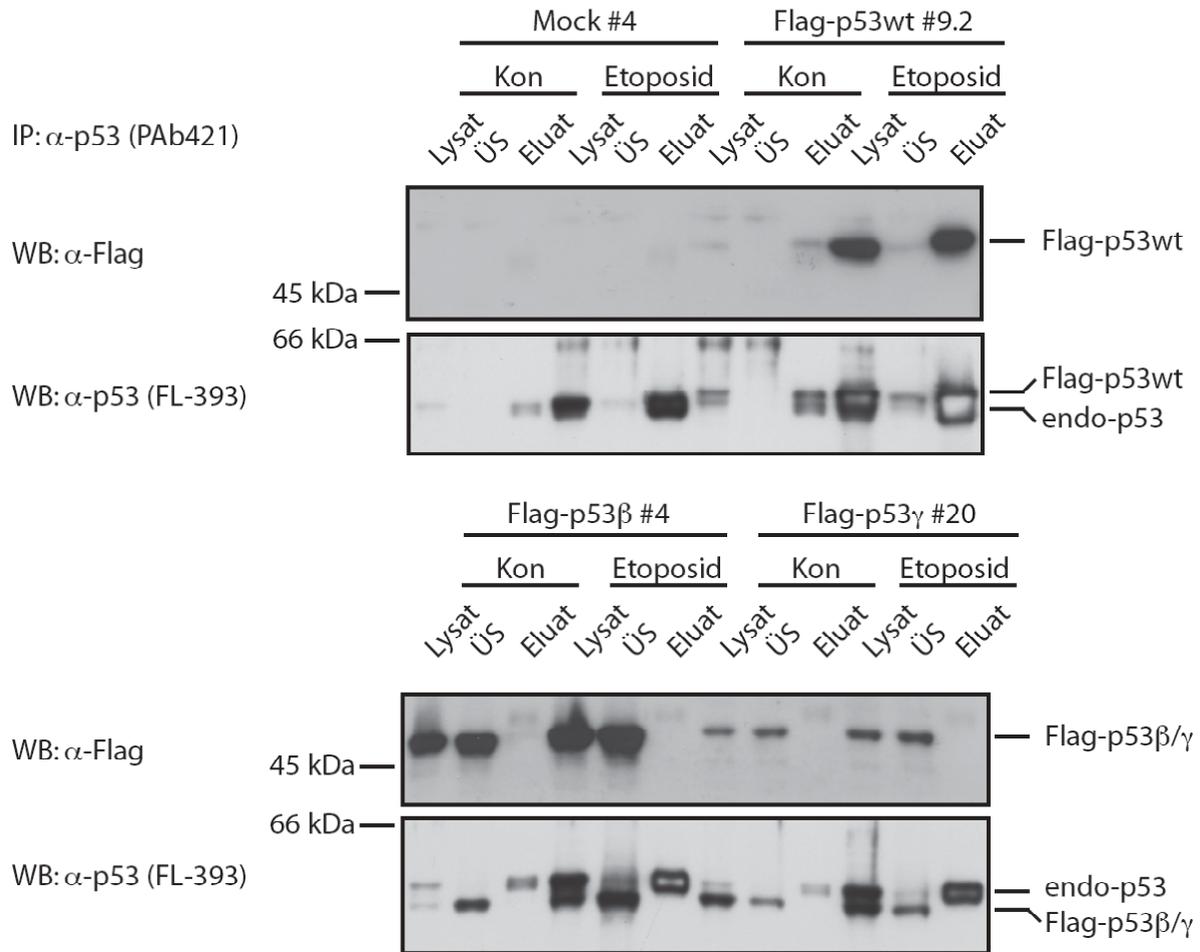


Abb. 3-19: p53 β und p53 γ kopräzipitieren nicht mit wtp53.

Extrakte der angegebenen RKO-Klone, welche unbehandelt geblieben waren (Kon) oder für 24 h in Gegenwart von 50 μ M Etoposid inkubiert worden waren, wurden nach der Präzipitation mit dem anti-p53-Antikörper PAb421 mittels Western Blot und Verwendung eines anti-Flag-Antikörpers (jeweils oberer Blot) bzw. eines polyklonalen anti-p53-Antikörpers, der gegen das gesamte Protein gerichtet ist (FL-393; jeweils unterer Blot), analysiert. Aufgetragen wurde das Lysat vor der Präzipitation (Lysat), der Überstand nach der Präzipitation (ÜS) und das Eluat.

Wie erwartet war in den Proben Mock-transfizierter RKO-Zellen keine Proteinbande mit Flag-Epitop nachweisbar. Flag-p53wt war in Kontrollansätzen der RKO-Zelllinie Flag-p53wt #9.2 kaum nachzuweisen. Die Inkubation der Zellen in Gegenwart von Etoposid für 24 h stabilisierte Flag-p53wt und die entsprechende Bande konnte im Lysat deutlich nachgewiesen werden.

Durch die Präzipitation mit dem PAb421-Antikörper wurde Flag-p53wt aus dem Überstand entfernt und konnte dafür im Eluat detektiert werden. Im Gegensatz hierzu wurden Flag-p53 β und Flag-p53 γ sowohl im Lysat vor der Präzipitation als auch im Überstand nach der Präzipitation detektiert, nicht jedoch im Eluat.

Da es theoretisch denkbar war, dass die Abwesenheit von Flag-p53 β und Flag-p53 γ im Eluat nicht auf eine fehlende Interaktion mit wtp53 zurückzuführen war, sondern darauf, dass in diesen Fällen die Immunpräzipitation nicht erfolgreich war, wurden in einem zweiten Western Blot (jeweils untere Blots in Abb. 3-19) die p53-Isoformen mit einem Antikörper

nachgewiesen, der jede der Isoformen - sowohl endogenen als auch transgenen - bindet. Dieser Western Blot verifiziert die effiziente Fällung von endogenem wtp53 nicht nur aus Lysaten der Mock- und Flag-p53wt-transfizierten Zellen, sondern auch aus denen der Flag-p53 β und Flag-p53 γ exprimierenden Zellen.

Da Flag-p53wt bei der Verwendung des Antikörpers PAb421 (Abb. 3-19) direkt durch Bindung des Antikörpers gefällt wurde und somit nicht gezeigt werden war, dass Flag-p53wt mit endogenem wtp53 interagiert, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Flag-Sequenz am N-Terminus der Proteine störend auf eine Interaktion mit endogenem wtp53 auswirkt. Aus diesem Grund wurden weitere Immunpräzipitationen durchgeführt, in denen die Flag-markierten Proteine direkt durch einen anti-Flag-Antikörper gefällt wurden. Im anschließenden Western Blot wurden die Eluate auf die Anwesenheit von endogenem wtp53 durch Verwendung des anti-p53-Antikörpers DO-1 analysiert (Abb. 3-20).

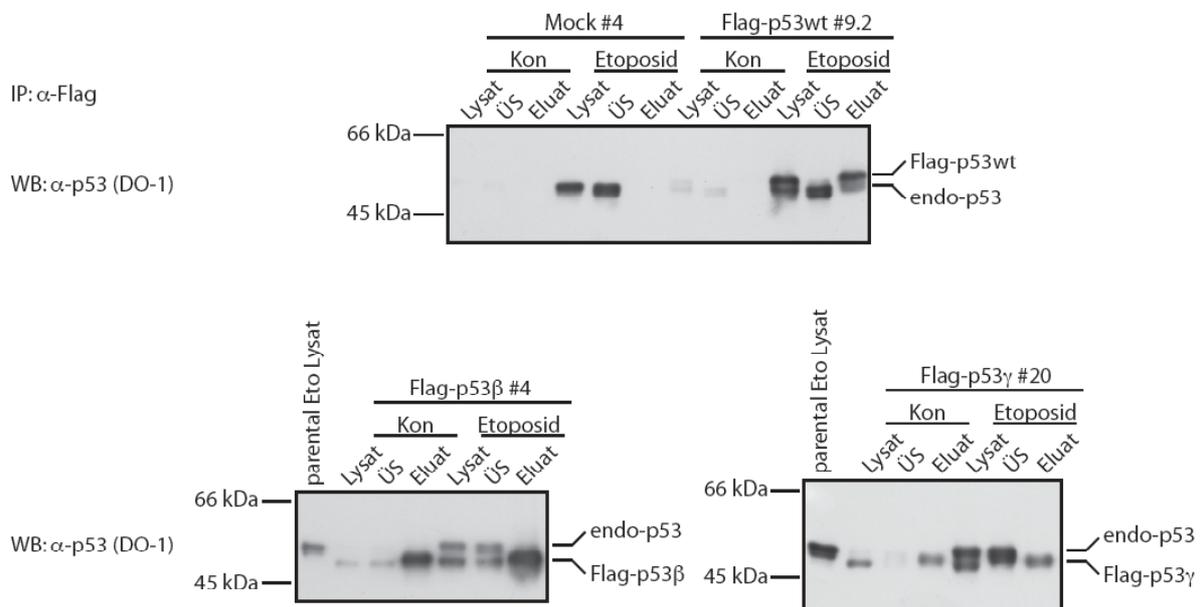


Abb. 3-20: Flag-p53wt und endogenes wtp53 interagieren.

Zellen der angegebenen RKO-Klone wurden für 24 h unter Kontrollbedingungen (Kon) oder in Gegenwart von 50 μM Etoposid kultiviert. Die Zellen wurden lysiert und die Transgene mit einem anti-Flag-Antikörper immunpräzipitiert. Eine Kopräzipitation von endogenem wtp53 wurde im Western Blot durch Verwendung des anti-p53-Antikörpers DO-1 analysiert. Aufgetragen wurde das Lysat vor der Präzipitation (Lysat), der Überstand nach der Präzipitation (ÜS) und das Eluat.

Die Auftragung eines Lysats von mit Etoposid inkubierten parentalen RKO-Zellen diente als Größenstandard für endogenes wtp53. Die Abwesenheit von p53 im Eluat des Mock-Klons belegte die spezifische Fällung Flag-markierter Proteine durch den anti-Flag-Antikörper.

Im Eluat der mit Etoposid inkubierten Flag-p53wt exprimierenden Zellen waren mehrere Banden nachzuweisen: eine langsamer migrierende Bande, die Flag-markiertem wtp53 entsprach und die etwas schneller wandernde Bande, die endogenem wtp53 entsprach. Dieser Ansatz stellte die Positivkontrolle für die Interaktion von transgenem Flag-markiertem wtp53 mit endogenem wtp53 dar.

In den mit Etoposid inkubierten Proben der Klone RKO Flag-p53 β #4 und Flag-p53 γ #20 waren in den Volllysaten jeweils mehrere Banden nachzuweisen. Eine Bande, die endogenem wtp53 entsprach und je eine etwas schneller migrierende: Flag-p53 β bzw. Flag-p53 γ . In nach der Immunpräzipitation erhaltenen Eluaten dieser Klone war jeweils nur noch die Bande der transgen exprimierten Isoform nachzuweisen. Die Abwesenheit von endogenem wtp53 in den Eluaten Flag-p53 β und Flag-p53 γ exprimierender Zellen legte eine fehlende Oligomerisierung mit p53 β und p53 γ nahe.

3.12. Interaktion der p53-Isoformen mit Bindungspartnern

Da aufgrund der fehlenden DNA-Bindung und Oligomerisierungs-Defizienz der p53-Isoformen p53 β und p53 γ ihr direkter Einfluss auf die Funktion von wtp53 unwahrscheinlich ist, wurde in folgenden Experimenten ein potentieller indirekter Einfluss von p53 β und p53 γ auf die Aktivität von wtp53 untersucht. Durch die Konkurrenz um Bindungspartner würden p53 β und p53 γ die Aktivität von wtp53 indirekt modulieren. Ein essentieller Interaktionspartner von p53 ist MDM2, welches an p53 innerhalb dessen erster Transaktivierungsdomäne am N-Terminus bindet und anschließend die Ubiquitylierung C-terminaler Lysinreste katalysiert. Die Analyse der Interaktion von p53 β bzw. p53 γ mit MDM2 könnte ferner den gestörten proteasomalen Abbau dieser Isoformen zunehmend aufklären.

Zu diesem Zweck wurden die klonalen RKO-Zelllinien für 6 h in Anwesenheit des Proteasominhibitors MG-132 inkubiert und anschließend aus den Lysaten entweder Flag-markierte Proteine oder MDM2 gefällt. In den folgenden Western Blot Analysen wurden die Proben auf das Vorhandensein von MDM2 und p53 bzw. Flag-markierter Transgene getestet (Abb. 3-21).

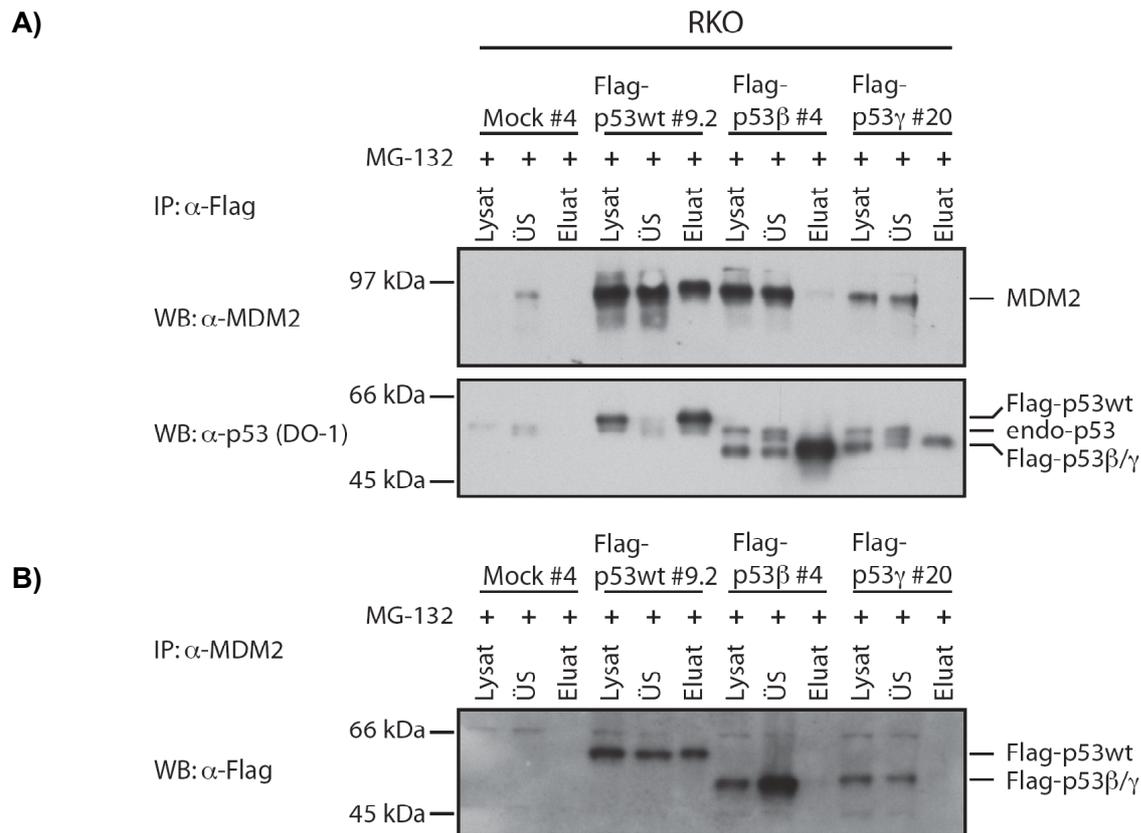


Abb. 3-21: Bindung von MDM2 an wtp53, nicht jedoch an p53β und p53γ.

Extrakte der angegebenen RKO-Klone, welche für 6 h in Gegenwart von 5 µM MG-132 inkubiert worden waren, wurden nach der Präzipitation mit einem anti-Flag-Antikörper mittels Western Blot und Verwendung eines anti-MDM2-Antikörpers bzw. des anti-p53-Antikörpers DO-1 analysiert (A). Identisch behandelte Extrakte wurden nach der Präzipitation mit einem anti-MDM2-Antikörper mittels Western Blot und Verwendung eines anti-Flag-Antikörpers analysiert (B). Aufgetragen wurde das Lysat vor der Präzipitation (Lysat), der Überstand nach der Präzipitation (ÜS) und das Eluat.

Durch die Fällung Flag-markierter Proteine wurde MDM2 ausschließlich in Proben Flag-p53wt exprimierender Zellen effizient kopräzipitiert (Abb. 3-21 A). Lediglich eine sehr schwache MDM2 repräsentierende Proteinbande war in dem Eluat Flag-p53β exprimierender Zellen nachzuweisen, in dem Eluat Flag-p53γ exprimierender Zellen war kein Signal für MDM2 zu detektieren. Durch die Verwendung des anti-p53-Antikörpers DO-1 konnte die erfolgreiche Präzipitation der Flag-markierten p53-Isoformen nachgewiesen werden. Zudem konnte, wie bereits in Abb. 3-20 gezeigt, endogenes wtp53 ausschließlich durch Flag-p53wt kopräzipitiert werden, nicht aber durch Flag-p53β bzw. Flag-p53γ.

Die Fällung von MDM2 führte exklusiv zur Kopräzipitation von transgenem Flag-markiertem wtp53, in den Eluaten Flag-p53β und Flag-p53γ exprimierender RKO-Klone konnte das entsprechende Transgen nicht nachgewiesen werden (Abb. 3-21 B).

3.13. *bak* ist ein Zielgen von p53

Es ist bekannt, dass p53 innerhalb der Bcl-2-Proteinfamilie die Expression des proapoptischen Multidomänenproteins Bax (Miyashita und Reed 1995) und der drei BH3-only Proteine Noxa (Oda *et al.* 2000a), Puma (Nakano und Vousden 2001; Yu *et al.* 2001) und Bid (Sax *et al.* 2002) positiv reguliert.

Bei der Suche nach weiteren p53-Zielgenen innerhalb der Bcl-2-Familie wurden insgesamt 8200 Basen des humanen *bak1*-Genlokus mit den Programmen *Gene2Promoter* und *EIDorado* (Genomatix) auf das Vorhandensein potentieller Promotorregionen analysiert. Dabei konnten zwei putative Promotorregionen identifiziert werden. Promotorregion 1 beginnt oberhalb des Transkriptionsstarts und endet innerhalb des ersten Exons. Die potentielle Promotorregion 2 beginnt innerhalb von Intron 1 und endet in der kodierenden Sequenz innerhalb des zweiten Exons (Abb. 3-22).

Aufgrund dieser Analyse wurde der Sequenzbereich, der mit Hilfe des Programms *MatInspector* (Genomatix) auf Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen überprüft wurde, von 8200 Basen auf 3350 Basen reduziert. Dieser Sequenzbereich beginnt 110 Basen oberhalb des Startpunktes der ersten potentiellen Promotorregion und damit 700 bp oberhalb von Exon 1, umfasst das gesamte Exon 1, ebenso Intron 1 und den Beginn von Exon 2 inklusive der ersten 16 Codons (Abb. 3-22).

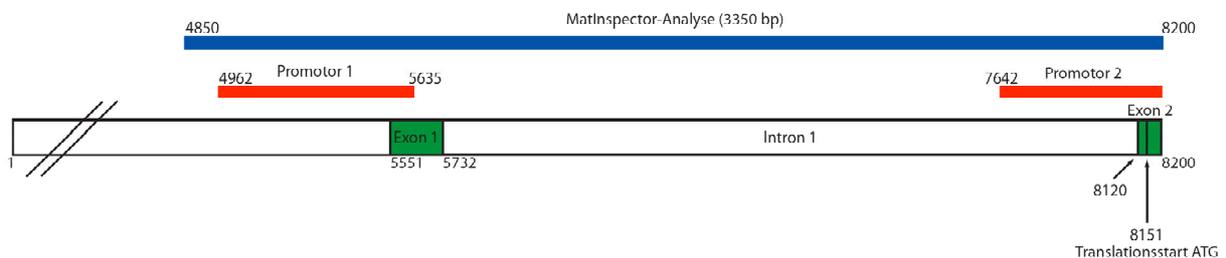


Abb. 3-22: Schematische Darstellung eines Teils des humanen *bak1*-Genlokus, der auf Promotorsequenzen und Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen untersucht wurde.

Die p53-Konsensussequenz besteht aus mindestens zwei Kopien der 10 Basenpaar langen Sequenz 5' PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy 3', die durch maximal 13 Basenpaare voneinander getrennt sein können (el-Deiry *et al.* 1992). Das Programm *MatInspector* identifizierte drei potentielle p53-Bindungsstellen (p53-BS) innerhalb der analysierten Sequenz des *bak1*-Genlokus. Die erste (p53-BS1) befindet sich oberhalb von Exon 1, die beiden anderen Bindungsstellen, p53-BS2 und p53-BS3, befinden sich innerhalb von Intron 1 (Abb. 3-23).

```

ACAGCCGCCC TGCCTGCCTG GGAGGTGGGG 5390

TGGGGAAAGT GGGCGGGACA TGCTCCTGGG CCTGGCCAC CCAGATCACC CTACAGGCTG 5450 Stelle 1

TCGGCCTGTG CGTCTGCATC CGGTGGCCAC AGAGCAACTT CCTCTAGAGG GAGCTGATTG 5510

GAGCCGGGTG CCGCTGGCAC CTCTATGATC ACTGGAGTCT GCGGGGTCCC TCGGGCTGCA 5570 Exon 1

CAGGGACAAG TAAAGGCTAC ATCCAGATGC CGGGAATGCA CTGACGCCCA TTCCTGAAA 5630

CTGGGCTCCC ACTCAGCCCC TGGGAGCAGC AGCCGCCAGC CCCTCGGGAC CTCCATCTCC 5690

ACCCTGCTGA GCCACCCGGG TTGGGCCAGG ATCCCGGCAG CTAAGCTGGA AGGGTCTTGT 5750

CCATCCTCCC AGATCTCAGC AGCCCCAGCC CCAGGGTGGG GCAGGGAGCC TGCCGGGAGC 5810

CGGGTGGGGA AGGGGAAGCT CAAGGCTTCC CTGGGCAGGT CTGCCGCCCC GGCTGGGGAC 5870 Stelle 2

CTGATCCTGC CATGCCTGCC TCTGGCTGCC CCTCACAGCT TCCCCTTTG GCCCAGCCCT 5930

GGATGCCGGA GAACTGTAAG AACTGGGTCC TTTAACAGTC TGGGAGATGG GAGTGGAGGT 5990

CAGAGCCAAG GTCAAGGGCA GAGAGAGAAC TTCTCAGCG CTGCTGCTG CCCAACATCC 6050

CTAGACTGGG TCCAAGGCCT GGCCAGGCAT GTATCCCTGG GCAACATTCA TCGGGGCCCA 6110 Stelle 3

GCAAGCCCAG GAAGTCGGGG 6130

```

Abb. 3-23: Darstellung der drei potentiellen p53-Bindungsstellen (rot) innerhalb des *bak*-Promotors. Grün dargestellt ist Exon 1. Die Numerierung der Sequenz entspricht der in Abb. 3-22.

