

Aus dem Institut für Virologie
des Medizinischen Zentrums für Hygiene und Mikrobiologie
der Philipps-Universität Marburg
Leiter: Prof. Dr. H.-D. Klenk

Die Rolle des Tumorsuppressors p53
bei der malignen Transformation durch Adenoviren

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Christian Löber
aus Dauborn

Marburg / Lahn 2001

Diese Arbeit wurde am Institut für Virologie des Medizinischen Zentrums für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie mit Medizinaluntersuchungsamt in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Matthias Dobbstein angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht:

Löber, C., Lenz-Stöppler, C., Roth, J. and Dobbstein, M. (2001) Adenovirus-E1-ransformed cells grow despite the continuous presence of transcriptionally active p53. Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht.

Koch, P., Gatfield, J., Löber, C., Hobom, U., Lenz-Stöppler, C., Roth, J. and Dobbstein, M. (2001) Efficient replication of adenovirus despite the overexpression of active and nondegradable p53. *Cancer Res*, **61**, 5941-7.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg am 31. Oktober 2001 als Dissertation angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. R. Thauer, Fachbereich Biologie

Zweitgutachter: Prof. Dr. H.-D. Klenk, Institut für Virologie, Fachbereich Humanmedizin

Tag der mündlichen Prüfung: 6. November 2001

Kurzinhalt

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	ADENOVIREN – EPIDEMIOLOGIE UND MOLEKULARBIOLOGIE	1
1.2.	DER TUMORSUPPRESSOR P53	3
1.3.	MALIGNEN TRANSFORMATION DURCH DIE FRÜHE REGION 1 VON ADENOVIREN	8
1.4.	EINFLUSS WEITERER TRANSFORMIERENDER VIRALER PROTEINE AUF P53	11
1.5.	AUFGABENSTELLUNG	12
2.	MATERIAL	13
2.1.	CHEMIKALIEN	13
2.2.	MEDIEN	14
2.3.	PUFFER UND LÖSUNGEN	14
2.4.	ANTIKÖRPER	19
2.5.	KITS	19
2.6.	PLASMIDE & VEKTOREN	20
2.7.	BAKTERIEN	20
2.8.	VIREN	21
2.9.	EUKARYONTENZELLEN	21
3.	METHODEN	23
3.1.	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	23
3.2.	PROTEINCHEMISCHE & IMMUNOLOGISCHE METHODEN	27
3.3.	ASSAYS	31
3.4.	ARBEITEN MIT PLASMID-DNS	36
3.5.	ELEKTROPHORETISCHE METHODEN	47
4.	ERGEBNISSE	51
4.1.	EIN P53-RESPONSIVER PROMOTOR IST IN ADENOVIRUS-TRANSFORMIERTEN ZELLEN AKTIV	51