Um eine p53-abhängige Transaktivierung des *bak*-Promotors und die Bedeutung der einzelnen p53-Bindungsstellen zu analysieren, wurden verschiedene Reportergenplasmide generiert. Es wurde ein Reportergenplasmid zur Expression der Luciferase des Glühwürmchens kloniert, das alle drei p53-Bindungsstellen enthält (pGL3-Basic-p53-BS). Außerdem wurden drei weitere Plasmide generiert (pGL3-Basic-mutp53-BS1, -mutp53-BS2 und -mutp53-BS3), in denen jeweils eine der drei p53-Bindungsstellen derart mutiert ist, dass eine p53-Bindung verhindert wird (el-Deiry *et al.* 1992; Abschnitt 2.3), wohingegen die beiden anderen p53-Bindungsstellen jeweils unmutiert blieben. Weiterhin wurde ein Reportergenplasmid kloniert, in dem alle drei potentiellen p53-Bindungsstellen mutiert sind (pGL3-Basic-mutp53-BS).

Um zu analysieren, inwiefern sich die Luciferaseexpression ausgehend vom *bak*-Promotorkonstrukt durch p53 induzieren lässt, wurden Analysen der Luciferaseaktivität mit den beschriebenen Reportergenkonstrukten durchgeführt. Dazu wurde einerseits die p53-defiziente Zelllinie HCT116 verwendet und andererseits die Zelllinie HeLa, in der eine hohe Transfektionsrate erzielt wird und die deshalb häufig für Reporteranalysen eingesetzt wird. Zusätzlich zum jeweiligen Reportergenplasmid wurde ein Expressionsplasmid für wtp53 in unterschiedlicher Konzentration kotransfiziert (Abb. 3-24).

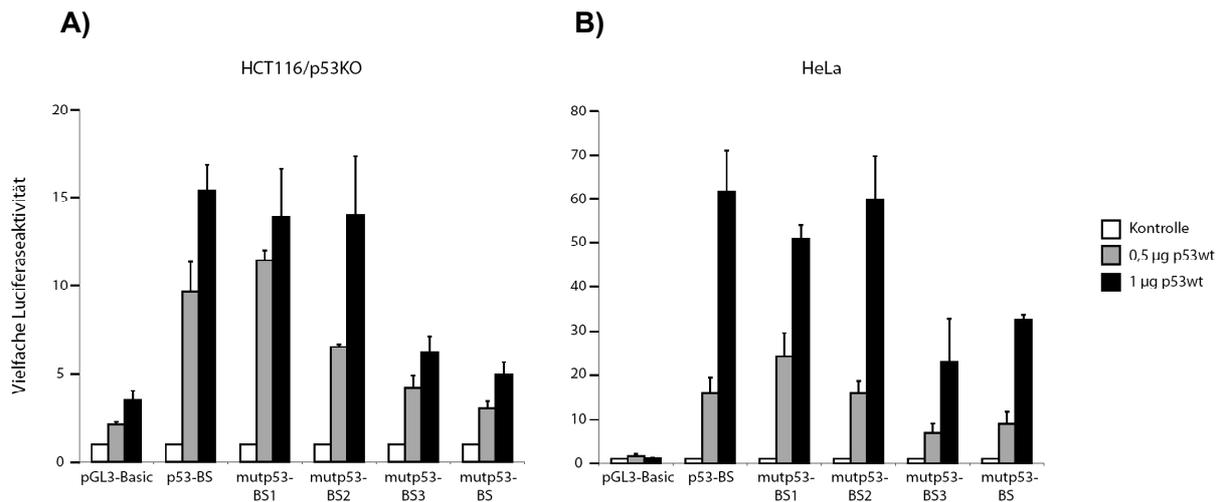


Abb. 3-24: Analyse der Luciferaseaktivität zur Charakterisierung der p53-Bindungsstellen im humanen *bak*-Promotor.

HCT116/p53KO-Zellen (A) und HeLa-Zellen (B) wurden mit den angegebenen Reportergenplasmiden und 0,5 µg oder 1 µg eines wtp53-Expressionsvektors transfiziert und die Luciferaseaktivität nach 48 h gemessen. Gezeigt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente mit Standardabweichung. Die gemessenen Werte wurden auf gleiche Proteinmengen normiert.

Die Luciferaseexpression ließ sich ausgehend vom Wildtyp *bak*-Promotorkonstrukt (pGL3-Basic-p53-BS) durch p53 induzieren. In HCT116/p53KO-Zellen (Abb. 3-24 A) führte die Kotransfektion von 0,5 µg p53-Expressionsvektor gemeinsam mit dem Reportergenplasmid pGL3-Basic-p53-BS zu einer Erhöhung der Luciferaseaktivität vom 2,1-fachen im Kontrollansatz (pGL3-Basic) auf das 9,6-fache. Die Kombination desselben Reportergenplasmids mit 1 µg p53-Expressionsvektor führte zu einer weiteren Steigerung der Luciferaseaktivität auf das 15,4-fache im Vergleich zu einer 3,5-fachen im Kontrollansatz.

Die Punktmutationen in den p53-Bindungsstellen 1 und 2 führten nicht zu einer signifikanten Änderung im Transaktivierungsprofil, speziell bei der Transfektion von 1 µg p53-Expressionsplasmid. Eine Reduktion der Luciferaseaktivität wurde jedoch durch die Mutation der p53-Bindungsstelle 3 hervorgerufen. Bei der Transfektion von 0,5 µg p53-Expressionsplasmid verringerte sich die Luciferaseaktivität vom 9,6-fachen (pGL3-Basic-p53-BS) auf das 4,2-fache. Bei der Transfektion von 1 µg p53-Expressionsplasmid entsprechend vom 15,4-fachen auf das 6,2-fache. Die Mutation aller drei p53-Bindungsstellen hatte vergleichbare Auswirkungen auf die Luciferaseaktivität wie die der p53-BS3 allein.

Die Ergebnisse der Analyse der Transaktivierung des *bak*-Promotorkonstrukts in HeLa-Zellen (Abb. 3-24 B) sind mit denen in HCT116/p53KO-Zellen konsistent. Die Kotransfektion von 0,5 µg p53-Expressionsplasmid transaktivierte die Luciferaseexpression ausgehend vom Vektor pGL3-Basic-p53-BS um das 15,9-fache. Im Vergleich dazu wurde im Kontrollansatz mit dem pGL3-Basic Vektor eine 1,6-fache Aktivität gemessen. Mit denselben Reportergenkonstrukten bewirkte 1 µg p53-Expressionsplasmid eine 61,7-fache

Luciferaseaktivität (pGL3-Basic-p53-BS) verglichen mit einer 1,1-fachen Luciferaseaktivität im Kontrollansatz mit dem Vektor pGL3-Basic.

Die Punktmutationen der p53-Bindungsstellen 1 und 2 beeinflussten auch in den HeLa-Zellen die Luciferaseaktivität nicht signifikant verglichen mit der Induktion ausgehend vom Vektor pGL3-Basic-p53-BS. Wie auch in den HCT116/p53KO-Zellen bewirkte jedoch die Mutation der dritten p53-Bindungsstelle im HeLa-Zellsystem eine deutliche Reduktion der Luciferaseaktivität vom 15,9-fachen für pGL3-Basic-p53-BS auf das 7-fache für pGL3-Basic-mutp53-BS3 (0,5 µg p53) und dementsprechend vom 61,7-fachen auf das 23-fache bei der Verwendung von 1 µg p53-Expressionsplasmid. Vergleichbar mit den Werten für das Reporterplasmid pGL3-Basic-mutp53-BS3 waren die Werte, die mit dem Konstrukt pGL3-Basic-mutp53-BS gemessen wurden, in dem alle drei potentiellen p53-BS mutiert sind.

Da bekannt ist, dass die p53-Familienmitglieder p63 und p73 auch an die p53-Konsensussequenz binden, sollte in einer zweiten Studie untersucht werden, inwiefern diese Proteine in der Lage sind, die Transkription ausgehend vom *bak*-Promotor zu initiieren und wie sich Mutationen in den einzelnen p53-Konsensusstellen hierauf auswirken. Dazu wurden HCT116/p53KO-Zellen und HeLa-Zellen wie bereits beschrieben kultiviert, jedoch statt eines p53-Expressionsplasmids Vektoren zur Expression von TAp63 α bzw. TAp73 α zusammen mit den Reporterplasmiden transfiziert (Abb. 3-25).

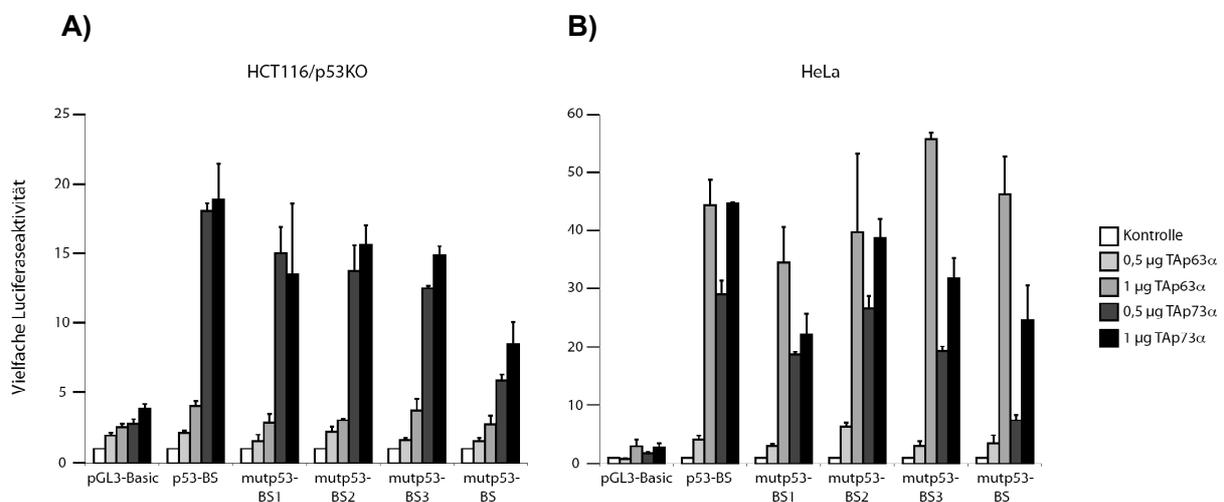


Abb. 3-25: Transaktivierung des *bak*-Promotors durch TAp63 α und TAp73 α .

HCT116/p53KO-Zellen (A) und HeLa-Zellen (B) wurden mit den angegebenen Reporterplasmiden transfiziert und die Luciferaseaktivität 48 h nach Kotransfektion mit Expressionsvektoren für TAp63 α bzw. TAp73 α bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente mit Standardabweichung. Die gemessenen Werte wurden auf gleiche Proteinmengen normiert.

In HCT116/p53KO-Zellen (Abb. 3-25 A) konnte TAp63 α die Transkription ausgehend vom *bak*-Promotorkonstrukt nicht aktivieren. Die Induktion der Luciferaseaktivität durch die Expression von TAp63 α unterschied sich bei den unterschiedlichen Reporterplasmiden nicht signifikant von den Kontrollwerten des Vektors pGL3-Basic.

Anders war die Situation für TAp73 α , das ausgehend vom Vektor pGL3-Basic-p53-BS die Luciferaseaktivität auf das 18,1-fache erhöhte (0,5 μ g) im Vergleich zu einer Luciferaseaktivität von 2,8-fach für den Kontrollvektor pGL3-Basic. 1 μ g p73-Expressionsplasmid rief bei denselben Reporterengenplasmiden eine vergleichbare Luciferaseaktivität hervor.

Die Mutation einzelner p53-Bindungsstellen verminderte die Luciferaseaktivität nach Expression von TAp73 α geringfügig, blieb jedoch zwischen den einzelnen Reporterengenplasmiden (pGL3-Basic-mutp53-BS1, -mutp53-BS2 und -mutp53-BS3) vergleichbar, so dass kein Rückschluss auf eine bevorzugte p53-Bindungsstelle gezogen werden konnte. Eine deutlichere Reduktion wurde durch die Mutation aller drei Bindungsstellen hervorgerufen. Die Kotransfektion der Vektoren TAp73 α (0,5 μ g) und pGL3-Basic-mutp53-BS führte zu einer 5,9-fachen Luciferaseaktivität, 1 μ g Expressionsplasmid für TAp73 α zu einer 8,5-fachen Luciferaseaktivität.

Die Ergebnisse für die HeLa-Zellen (Abb. 3-25 B) waren nicht mit denen für die HCT116/p53KO-Zellen vergleichbar. Die Transfektion von 0,5 μ g TAp63 α -Expressionsplasmid hatte in keinem Ansatz signifikanten Einfluss auf die Aktivität der Luciferase. Hingegen wurde die Transkription der Luciferase in allen Ansätzen - außer dem Kontrollansatz mit dem Vektor pGL3-Basic - durch Kotransfektion von 1 μ g TAp63 α -Expressionsplasmid stark induziert. Für das Reporterengenplasmid pGL3-Basic-p53-BS wurde eine 44,3-fache Luciferaseaktivität gemessen im Vergleich zu einer 3-fachen für den Kontrollvektor pGL3-Basic. Die Werte der vier anderen Reporterengenkonstrukte unterschieden sich nicht signifikant von dem für den Vektor pGL3-Basic-p53-BS.

Die Expression von TAp73 α induzierte die Transkription der Luciferase ausgehend von den einzelnen Reporterengenplasmiden sehr unterschiedlich. Die höchste Luciferaseaktivität war bei der Verwendung des Vektors pGL3-Basic-p53-BS zu messen (0,5 μ g TAp73 α -Expressionsvektor: 29-fach; 1 μ g: 44,6-fach), die geringsten Werte für die beiden Reporterengenkonstrukte pGL3-Basic-mutp53-BS1 (0,5 μ g: 18,7-fach; 1 μ g: 22,1-fach) und pGL3-Basic-mutp53-BS (0,5 μ g: 7,4-fach; 1 μ g: 24,5-fach).

3.14. Bindung von p53 an seine Konsensussequenz innerhalb der bak-Promotorregion

Die Reporterengenanalyse zur p53-abhängigen Regulation der *bak*-Expression (Abb. 3-24) ließ zwei Schlussfolgerungen zu. Erstens konnte die *bak*-Expression durch p53 induziert werden und zweitens war die p53-Bindungsstelle 3 innerhalb der *bak*-Promotorsequenz entscheidend für diese Transaktivierung.

In einem EMSA sollte daher untersucht werden, ob p53 tatsächlich an die Sequenz der p53-Bindungsstelle 3 bindet und ob diese Bindung durch die in der Reporterengenanalyse

verwendeten Punktmutationen verhindert werden kann. Zu diesem Zweck wurden die drei Oligonukleotide „p53-PK“ mit einer optimalen p53-Konsensussequenz, „p53-BS3“ mit der Sequenz der dritten p53-Bindungsstelle des *bak*-Promotors und „mutp53-BS3“ mit kritischen Punktmutationen in der dritten p53-Bindungsstelle des *bak*-Promotors radioaktiv markiert. Lysate Etoposid-behandelter HCT116/wt- und HCT116/p53KO-Zellen wurden mit diesen markierten Oligonukleotiden inkubiert und einige der Ansätze zusätzlich mit dem p53-Antikörper PAb421 versetzt. Das Migrationsverhalten der radioaktiv markierten DNA wurde in einem nativen Polyacrylamidgel analysiert (Abb. 3-26).

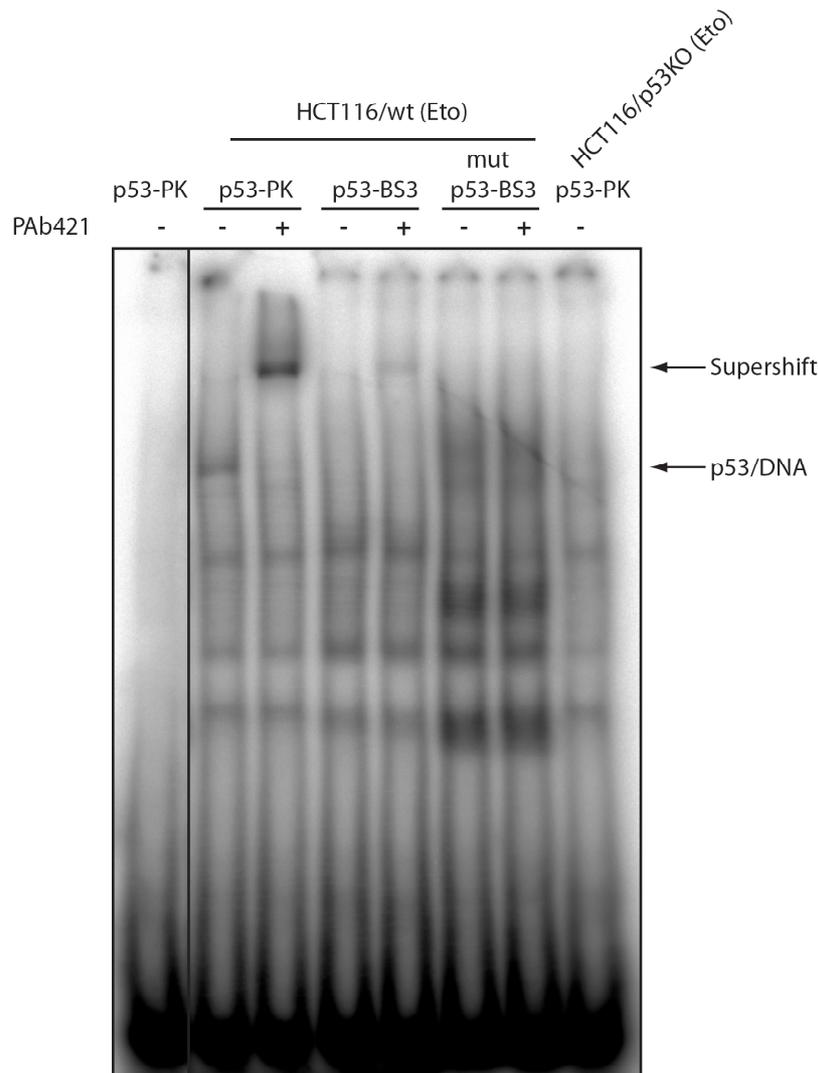


Abb. 3-26: p53-Bindung an die dritte Bindungsstelle innerhalb der *bak*-Promotorregion.

HCT116/wt-Zellen wurden für 24 h in Gegenwart von 50 μ M Etoposid (Eto) kultiviert und deren Lysat mit den radioaktiv markierten Oligonukleotiden p53-PK, p53-BS3 bzw. mutp53-BS3 inkubiert. p53-defiziente HCT116-Zellen wurden ebenfalls mit Etoposid behandelt und deren Lysat mit dem Oligonukleotid p53-PK inkubiert. In der ersten Spur wurde das freie radioaktive Oligonukleotid p53-PK aufgetragen. Die Formation eines p53/DNA-Komplexes und die Induktion eines Supershifts durch Inkubation mit dem anti-p53-Antikörper PAb421 sind gekennzeichnet.

Das Oligonukleotid p53-PK mit einer optimalen p53-Konsensussequenz konnte durch p53 gebunden werden. In keiner anderen Probe, insbesondere der von HCT116/p53KO-Zellen, war ein Protein/DNA-Komplex auf vergleichbarer Höhe nachzuweisen. Durch die Zugabe

des anti-p53-Antikörpers PAb421 wurde die Migration dieses p53/DNA-Komplexes vollständig retardiert, wodurch das Protein im Komplex identifiziert wurde. Ein weniger intensives Signal für einen Komplex mit dem gleichen Migrationsverhalten konnte in dem identisch behandelten Ansatz für das Oligonukleotid p53-BS3 nachgewiesen werden, was auf eine p53-Bindung an diese DNA-Sequenz schließen lässt. In dem mit dem Antikörper PAb421 versetzten Ansatz des Oligonukleotids mutp53-BS3 konnte ein solcher Protein/DNA-Komplex auf vergleichbarer Laufhöhe nicht nachgewiesen werden.

4. Diskussion

Aufgrund alternativen Spleißens, alternativer Initiation der Translation oder der Verwendung eines alternativen Promotors entstehen neun Spleißvarianten ausgehend vom humanen *p53*-Gen, welche auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden können (Bourdon *et al.* 2005). Neben endogenem *wtp53* ($p53\alpha$) konnte die Proteinexpression von $p53\beta$, $\Delta 40p53\beta$ und $\Delta 133p53\beta$ mit Hilfe eines spezifisch gegen den C-Terminus von $p53\beta$ gerichteten Antikörpers gezeigt werden (Bourdon *et al.* 2005; Murray-Zmijewski *et al.* 2006). Wegen des geringen Unterschieds im Molekulargewicht der Isoformen $p53\beta$ und $p53\gamma$ können sie nicht anhand ihres Laufverhaltens in Standard-Polyacrylamidgelen voneinander unterschieden werden. Da zur Zeit kein Antikörper verfügbar ist, der spezifisch gegen den C-Terminus von $p53\gamma$ gerichtet ist, war ein Nachweis dieser Isoformen ($p53\gamma$, $\Delta 40p53\gamma$ und $\Delta 133p53\gamma$) auf Proteinebene bisher nicht möglich.

Für die N-terminal alternativ gespleißten Isoformen $\Delta 40p53$ und $\Delta 133p53$ wurden unter anderem dominant-negative Effekte gegenüber der Funktion von *wtp53* gezeigt (Courtois *et al.* 2002; Ghosh *et al.* 2004; Murray-Zmijewski *et al.* 2006). Inwiefern die mit einem alternativen C-Terminus ausgestatteten Isoformen $p53\beta$ und $p53\gamma$ in die Regulation der durch *wtp53* induzierten Stressantworten involviert sind, war bislang ungeklärt. Die Aminosäuresequenzen von $p53\beta$ und $p53\gamma$ sind bis einschließlich Aminosäure 331 identisch mit derjenigen von *wtp53*. Bei der Isoform $p53\beta$ schließen sich ab Position 332 10 alternative C-terminale Aminosäuren an (332-341: DQTSFQKENC) und die Isoform $p53\gamma$ verfügt C-terminal über 15 alternative Aminosäuren (332-346: MLLDLRWCYFLINSS). Tatsächlich wurde für $p53\beta$ gezeigt, dass es mit *wtp53* interagiert und unter Stressbedingungen die *wtp53*-abhängige Transaktivierung des *bax*-Promotors positiv beeinflusst, auf die des *p21*-Promotors jedoch keinen Einfluss hat. Es wurde ebenfalls eine geringe Zunahme *wtp53*-induzierter Apoptose gemessen (Bourdon *et al.* 2005). Um die Funktion von $p53\beta$ und auch von $p53\gamma$ genauer zu charakterisieren, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Zellsystem für die stabile Expression Flag-markierter *p53*-Isoformen ausgewählt, in dem endogen die *wtp53*-Isoform, nicht jedoch eine der C-terminal verkürzten Isoformen auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte. Da alternative *p53*-Isoformen nur in *p53*-exprimierenden Zellen gebildet werden können, ist eine Zelllinie mit *wtp53*-positivem Hintergrund sinnvoll. Das Anfügen einer N-terminalen Flag-Sequenz war zum differentiellen Nachweis der Expressionsprodukte notwendig, da bisher keine für $p53\beta$ und $p53\gamma$ spezifischen Antikörper kommerziell verfügbar sind.

4.1. **p53 wird durch Caspasen gespalten**

Die humanen Kolonkarzinomzelllinien RKO und HCT116 wurden hinsichtlich der endogenen Proteinexpression von wtp53, p53 β und p53 γ analysiert. Da funktionelles wtp53 in vitalen Zellen nur in geringen Mengen vorhanden ist, wurden die Zelllinien zur Stabilisierung und somit zum verlässlichen Nachweis von p53 in Gegenwart des Zytostatikums Camptothecin inkubiert oder γ -bestrahlt. Die Zelllinie MCF-7 sollte hierbei als Positivkontrolle dienen und einen Größenstandard für p53 β liefern, da gezeigt worden war, dass p53 β in diesen Zellen exprimiert wird (Bourdon *et al.* 2005). Zusätzlich wurden p53-defiziente HCT116-Zellen mit einem unmarkierten Expressionsplasmid für p53 β transfiziert, um eine weitere Positivkontrolle zur Verfügung zu stellen. Aufgrund des Molekulargewichtes kann der Nachweis von p53 β gleichzeitig als Größenstandard für p53 γ dienen. Zur Detektion der p53-Isoformen wurde der anti-p53-Antikörper DO-1 gewählt, der aufgrund seines N-terminalen Bindungsepitops (AS 21 – 25) alle drei zu analysierenden Isoformen nachweist.

Abb. 3-1 zeigt die Stabilisierung von wtp53 nach der Induktion eines DNA-Schadens durch γ -Bestrahlung und in besonderem Maße durch Camptothecin in RKO- und HCT116-Zellen. Diese Stabilisierung war auch in MCF-7 (casp-3)-Zellen nach Camptothecin-Zugabe zu detektieren, nicht jedoch nach γ -Bestrahlung. Die transiente Transfektion p53-defizienter HCT116-Zellen mit einem Expressionsplasmid, welches unmarkiertes p53 β kodiert, führte zu dessen Expression, die durch den DO-1-Antikörper nachgewiesen werden konnte. In keiner anderen Probe konnte auf gleicher Höhe eine p53-spezifische Bande nachgewiesen werden, die auf eine endogene Expression von p53 β oder p53 γ hätte schließen lassen.

Interessanterweise konnte nach der Induktion eines DNA-Schadens, speziell durch Camptothecin, in den Zelllinien RKO und HCT116 eine schneller migrierende, p53-spezifische Bande mit dem DO-1-Antikörper nachgewiesen werden. Da eine p53-Spaltung durch Caspasen (Sayan *et al.* 2006) und Calpain (Kubbutat und Vousden 1997) beschrieben ist, wurde in einem nächsten Experiment der Entstehung dieser schneller migrierenden Bande nachgegangen, indem γ -bestrahlte bzw. mit Camptothecin inkubierte RKO- und HCT116-Zellen parallel in Gegenwart des Calpain-Inhibitors I oder des Breitband-Caspase-Inhibitors QVD kultiviert wurden. Das Auftreten der erwähnten p53-Form insbesondere nach Camptothecin-Zugabe zu RKO- und HCT116-Zellen, aber auch nach γ -Bestrahlung von HCT116-Zellen, konnte durch den Breitband-Caspase-Inhibitor QVD effizient verringert werden, nicht jedoch durch den Calpain-Inhibitor I (Abb. 3-2). Daraus kann geschlossen werden, dass p53 in den analysierten Zellsystemen nach DNA-Schädigung durch Caspasen, die im Apoptosesignalweg aktiviert werden, gespalten wird.

Da in der humanen Kolonkarzinomzelllinie RKO keine der beiden p53-Isoformen p53 β bzw. p53 γ auf Proteinebene nachgewiesen werden konnten, wurde diese Zelllinie als System

zur stabilen Expression Flag-markierter p53-Isoformen ausgewählt. Um für die geplanten zellbiologischen Experimente eine adäquate Kontrolle zur Verfügung zu stellen, wurden ebenfalls stabile klonale Zelllinien zur Überexpression von Flag-markiertem wtp53 generiert. Die Expression der Transgene in einigen der getesteten Klone zeigen Abb. 3-3 und Abb. 3-4.

4.2. Verminderter Abbau von p53 β und p53 γ durch das Proteasom

In seiner Funktion als Transkriptionsfaktor induziert p53 die Transkription von Genen, welche pro-apoptotische oder Zellzyklus-arretierende Proteine kodieren. Da die Funktion solcher Proteine in Situationen essentiell ist, in denen die Zelle durch genotoxischen Stress geschädigt ist, eine gesunde Zelle jedoch unter Umständen eliminieren würde, wird die Aktivität von p53 streng reguliert. In gesunden Zellen wird p53 sehr effektiv durch das Proteasom abgebaut. Der wichtigste negative Regulator ist dabei die Ubiquitin-E3-Ligase MDM2, die p53 ubiquityliert und damit für den proteasomalen Abbau markiert. Da die Degradation von p53 im Zytoplasma stattfindet, wird ubiquityliertes p53 aus dem Zellkern exportiert. Dies wird durch die beiden nukleären Exportsignale (NES) von p53 gewährleistet. Durch DNA-Schädigung werden verschiedene Kinasen wie bspw. ATM, ATR, Chk1 und Chk2 aktiviert, die p53 an dessen N-Terminus phosphorylieren und hierdurch die Interaktion von MDM2 und p53 unterbinden. Zudem wird aber auch MDM2 selbst phosphoryliert und dadurch deaktiviert. Ebenso führt die Interaktion von p14^{ARF} mit MDM2 zu dessen Hemmung. Die Phosphorylierung von p53 und MDM2, sowie die Hemmung von MDM2 durch p14^{ARF} führen letztlich zur Stabilisierung von p53 und Erhöhung des zellulären p53-Gehalts.

Die Analyse der p53-Expression in den klonalen RKO-Zelllinien unter Stressbedingungen zeigte, dass wie erwartet endogenes wtp53 nach der Induktion eines DNA-Schadens aufgrund seiner Stabilisierung vermehrt nachgewiesen werden konnte (Abb. 3-5). Auch transgenes Flag-markiertes wtp53 wurde infolge von DNA-Schädigung vermindert degradiert und somit effizient stabilisiert. Im Gegensatz dazu waren Flag-p53 β und Flag-p53 γ bereits in Kontrollansätzen stabil exprimiert und ihr Proteinniveau wurde infolge der Induktion eines DNA-Schadens nicht nachweisbar erhöht. Eine mögliche Erklärung für die starke Expression der Isoformen Flag-p53 β und Flag-p53 γ ist deren Transkriptionskontrolle durch den CMV-Promotor. Obwohl es wahrscheinlich ist, dass die drei Transgene Flag-p53wt/ β / γ ausgehend vom CMV-Promotor stärker transkribiert werden als endogenes wtp53, scheint der hohe Proteingehalt der beiden Isoformen Flag-p53 β und Flag-p53 γ in Kontrollansätzen weniger durch eine starke Transkription als eher durch einen fehlenden Abbau zu begründen zu sein, da transgenes Flag-p53wt trotz seiner Transkription ausgehend vom gleichen Promotor in Kontrollansätzen kaum nachzuweisen ist. Flag-p53wt scheint ähnlich wie endogenes wtp53 reguliert zu sein.

Um der Frage nachzugehen, ob die proteasomale Degradation Ursache für den Abbau von wtp53 bzw. der fehlende Abbau ursächlich für die Stabilität von Flag-p53 β und Flag-p53 γ ist, wurden die RKO-Klone mit dem proteasomalen Inhibitor MG-132 inkubiert und anschließend im Western Blot mit dem DO-1-Antikörper analysiert (Abb. 3-6). Tatsächlich führte die Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG-132 zu einer Stabilisierung von endogenem wtp53, sowie transgenem Flag-p53wt. Das Proteinniveau der beiden Isoformen Flag-p53 β und Flag-p53 γ konnte durch MG-132 jedoch im Vergleich zu Kontrollansätzen kaum gesteigert werden. Transgenes Flag-p53wt wird trotz der vom CMV-Promotor ausgehenden Transkription effektiv über proteasomale Degradation reguliert. Die analoge Regulation der Isoformen p53 β und p53 γ über proteasomalen Abbau erfolgt hingegen nicht oder nur stark vermindert.

Alternatives Spleißen von Intron 9 der humanen p53 prä-mRNA führt zur Entstehung der zwei C-terminal verkürzten Proteinisoformen p53 β und p53 γ . Durch diese C-terminale Verkürzung fehlen diesen beiden Proteinen die folgenden Domänen: ein Großteil der Tetramerisierungsdomäne mit dem nukleären Exportsignal (NES) und die basische Domäne mit zwei der insgesamt drei nukleären Lokalisationssignale (NLS II und NLS III). Daher kann der ineffiziente proteasomale Abbau von p53 β und p53 γ verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte er auf den Verlust der 6 C-terminalen Lysinreste innerhalb der basischen Domäne (K370, K372, K373, K381, K382 und K386), die durch MDM2 ubiquityliert werden, zurückgeführt werden (Rodriguez *et al.* 2000). Andererseits ist die Ubiquitylierung weiterer 5 Lysinreste in der DNA-Bindungsdomäne beschrieben (K101, K120, K132, K139 und K164), die zum proteasomalen Abbau führt (Chan *et al.* 2006; Nie *et al.* 2007). Diese 5 Lysinreste sind in p53 β und p53 γ noch vorhanden, so dass theoretisch eine verminderte Ubiquitylierung möglich wäre. Nie *et al.* (2007) haben folgendes Modell für den proteasomalen Abbau von p53 vorgeschlagen: Die MDM2-Bindung an den N-Terminus von p53 induziert eine Konformationsänderung in p53, die zur Exposition der Lysinreste führt, die Ziel der MDM2-vermittelten Ubiquitylierung sind. Durch die Ubiquitylierung der Lysinreste kommt es erneut zur Konformationsänderung und Exposition des C-terminalen NES (AS 340 – 351). Dies erlaubt den Export ins Zytoplasma, wo p53 schließlich durch das Proteasom degradiert wird. Dieses nukleäre Exportsignal fehlt jedoch p53 β und p53 γ , so dass nach dem Modell von Nie *et al.* (2007) selbst die Ubiquitylierung der Lysinreste in der DBD wirkungslos bliebe, da die Proteine nicht ins Zytoplasma exportiert werden könnten. Der Nachweis von Flag-p53 β und Flag-p53 γ im Zytoplasma (Abb. 3-14) zeigt jedoch, dass eine fehlende zytoplasmatische Lokalisation der Proteine nicht der Grund für ihren verminderten Abbau sein kann. Das Vorhandensein des N-terminalen NES (AS 11 - 27) scheint ausreichend für eine Lokalisation im Zytoplasma zu sein.

Weitere Modelle der komplexen Regulation von p53 durch MDM2 werden ebenso diskutiert. So wurde gezeigt, dass eine Oligomerisierungs-defiziente p53-Punktmutante nicht länger MDM2-abhängig degradiert wird (Kubbutat *et al.* 1998). p53-Punktmutanten, die zwar nicht mehr tetramersieren, aber dennoch dimerisieren können, erlauben eine MDM2-abhängige Degradation (Kubbutat *et al.* 1998). Bei der Suche nach der Domäne, über die p53 mit MDM2 interagiert, wurden N-terminale p53-Peptide verwendet und gezeigt, dass sie MDM2 binden können (Picksley *et al.* 1994). Andererseits zeigten Kubbutat *et al.* (1998), dass die Deletion der Oligomerisierungsdomäne in der Mutante p53 Δ 327 zu einer drastischen Reduktion der Bindungsaffinität zu MDM2 führt. Diese auf den ersten Blick kontroverse Beobachtung, dass zwar N-terminale p53-Peptide, nicht jedoch die C-terminal verkürzte Mutante p53 Δ 327 mit MDM2 interagieren können, könnte mit der Zugänglichkeit der N-terminalen Domäne aufgelöst werden. Es wird nämlich diskutiert, dass eine Oligomerisierung von p53 für dessen Interaktion mit MDM2 deshalb notwendig ist, da sie die Exposition der N-terminalen Interaktionsdomäne induziert, welche in monomerem p53 verborgen ist. Bei der Verwendung von N-terminalen p53-Peptiden hingegen besteht die Problematik der Zugänglichkeit nicht.

Ähnlich wie für p53 Δ 327 konnte in der vorliegenden Arbeit auch für p53 β und p53 γ keine Oligomerisierung nachgewiesen werden (Abb. 3-19 und Abb. 3-20). Im Zuge der Untersuchung der Interaktion von p53 β und p53 γ mit Bindungspartnern, konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen Flag-p53 β und MDM2 fast vollständig unterbunden ist, für Flag-p53 γ konnte keine Interaktion mit MDM2 nachgewiesen werden (Abb. 3-21). Obwohl die N-terminale Sequenz, über die MDM2 mit p53 interagiert, nach wie vor vorhanden ist, führt der Verlust des C-Terminus zu einem ebensolchen Verlust der MDM2-Bindung. Die Abwesenheit der sechs C-terminalen Lysinreste in p53 β und p53 γ , die durch MDM2 ubiquityliert werden, ist für die Regulation der Proteinstabilität zweitrangig. Die Oligomerisierungs-Defizienz dieser beiden p53-Isoformen scheint in erster Linie für den Verlust der N-terminalen Interaktion mit MDM2 verantwortlich zu sein, der zwangsläufig zu einer gestörten Regulation des Proteinabbaus führt. Eine durch Oligomerisierung von p53 induzierte Konformationsänderung und damit einhergehende Exposition des N-Terminus erscheint daher plausibel.

4.3. p53 β und p53 γ haben keinen Einfluss auf Apoptose- oder Zellzyklusarrest-relevante Proteine

Ein Teilaspekt der Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von p53 β und p53 γ auf die Expression bzw. Prozessierung Apoptose- und Zellzyklusarrest-relevanter Proteine, da beide Signalwege von wtp53 reguliert werden. Dazu wurden in den klonalen RKO-Zelllinien DNA-Schäden durch γ -Bestrahlung bzw. Etoposid-Zugabe induziert und anschließend im Western

Blot die Expression unterschiedlicher p53-Zielproteine, sowie die Prozessierung Apoptose-assoziiierter Proteine analysiert (Abb. 3-7). Das Expressionsniveau von Bak und Bax, zweier Zielgene von wtp53, wurde durch die Induktion eines DNA-Schadens und damit einhergehender Stabilisierung von wtp53 nicht signifikant beeinflusst. Offenkundig ist die Western Blot Analyse nicht sensitiv genug, um die Transaktivierung dieser Zielgene aussagekräftig zu untersuchen. Deshalb wurden im Folgenden die Transaktivierung durch wtp53 und der Einfluss von p53 β und p53 γ hierauf in Luciferase-Reporteranalysen untersucht. Eine Ausnahme bildete das p53-Zielgen *p21*, welches für einen Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen kodiert und somit zum Zellzyklusarrest beiträgt. Die Induktion dieses Proteins nach einem DNA-Schaden war deutlich zu detektieren. Eine differentielle Induktion der Expression in Anwesenheit einer der transgenen p53-Isoformen konnte nicht nachgewiesen werden. Folglich wurde die Expression von p21 vorrangig von endogenem wtp53 reguliert, da zwischen den Klonen RKO Mock #4 und Flag-p53wt #9.2 kein bedeutender Unterschied im Expressionsprofil zu erkennen war. Ein zusätzlicher positiver Einfluss von transgenem Flag-p53wt war nicht auszumachen, möglicherweise da erneut die Sensitivität der Analyse limitiert ist. Aufgrund der starken genotoxischen Stimuli könnte die Expression von p21 aber auch einen Sättigungswert erreicht haben, so dass ein zusätzlicher positiver Einfluss von Flag-p53wt oder Flag-p53 β/γ nicht sichtbar wird. Ein negativer Einfluss von p53 β bzw. p53 γ auf die Transaktivierung von *p21* durch endogenes wtp53 ist in Anbetracht der vergleichbaren p21-Bandenintensität in allen klonalen Zelllinien unwahrscheinlich.

Im Gegensatz zur Induktion von p21 wirkte sich die zusätzliche Expression von Flag-p53wt positiv auf die Prozessierung von Caspase-3 und die Spaltung von PARP aus. In Proben Etoposid inkubierter Flag-p53wt überexprimierender Zellen war eine verstärkte Spaltung dieser beiden Proteine nachzuweisen. Im Vergleich zu Mock-transfizierten RKO-Zellen gab es keine wesentlichen Unterschiede in der Prozessierung dieser beiden Proteine durch Flag-p53 β - und Flag-p53 γ -Überexpression. Dies legt nahe, dass diese beiden Isoformen den Apoptosesignalweg weder positiv noch negativ beeinflussen. γ -Bestrahlung rief in dem verwendeten Zellsystem vorwiegend Zellzyklusarrest und weniger Apoptose hervor als die Zugabe von Etoposid (Abb. 3-8 und Abb. 3-10) Daher war nach 24 h keine Prozessierung der Proteine Caspase-3 und dessen Substrat PARP bei DNA-Schädigung durch γ -Bestrahlung zu detektieren.

MDM2, der primäre negative Regulator von p53, wird selbst positiv durch p53 reguliert. Trotzdem war die MDM2-Expression in den mit Etoposid behandelten Proben am schwächsten, obwohl hier die höchste Menge an wtp53 nachgewiesen wurde (Abb. 3-5). Diese Korrelation scheint paradox und im Widerspruch zur belegten positiven Regulation von MDM2 durch p53 zu stehen. Perry *et al.* (1993) hatten jedoch gezeigt, dass die Induktion von

MDM2 in UV-bestrahlten Zellen verzögert ist, obwohl die p53-Proteinmenge früh erhöht war. Die Verzögerung der MDM2-Induktion korrelierte mit der Stärke der UV-Bestrahlung (Perry *et al.* 1993). Die Induktion eines schweren DNA-Schadens führt also vorwiegend zur Inhibierung der MDM2-Expression und erlaubt so eine starke Stabilisierung und Aktivierung von p53. p53 induziert nun Apoptose oder den Arrest der Zelle im Zellzyklus zur DNA-Reparatur. Im Falle einer Reparatur lässt die Inhibierung von MDM2 erst nach, wenn der Schaden beseitigt ist, wodurch es wieder zu einer Destabilisierung von p53 kommt. Gleichzeitig induziert p53 selbst in der Endphase des Reparaturprozesses die Transkription von MDM2, wodurch es sich selbst negativ reguliert. Die Analyse des Expressionsniveaus von MDM2 verdeutlichte zudem, dass nicht eine vermeintlich verminderte Expression von MDM2 für die Stabilisierung von Flag-p53 β und Flag-p53 γ in Kontrollansätzen verantwortlich ist.

4.4. p53 β und p53 γ haben keinen Einfluss auf wtp53-induzierte Apoptose

Um den potentiellen Einfluss der Isoformen p53 β und p53 γ auf die durch wtp53-induzierte Apoptose detaillierter und zuverlässiger als durch eine Western Blot Analyse untersuchen zu können, wurden durchflußzytometrische Analysen zur Bestimmung des relativen zellulären DNA-Gehalts durchgeführt. Hypodiploide Zellen wurden dabei als apoptotisch klassifiziert. Zu diesem Zweck wurden die klonalen RKO-Zelllinien mit verschiedenen Konzentrationen an Camptothecin und Etoposid inkubiert oder γ -bestrahlt. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Zellen für die durchflußzytometrische Analyse aufgearbeitet und der relative DNA-Gehalt bestimmt (Abb. 3-8 und Abb. 3-9). 24 h nach der Zugabe von 0,2 μ M Camptothecin wurde vorrangig ein Zellzyklusarrest in der G2-Phase induziert (Abb. 3-10). Daher wurden zu diesem Zeitpunkt nur wenig hypodiploide Zellen in jeder Probe detektiert. Gleiches galt für die γ -bestrahlten Zellen zu diesem Zeitpunkt. In den mit 1 μ M Camptothecin bzw. 100 μ M Etoposid inkubierten Flag-p53wt exprimierenden Zellen war bereits nach 24 h ein sensitivierender Effekt auf die Apoptoseinduktion nachweisbar. Besonders deutlich wurde dieser Effekt jedoch nach einer Inkubation der Zellen für 48 h mit diesen Chemotherapeutika, der zu diesem Zeitpunkt auch bei der geringeren Konzentration von 0,2 μ M Camptothecin hervortrat. Nach 48 h unterschieden sich die für Flag-p53 β und Flag-p53 γ überexprimierende Zellen erhaltenen Werte nicht signifikant von denen der Mock-transfizierten Zellen. Die Überexpression dieser beiden Isoformen übt also weder einen sensitivierenden noch einen inhibierenden Einfluss auf die durch wtp53-vermittelte Apoptose aus. Die Steigerung der Apoptoserate in Flag-p53wt überexprimierenden Zellen hingegen belegt die Relevanz von wtp53 für den Apoptosesignalweg.