4.2.	DIE TRANSIENTE ÜBEREXPRESSION VON AKTIVEM P53 FÜHRT IN ADENOVIRUS-TRANSFORMIERTEN ZELLEN ZU EINER GERINGEREN RELATIVEN INDUKTION DES MDM2-PROMOTORS ALS IN P53 -/- ZELLEN	52
4.3.	DIE AKTIVITÄT DES MDM2-PROMOTORS KANN IN ADENOVIRUS-TRANSFORMIERTEN ZELLEN DURCH TRANSIENTE ÜBEREXPRESSION VON E1B-55 kDa REDUZIERT WERDEN	54
4.4.	DIE EXPRESSION EINES ENDOGENEN, P53-RESPONSIVEN GENS VERHÄLT SICH ANALOG ZUR EXPRESSION DES LUZIFERASE-REPORTERKONSTRUKTES	56
4.5.	ADENOVIRUS-INFESTION REDUZIERT DIE P53-AKTIVITÄT IN ADENOVIRUS-TRANSFORMIERTEN ZELLEN	57
4.6.	HERSTELLUNG DER MUTANTE P53MT24-28 IM VEKTOR PCIN4	59
4.7.	ADENOVIRUS-TRANSFORMIERTE ZELLEN KÖNNEN MIT EINEM P53-EXPRESSIONSKONSTRUKT STABIL TRANSFIZIERT WERDEN	60
4.8.	NACH STABILER EXPRESSION IST P53 ÜBERWIEGEND IM ZELLKERN LOKALISIERT	64
4.9.	DIE STABILE ÜBEREXPRESSION VON P53 VERHINDERT NICHT DAS WACHSTUM VON ADENOVIRUS-TRANSFORMIERTEN ZELLEN	68
5.	DISKUSSION	70
5.1.	AKTIVITÄT VON P53 IN ADENOVIRUS-E1-TRANSFORMIERTEN ZELLEN	70
5.2.	DIE AUSWIRKUNGEN EINER ADENOVIRUS-INFESTION AUF DIE P53-MENGE UND -AKTIVITÄT	71
5.3.	STABILE ÜBEREXPRESSION VON P53 IN AD-E1-TRANSFORMIERTEN ZELLEN	72
5.4.	INAKTIVIERUNG VON P53-ZIELGENPRODUKTEN IN AD-E1-TRANSFORMIERTEN ZELLEN	74
5.5.	MODELLE ZUR MALIGNEN TRANSFORMATION HUMANER ZELLEN	76
5.6.	ROLLE DER P53-INAKTIVIERUNG DURCH E1B-55 kDa BEI DER MALIGNEN TRANSFORMATION	77
5.7.	KONSEQUENZEN FÜR DIE VERWENDUNG VON P53 ALS ZIELPROTEIN PHARMAKOLOGISCHER ANSÄTZE	78
6.	ZUSAMMENFASSUNG	80
7.	ABSTRACT	82
8.	ANHANG	84

8.1.	ABKÜRZUNGEN	84
8.2.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	85
9.	LITERATURVERZEICHNIS	86

Inhalt

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	ADENOVIREN – EPIDEMIOLOGIE UND MOLEKULARBIOLOGIE	1
1.2.	DER TUMORSUPPRESSOR P53	3
1.3.	MALIGNEN TRANSFORMATION DURCH DIE FRÜHE REGION 1 VON ADENOVIREN	8
1.4.	EINFLUSS WEITERER TRANSFORMIERENDER VIRALER PROTEINE AUF P53	11
1.5.	AUFGABENSTELLUNG	12
2.	MATERIAL	13
2.1.	CHEMIKALIEN	13
2.2.	MEDIEN	14
2.3.	PUFFER UND LÖSUNGEN	14
2.4.	ANTIKÖRPER	19
2.5.	KITS	19
2.6.	PLASMIDE & VEKTOREN	20
2.7.	BAKTERIEN	20
2.8.	VIREN	21
2.9.	EUKARYONTENZELLEN	21
3.	METHODEN	23
3.1.	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	23
3.1.1.	ZELLKULTURTECHNIK	23
3.1.2.	HERSTELLUNG EINES VIRUSSTOCKS	24
3.1.3.	TITERBESTIMMUNG	25
3.1.4.	TRANSDUKTION VON EUKARYONTENZELLEN	25
3.1.5.	KRISTALLVIOLETTFÄRBUNG VON ZELLEN	26
3.1.6.	LIPOSOMEN-VERMITTELTE TRANSFEKTION VON EUKARYONTENZELLEN	26
3.1.6.1.	Lipofectamine2000	26
3.1.6.2.	Lipofectamine PLUS	27
3.2.	PROTEINCHEMISCHE & IMMUNOLOGISCHE METHODEN	27
3.2.1.	INDIREKTE IMMUNFLUORESCENZ (IFA)	27
3.2.2.	IMMUNOBLOT	28