γ -Bestrahlung induzierte jedoch nach 24, 48 und 72 h in den drei klonalen Zelllinien RKO-Mock, Flag-p53wt und Flag-p53 β einen vergleichbaren Anteil apoptotischer Zellen. Ein

prozentual geringerer Anteil der Zellen war hingegen zu allen drei Zeitpunkten bei Überexpression von Flag-p53 γ apoptotisch. Der Grund einer fehlenden Sensitivierung der Zellen gegenüber Apoptose durch die Überexpression von Flag-markiertem wtp53 bei γ -Bestrahlung, sowie für den geringfügig resistenteren Phänotyp Flag-p53 γ überexprimierender Zellen ist unbekannt. Dieser Einfluss von Flag-p53 γ trat ausschließlich bei der Quantifizierung hypodiploider Zellen hervor, nicht aber bei der Verwendung anderer Methoden, so dass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen Methoden-inhärenten Sekundäreffekt handelt.

4.5. *p53 β und p53 γ haben keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung*

Da p53 nicht ausschließlich Apoptose als Antwort auf DNA-Schädigung auslöst, sondern auch die Progression des Zellzyklus unterbinden kann, sollte die Auswirkung der Expression von Flag-p53 β und Flag-p53 γ auf die Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen durch die durchflußzytometrische Analyse des relativen zellulären DNA-Gehalts untersucht werden. Die Induktion der Expression des CKI p21 war bereits im Western Blot analysiert worden (Abb. 3-7) und hatte gezeigt, dass ein Einfluss der Isoformen p53 β und p53 γ darauf unwahrscheinlich ist. Während anhand der Western Blot Analyse durch den Nachweis von p21 eine Ursache für die Arretierung im Zellzyklus nachgewiesen wurde, erfolgte mittels Durchflußzytometrie eine sensitivere Analyse der Auswirkung der p21-Expression.

Dazu wurden die Zellen wie für die Messung hypodiploider Zellen kultiviert und nach 24 h analysiert. Die Induktion eines DNA-Schadens durch 0,2 μ M Camptothecin führte nach 24 h vorrangig zum Arrest der Zellen in der G2-Phase des Zellzyklus (Abb. 3-10) und kaum zur Induktion von Apoptose (Abb. 3-8). Gleiche Resultate wurden für die γ -bestrahlten Zellen erhalten. Auch die Inkubation der Zellen mit 100 μ M Etoposid führte zu einer Erhöhung des Anteils der in der G2-Phase befindlichen Zellen, allerdings weniger ausgeprägt als nach der Zugabe von 0,2 μ M Camptothecin oder γ -Bestrahlung. Möglicherweise hängt dieser verminderte Anteil G2-arretierter Zellen mit der höheren Apoptoserate durch Etoposid-Inkubation zusammen verglichen mit dem Anteil apoptotischer Zellen nach γ -Bestrahlung oder Inkubation mit 0,2 μ M Camptothecin für 24 h (Abb. 3-8). Der geringere Anteil Flag-p53wt überexprimierender Zellen in der G2-Phase nach Inkubation der Zellen mit 100 μ M Etoposid im Vergleich zu den drei anderen Zelllinien ist möglicherweise mit der Apoptosesensitivierung durch Flag-p53wt-Überexpression zu erklären. Allerdings ist dies keine Erklärung für den geringeren Anteil dieser Zellen in der G2-Phase nach γ -Bestrahlung, da γ -Bestrahlung in Flag-p53wt-Zellen nicht vermehrt Apoptose auslöste. Die Verteilung Flag-p53 β und Flag-p53 γ überexprimierender Zellen war nach allen verwendeten Apoptosestimuli und auch in Kontrollansätzen mit der Mock-transfizierter Zellen vergleichbar.

Ein Einfluss dieser beiden Isoformen auf die Zellzyklusverteilung lässt sich daher nicht ableiten.

Wie kommt es zu einem Arrest des Zellzyklus in der G2-Phase? Durch Etoposid oder γ -Bestrahlung induzierte DNA-Schädigung führt zu einem p53-abhängigen Anstieg der p21-Expression (Abb. 3-7). Als Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen CDK1 und CDK2 kann p21 den Zellzyklusarrest in der G1-, S- und G2-Phase hervorrufen. Durch DNA-Schaden werden aber noch weitere Proteine aktiviert. So werden im Rahmen der DNA-Reparatur-Mechanismen die Kinasen ATM, ATR und DNA-Proteinkinasen aktiviert. Sie phosphorylieren indirekt über die Kinasen Chk1 und Chk2, aber auch direkt p53, das dadurch aktiviert wird und so die Expression der Proteine p21 oder 14-3-3 σ induziert. Die phosphorylierten und damit aktivierten Kinasen Chk1 und Chk2 phosphorylieren neben p53 auch die Phosphatase Cdc25C, die dadurch inaktiviert wird. Die phosphorylierte Phosphatase Cdc25C bindet an das durch p53 induzierte 14-3-3 σ und wird nach Ubiquitylierung über das Proteasom abgebaut. Aktive Cdc25C dephosphoryliert CDK1 (Cdc2). Diese dephosphorylierte CDK1 ist enzymatisch aktiv und kann im Komplex mit Cyclin B die Zellzyklusprogression in die M-Phase forcieren. Ist CDK1 jedoch phosphoryliert, so wird der CDK1/CyclinB-Komplex proteasomal abgebaut. Diese Mechanismen führen zu einem G2-Arrest nach genotoxischem Stress.

4.6. Einfluss von p53 β und p53 γ auf Seneszenz

Die bisherigen Analysen des Einflusses der p53-Isoformen p53 β und p53 γ auf die Apoptoseinduktion und den Zellzyklusarrest zeigten, dass p53 β und p53 γ diese durch wtp53-induzierten Signalwege im betrachteten Zellsystem nicht beeinflussen und außerdem, dass die untersuchten Apoptosestimuli nach 96 h zum Zelltod von annähernd 100% der RKO-Zellen führten. Allein diese Beobachtung lässt die Schlussfolgerung zu, dass p53 β und p53 γ offenbar auch einen dritten durch wtp53 vermittelten Signalweg – die Induktion von Seneszenz – nicht positiv beeinflussen. Dennoch sollte eine Beteiligung an diesem Signalweg direkt untersucht werden und nicht ausschließlich indirekt aus dem Zelltod aller klonalen RKO-Zelllinien geschlossen werden. Deshalb wurde für diese Analyse die Zelllinie MCF-7 ausgewählt, in der durch γ -Bestrahlung Seneszenz induziert wird (Essmann *et al.* 2004) und in der keine Expression von p53 β und p53 γ auf Proteinebene nachgewiesen wurde (Abb. 3-1).

Flag-p53wt konnte ausschließlich nach γ -Bestrahlung der MCF-7 bulk-Kultur nachgewiesen werden, wohingegen sowohl Flag-p53 β als auch Flag-p53 γ bereits unter Kontrollbedingungen stabil exprimiert waren und keine zusätzliche Stabilisierung dieser Proteine durch γ -Bestrahlung erzielt wurde (Abb. 3-11). 5 Tage nach der Induktion eines DNA-Schadens durch γ -Bestrahlung waren annähernd 100% der Zellen nach wie vor vital

und in die Seneszenz übergegangen. Die Zellen zeigten eine vergrößerte Zelloberfläche und wurden positiv auf die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase gefärbt (Abb. 3-12). Da in Mock-transfizierten MCF-7-Zellen und Flag-p53 β bzw. Flag-p53 γ überexprimierenden Zellen ein vergleichbarer Anteil der Zellen positiv auf SA- β -Galaktosidase gefärbt wurde, kann geschlussfolgert werden, dass die Isoformen p53 β und p53 γ die durch wtp53 induzierte Seneszenz weder hemmen noch begünstigen.

4.7. p53 β und p53 γ haben keine Transkriptions-unabhängige Funktion

Aus der Analyse der DNA-Fragmentierung, der Zellzyklusverteilung und der Seneszenz konnte nicht auf eine Beteiligung der Isoformen p53 β und p53 γ an diesen wtp53-vermittelten Signalwegen geschlossen werden. Bei all diesen Signalwegen ist die Funktion von wtp53 als Transkriptionsfaktor entscheidend. Da in jüngerer Zeit vermehrt Transkriptions-unabhängige Funktionen von p53 durch dessen Interaktion mit Bcl-2-Proteinen an den Mitochondrien diskutiert werden (Marchenko *et al.* 2000; Mihara *et al.* 2003), sollte untersucht werden, ob die Isoformen p53 β und p53 γ durch Translokation an die Mitochondrien Transkriptions-unabhängig wirken können. Zu diesem Zweck wurde die Lokalisation der drei p53-Isoformen an den Mitochondrien analysiert (Abb. 3-13).

Flag-p53wt konnte nach Stabilisierung, induziert durch einen DNA-Schaden, sowohl in der zytoplasmatischen als auch der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen werden. Flag-p53 β und Flag-p53 γ wurden unabhängig von den Kulturbedingungen fast ausschließlich in der zytoplasmatischen Fraktion nachgewiesen und nur eine schwache Bande konnte nach sehr langer Exposition des Autoradiographiefilms in der mitochondrialen Fraktion detektiert werden. Diese Beobachtung legt zwei Schlussfolgerungen nahe: Erstens ist eine Transkriptions-unabhängige Funktion der Isoformen p53 β und p53 γ an den Mitochondrien unwahrscheinlich, da sie kaum mit dieser Organelle kolokalisieren. Eine Interaktion von p53 β und p53 γ mit Bcl-2-Proteinen an den Mitochondrien wurde daher ausgeschlossen und keine Interaktionsstudien mit Bcl-2-Proteinen vorgenommen. Zweitens ist die Lokalisation von wtp53 an den Mitochondrien vermutlich durch seine C-terminale Domäne verursacht, da der Verlust dieser Domäne dramatische Auswirkungen auf die mitochondriale Lokalisation hat.

Der Einfluss der 62 C-terminalen Aminosäuren von wtp53 auf die Lokalisation des Proteins könnte mit Hilfe ihrer Fusion an ein Markerprotein wie z.B. GFP analysiert werden. Es ist auch denkbar, dass die mitochondriale Lokalisation von wtp53, ähnlich wie seine Regulation durch MDM2, von seiner Tetramerisierung beeinflusst wird und die Abwesenheit von p53 β und p53 γ an den Mitochondrien dementsprechend auf ihre Oligomerisierungs-Defizienz und nicht auf ein definiertes Lokalisationssignal innerhalb der C-terminalen Domäne zurückzuführen ist. Diese Hypothese könnte mit Hilfe der Oligomerisierungs-defizienten p53-Punktmutante (Kubbutat *et al.* 1998) untersucht werden.

4.8. Alle p53-Isoformen sind in unterschiedlichen Mengen im Nukleus und im Zytoplasma lokalisiert

Die Analyse Mitochondrien-angereicherter Fraktionen hatte gezeigt, dass sich der Verlust der C-terminalen Domäne massiv auf die Lokalisation der Isoformen p53 β und p53 γ auswirkt. Es war daher denkbar, dass p53 β und p53 γ aufgrund des Verlustes zweier C-terminaler nukleärer Lokalisationssignale (NLS II: AS 370 – 377 und NLS III: AS 380 – 386) nicht im Nukleus lokalisiert sind. Ihre funktionelle Interaktion mit wtp53 und die Bindung an DNA-Zielsequenzen wären somit ausgeschlossen.

Die Lokalisation der p53-Isoformen wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden untersucht. Zum einen durch subzelluläre Fraktionierung und anschließende Western Blot Analyse (Abb. 3-14), zum anderen durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie (Abb. 3-15). Bei der Analyse der subzellulären Fraktionierung zeigten die Proteine Flag-p53wt und Flag-p53 β sowohl eine Lokalisation im Zytoplasma als auch im Nukleus. Flag-p53 γ war vorrangig in der zytoplasmatischen Fraktion nachzuweisen, eine schwache Proteinbande war jedoch auch in der nukleären Fraktion detektierbar.

Obwohl PARP in diesem Western Blot vorrangig die Funktion eines Markerproteins hatte, so ist die Spaltung von PARP jedoch zudem ein Indiz für die Induktion von Apoptose. Das PARP-Spaltprodukt konnte in allen Proben Etoposid inkubierter Zellen, nicht jedoch in den Kontrollansätzen nachgewiesen werden. Die starke Expression von Flag-p53 β und Flag-p53 γ bereits in Kontrollansätzen konnte demnach nicht zu einer Spaltung von PARP beitragen, womit durch dieses Experiment indirekt und wiederholt eine pro-apoptotische Funktion dieser beiden Proteine unwahrscheinlich erscheint. Der Nachweis des PARP-Spaltproduktes in Etoposid-inkubierten Proben Flag-p53 β und Flag-p53 γ überexprimierender Zellen lässt genauso wenig auf eine anti-apoptotische Funktion dieser beiden Isoformen schließen. Die Spaltung von PARP auch in Etoposid-inkubierten Mock-transfizierten Zellen zeigte vielmehr die Korrelation der PARP-Spaltung mit der zuvor gezeigten Stabilisierung von endogenem wtp53 nach DNA-Schädigung durch Etoposid (Abb. 3-5).

Die Immunfluoreszenzanalyse der p53-Lokalisation zeigte eine nukleäre Lokalisation von Flag-p53wt und Flag-p53 β . Die p53 γ -Isoform war sowohl im Kern als auch im Zytoplasma lokalisiert. Dieses Resultat war nicht gänzlich kongruent zu den in Fraktionierungsexperimenten (Abb. 3-14) erhaltenen Ergebnissen, die eine zytoplasmatische Lokalisation aller drei Isoformen belegten. Hierzu ist anzumerken, dass bei der Western Blot Analyse der subzellulären Fraktionen von jeder Fraktion gleiche Proteinmengen aufgetrennt wurden. Aufgrund des unterschiedlichen Anteils am Zellvolumen und der ebenso unterschiedlichen Proteinzusammensetzung und damit auch –konzentration der beiden Fraktionen lässt sich die spezifische Proteinmenge beider Fraktionen nicht vergleichen. Gleiche Bandenintensität in beiden Fraktionen bedeutet deshalb nicht zwingend, dass gleiche Mengen des

nachgewiesenen Proteins in beiden Fraktionen lokalisiert sind. Die Bandenintensitäten lassen sich nur zwischen gleichen Fraktionen in Relation zueinander setzen, vorausgesetzt das Expressionsniveau der Proteine (in diesem Fall der p53-Isoformen) ist identisch. Die subzelluläre Fraktionierung gibt also Aufschluss darüber, ob ein bestimmtes Protein in einer bestimmten Fraktion lokalisiert ist. Mit dieser Methode kann jedoch nicht die Proteinmenge unterschiedlicher Fraktionen miteinander verglichen werden, da durch die Ladung gleicher Proteinmengen einzelne Proteine immer nur im Verhältnis zu allen anderen Proteinen derselben Fraktion aufgetragen werden. Die Analyse mittels Immunfluoreszenz zeigte, dass bei der Western Blot Analyse der subzellulären Fraktionierung das Gel offenbar im Verhältnis mit signifikant mehr p53 in der zytoplasmatischen Fraktion beladen wurde, als tatsächlich in der Zelle im Verhältnis zum Kern im Zytoplasma lokalisiert ist. So bestätigte zwar die subzelluläre Fraktionierung die Anwesenheit aller drei Isoformen in beiden Fraktionen, das Vorhandensein in beiden Fraktionen im Verhältnis zueinander zeigte jedoch die Immunfluoreszenz. Wie bereits erwähnt, waren Flag-p53wt und Flag-p53 β fast ausschließlich im Kern nachzuweisen, was einer zytoplasmatischen Lokalisation von wtp53 im Zytoplasma, auch an den Mitochondrien, weniger Bedeutung beimisst. Flag-p53 γ war hingegen sowohl im Kern als auch im Zytoplasma gut nachzuweisen. Der Unterschied in der Lokalisation zwischen Flag-p53 β und Flag-p53 γ muss in ihrer kurzen, spezifischen, 10 bzw. 15 Aminosäure langen C-terminalen Sequenz begründet sein. Es ist nicht auszuschließen, dass die Induktion eines DNA-Schadens eine veränderte subzelluläre Lokalisation der drei Isoformen in der Immunfluoreszenz zeigen würde. Die Analyse der Lokalisation von Flag-p53 β und Flag-p53 γ im Western Blot (Abb. 3-13 und Abb. 3-14) deutete jedoch nicht auf eine Variation der Lokalisation dieser beiden Isoformen abhängig von der Induktion eines DNA-Schadens hin.

Es lässt sich aus beiden Untersuchungen schlussfolgern, dass auch Flag-p53 β und Flag-p53 γ im Nukleus lokalisiert sind. Diese grundlegende Prämisse zur direkten Modulation der transkriptionellen Aktivität von wtp53 ist also erfüllt und ihre vermeintliche Abwesenheit in diesem Zellkompartiment daher nicht der Grund für das bisher beobachtete Fehlen einer Funktion.

4.9. *p53 β und p53 γ besitzen keine transaktivierende Funktion*

Die Analyse des Einflusses von p53 β und p53 γ auf die Transaktivierung durch wtp53 mittels Western Blot ließ aufgrund mangelnder Sensitivität der Methode keine eindeutige Schlussfolgerung zu (Abb. 3-7). Um dennoch eine transaktivierende Funktion von p53 β und p53 γ bzw. deren Einfluss auf die Funktion von wtp53 analysieren zu können, wurden im Folgenden Luciferase-Reportergenanalysen mit p53-induzierbaren Promotorelementen durchgeführt. Da p53 β und p53 γ im Kern lokalisiert sind und sie sowohl über die beiden N-

terminalen Transaktivierungsdomänen, als auch über die DNA-Bindungsdomäne verfügen, war solch eine Funktion denkbar.

p53-defiziente HCT116-Zellen wurden zu diesem Zweck mit Reporter-genplasmiden zur Expression der Luciferase ausgehend vom *bax*-Promotorkonstrukt oder vom CMV_{mini}-Promotor, der am 3'-Ende einer 13-fachen Wiederholung des *ribosomal gene clusters* (RGC), einer p53-Konsensussequenz, lokalisiert ist, transfiziert. Des Weiteren wurden Expressionsplasmide unterschiedlicher p53-Isoformen kotransfiziert und die Luciferaseaktivität analysiert (Abb. 3-16 und Abb. 3-17). Das *bax*-Promotorkonstrukt konnte ausschließlich durch die Expression von wtp53 induziert werden, ausgehend vom RGC-Promotorkonstrukt führte wtp53 zu einer 48-fachen Luciferaseaktivität. Die Transfektion des p53 β -Expressionsvektors gemeinsam mit dem RGC-Promotorkonstrukt führte zu einer Induktion der Luciferaseaktivität um das 18,1-fache. Da die Expression von p53 β in keinem der übrigen Ansätze einen Einfluss auf die Luciferaseaktivität ausübte, ist diese Aktivierung möglicherweise auf eine unspezifische DNA-Bindung von p53 β an die 13-fache Wiederholung der p53-Konsensussequenz zurückzuführen. Weshalb solch ein Effekt nicht durch die Expression von p53 γ beobachtet werden konnte, das sich in seiner Sequenz kaum von p53 β unterscheidet, ist unbekannt. Die gemeinsame Expression von wtp53 mit unterschiedlichen Mengen an p53 β bzw. p53 γ führte nicht zu einer signifikanten Änderung der Luciferaseaktivität verglichen mit der bei alleiniger wtp53-Expression ausgehend von beiden Promotorelementen (Abb. 3-16). Dies legt eine fehlende Aktivität der Isoformen p53 β und p53 γ als Transkriptionsfaktoren und keine Interaktion mit der Funktion von wtp53 nahe.

Diese Ergebnisse wurden durch weitere Luciferase-Reporter-genanalysen erhärtet. Für die p53-Isoform Δ 133p53 ist ein dominant-negativer Effekt gegenüber wtp53 beschrieben (Murray-Zmijewski *et al.* 2006). Dieser Effekt wird auf die Tatsache zurückgeführt, dass Δ 133p53 zwar noch mit wtp53 oligomerisieren kann, durch den Verlust seiner beiden Transaktivierungsdomänen jedoch die Expression von Zielgenen nicht mehr induziert. Die direkte Interaktion von wtp53 und Δ 133p53 ist bisher allerdings noch nicht untersucht worden. Die Expression von Δ 133p53, Δ 133p53 β und Δ 133p53 γ allein konnte die Luciferaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle nicht modulieren. Die Koexpression von wtp53 mit Δ 133p53 insbesondere beim Verhältnis von 1:1 führte hingegen zu einer deutlichen Reduktion der wtp53-induzierten Luciferaseaktivität. Interessanterweise wurde dieser dominant-negative Effekt von Δ 133p53 gegenüber wtp53 durch die verkürzten C-Termini von Δ 133p53 β und Δ 133p53 γ vollständig aufgehoben. Während der Verlust des N-Terminus in einer dominant-negativen Form von p53 resultiert, führt der Verlust des C-Terminus zu einer inaktiven Variante von p53. Die Resultate der Luciferase-Reporter-genanalysen mit den unterschiedlichen N-terminal verkürzten Isoformen untermauern die Ergebnisse für die

beiden Isoformen p53 β und p53 γ , für die aufgrund ihrer C-terminalen Verkürzung bislang weder ein positiver noch ein negativer Effekt wtp53 gegenüber gezeigt werden konnte.

4.10. p53 β und p53 γ binden nicht an DNA

Da für die transaktivierende Funktion von wtp53 die Bindung an DNA essentiell ist, wurde die Bindung der drei Isoformen an eine p53-Zielsequenz in EMSAs analysiert. Für dieses Experiment wurden Zellysate von Kontrollansätzen, sowie mit Etoposid kultivierten klonalen RKO-Zelllinien mit einem radioaktiv-markierten p53-Konsensusoligonukleotid inkubiert (Abb. 3-18). Mittels Autoradiographie konnte ein spezifischer Protein/DNA-Komplex in allen RKO-Proben nachgewiesen werden, dessen Intensität nach DNA-Schädigung durch Etoposid zunahm. Die Verwendung eines anti-Flag-Antikörpers führte zu einem langsamer migrierenden Komplex ausschließlich in Lysaten Flag-p53wt exprimierender Zellen, nicht aber in Flag-p53 β oder Flag-p53 γ enthaltenden Lysaten. Dies belegte einerseits, dass es sich um einen p53/DNA-Komplex handelte, in dem Flag-p53wt vorhanden war und andererseits, dass weder Flag-p53 β noch Flag-p53 γ an das Oligonukleotid gebunden waren. Die N-terminale Flag-Sequenz verhinderte folglich die DNA-Bindung von Flag-p53wt nicht. Aufgrund ihres Unvermögens, DNA zu binden sind p53 β und p53 γ nicht in der Lage, eine direkte Funktion als Transkriptionsfaktor aufzuüben.

4.11. p53 β und p53 γ sind Oligomerisierungs-defizient

Schließlich sollte geklärt werden, weshalb p53 β und p53 γ , die beide über die DNA-Bindungsdomäne verfügen, nicht an DNA binden. Es ist bekannt, dass p53, um DNA zu binden, als Tetramer vorliegen muss (Chene 2001). Daher sollte untersucht werden, ob Flag-p53 β und Flag-p53 γ mit endogenem wtp53 interagieren. Obwohl die bisherigen Analysen einen solchen Einfluss nicht zeigen konnten, würde eine Interaktion zwischen p53 β bzw. p53 γ und wtp53 einen Mechanismus darstellen, durch den diese beiden Isoformen die Funktion von wtp53 beeinflussen, ohne dass sie selbst in der Lage sind, an DNA zu binden oder, wie durch den EMSA ebenso gezeigt wurde, auch nicht in einem Komplex mit wtp53 DNA binden. Die Protein-Protein-Interaktion wurde mittels Koimmunpräzipitation analysiert (Abb. 3-19 und Abb. 3-20).

Durch Verwendung des anti-p53-Antikörpers PAb421 (Epitop: AS 371-380) wurde spezifisch die Isoform wtp53 aus den Lysaten der verschiedenen klonalen RKO-Zelllinien präzipitiert (Abb. 3-19). Die anschließende Western Blot Analyse mit einem anti-Flag-Antikörper zeigte, dass ausschließlich Flag-p53wt im Eluat vorhanden war, Flag-p53 β und Flag-p53 γ hingegen nicht kopräzipitiert wurden. Die Anwesenheit von endogenem wtp53 in allen Eluaten konnte durch die Verwendung eines polyklonalen anti-p53-Antikörpers, der gegen das gesamte Protein gerichtet ist, nachgewiesen werden. Die Abwesenheit von Flag-

p53 β und Flag-p53 γ in den Eluaten aufgrund einer nicht erfolgreichen Immunpräzipitation konnte somit ausgeschlossen werden. Da der Antikörper PAb421 sowohl endogenes wtp53 als auch transgenes Flag-p53wt direkt bindet und somit die Interaktion von endogenem wtp53 mit Flag-markiertem wtp53 nicht nachgewiesen wurde, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Kopräzipitation aufgrund eines negativen Einflusses der N-terminalen Flag-Sequenz erfolglos war. Dies wurde in weiteren Immunpräzipitationen mit einem anti-Flag-Antikörper ausgeschlossen (Abb. 3-20). Im anschließenden Western Blot mit dem anti-p53-Antikörper DO-1, der alle drei p53-Isoformen bindet, wurde die Kopräzipitation von endogenem wtp53 mit Flag-p53wt nachgewiesen. Damit wurde gezeigt, dass die N-terminale Flag-Sequenz diese Interaktion nicht inhibiert. Wurden hingegen Flag-p53 β oder Flag-p53 γ präzipitiert, so konnte in den Eluaten keine Bande spezifisch für endogenes wtp53 nachgewiesen werden (Abb. 3-20). Dies bestätigte die fehlende Interaktion dieser beiden Isoformen mit wtp53.

Der Verlust der Tetramerisierungsdomäne von p53 β und p53 γ führt zum Verlust der Oligomerisierung dieser p53-Isoformen. Sie können durch die fehlende Interaktion mit wtp53 dessen Funktion nicht direkt modulieren. Da p53 als Tetramer an DNA bindet, resultiert die Oligomerisierungs-Defizienz im Verlust der DNA-Bindungskapazität und obwohl p53 β und p53 γ über die beiden Transaktivierungsdomänen am N-Terminus verfügen, sind sie somit nicht in der Lage, eine Funktion als Transkriptionsfaktor auszuüben.

4.12. Abschließende Betrachtung zur Charakterisierung der p53-Isoformen

Die beiden p53-Isoformen p53 β und p53 γ wurden in der vorliegenden Arbeit erfolgreich charakterisiert. Die erhaltenen Resultate stehen im Einklang mit dem aktuellen Modell für die Domänenstruktur von p53 und daraus abgeleiteten Funktionen. Beide Isoformen verfügen nicht über die reguläre Oligomerisierungsdomäne, sowie die sich anschließende basische Domäne. Da die Tetramerisierung von p53 für die erfolgreiche Bindung und Regulation von Zielgenen notwendig ist, beeinflussen die beiden Oligomerisierungs-defizienten Isoformen p53 β und p53 γ die transaktivierende Funktion von wtp53 nicht direkt.

Die C-terminale Sequenz, die p53 β und p53 γ fehlt, beinhaltet nicht nur den Großteil der Tetramerisierungsdomäne (AS 326 – 356), sondern auch die basische Domäne (AS 364 – 393), welche eine regulatorische Funktion ausübt (Harms und Chen 2006). Studien, in der eine C-terminal verkürzte p53-Variante (Δ 321-393) analysiert wurde, zeigten, dass dieses Protein hauptsächlich monomer ist und DNA nur sehr schwach, mit einer 10- bis 100-fach verminderten Affinität verglichen mit wtp53 bindet (Wang *et al.* 1994; Balagurumoorthy *et al.* 1995; Wang *et al.* 1995). Die basische Domäne unterstützt die Bindung von p53 an DNA in einer DNA-Struktur-spezifischen, aber Sequenz-unspezifischen Weise, eine p53-Funktion, die mit DNA-Reparatur und Rekombination assoziiert ist (Kim und Deppert 2006).

Andererseits kann die basische Domäne die Sequenz-spezifische DNA-Bindung von p53 positiv regulieren und damit die transaktivierende Funktion von p53 unterstützen (McKinney *et al.* 2004). Es wurde außerdem gezeigt, dass eine Reihe regulatorischer Proteine an die basische Domäne von p53 binden (Nie *et al.* 2000; Okamoto *et al.* 2000; Braithwaite *et al.* 2006). Allein diese wichtigen Funktionen der basischen Domäne, lassen eine sehr eingeschränkte Wirkungsweise der Isoformen p53 β und p53 γ vermuten.

Die Tetramerisierungsdomäne, die p53 β und p53 γ zum Großteil fehlt, ist nicht nur für die Oligomerisierung des Proteins - eine Voraussetzung für die DNA-Bindung - verantwortlich, sondern auch direkt und indirekt für die Interaktion mit anderen Proteinen (Chene 2001). Obwohl beispielsweise die Kinase Chk1 N-terminale Serinreste von p53 phosphoryliert, wird diese Phosphorylierung durch den Verlust der Tetramerisierungsdomäne von p53 verhindert (Shieh *et al.* 2000). Da der Verlust der Tetramerisierungs- und basischen Domäne in p53 β und p53 γ vermutlich den Verlust der Interaktion mit vielen p53-bindenden Proteinen nach sich zieht, ist es nicht wahrscheinlich, dass p53 β und p53 γ die Aktivität von wtp53 durch die Konkurrenz um Bindungspartner beeinflussen. So konnte bereits gezeigt werden, dass bei p53 β und p53 γ die Bindung an MDM2 (fast) vollständig unterbunden ist (Abb. 3-21). Da jedoch auch viele Proteine an p53 unabhängig von dessen Tetramerisierungs- und basischer Domäne binden, ist nicht auszuschließen, dass eine Bindung dieser Faktoren durch p53 β und p53 γ indirekt die Funktion von wtp53 beeinflusst.

Da p53 von zahlreichen Proteinen wie z.B. Chk1/2, ATM, ATR, p38 MAPK oder Kaseinkinase 1/2 phosphoryliert wird, wäre eine Analyse potentieller posttranslationaler Modifikationen von p53 β und p53 γ dahingehend aufschlussreich, als dass der Nachweis spezifischer Modifikationen ein Indiz für eine Wechselwirkung mit diesen Proteinen ist. Somit wäre ein Hinweis auf eine mögliche indirekte Beeinflussung von wtp53 gegeben. Die zusätzliche Expression von p53 β und p53 γ könnte die Verfügbarkeit der Enzyme einschränken und so deren Wirkung auf das funktionelle wtp53 vermindern.

Ein besonders interessanter Aspekt, der sich aus der vorliegenden Arbeit ergibt, ist die Rolle des C-Terminus für die mitochondriale Lokalisation von p53. Nur wtp53 kann in Mitochondrien-angereicherten Fraktionen nachgewiesen werden. Die spezifische Lokalisation von wtp53 ist also auf das Vorhandensein der basischen und/oder der Tetramerisierungsdomäne zurückzuführen. Es stellt sich daher die Frage, ob die Tetramerisierung von p53 eine Voraussetzung für dessen mitochondriale Lokalisation ist oder ob in der C-terminalen Domäne ein mitochondriales Lokalisationssignal vorhanden ist. Dieser Frage könnte zum einen durch Fusion der letzten 62 C-terminalen Aminosäuren an ein Markerprotein wie GFP und zum anderen mit Hilfe einer Oligomerisierungs-defizienten Punktmutante (Kubbutat *et al.* 1998) nachgegangen werden.

Es ist ebenso denkbar, dass die mRNA-Expression alternativer p53-Spleißvarianten *in vivo* zu einer geringeren Proteinexpression und damit verminderten Aktivität von wtp53 führt. p53 β und p53 γ könnten demnach eine inhibierende Funktion auf RNA-Ebene ausüben, indem die Menge regulär gespleißter mRNA aufgrund vermehrtem alternativen Spleißens reduziert wird.

4.13. *bak* ist ein Zielgen von p53

Die Analyse des Promotorbereichs des *bak1*-Genlokus führte zur Identifizierung dreier potentieller p53-Bindungsstellen. Um zu untersuchen, ob *bak* tatsächlich ein Zielgen von p53 ist und wenn ja, welche der drei potentiellen p53-Bindungsstellen entscheidend für die Regulation ist, wurden Reportergenplasmide zur Luciferase-Expression generiert. An das 5'-Ende der cDNA der Luciferase wurde eine DNA-Sequenz kloniert, welche alle drei p53-Bindungsstellen entweder unmutiert, einzeln mutiert oder gemeinsam mutiert, enthält. Anschließend wurde in HCT116/p53KO- und HeLa-Zellen die Luciferaseaktivität mit diesen Reportergenplasmiden und wtp53-Expressionsplasmiden analysiert (Abb. 3-24). Die Induktion der Luciferaseaktivität ausgehend vom Plasmid pGL3-Basic-p53-BS belegte in beiden Zelllinien eine p53-abhängige Regulation des *bak*-Promotors. Diese Induktion wurde durch die Mutation der p53-Bindungsstellen 1 und 2 nicht signifikant moduliert. Allerdings reduzierte die Mutation der dritten p53-Bindungsstelle die Luciferaseaktivität deutlich in beiden Zellsystemen. Die Mutation aller drei p53-Bindungsstellen führte zu einem vergleichbaren Resultat. Dieses Ergebnis, das in zwei Zellsystemen reproduziert wurde, zeigte nicht nur, dass *bak* p53-abhängig reguliert wird, sondern auch, dass die p53-Bindungsstelle 3 für diese Regulation entscheidend ist.

Durch eine detaillierte Analyse der Sequenz der p53-Bindungsstellen des *bak*-Promotors ist das praktisch ermittelte Ergebnis auch in einer theoretischen Vorhersage am wahrscheinlichsten. El-Deiry *et al.* (1992) identifizierten die p53-Bindungsstelle als Sequenz bestehend aus mindestens zwei Kopien der 10 Basenpaar langen Sequenz 5' PuPuPuC(A/T)(A/T)GPyPyPy 3', welche durch 0 – 13 Basenpaare voneinander getrennt sein dürfen. Später erkannte man aber, dass p53 an diese Konsensussequenz mit einer Insertion von 0 – 13 Basenpaaren zwar bindet, die Transaktivierung von Zielgenen jedoch am effektivsten ist, wenn diese Kopien nicht voneinander getrennt sind (Tokino *et al.* 1994). Dies ist bei den beiden p53-Bindungsstellen 2 und 3 der Fall (Abb. 3-23). Zudem ist das Vorhandensein des zentralen Cytosins und Guanins für die p53-Bindung essentiell. Eine Mutation in diesem Bereich wirkt sich dramatisch auf die p53-Bindung aus (el-Deiry *et al.* 1992). Lediglich in p53-Bindungsstelle 3 sind in beiden Kopien der p53-Konsensussequenz die zentralen Cytosin- und Guaninbasen vorhanden, obwohl die Sequenz in anderen Bereichen über insgesamt 3 abweichende Basen verfügt. Somit ist auch nach theoretischer Analyse der drei potentiellen p53-Bindungsstellen des *bak*-Promotors die dritte als bedeutendste zu bewerten.

Zudem konnte in einer Gel-Retardations-Analyse die Bindung von p53 an ein Oligonukleotid mit der Sequenz der dritten p53-Bindungsstelle des *bak*-Promotors durch die Bindung des anti-p53-Antikörpers PAb421 an diesen p53/DNA-Komplex gezeigt werden (Abb. 3-26).

Da bekannt ist, dass die beiden p53-Familienmitglieder p63 und p73 unter anderem auch an die p53-Konsensussequenz binden, wurde in weiteren Reporterstudien untersucht, inwiefern diese beiden Proteine die Transkription ausgehend vom *bak*-Promotor beeinflussen (Abb. 3-25).

Da die Ergebnisse für die beiden Zelllinien HCT116/p53KO und HeLa nicht konsistent sind, werden die Resultate beider Zelllinien einzeln diskutiert. TAp63 α hatte in HCT116/p53KO-Zellen keinen Einfluss auf die Luciferaseaktivität und kann damit nicht als Faktor, der die *bak*-Expression reguliert, eingestuft werden. Die Expression von TAp73 α hingegen induzierte die Luciferaseaktivität signifikant, die höchsten Werte wurden dabei mit dem Vektor pGL3-Basic-p53-BS erzielt. Die einzelne Mutation der p53-Bindungsstellen verminderte die Luciferaseaktivität verglichen zum unmutierten Promotorkonstrukt geringfügig, war jedoch zwischen den einzelnen Reporterplasmiden vergleichbar, so dass kein Rückschluss auf eine bevorzugte p53-Bindungsstelle gezogen werden kann. Die Mutation aller drei Bindungsstellen reduzierte die Luciferaseaktivität am deutlichsten. Dies deutet darauf hin, dass TAp73 α an jede der drei p53-Bindungsstellen bindet und deshalb die Mutation jeder einzelnen zu einer mäßigen Reduktion der Luciferaseaktivität führt. Die Mutation aller drei Bindungsstellen führt in der Konsequenz zu der deutlichsten Verminderung der Luciferaseaktivität.

In HeLa-Zellen hatte die Transfektion mit 0,5 μ g TAp63 α keinen Einfluss auf die Luciferaseaktivität. Allerdings wurde durch Transfektion von 1 μ g TAp63 α -Expressionsvektor die Luciferaseaktivität ausgehend vom *bak*-Promotorkonstrukt ausgeprägt induziert. Möglicherweise wurde durch die Transfektion von 1 μ g TAp63 α ein Schwellenwert überschritten. Allerdings wirkte sich die Mutation einzelner p53-Bindungsstellen ebenso wie die Mutation aller drei p53-Bindungsstellen nicht auf diese Induktion aus, so dass der Schluss nahe liegt, dass TAp63 α die *bak*-Transkription ausgehend von einer Konsensussequenz innerhalb der *bak*-Promotorsequenz reguliert, die sich von den drei p53-Bindungsstellen unterscheidet. TAp73 α führte wie auch in den HCT116/p53KO-Zellen zu einer Induktion der Luciferaseaktivität, wobei die Mutation der p53-Bindungsstelle 1, ebenso wie die Mutation aller drei p53-Bindungsstellen gemeinsam die Luciferaseaktivität am deutlichsten reduzierte.

Die Ergebnisse lassen keine eindeutige Schlussfolgerung bezüglich der Rolle von TAp63 α bei der Regulation des *bak*-Promotors zu. Um dies bewerten zu können, sollten weitere Analysen wie z.B. *Real-Time* PCR hinzugezogen werden. Die Induktion durch TAp73 α erscheint hingegen sehr wahrscheinlich. Allerdings ist eine Aussage darüber, welche der p53-Bindungsstellen die Schlüsselrolle für die Bindung von TAp73 α spielt,

schwierig. Sicher ist, dass eine Mutation aller drei Bindungsstellen die Induktion von *bak* durch TAp73 α reduziert.

4.14. Die Regulation des *bak*-Promotors: Ein Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wird *bak* erstmals als Zielgen von p53 beschrieben. Die in theoretischen Analysen identifizierten p53-Bindungsstellen innerhalb der *bak*-Promotorsequenz wurden mit Hilfe von Mutationsstudien an Reportergenplasmiden erfolgreich charakterisiert. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Regulation des *bak*-Promotors nicht nur durch p53, sondern auch durch TAp73 α erfolgt. Für die p53-vermittelte Regulation ist die p53-Bindungsstelle 3 von essentieller Bedeutung, wohingegen vermutlich die p53-Bindungsstelle 1 in die Regulation durch TAp73 α involviert ist. Diese Befunde sind eine hervorragende Grundlage für weitere Analysen. Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) zur Verifikation der p53-Bindung an die beschriebenen Bindungsstellen könnten die vorgelegten Daten erhärten. Abgesehen von den Reportergenanalysen (Abb. 3-24) geben die in Abb. 3-7 gezeigten Western Blot Analysen einen weiteren Hinweis auf eine p53-vermittelte *bak*-Regulation. Dort wird eine leichte Erhöhung der Bak-Expression nach der Induktion eines DNA-Schadens detektiert. Diese Erhöhung im Expressionsniveau ist nach wtp53-Stabilisierung für Bak sogar eindeutiger nachzuweisen als für das anerkannte p53-Zielgen *bax*. Neben Reportergen- und Western Blot Analysen wäre der Nachweis der p53-vermittelten Induktion der *bak*-Expression mittels quantitativer *Real-Time* PCR sensitiver und könnte die beschriebenen Beobachtungen weiter untermauern. Diese Analysen könnten beispielsweise in den isogenen Zelllinien HCT116/wt und HCT116/p53KO durchgeführt werden.

5. Zusammenfassung

2005 beschrieben Bourdon *et al.* die Expression von insgesamt neun humanen p53-Isoformen. Die Proteine p53 β , Δ 40p53 β und Δ 133p53 β wurden durch die Verwendung eines gegen den spezifischen C-Terminus der Proteine gerichteten Antikörpers nachgewiesen (Bourdon *et al.* 2005; Murray-Zmijewski *et al.* 2006). Zudem beschrieben die Autoren, dass p53 β DNA bindet, mit wtp53 (p53 α) interagiert und die wtp53-regulierte Transkription ausgehend von einem *bax*-Promotorkonstrukt unter Stressbedingungen positiv reguliert. Für die N-terminal verkürzten Isoformen Δ 40p53 und Δ 133p53 ist ein dominant-negativer Effekt gegenüber wtp53 bekannt (Courtois *et al.* 2002; Ghosh *et al.* 2004; Murray-Zmijewski *et al.* 2006).

Da im Gegensatz zu den zahlreichen Studien über den Einfluss posttranslationaler Modifikationen auf die Aktivität von wtp53 sehr wenig über die Funktion der p53-Isoformen bekannt ist, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die beiden p53-Isoformen p53 β und p53 γ im Vergleich zu wtp53 zu charakterisieren. Dazu wurden klonale RKO-Zelllinien generiert, welche die Flag-markierten Transgene wtp53, p53 β und p53 γ gemeinsam mit endogenem wtp53 stabil exprimieren. Mit Hilfe dieser Klone wurde der Einfluss von p53 β und p53 γ auf wtp53-regulierte Signalwege wie Apoptose, Zellzyklusarrest und Seneszenz untersucht. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Isoformen p53 β und p53 γ durch den Verlust der Tetramerisierungs- und basischen Domäne nicht mit wtp53 interagieren und ebenso die Fähigkeit verloren haben, DNA zu binden. Aufgrund dieser Fehlfunktion können sie nicht wie wtp53 als Transkriptionsfaktor fungieren und auch die Aktivität von wtp53 nicht direkt beeinflussen. Im Gegensatz zu wtp53 konnten p53 β und p53 γ auch nicht an den Mitochondrien nachgewiesen werden, was ihre Beteiligung an einem p53-vermittelten Transkriptions-unabhängigen Signalweg ausschließt. Allerdings könnten p53 β und p53 γ einen indirekten Einfluss auf wtp53 durch die Konkurrenz um die Bindung von Kofaktoren ausüben. Ebenso kann ihre Expression auf mRNA-Ebene zu einer Verringerung der wtp53-Expression und damit zu einer Reduktion der wtp53-Aktivität führen.

Neben der Untersuchung der Funktion einiger der 2005 beschriebenen p53-Isoformen war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, Zielgene von p53 innerhalb der Bcl-2-Proteinfamilie zu identifizieren. Abgesehen von den BH3-only Proteinen Noxa, Puma und Bid war *bax* bereits 1995 als Zielgen von p53 im Menschen beschrieben worden (Miyashita und Reed 1995). Die Promotorsequenz des homologen Multidomänenproteins Bak wurde daher auf potentielle p53-Bindungsstellen untersucht. Tatsächlich konnten bei der Promotoranalyse des *bak1*-Genlokus drei potentielle p53-Bindungsstellen identifiziert werden. Eine Reporteranalyse verifizierte die p53-abhängige Transaktivierung des *bak*-Promotorkonstrukts und identifizierte

zugleich die für die Aktivierung der Transkription entscheidende p53-Bindungsstelle, an welche eine Bindung von p53 nachgewiesen werden konnte.

Summary

In 2005 Bourdon *et al.* revealed that nine isoforms can be expressed from the human *p53* gene locus. The proteins p53 β , Δ 40p53 β and Δ 133p53 β were detected in several human carcinoma cell lines by using an antibody directed against the specific C-terminus of these proteins (Bourdon *et al.* 2005; Murray-Zmijewski *et al.* 2006). The authors further described binding of p53 β to DNA, an interaction of p53 β with wtp53 (p53 α) and the positive regulation of stress-induced wtp53-mediated transactivation of a *bax* promoter construct by p53 β . The N-terminally truncated isoforms Δ 40p53 and Δ 133p53 exhibit a dominant-negative effect towards wtp53 (Courtois *et al.* 2002; Ghosh *et al.* 2004; Murray-Zmijewski *et al.* 2006).

In contrast to an overwhelming knowledge concerning the influence of multiple posttranslational modifications on the activity and function of the tumour suppressor protein p53, there is clearly a paucity of information on the role of alternatively spliced p53 isoforms in these processes. Therefore, the present study aimed to characterize the two isoforms p53 β and p53 γ in comparison to wtp53. To this end RKO cell lines were generated stably expressing Flag-tagged versions of wtp53, p53 β and p53 γ together with the endogenous wtp53 protein. By the use of these cell lines the influence of p53 β and p53 γ on wtp53-regulated signalling pathways like apoptosis, cell cycle arrest and senescence was analyzed. The presented data reveal that due to their loss of the tetramerization and basic domain p53 β and p53 γ are virtually unable to interact with wtp53 or bind to DNA. Consequently and in contrast to wtp53, they cannot act as a transcription factor or directly influence the activity of wtp53. As, unlike wtp53, both C-terminally truncated p53 isoforms do also not translocate to mitochondria upon stress induction, these data provide strong evidence that p53 β and p53 γ do neither modulate transcription-dependent nor –independent events mediated by wtp53. Nevertheless, it is still possible that p53 β and p53 γ indirectly influence the function of the wtp53 protein by competing for the binding of cofactors. Similarly, their expression on the mRNA level may lead to a reduced wtp53 expression and thereby to a decrease in wtp53 activity.

In addition to the analysis of p53 isoforms, another aim of this work was the identification of novel p53 target genes within the Bcl-2 protein family. Besides the BH3-only proteins Noxa, Puma and Bid *bax* was described to be a target gene of p53 in humans (Miyashita und Reed 1995). Therefore the promoter sequence of the homologous protein Bak was analyzed and indeed, three potential p53 binding sites could be identified. The p53-dependent transactivation of a *bak* promoter construct and the p53 binding site responsible for it were

verified by reporter gene studies. Furthermore, binding of p53 to the p53 binding site critical for transactivation could be demonstrated.

6. Referenzen

- Aballay, A. und Ausubel, F.M. 2001. Programmed cell death mediated by ced-3 and ced-4 protects *Caenorhabditis elegans* from *Salmonella typhimurium*-mediated killing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(5): 2735-2739.
- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X. und Akey, C.W. 2002. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* **9**(2): 423-432.
- Adams, J.M. und Cory, S. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* **26**(9): 1324-1337.
- Almog, N., Goldfinger, N. und Rotter, V. 2000. p53-dependent apoptosis is regulated by a C-terminally alternatively spliced form of murine p53. *Oncogene* **19**(30): 3395-3403.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. und Yuan, J. 1996. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**(2): 171.
- An, W., Kim, J. und Roeder, R.G. 2004. Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. *Cell* **117**(6): 735-748.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Lauper, S., Eskes, R. und Martinou, J.C. 2000. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* **345 Pt 2**: 271-278.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B. und Martinou, J.C. 2001. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* **276**(15): 11615-11623.
- Appella, E. und Anderson, C.W. 2001. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* **268**(10): 2764-2772.
- Arai, N., Nomura, D., Yokota, K., Wolf, D., Brill, E., Shohat, O. und Rotter, V. 1986. Immunologically distinct p53 molecules generated by alternative splicing. *Mol Cell Biol* **6**(9): 3232-3239.
- Ashkenazi, A. und Dixit, V.M. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**(5381): 1305-1308.
- Bakalkin, G., Yakovleva, T., Selivanova, G., Magnusson, K.P., Szekely, L., Kiseleva, E., Klein, G., Terenius, L. und Wiman, K.G. 1994. p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(1): 413-417.
- Balagurumorthy, P., Sakamoto, H., Lewis, M.S., Zambrano, N., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Appella, E. und Harrington, R.E. 1995. Four p53 DNA-binding domain peptides bind natural p53-response elements and bend the DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(19): 8591-8595.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y. und Ziv, Y. 1998. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* **281**(5383): 1674-1677.
- Baptiste, N., Friedlander, P., Chen, X. und Prives, C. 2002. The proline-rich domain of p53 is required for cooperation with anti-neoplastic agents to promote apoptosis of tumor cells. *Oncogene* **21**(1): 9-21.
- Barlev, N.A., Liu, L., Chehab, N.H., Mansfield, K., Harris, K.G., Halazonetis, T.D. und Berger, S.L. 2001. Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell* **8**(6): 1243-1254.
- Benard, J., Douc-Rasy, S. und Ahomadegbe, J.C. 2003. TP53 family members and human cancers. *Hum Mutat* **21**(3): 182-191.
- Bhardwaj, A. und Aggarwal, B.B. 2003. Receptor-mediated choreography of life and death. *J Clin Immunol* **23**(5): 317-332.
- Boatright, K.M., Rensatus, M., Scott, F.L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I.M., Ricci, J.E., Edris, W.A., Sutherland, D.P., Green, D.R. und Salvesen, G.S. 2003. A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* **11**(2): 529-541.
- Bode, A.M. und Dong, Z. 2004. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* **4**(10): 793-805.
- Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G. und Thompson, C.B. 1993. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* **74**(4): 597-608.
- Bourdon, J.C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D.P., Saville, M.K. und Lane, D.P. 2005. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* **19**(18): 2122-2137.

- Boya, P., Gonzalez-Polo, R.A., Casares, N., Perfettini, J.L., Dessen, P., Larochette, N., Metivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., Pierron, G., Codogno, P. und Kroemer, G. 2005. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* **25**(3): 1025-1040.
- Boyd, S.D., Tsai, K.Y. und Jacks, T. 2000. An intact HDM2 RING-finger domain is required for nuclear exclusion of p53. *Nat Cell Biol* **2**(9): 563-568.
- Braithwaite, A.W., Del Sal, G. und Lu, X. 2006. Some p53-binding proteins that can function as arbiters of life and death. *Cell Death Differ* **13**(6): 984-993.
- Brattain, M.G., Fine, W.D., Khaled, F.M., Thompson, J. und Brattain, D.E. 1981. Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res* **41**(5): 1751-1756.
- Brattain, M.G., Levine, A.E., Chakrabarty, S., Yeoman, L.C., Willson, J.K. und Long, B. 1984. Heterogeneity of human colon carcinoma. *Cancer Metastasis Rev* **3**(3): 177-191.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W. und Vogelstein, B. 1998. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* **282**(5393): 1497-1501.
- Cain, K., Bratton, S.B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D.G., Sun, X.M. und Cohen, G.M. 2000. Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem* **275**(9): 6067-6070.
- Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B. und Siliciano, J.D. 1998. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* **281**(5383): 1677-1679.
- Caron de Fromental, C. und Soussi, T. 1992. TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer* **4**(1): 1-15.
- Carter, S., Bischof, O., Dejean, A. und Vousden, K.H. 2007. C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53. *Nat Cell Biol* **9**(4): 428-435.
- Cartron, P.F., Gallenne, T., Bougras, G., Gautier, F., Manero, F., Vusio, P., Meflah, K., Vallette, F.M. und Juin, P. 2004. The first alpha helix of Bax plays a necessary role in its ligand-induced activation by the BH3-only proteins Bid and PUMA. *Mol Cell* **16**(5): 807-818.
- Casciano, I., Mazzocco, K., Boni, L., Pagnan, G., Banelli, B., Allemanni, G., Ponzoni, M., Tonini, G.P. und Romani, M. 2002. Expression of DeltaNp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients. *Cell Death Differ* **9**(3): 246-251.
- Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Mosley, B., Nelson, N., Van Ness, K., Greenstreet, T.A., March, C.J., Kronheim, S.R., Druck, T., Cannizzaro, L.A. und et al. 1992. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* **256**(5053): 97-100.
- Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S.A. und Letai, A. 2006. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* **9**(5): 351-365.
- Chai, J., Wu, Q., Shiozaki, E., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S. und Shi, Y. 2001. Crystal structure of a procaspase-7 zymogen: mechanisms of activation and substrate binding. *Cell* **107**(3): 399-407.
- Chan, S.W. und Blackburn, E.H. 2002. New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene* **21**(4): 553-563.
- Chan, W.M., Mak, M.C., Fung, T.K., Lau, A., Siu, W.Y. und Poon, R.Y. 2006. Ubiquitination of p53 at multiple sites in the DNA-binding domain. *Mol Cancer Res* **4**(1): 15-25.
- Chang, B.D., Swift, M.E., Shen, M., Fang, J., Broude, E.V. und Roninson, I.B. 2002a. Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1): 389-394.
- Chang, D.W., Xing, Z., Capacio, V.L., Peter, M.E. und Yang, X. 2003. Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *Embo J* **22**(16): 4132-4142.
- Chang, D.W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B.C., Yaish-Ohad, S., Peter, M.E. und Yang, X. 2002b. c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *Embo J* **21**(14): 3704-3714.
- Chehab, N.H., Malikzay, A., Stavridi, E.S. und Halazonetis, T.D. 1999. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(24): 13777-13782.
- Chen, D., Kon, N., Li, M., Zhang, W., Qin, J. und Gu, W. 2005a. ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* **121**(7): 1071-1083.
- Chen, G. und Goeddel, D.V. 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* **296**(5573): 1634-1635.
- Chen, J., Marechal, V. und Levine, A.J. 1993. Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol* **13**(7): 4107-4114.

- Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M. und Huang, D.C. 2005b. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* **17**(3): 393-403.
- Chene, P. 2001. The role of tetramerization in p53 function. *Oncogene* **20**(21): 2611-2617.
- Cheng, E.H., Wei, M.C., Weiler, S., Flavell, R.A., Mak, T.W., Lindsten, T. und Korsmeyer, S.J. 2001. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* **8**(3): 705-711.
- Chipuk, J.E., Bouchier-Hayes, L., Kuwana, T., Newmeyer, D.D. und Green, D.R. 2005. PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* **309**(5741): 1732-1735.
- Chipuk, J.E. und Green, D.R. 2006. Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ* **13**(6): 994-1002.
- Chipuk, J.E., Maurer, U., Green, D.R. und Schuler, M. 2003. Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. *Cancer Cell* **4**(5): 371-381.
- Chow, V.T., Quek, H.H. und Tock, E.P. 1993. Alternative splicing of the p53 tumor suppressor gene in the Molt-4 T-lymphoblastic leukemia cell line. *Cancer Lett* **73**(2-3): 141-148.
- Collins, C.J. und Sedivy, J.M. 2003. Involvement of the INK4a/Arf gene locus in senescence. *Aging Cell* **2**(3): 145-150.
- Concin, N., Becker, K., Slade, N., Erster, S., Mueller-Holzner, E., Ulmer, H., Daxenbichler, G., Zeimet, A., Zeillinger, R., Marth, C. und Moll, U.M. 2004. Transdominant DeltaTAp73 isoforms are frequently up-regulated in ovarian cancer. Evidence for their role as epigenetic p53 inhibitors in vivo. *Cancer Res* **64**(7): 2449-2460.
- Courtois, S., Verhaegh, G., North, S., Luciani, M.G., Lassus, P., Hibner, U., Oren, M. und Hainaut, P. 2002. DeltaN-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53. *Oncogene* **21**(44): 6722-6728.
- Cuconati, A., Mukherjee, C., Perez, D. und White, E. 2003. DNA damage response and MCL-1 destruction initiate apoptosis in adenovirus-infected cells. *Genes Dev* **17**(23): 2922-2932.
- De Laurenzi, V., Costanzo, A., Barcaroli, D., Terrinoni, A., Falco, M., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Levrero, M. und Melino, G. 1998. Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. *J Exp Med* **188**(9): 1763-1768.
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M.A. und Yuan, J. 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* **1**(2): 112-119.
- Deng, J., Carlson, N., Takeyama, K., Dal Cin, P., Shipp, M. und Letai, A. 2007. BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Cell* **12**(2): 171-185.
- Dilley, T.K., Bowden, G.T. und Chen, Q.M. 2003. Novel mechanisms of sublethal oxidant toxicity: induction of premature senescence in human fibroblasts confers tumor promoter activity. *Exp Cell Res* **290**(1): 38-48.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. und et al. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(20): 9363-9367.
- Dohn, M., Zhang, S. und Chen, X. 2001. p63alpha and DeltaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene* **20**(25): 3193-3205.
- Donepudi, M., Mac Sweeney, A., Briand, C. und Grutter, M.G. 2003. Insights into the regulatory mechanism for caspase-8 activation. *Mol Cell* **11**(2): 543-549.
- Dornan, D., Shimizu, H., Burch, L., Smith, A.J. und Hupp, T.R. 2003. The proline repeat domain of p53 binds directly to the transcriptional coactivator p300 and allosterically controls DNA-dependent acetylation of p53. *Mol Cell Biol* **23**(23): 8846-8861.
- Dornan, D., Wertz, I., Shimizu, H., Arnott, D., Frantz, G.D., Dowd, P., O'Rourke, K., Koeppen, H. und Dixit, V.M. 2004. The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature* **429**(6987): 86-92.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. und Wang, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**(1): 33-42.
- Dumaz, N., Milne, D.M. und Meek, D.W. 1999. Protein kinase CK1 is a p53-threonine 18 kinase which requires prior phosphorylation of serine 15. *FEBS Lett* **463**(3): 312-316.
- Dumont, P., Leu, J.I., Della Pietra, A.C., 3rd, George, D.L. und Murphy, M. 2003. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* **33**(3): 357-365.
- el-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W. und Vogelstein, B. 1992. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* **1**(1): 45-49.

- 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. und Vogelstein, B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**(4): 817-825.
- Ellis, R.E., Yuan, J.Y. und Horvitz, H.R. 1991. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* **7**: 663-698.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. und Nagata, S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**(6662): 43-50.
- Erster, S. und Moll, U.M. 2004. Stress-induced p53 runs a direct mitochondrial death program: its role in physiologic and pathophysiologic stress responses in vivo. *Cell Cycle* **3**(12): 1492-1495.
- Essmann, F., Engels, I.H., Totzke, G., Schulze-Osthoff, K. und Janicke, R.U. 2004. Apoptosis resistance of MCF-7 breast carcinoma cells to ionizing radiation is independent of p53 and cell cycle control but caused by the lack of caspase-3 and a caffeine-inhibitable event. *Cancer Res* **64**(19): 7065-7072.
- Essmann, F., Pohlmann, S., Gillissen, B., Daniel, P.T., Schulze-Osthoff, K. und Janicke, R.U. 2005. Irradiation-induced translocation of p53 to mitochondria in the absence of apoptosis. *J Biol Chem* **280**(44): 37169-37177.
- Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L. und Henson, P.M. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* **148**(7): 2207-2216.
- Felix, C.A., Nau, M.M., Takahashi, T., Mitsudomi, T., Chiba, I., Poplack, D.G., Reaman, G.H., Cole, D.E., Letterio, J.J., Whang-Peng, J. und et al. 1992. Hereditary and acquired p53 gene mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* **89**(2): 640-647.
- Fillippovich, I., Sorokina, N., Gatei, M., Haupt, Y., Hobson, K., Moallem, E., Spring, K., Mould, M., McGuckin, M.A., Lavin, M.F. und Khanna, K.K. 2001. Transactivation-deficient p73alpha (p73Deltaexon2) inhibits apoptosis and competes with p53. *Oncogene* **20**(4): 514-522.
- Fiscella, M., Ullrich, S.J., Zambrano, N., Shields, M.T., Lin, D., Lees-Miller, S.P., Anderson, C.W., Mercer, W.E. und Appella, E. 1993. Mutation of the serine 15 phosphorylation site of human p53 reduces the ability of p53 to inhibit cell cycle progression. *Oncogene* **8**(6): 1519-1528.
- Fischer, U., Janicke, R.U. und Schulze-Osthoff, K. 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* **10**(1): 76-100.
- Flaman, J.M., Waridel, F., Estreicher, A., Vannier, A., Limacher, J.M., Gilbert, D., Iggo, R. und Frebourg, T. 1996. The human tumour suppressor gene p53 is alternatively spliced in normal cells. *Oncogene* **12**(4): 813-818.
- Fortin, A., Cregan, S.P., MacLaurin, J.G., Kushwaha, N., Hickman, E.S., Thompson, C.S., Hakim, A., Albert, P.R., Cecconi, F., Helin, K., Park, D.S. und Slack, R.S. 2001. APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death. *J Cell Biol* **155**(2): 207-216.
- Freedman, D.A., Wu, L. und Levine, A.J. 1999. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci* **55**(1): 96-107.
- French, L.E. und Tschopp, J. 2003. Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. *Cell Death Differ* **10**(1): 117-123.
- Friedlander, P., Haupt, Y., Prives, C. und Oren, M. 1996. A mutant p53 that discriminates between p53-responsive genes cannot induce apoptosis. *Mol Cell Biol* **16**(9): 4961-4971.
- Fuentes-Prior, P. und Salvesen, G.S. 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* **384**(Pt 2): 201-232.
- Geyer, R.K., Yu, Z.K. und Maki, C.G. 2000. The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export. *Nat Cell Biol* **2**(9): 569-573.
- Ghosh, A., Stewart, D. und Matlashewski, G. 2004. Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. *Mol Cell Biol* **24**(18): 7987-7997.
- Gire, V., Roux, P., Wynford-Thomas, D., Brondello, J.M. und Dulic, V. 2004. DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *Embo J* **23**(13): 2554-2563.
- Gisselsson, D. 2003. Chromosome instability in cancer: how, when, and why? *Adv Cancer Res* **87**: 1-29.
- Gottifredi, V., Karni-Schmidt, O., Shieh, S.S. und Prives, C. 2001. p53 down-regulates CHK1 through p21 and the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* **21**(4): 1066-1076.
- Griffiths, G.J., Corfe, B.M., Savory, P., Leech, S., Esposti, M.D., Hickman, J.A. und Dive, C. 2001. Cellular damage signals promote sequential changes at the N-terminus and BH-1 domain of the pro-apoptotic protein Bak. *Oncogene* **20**(52): 7668-7676.
- Griffiths, G.J., Dubrez, L., Morgan, C.P., Jones, N.A., Whitehouse, J., Corfe, B.M., Dive, C. und Hickman, J.A. 1999. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* **144**(5): 903-914.

- Grinnell, F. 2003. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol* **13**(5): 264-269.
- Gu, L., Zhu, N., Findley, H.W., Woods, W.G. und Zhou, M. 2004. Identification and characterization of the IKK α promoter: positive and negative regulation by ETS-1 and p53, respectively. *J Biol Chem* **279**(50): 52141-52149.
- Gu, W. und Roeder, R.G. 1997. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**(4): 595-606.
- Han, K.A. und Kulesz-Martin, M.F. 1992. Alternatively spliced p53 RNA in transformed and normal cells of different tissue types. *Nucleic Acids Res* **20**(8): 1979-1981.
- Harms, K.L. und Chen, X. 2005. The C terminus of p53 family proteins is a cell fate determinant. *Mol Cell Biol* **25**(5): 2014-2030.
- Harms, K.L. und Chen, X. 2006. The functional domains in p53 family proteins exhibit both common and distinct properties. *Cell Death Differ* **13**(6): 890-897.
- Hausmann, G., O'Reilly, L.A., van Driel, R., Beaumont, J.G., Strasser, A., Adams, J.M. und Huang, D.C. 2000. Pro-apoptotic apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-x(L). *J Cell Biol* **149**(3): 623-634.
- Hayflick, L. 1965. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* **37**: 614-636.
- Helton, E.S., Zhu, J. und Chen, X. 2006. The unique NH₂-terminally deleted (DeltaN) residues, the PXXP motif, and the PPXY motif are required for the transcriptional activity of the DeltaN variant of p63. *J Biol Chem* **281**(5): 2533-2542.
- Hengartner, M.O. und Horvitz, H.R. 1994. C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. *Cell* **76**(4): 665-676.
- Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P., Chen, D.J. und Sedivy, J.M. 2004. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* **14**(4): 501-513.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W. und Vogelstein, B. 1997. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* **1**(1): 3-11.
- Hinds, M.G., Lackmann, M., Skea, G.L., Harrison, P.J., Huang, D.C. und Day, C.L. 2003. The structure of Bcl-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity. *Embo J* **22**(7): 1497-1507.
- Hirao, A., Kong, Y.Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S.J. und Mak, T.W. 2000. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* **287**(5459): 1824-1827.
- Hoffman, W.H., Biade, S., Zilfou, J.T., Chen, J. und Murphy, M. 2002. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem* **277**(5): 3247-3257.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. und Harris, C.C. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science* **253**(5015): 49-53.
- Honda, R. und Yasuda, H. 1999. Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *Embo J* **18**(1): 22-27.
- Horvitz, H.R., Shaham, S. und Hengartner, M.O. 1994. The genetics of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **59**: 377-385.
- Hsu, C.H., Chang, M.D., Tai, K.Y., Yang, Y.T., Wang, P.S., Chen, C.J., Wang, Y.H., Lee, S.C., Wu, C.W. und Juan, L.J. 2004. HCMV IE2-mediated inhibition of HAT activity downregulates p53 function. *Embo J* **23**(11): 2269-2280.
- Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G. und Goeddel, D.V. 1996. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* **84**(2): 299-308.
- Hsu, Y.T., Wolter, K.G. und Youle, R.J. 1997. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(8): 3668-3672.
- Hsu, Y.T. und Youle, R.J. 1998. Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem* **273**(17): 10777-10783.
- Hu, Y., Ding, L., Spencer, D.M. und Nunez, G. 1998. WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem* **273**(50): 33489-33494.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J.L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L.E. und Tschopp, J. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* **388**(6638): 190-195.
- Ito, A., Kawaguchi, Y., Lai, C.H., Kovacs, J.J., Higashimoto, Y., Appella, E. und Yao, T.P. 2002. MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *Embo J* **21**(22): 6236-6245.

- Ito, A., Lai, C.H., Zhao, X., Saito, S., Hamilton, M.H., Appella, E. und Yao, T.P. 2001. p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *Embo J* **20**(6): 1331-1340.
- Janicke, R.U., Sprengart, M.L., Wati, M.R. und Porter, A.G. 1998. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* **273**(16): 9357-9360.
- Jayaraman, J. und Prives, C. 1995. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by short single strands of DNA requires the p53 C-terminus. *Cell* **81**(7): 1021-1029.
- Jayaraman, L. und Prives, C. 1999. Covalent and noncovalent modifiers of the p53 protein. *Cell Mol Life Sci* **55**(1): 76-87.
- Jiang, X. und Wang, X. 2000. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem* **275**(40): 31199-31203.
- Jones, S.N., Roe, A.E., Donehower, L.A. und Bradley, A. 1995. Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* **378**(6553): 206-208.
- Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., Ferri, K.F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y.Y., Mak, T.W., Zuniga-Pflucker, J.C., Kroemer, G. und Penninger, J.M. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* **410**(6828): 549-554.
- Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J.M., Dumont, X., Ferrara, P., McKeon, F. und Caput, D. 1997. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* **90**(4): 809-819.
- Kang, B.H., Ko, E., Kwon, O.K. und Choi, K.Y. 2002. The structure of procaspase 6 is similar to that of active mature caspase 6. *Biochem J* **364**(Pt 3): 629-634.
- Kapoor, M., Hamm, R., Yan, W., Taya, Y. und Lozano, G. 2000. Cooperative phosphorylation at multiple sites is required to activate p53 in response to UV radiation. *Oncogene* **19**(3): 358-364.
- Karin, M. und Lin, A. 2002. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* **3**(3): 221-227.
- Kastan, M.B., Zhan, Q., el-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B. und Fornace, A.J., Jr. 1992. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* **71**(4): 587-597.
- Kaufmann, T., Schlipf, S., Sanz, J., Neubert, K., Stein, R. und Borner, C. 2003. Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* **160**(1): 53-64.
- Keller, D., Zeng, X., Li, X., Kapoor, M., Iordanov, M.S., Taya, Y., Lozano, G., Magun, B. und Lu, H. 1999. The p38MAPK inhibitor SB203580 alleviates ultraviolet-induced phosphorylation at serine 389 but not serine 15 and activation of p53. *Biochem Biophys Res Commun* **261**(2): 464-471.
- Keller, D.M., Zeng, X., Wang, Y., Zhang, Q.H., Kapoor, M., Shu, H., Goodman, R., Lozano, G., Zhao, Y. und Lu, H. 2001. A DNA damage-induced p53 serine 392 kinase complex contains CK2, hSpt16, and SSRP1. *Mol Cell* **7**(2): 283-292.
- Kerr, J.F., Winterford, C.M. und Harmon, B.V. 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* **73**(8): 2013-2026.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. und Currie, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**(4): 239-257.
- Khanna, K.K., Keating, K.E., Kozlov, S., Scott, S., Gatei, M., Hobson, K., Taya, Y., Gabrielli, B., Chan, D., Lees-Miller, S.P. und Lavin, M.F. 1998. ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet* **20**(4): 398-400.
- Khosravi, R., Maya, R., Gottlieb, T., Oren, M., Shiloh, Y. und Shkedy, D. 1999. Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(26): 14973-14977.
- Kim, E. und Deppert, W. 2006. The versatile interactions of p53 with DNA: when flexibility serves specificity. *Cell Death Differ* **13**(6): 885-889.
- Kim, E., Gunther, W., Yoshizato, K., Meissner, H., Zapf, S., Nusing, R.M., Yamamoto, H., Van Meir, E.G., Deppert, W. und Giese, A. 2003. Tumor suppressor p53 inhibits transcriptional activation of invasion gene thromboxane synthase mediated by the proto-oncogenic factor ets-1. *Oncogene* **22**(49): 7716-7727.
- Kim, H., Rafiuddin-Shah, M., Tu, H.C., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J. und Cheng, E.H. 2006. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol* **8**(12): 1348-1358.

- Kirchhoff, S., Muller, W.W., Krueger, A., Schmitz, I. und Krammer, P.H. 2000a. TCR-mediated up-regulation of c-FLIPshort correlates with resistance toward CD95-mediated apoptosis by blocking death-inducing signaling complex activity. *J Immunol* **165**(11): 6293-6300.
- Kirchhoff, S., Muller, W.W., Li-Weber, M. und Krammer, P.H. 2000b. Up-regulation of c-FLIPshort and reduction of activation-induced cell death in CD28-costimulated human T cells. *Eur J Immunol* **30**(10): 2765-2774.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H. und Peter, M.E. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* **14**(22): 5579-5588.
- Kobet, E., Zeng, X., Zhu, Y., Keller, D. und Lu, H. 2000. MDM2 inhibits p300-mediated p53 acetylation and activation by forming a ternary complex with the two proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(23): 12547-12552.
- Krajewski, S., Tanaka, S., Takayama, S., Schibler, M.J., Fenton, W. und Reed, J.C. 1993. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res* **53**(19): 4701-4714.
- Krtolica, A. und Campisi, J. 2002. Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int J Biochem Cell Biol* **34**(11): 1401-1414.
- Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.Y. und Campisi, J. 2001. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(21): 12072-12077.
- Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Krammer, P.H. und Kirchhoff, S. 2001. Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* **276**(23): 20633-20640.
- Kubbutat, M.H., Ludwig, R.L., Ashcroft, M. und Vousden, K.H. 1998. Regulation of Mdm2-directed degradation by the C terminus of p53. *Mol Cell Biol* **18**(10): 5690-5698.
- Kubbutat, M.H. und Vousden, K.H. 1997. Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability. *Mol Cell Biol* **17**(1): 460-468.
- Kuhnel, F., Zender, L., Wirth, T., Schulte, B., Trautwein, C., Manns, M. und Kubicka, S. 2004. Tumor-specific adenoviral gene therapy: transcriptional repression of gene expression by utilizing p53-signal transduction pathways. *Cancer Gene Ther* **11**(1): 28-40.
- Kulesz-Martin, M.F., Lisafeld, B., Huang, H., Kisiel, N.D. und Lee, L. 1994. Endogenous p53 protein generated from wild-type alternatively spliced p53 RNA in mouse epidermal cells. *Mol Cell Biol* **14**(3): 1698-1708.
- Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B.A., Green, D.R. und Newmeyer, D.D. 2005. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* **17**(4): 525-535.
- Kuwana, T., Mackey, M.R., Perkins, G., Ellisman, M.H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D.R. und Newmeyer, D.D. 2002. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* **111**(3): 331-342.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685.
- Lane, D.P. und Crawford, L.V. 1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**(5701): 261-263.
- Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G. und Earnshaw, W.C. 1994. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**(6495): 346-347.
- Lee, D., Kim, J.W., Seo, T., Hwang, S.G., Choi, E.J. und Choe, J. 2002. SWI/SNF complex interacts with tumor suppressor p53 and is necessary for the activation of p53-mediated transcription. *J Biol Chem* **277**(25): 22330-22337.
- Lee, K.C., Crowe, A.J. und Barton, M.C. 1999. p53-mediated repression of alpha-fetoprotein gene expression by specific DNA binding. *Mol Cell Biol* **19**(2): 1279-1288.
- Lee, S., Elenbaas, B., Levine, A. und Griffith, J. 1995. p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell* **81**(7): 1013-1020.
- Leng, R.P., Lin, Y., Ma, W., Wu, H., Lemmers, B., Chung, S., Parant, J.M., Lozano, G., Hakem, R. und Benchimol, S. 2003. Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell* **112**(6): 779-791.
- Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S. und Korsmeyer, S.J. 2002. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2**(3): 183-192.
- Leu, J.I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E. und George, D.L. 2004. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* **6**(5): 443-450.

- Levine, B. und Yuan, J. 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* **115**(10): 2679-2688.
- Li, B. und Lee, M.Y. 2001. Transcriptional regulation of the human DNA polymerase delta catalytic subunit gene POLD1 by p53 tumor suppressor and Sp1. *J Biol Chem* **276**(32): 29729-29739.
- Li, L.Y., Luo, X. und Wang, X. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**(6842): 95-99.
- Li, M., Brooks, C.L., Wu-Baer, F., Chen, D., Baer, R. und Gu, W. 2003. Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* **302**(5652): 1972-1975.
- Li, M., Luo, J., Brooks, C.L. und Gu, W. 2002. Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J Biol Chem* **277**(52): 50607-50611.
- Liang, S.H. und Clarke, M.F. 1999. The nuclear import of p53 is determined by the presence of a basic domain and its relative position to the nuclear localization signal. *Oncogene* **18**(12): 2163-2166.
- Lindsten, T., Ross, A.J., King, A., Zong, W.X., Rathmell, J.C., Shiels, H.A., Ulrich, E., Waymire, K.G., Mahar, P., Frauwirth, K., Chen, Y., Wei, M., Eng, V.M., Adelman, D.M., Simon, M.C., Ma, A., Golden, J.A., Evan, G., Korsmeyer, S.J., MacGregor, G.R. und Thompson, C.B. 2000. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* **6**(6): 1389-1399.
- Linzer, D.I. und Levine, A.J. 1979. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17**(1): 43-52.
- Lithgow, T., van Driel, R., Bertram, J.F. und Strasser, A. 1994. The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ* **5**(4): 411-417.
- Liu, G., Nozell, S., Xiao, H. und Chen, X. 2004. DeltaNp73beta is active in transactivation and growth suppression. *Mol Cell Biol* **24**(2): 487-501.
- Liu, L., Scolnick, D.M., Trievel, R.C., Zhang, H.B., Marmorstein, R., Halazonetis, T.D. und Berger, S.L. 1999a. p53 sites acetylated in vitro by PCAF and p300 are acetylated in vivo in response to DNA damage. *Mol Cell Biol* **19**(2): 1202-1209.
- Liu, X., Dai, S., Zhu, Y., Marrack, P. und Kappler, J.W. 2003. The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function. *Immunity* **19**(3): 341-352.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C. und Wang, X. 1997. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**(2): 175-184.
- Liu, X., Zou, H., Widlak, P., Garrard, W. und Wang, X. 1999b. Activation of the apoptotic endonuclease DFF40 (caspase-activated DNase or nuclease). Oligomerization and direct interaction with histone H1. *J Biol Chem* **274**(20): 13836-13840.
- Liu, Y. und Kulesz-Martin, M.F. 2006. Sliding into home: facilitated p53 search for targets by the basic DNA binding domain. *Cell Death Differ* **13**(6): 881-884.
- Lohr, K., Moritz, C., Contente, A. und Dobbelstein, M. 2003. p21/CDKN1A mediates negative regulation of transcription by p53. *J Biol Chem* **278**(35): 32507-32516.
- Lundblad, V. 2000. DNA ends: maintenance of chromosome termini versus repair of double strand breaks. *Mutat Res* **451**(1-2): 227-240.
- Luo, J., Li, M., Tang, Y., Laszkowska, M., Roeder, R.G. und Gu, W. 2004. Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(8): 2259-2264.
- Maier, B., Gluba, W., Bernier, B., Turner, T., Mohammad, K., Guise, T., Sutherland, A., Thorner, M. und Scrable, H. 2004. Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev* **18**(3): 306-319.
- Maiyar, A.C., Phu, P.T., Huang, A.J. und Firestone, G.L. 1997. Repression of glucocorticoid receptor transactivation and DNA binding of a glucocorticoid response element within the serum/glucocorticoid-inducible protein kinase (sgk) gene promoter by the p53 tumor suppressor protein. *Mol Endocrinol* **11**(3): 312-329.
- Marchenko, N.D., Zaika, A. und Moll, U.M. 2000. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* **275**(21): 16202-16212.
- Martin, D.A., Siegel, R.M., Zheng, L. und Lenardo, M.J. 1998. Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J Biol Chem* **273**(8): 4345-4349.
- Martin, S.J. und Green, D.R. 1995. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* **82**(3): 349-352.
- Matlashewski, G., Pim, D., Banks, L. und Crawford, L. 1987. Alternative splicing of human p53 transcripts. *Oncogene Res* **1**(1): 77-85.

- Maya, R., Balass, M., Kim, S.T., Shkedy, D., Leal, J.F., Shifman, O., Moas, M., Buschmann, T., Ronai, Z., Shiloh, Y., Kastan, M.B., Katzir, E. und Oren, M. 2001. ATM-dependent phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev* **15**(9): 1067-1077.
- McKinney, K., Mattia, M., Gottifredi, V. und Prives, C. 2004. p53 linear diffusion along DNA requires its C terminus. *Mol Cell* **16**(3): 413-424.
- Medema, J.P., Scaffidi, C., Kischkel, F.C., Shevchenko, A., Mann, M., Krammer, P.H. und Peter, M.E. 1997. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *Embo J* **16**(10): 2794-2804.
- Melino, G., Lu, X., Gasco, M., Crook, T. und Knight, R.A. 2003. Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *Trends Biochem Sci* **28**(12): 663-670.
- Metzstein, M.M., Stanfield, G.M. und Horvitz, H.R. 1998. Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet* **14**(10): 410-416.
- Michalak, E., Villunger, A., Erlacher, M. und Strasser, A. 2005. Death squads enlisted by the tumour suppressor p53. *Biochem Biophys Res Commun* **331**(3): 786-798.
- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K. und Tschopp, J. 2001. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* **21**(16): 5299-5305.
- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D.W., Briand, C. und Grutter, M.G. 2002. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* **277**(47): 45162-45171.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P. und Moll, U.M. 2003. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* **11**(3): 577-590.
- Mikhailov, V., Mikhailova, M., Pulkrabek, D.J., Dong, Z., Venkatachalam, M.A. und Saikumar, P. 2001. Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* **276**(21): 18361-18374.
- Mills, A.A., Zheng, B., Wang, X.J., Vogel, H., Roop, D.R. und Bradley, A. 1999. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* **398**(6729): 708-713.
- Ming, L., Wang, P., Bank, A., Yu, J. und Zhang, L. 2006. PUMA Dissociates Bax and Bcl-X(L) to induce apoptosis in colon cancer cells. *J Biol Chem* **281**(23): 16034-16042.
- Miyashita, T. und Reed, J.C. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**(2): 293-299.
- Moll, U.M. und Slade, N. 2004. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res* **2**(7): 371-386.
- Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D. und Levine, A.J. 1992. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69**(7): 1237-1245.
- Monaghan, P., Robertson, D., Amos, T.A., Dyer, M.J., Mason, D.Y. und Greaves, M.F. 1992. Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J Histochem Cytochem* **40**(12): 1819-1825.
- Montes de Oca Luna, R., Wagner, D.S. und Lozano, G. 1995. Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature* **378**(6553): 203-206.
- Moroni, M.C., Hickman, E.S., Lazzarini Denchi, E., Caprara, G., Colli, E., Cecconi, F., Muller, H. und Helin, K. 2001. Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol* **3**(6): 552-558.
- Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., Ng, S.L. und Fesik, S.W. 1996. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* **381**(6580): 335-341.
- Murray-Zmijewski, F., Lane, D.P. und Bourdon, J.C. 2006. p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ* **13**(6): 962-972.
- Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S. und Dixit, V.M. 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* **273**(5): 2926-2930.
- Nakamura, S., Roth, J.A. und Mukhopadhyay, T. 2000. Multiple lysine mutations in the C-terminal domain of p53 interfere with MDM2-dependent protein degradation and ubiquitination. *Mol Cell Biol* **20**(24): 9391-9398.
- Nakano, K. und Vousden, K.H. 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **7**(3): 683-694.
- Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Hearn, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J. und Lowe, S.W. 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**(6): 703-716.
- Nechushtan, A., Smith, C.L., Lamensdorf, I., Yoon, S.H. und Youle, R.J. 2001. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J Cell Biol* **153**(6): 1265-1276.
- Nie, L., Sasaki, M. und Maki, C.G. 2007. Regulation of p53 nuclear export through sequential changes in conformation and ubiquitination. *J Biol Chem* **282**(19): 14616-14625.

- Nie, Y., Li, H.H., Bula, C.M. und Liu, X. 2000. Stimulation of p53 DNA binding by c-Abl requires the p53 C terminus and tetramerization. *Mol Cell Biol* **20**(3): 741-748.
- Nielsen, S.J., Schneider, R., Bauer, U.M., Bannister, A.J., Morrison, A., O'Carroll, D., Firestein, R., Cleary, M., Jenuwein, T., Herrera, R.E. und Kouzarides, T. 2001. Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* **412**(6846): 561-565.
- Nijhawan, D., Fang, M., Traer, E., Zhong, Q., Gao, W., Du, F. und Wang, X. 2003. Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev* **17**(12): 1475-1486.
- O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L.A., Hausmann, G., Adams, J.M., Cory, S. und Huang, D.C. 1998. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *Embo J* **17**(2): 384-395.
- O'Reilly, L.A., Print, C., Hausmann, G., Moriishi, K., Cory, S., Huang, D.C. und Strasser, A. 2001. Tissue expression and subcellular localization of the pro-survival molecule Bcl-w. *Cell Death Differ* **8**(5): 486-494.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. und Tanaka, N. 2000a. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**(5468): 1053-1058.
- Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y. und Taya, Y. 2000b. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* **102**(6): 849-862.
- Oh, K.J., Barbuto, S., Pitter, K., Morash, J., Walensky, L.D. und Korsmeyer, S.J. 2006. A membrane-targeted BID BCL-2 homology 3 peptide is sufficient for high potency activation of BAX in vitro. *J Biol Chem* **281**(48): 36999-37008.
- Okamoto, T., Izumi, H., Imamura, T., Takano, H., Ise, T., Uchiumi, T., Kuwano, M. und Kohno, K. 2000. Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression. *Oncogene* **19**(54): 6194-6202.
- Olivier, M., Eeles, R., Hollstein, M., Khan, M.A., Harris, C.C. und Hainaut, P. 2002. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* **19**(6): 607-614.
- Olsson, A., Manzl, C., Strasser, A. und Villunger, A. 2007. How important are post-translational modifications in p53 for selectivity in target-gene transcription and tumour suppression? *Cell Death Differ* **14**(9): 1561-1575.
- Ortt, K. und Sinha, S. 2006. Derivation of the consensus DNA-binding sequence for p63 reveals unique requirements that are distinct from p53. *FEBS Lett* **580**(18): 4544-4550.
- Osada, M., Park, H.L., Nagakawa, Y., Begum, S., Yamashita, K., Wu, G., Kim, M.S., Trink, B. und Sidransky, D. 2006. A novel response element confers p63- and p73-specific activation of the WNT4 promoter. *Biochem Biophys Res Commun* **339**(4): 1120-1128.
- Osada, M., Park, H.L., Nagakawa, Y., Yamashita, K., Fomenkov, A., Kim, M.S., Wu, G., Nomoto, S., Trink, B. und Sidransky, D. 2005. Differential recognition of response elements determines target gene specificity for p53 and p63. *Mol Cell Biol* **25**(14): 6077-6089.
- Ou, H.D., Lohr, F., Vogel, V., Mantele, W. und Dotsch, V. 2007. Structural evolution of C-terminal domains in the p53 family. *Embo J* **26**(14): 3463-3473.
- Perry, M.E., Piette, J., Zawadzki, J.A., Harvey, D. und Levine, A.J. 1993. The mdm-2 gene is induced in response to UV light in a p53-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(24): 11623-11627.
- Petros, A.M., Nettesheim, D.G., Wang, Y., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Mack, J., Swift, K., Matayoshi, E.D., Zhang, H., Thompson, C.B. und Fesik, S.W. 2000. Rationale for Bcl-xL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies. *Protein Sci* **9**(12): 2528-2534.
- Picksley, S.M., Vojtesek, B., Sparks, A. und Lane, D.P. 1994. Immunochemical analysis of the interaction of p53 with MDM2;—fine mapping of the MDM2 binding site on p53 using synthetic peptides. *Oncogene* **9**(9): 2523-2529.
- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N.J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H.W., Cordon-Cardo, C. und DePinho, R.A. 1998. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* **92**(6): 713-723.
- Pop, C., Chen, Y.R., Smith, B., Bose, K., Bobay, B., Tripathy, A., Franzen, S. und Clark, A.C. 2001. Removal of the pro-domain does not affect the conformation of the procaspase-3 dimer. *Biochemistry* **40**(47): 14224-14235.
- Pozniak, C.D., Radinovic, S., Yang, A., McKeon, F., Kaplan, D.R. und Miller, F.D. 2000. An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science* **289**(5477): 304-306.

- Reed, J.C. 1999. Splicing and dicing apoptosis genes. *Nat Biotechnol* **17**(11): 1064-1065.
- Reed, M., Woelker, B., Wang, P., Wang, Y., Anderson, M.E. und Tegtmeyer, P. 1995. The C-terminal domain of p53 recognizes DNA damaged by ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(21): 9455-9459.
- Riedl, S.J., Fuentes-Prior, P., Renatus, M., Kairies, N., Krapp, S., Huber, R., Salvesen, G.S. und Bode, W. 2001. Structural basis for the activation of human procaspase-7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(26): 14790-14795.
- Rinaldo, C., Prodosmo, A., Mancini, F., Iacovelli, S., Sacchi, A., Moretti, F. und Soddu, S. 2007. MDM2-regulated degradation of HIPK2 prevents p53Ser46 phosphorylation and DNA damage-induced apoptosis. *Mol Cell* **25**(5): 739-750.
- Robertson, K.D. und Wolffe, A.P. 2000. DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* **1**(1): 11-19.
- Rodriguez, M.S., Desterro, J.M., Lain, S., Lane, D.P. und Hay, R.T. 2000. Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* **20**(22): 8458-8467.
- Roninson, I.B. 2002. Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett* **179**(1): 1-14.
- Roth, J., Koch, P., Contente, A. und Dobbelstein, M. 2000. Tumor-derived mutations within the DNA-binding domain of p53 that phenotypically resemble the deletion of the proline-rich domain. *Oncogene* **19**(14): 1834-1842.
- Roucou, X., Rostovtseva, T., Montessuit, S., Martinou, J.C. und Antonsson, B. 2002. Bid induces cytochrome c-impermeable Bax channels in liposomes. *Biochem J* **363**(Pt 3): 547-552.
- Rountree, M.R., Bachman, K.E., Herman, J.G. und Baylin, S.B. 2001. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. *Oncogene* **20**(24): 3156-3165.
- Saito, M., Korsmeyer, S.J. und Schlesinger, P.H. 2000. BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol* **2**(8): 553-555.
- Saito, S., Goodarzi, A.A., Higashimoto, Y., Noda, Y., Lees-Miller, S.P., Appella, E. und Anderson, C.W. 2002. ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser(46), in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* **277**(15): 12491-12494.
- Saito, S., Yamaguchi, H., Higashimoto, Y., Chao, C., Xu, Y., Fornace, A.J., Jr., Appella, E. und Anderson, C.W. 2003. Phosphorylation site interdependence of human p53 post-translational modifications in response to stress. *J Biol Chem* **278**(39): 37536-37544.
- Sakaguchi, K., Herrera, J.E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C.W. und Appella, E. 1998. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* **12**(18): 2831-2841.
- Sakaguchi, K., Sakamoto, H., Lewis, M.S., Anderson, C.W., Erickson, J.W., Appella, E. und Xie, D. 1997. Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry* **36**(33): 10117-10124.
- Sakahira, H., Enari, M. und Nagata, S. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* **391**(6662): 96-99.
- Saleh, A., Srinivasula, S.M., Acharya, S., Fishel, R. und Alnemri, E.S. 1999. Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem* **274**(25): 17941-17945.
- Salvesen, G.S. und Dixit, V.M. 1999. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(20): 10964-10967.
- Sansome, C., Zaika, A., Marchenko, N.D. und Moll, U.M. 2001. Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells. *FEBS Lett* **488**(3): 110-115.
- Saretzki, G., Sitte, N., Merkel, U., Wurm, R.E. und von Zglinicki, T. 1999. Telomere shortening triggers a p53-dependent cell cycle arrest via accumulation of G-rich single stranded DNA fragments. *Oncogene* **18**(37): 5148-5158.
- Sasaki, Y., Naishiro, Y., Oshima, Y., Imai, K., Nakamura, Y. und Tokino, T. 2005. Identification of pigment epithelium-derived factor as a direct target of the p53 family member genes. *Oncogene* **24**(32): 5131-5136.
- Sattler, M., Liang, H., Nettekheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., Thompson, C.B. und Fesik, S.W. 1997. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* **275**(5302): 983-986.
- Sax, J.K., Fei, P., Murphy, M.E., Bernhard, E., Korsmeyer, S.J. und El-Deiry, W.S. 2002. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. *Nat Cell Biol* **4**(11): 842-849.
- Sayan, B.S., Sayan, A.E., Knight, R.A., Melino, G. und Cohen, G.M. 2006. p53 is cleaved by caspases generating fragments localizing to mitochondria. *J Biol Chem* **281**(19): 13566-13573.

- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. und Peter, M.E. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* **17**(6): 1675-1687.
- Scaffidi, C., Medema, J.P., Krammer, P.H. und Peter, M.E. 1997. FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J Biol Chem* **272**(43): 26953-26958.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P.H. und Peter, M.E. 1999. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* **274**(3): 1541-1548.
- Scherer, W.F., Syverton, J.T. und Gey, G.O. 1953. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* **97**(5): 695-710.
- Schreiber, V., Molinete, M., Boeuf, H., de Murcia, G. und Menissier-de Murcia, J. 1992. The human poly(ADP-ribose) polymerase nuclear localization signal is a bipartite element functionally separate from DNA binding and catalytic activity. *Embo J* **11**(9): 3263-3269.
- Schuler, M., Bossy-Wetzels, E., Goldstein, J.C., Fitzgerald, P. und Green, D.R. 2000. p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *J Biol Chem* **275**(10): 7337-7342.
- Scoumanne, A., Harms, K.L. und Chen, X. 2005. Structural basis for gene activation by p53 family members. *Cancer Biol Ther* **4**(11): 1178-1185.
- Scrabble, H., Sasaki, T. und Maier, B. 2005. DeltaNp53 or p44: priming the p53 pump. *Int J Biochem Cell Biol* **37**(5): 913-919.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben-Ze'ev, A. und Rotter, V. 1990. Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol Cell Biol* **10**(12): 6565-6577.
- Shi, Y. 2006. Mechanical aspects of apoptosome assembly. *Curr Opin Cell Biol* **18**(6): 677-684.
- Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y. und Prives, C. 2000. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* **14**(3): 289-300.
- Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y. und Prives, C. 1997. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* **91**(3): 325-334.
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C.B. und Tsujimoto, Y. 2004. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* **6**(12): 1221-1228.
- Slee, E.A., Harte, M.T., Kluck, R.M., Wolf, B.B., Casiano, C.A., Newmeyer, D.D., Wang, H.G., Reed, J.C., Nicholson, D.W., Alnemri, E.S., Green, D.R. und Martin, S.J. 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* **144**(2): 281-292.
- Smogorzewska, A. und de Lange, T. 2002. Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *Embo J* **21**(16): 4338-4348.
- Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. und Brennan, M. 1973. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **51**(5): 1409-1416.
- Soussi, T., Kato, S., Levy, P.P. und Ishioka, C. 2005. Reassessment of the TP53 mutation database in human disease by data mining with a library of TP53 missense mutations. *Hum Mutat* **25**(1): 6-17.
- Sprick, M.R., Rieser, E., Stahl, H., Grosse-Wilde, A., Weigand, M.A. und Walczak, H. 2002. Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *Embo J* **21**(17): 4520-4530.
- Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T. und Alnemri, E.S. 1998. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* **1**(7): 949-957.
- Srinivasula, S.M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R.A., Robbins, P.D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y. und Alnemri, E.S. 2001. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* **410**(6824): 112-116.
- St Clair, S., Giono, L., Varmeh-Ziaie, S., Resnick-Silverman, L., Liu, W.J., Padi, A., Dastidar, J., DaCosta, A., Mattia, M. und Manfredi, J.J. 2004. DNA damage-induced downregulation of Cdc25C is mediated by p53 via two independent mechanisms: one involves direct binding to the cdc25C promoter. *Mol Cell* **16**(5): 725-736.
- Stennicke, H.R., Deveraux, Q.L., Humke, E.W., Reed, J.C., Dixit, V.M. und Salvesen, G.S. 1999. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* **274**(13): 8359-8362.
- Stiewe, T., Zimmermann, S., Frilling, A., Esche, H. und Putzer, B.M. 2002. Transactivation-deficient DeltaTA-p73 acts as an oncogene. *Cancer Res* **62**(13): 3598-3602.

- Subbaramaiah, K., Altorki, N., Chung, W.J., Mestre, J.R., Sampat, A. und Dannenberg, A.J. 1999. Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *J Biol Chem* **274**(16): 10911-10915.
- Sulston, J., Du, Z., Thomas, K., Wilson, R., Hillier, L., Staden, R., Halloran, N., Green, P., Thierry-Mieg, J., Qiu, L. und et al. 1992. The *C. elegans* genome sequencing project: a beginning. *Nature* **356**(6364): 37-41.
- 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, D.P., Penninger, J.M. und Kroemer, G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**(6718): 441-446.
- Suzuki, M., Youle, R.J. und Tjandra, N. 2000. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* **103**(4): 645-654.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K. und Takahashi, R. 2001. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* **8**(3): 613-621.
- Taira, N., Nihira, K., Yamaguchi, T., Miki, Y. und Yoshida, K. 2007. DYRK2 is targeted to the nucleus and controls p53 via Ser46 phosphorylation in the apoptotic response to DNA damage. *Mol Cell* **25**(5): 725-738.
- Takai, H., Smogorzewska, A. und de Lange, T. 2003. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* **13**(17): 1549-1556.
- Thomas, L.R., Stillman, D.J. und Thorburn, A. 2002. Regulation of Fas-associated death domain interactions by the death effector domain identified by a modified reverse two-hybrid screen. *J Biol Chem* **277**(37): 34343-34348.
- Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J. und et al. 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* **356**(6372): 768-774.
- Thornberry, N.A., Chapman, K.T. und Nicholson, D.W. 2000. Determination of caspase specificities using a peptide combinatorial library. *Methods Enzymol* **322**: 100-110.
- Thornberry, N.A. und Lazebnik, Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science* **281**(5381): 1312-1316.
- Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T. und Nicholson, D.W. 1997. A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* **272**(29): 17907-17911.
- Thut, C.J., Goodrich, J.A. und Tjian, R. 1997. Repression of p53-mediated transcription by MDM2: a dual mechanism. *Genes Dev* **11**(15): 1974-1986.
- Tokino, T., Thiagalingam, S., el-Deiry, W.S., Waldman, T., Kinzler, K.W. und Vogelstein, B. 1994. p53 tagged sites from human genomic DNA. *Hum Mol Genet* **3**(9): 1537-1542.
- Tomita, Y., Marchenko, N., Erster, S., Nemajero, A., Dehner, A., Klein, C., Pan, H., Kessler, H., Pancoska, P. und Moll, U.M. 2006. WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem* **281**(13): 8600-8606.
- Tsujimoto, Y., Finger, L.R., Yunis, J., Nowell, P.C. und Croce, C.M. 1984. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* **226**(4678): 1097-1099.
- Unger, T., Juven-Gershon, T., Moallem, E., Berger, M., Vogt Sionov, R., Lozano, G., Oren, M. und Haupt, Y. 1999a. Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. *Embo J* **18**(7): 1805-1814.
- Unger, T., Sionov, R.V., Moallem, E., Yee, C.L., Howley, P.M., Oren, M. und Haupt, Y. 1999b. Mutations in serines 15 and 20 of human p53 impair its apoptotic activity. *Oncogene* **18**(21): 3205-3212.
- Vandel, L., Nicolas, E., Vaute, O., Ferreira, R., Ait-Si-Ali, S. und Trouche, D. 2001. Transcriptional repression by the retinoblastoma protein through the recruitment of a histone methyltransferase. *Mol Cell Biol* **21**(19): 6484-6494.
- Varfolomeev, E.E. und Ashkenazi, A. 2004. Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell* **116**(4): 491-497.
- Varfolomeev, E.E., Boldin, M.P., Goncharov, T.M. und Wallach, D. 1996. A potential mechanism of "cross-talk" between the p55 tumor necrosis factor receptor and Fas/APO1: proteins binding to the death domains of the two receptors also bind to each other. *J Exp Med* **183**(3): 1271-1275.
- Vaux, D.L., Cory, S. und Adams, J.M. 1988. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* **335**(6189): 440-442.

- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J. und Vaux, D.L. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**(1): 43-53.
- Verhagen, A.M., Silke, J., Ekert, P.G., Pakusch, M., Kaufmann, H., Connolly, L.M., Day, C.L., Tikoo, A., Burke, R., Wrobel, C., Moritz, R.L., Simpson, R.J. und Vaux, D.L. 2002. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem* **277**(1): 445-454.
- Wajant, H. 2003. Death receptors. *Essays Biochem* **39**: 53-71.
- Walensky, L.D., Pitter, K., Morash, J., Oh, K.J., Barbuto, S., Fisher, J., Smith, E., Verdine, G.L. und Korsmeyer, S.J. 2006. A stapled BID BH3 helix directly binds and activates BAX. *Mol Cell* **24**(2): 199-210.
- Walker, N.P., Talanian, R.V., Brady, K.D., Dang, L.C., Bump, N.J., Ferez, C.R., Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M.C., Hammill, L.D. und et al. 1994. Crystal structure of the cysteine protease interleukin-1 beta-converting enzyme: a (p20/p10)₂ homodimer. *Cell* **78**(2): 343-352.
- Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V. und Baldwin, A.S., Jr. 1998. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* **281**(5383): 1680-1683.
- Wang, J., Chun, H.J., Wong, W., Spencer, D.M. und Lenardo, M.J. 2001. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(24): 13884-13888.
- Wang, J., Wiltshire, T., Wang, Y., Mikell, C., Burks, J., Cunningham, C., Van Laar, E.S., Waters, S.J., Reed, E. und Wang, W. 2004. ATM-dependent CHK2 activation induced by anticancer agent, irifolven. *J Biol Chem* **279**(38): 39584-39592.
- Wang, P., Reed, M., Wang, Y., Mayr, G., Stenger, J.E., Anderson, M.E., Schwedes, J.F. und Tegtmeyer, P. 1994. p53 domains: structure, oligomerization, and transformation. *Mol Cell Biol* **14**(8): 5182-5191.
- Wang, P., Yu, J. und Zhang, L. 2007. The nuclear function of p53 is required for PUMA-mediated apoptosis induced by DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(10): 4054-4059.
- Wang, X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **15**(22): 2922-2933.
- Wang, Y., Schwedes, J.F., Parks, D., Mann, K. und Tegtmeyer, P. 1995. Interaction of p53 with its consensus DNA-binding site. *Mol Cell Biol* **15**(4): 2157-2165.
- Waterman, M.J., Stavridi, E.S., Waterman, J.L. und Halazonetis, T.D. 1998. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet* **19**(2): 175-178.
- Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B. und Korsmeyer, S.J. 2000. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* **14**(16): 2060-2071.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B. und Korsmeyer, S.J. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**(5517): 727-730.
- Willis, S.N., Chen, L., Dewson, G., Wei, A., Naik, E., Fletcher, J.I., Adams, J.M. und Huang, D.C. 2005. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev* **19**(11): 1294-1305.
- Willis, S.N., Fletcher, J.I., Kaufmann, T., van Delft, M.F., Chen, L., Czabotar, P.E., Ierino, H., Lee, E.F., Fairlie, W.D., Bouillet, P., Strasser, A., Kluck, R.M., Adams, J.M. und Huang, D.C. 2007. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* **315**(5813): 856-859.
- Wilson, K.P., Black, J.A., Thomson, J.A., Kim, E.E., Griffith, J.P., Navia, M.A., Murcko, M.A., Chambers, S.P., Aldape, R.A., Raybuck, S.A. und et al. 1994. Structure and mechanism of interleukin-1 beta converting enzyme. *Nature* **370**(6487): 270-275.
- Wilson-Annan, J., O'Reilly, L.A., Crawford, S.A., Hausmann, G., Beaumont, J.G., Parma, L.P., Chen, L., Lackmann, M., Lithgow, T., Hinds, M.G., Day, C.L., Adams, J.M. und Huang, D.C. 2003. Proapoptotic BH3-only proteins trigger membrane integration of prosurvival Bcl-w and neutralize its activity. *J Cell Biol* **162**(5): 877-887.
- Wolf, D., Harris, N., Goldfinger, N. und Rotter, V. 1985. Isolation of a full-length mouse cDNA clone coding for an immunologically distinct p53 molecule. *Mol Cell Biol* **5**(1): 127-132.
- Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G. und Youle, R.J. 1997. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol* **139**(5): 1281-1292.
- Woo, E.J., Kim, Y.G., Kim, M.S., Han, W.D., Shin, S., Robinson, H., Park, S.Y. und Oh, B.H. 2004. Structural mechanism for inactivation and activation of CAD/DFF40 in the apoptotic pathway. *Mol Cell* **14**(4): 531-539.
- Wu, G., Nomoto, S., Hoque, M.O., Dracheva, T., Osada, M., Lee, C.C., Dong, S.M., Guo, Z., Benoit, N., Cohen, Y., Rechthand, P., Califano, J., Moon, C.S., Ratovitski, E., Jen, J., Sidransky, D.

- und Trink, B. 2003. DeltaNp63alpha and TAp63alpha regulate transcription of genes with distinct biological functions in cancer and development. *Cancer Res* **63**(10): 2351-2357.
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D. und Levine, A.J. 1993. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* **7**(7A): 1126-1132.
- Wu, Y., Liu, Y., Lee, L., Miner, Z. und Kulesz-Martin, M. 1994. Wild-type alternatively spliced p53: binding to DNA and interaction with the major p53 protein in vitro and in cells. *Embo J* **13**(20): 4823-4830.
- Xing, J., Sheppard, H.M., Corneillie, S.I. und Liu, X. 2001. p53 Stimulates TFIIID-TFIIA-promoter complex assembly, and p53-T antigen complex inhibits TATA binding protein-TATA interaction. *Mol Cell Biol* **21**(11): 3652-3661.
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. und Beach, D. 1993. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**(6456): 701-704.
- Yang, A., Kaghad, M., Caput, D. und McKeon, F. 2002. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet* **18**(2): 90-95.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dotsch, V., Andrews, N.C., Caput, D. und McKeon, F. 1998. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* **2**(3): 305-316.
- Yang, A., Walker, N., Bronson, R., Kaghad, M., Oosterwegel, M., Bonnin, J., Vagner, C., Bonnet, H., Dikkes, P., Sharpe, A., McKeon, F. und Caput, D. 2000. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature* **404**(6773): 99-103.
- Yin, Y., Stephen, C.W., Luciani, M.G. und Fahraeus, R. 2002. p53 Stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products. *Nat Cell Biol* **4**(6): 462-467.
- Yu, J., Wang, Z., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. und Zhang, L. 2003. PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4): 1931-1936.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Kinzler, K.W. und Vogelstein, B. 2001. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* **7**(3): 673-682.
- Yu, S.W., Wang, H., Poitras, M.F., Coombs, C., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M. und Dawson, V.L. 2002. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* **297**(5579): 259-263.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H.M. und Horvitz, H.R. 1993. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* **75**(4): 641-652.
- Zhang, S.Q., Kovalenko, A., Cantarella, G. und Wallach, D. 2000. Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation. *Immunity* **12**(3): 301-311.
- Zhang, Y. und Xiong, Y. 2001. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* **292**(5523): 1910-1915.
- Zhang, Y., Xiong, Y. und Yarbrough, W.G. 1998. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* **92**(6): 725-734.
- Zhu, J., Zhang, S., Jiang, J. und Chen, X. 2000. Definition of the p53 functional domains necessary for inducing apoptosis. *J Biol Chem* **275**(51): 39927-39934.
- Zhu, J., Zhou, W., Jiang, J. und Chen, X. 1998. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for mediating apoptosis. *J Biol Chem* **273**(21): 13030-13036.
- Zhu, N., Gu, L., Findley, H.W. und Zhou, M. 2005. Transcriptional repression of the eukaryotic initiation factor 4E gene by wild type p53. *Biochem Biophys Res Commun* **335**(4): 1272-1279.
- Zilfou, J.T., Hoffman, W.H., Sank, M., George, D.L. und Murphy, M. 2001. The corepressor mSin3a interacts with the proline-rich domain of p53 and protects p53 from proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* **21**(12): 3974-3985.
- Zong, W.X., Lindsten, T., Ross, A.J., MacGregor, G.R. und Thompson, C.B. 2001. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* **15**(12): 1481-1486.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. und Wang, X. 1997. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* **90**(3): 405-413.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X. und Wang, X. 1999. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* **274**(17): 11549-11556.

7. Anhang

Curriculum Vitae

	Vilma Ulrike Franziska Graupner
15.03.1979	geboren in Berlin
1985 - 1991	Besuch der 26. Oberschule „Antonio Augustino Neto“ in Berlin-Pankow
1991 - 1992	Besuch des Carl-Friedrich-Gauß-Gymnasiums in Berlin-Pankow
1992 - 1998	Besuch des Carl-von-Ossietzky-Gymnasiums in Berlin-Pankow Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1998 - 2003	Studium der Biologie an der Humboldt-Universität zu Berlin Diplomarbeit am Universitätsklinikum Charité der Humboldt-Universität zu Berlin im Bereich Molekulare Hämatologie und Onkologie bei Prof. Dr. Peter Daniel Thema: „Organellen-spezifische Regulation der Nbk-vermittelten Apoptose“
2004 - 2008	Doktorarbeit am Institut für Molekulare Medizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bei Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff Thema: „Funktionelle Charakterisierung neuer Isoformen des Tumorsuppressors p53“

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Klaus Schulze-Osthoff danke ich für die Möglichkeit, die Dissertation am Institut für Molekulare Medizin anzufertigen, für die Vergabe des Themas zur Analyse des Bak-Promotors und das Korrekturlesen der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Frank Wunderlich möchte ich für die freundliche Übernahme des Koreferats danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Frank Eßmann und PD Dr. Rainer Jänicke für die Zusammenarbeit, die Unterstützung und die Betreuung des p53-Isoformen-Projektes. Herrn Dr. Frank Eßmann möchte ich zudem für das äußerst kritische Korrekturlesen der Arbeit danken.

Obwohl diese Menschen mich natürlich nicht direkt bei meiner Arbeit unterstützen konnten, war allein das Wissen, dass ich mich jederzeit auf sie verlassen kann und sie bedingungslos hinter mir stehen, eine große Stütze. Mein besonderer Dank gilt daher Frank, Heidi, Rainer, Vera, Gertrud, Harry, Judith, Susanne, Sandra und Franziska. Ich weiß mich glücklich zu schätzen, dass ihr Teil meines Lebens seid.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der hier vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 28.04.2008

Vilma Graupner