3.2.2.1.	Ernten der Zellen für den Immunoblot	28
3.2.2.2.	Halbtrocken-Verfahren	28
3.2.2.3.	Naß-Verfahren	29
3.2.2.4.	Detektion der Proteine	30
3.2.3.	PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD	31
3.3.	ASSAYS	31
3.3.1.	LUZIFERASE-ASSAY	31
3.3.2.	COLONY FORMING ASSAY	32
3.3.3.	RT-PCR-ASSAY	34
3.4.	ARBEITEN MIT PLASMID-DNS	36
3.4.1.	TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i>	36
3.4.1.1.	Herstellen kompetenter Zellen	36
3.4.1.2.	Chemische Transformation von <i>E. coli</i>	36
3.4.1.3.	Elektroporation von <i>E. coli</i>	37
3.4.2.	DNS-ISOLATION UND QUANTIFIZIERUNG	37
3.4.2.1.	Mini-Präparationen	38
3.4.2.2.	Maxi-Präparationen	38
3.4.2.3.	Quantifizierung	39
3.4.3.	FÄLLUNG VON DNS	39
3.4.4.	RESTRIKTIONSVERDAU VON DNS	39
3.4.5.	POLYMERASE-KETTENREAKTION	40
3.4.6.	MUTAGENESE	41
3.4.6.1.	Entwerfen der Mutagenese-Oligonukleotide	41
3.4.6.2.	Mutagenese-Reaktion	44
3.4.7.	SEQUENZIERUNG VON DNS	45
3.4.7.1.	Polymerase-Reaktion	46
3.4.7.2.	Sequenzierung	47
3.5.	ELEKTROPHORETISCHE METHODEN	47
3.5.1.	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	47
3.5.2.	NATRIUMDODECYLSULFAT-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	48
3.5.3.	HARNSTOFF-POLYACRYLAMID-SEQUENZIERGEL	49
4.	ERGEBNISSE	51

4.1.	EIN P53-RESPONSIVER PROMOTOR IST IN ADENOVIRUS-TRANSFORMIERTEN ZELLEN AKTIV	51
-------------	--	-----------

4.2.	DIE TRANSIENTE ÜBEREXPRESSION VON AKTIVEM P53 FÜHRT IN ADENOVIRUS-TRANSFORMIERTEN ZELLEN ZU EINER GERINGEREN RELATIVEN INDUKTION DES MDM2-PROMOTORS ALS IN P53 -/- ZELLEN	52
4.3.	DIE AKTIVITÄT DES MDM2-PROMOTORS KANN IN ADENOVIRUS-TRANSFORMIERTEN ZELLEN DURCH TRANSIENTE ÜBEREXPRESSION VON E1B-55 kDa REDUZIERT WERDEN	54
4.4.	DIE EXPRESSION EINES ENDOGENEN, P53-RESPONSIVEN GENS VERHÄLT SICH ANALOG ZUR EXPRESSION DES LUZIFERASE-REPORTERKONSTRUKTES	56
4.5.	ADENOVIRUS-INFESTION REDUZIERT DIE P53-AKTIVITÄT IN ADENOVIRUS-TRANSFORMIERTEN ZELLEN	57
4.6.	HERSTELLUNG DER MUTANTE P53MT24-28 IM VEKTOR PCIN4	59
4.7.	ADENOVIRUS-TRANSFORMIERTE ZELLEN KÖNNEN MIT EINEM P53-EXPRESSIONSKONSTRUKT STABIL TRANSFIZIERT WERDEN	60
4.8.	NACH STABILER EXPRESSION IST P53 ÜBERWIEGEND IM ZELLKERN LOKALISIERT	64
4.9.	DIE STABILE ÜBEREXPRESSION VON P53 VERHINDERT NICHT DAS WACHSTUM VON ADENOVIRUS-TRANSFORMIERTEN ZELLEN	68
5.	DISKUSSION	70
5.1.	AKTIVITÄT VON P53 IN ADENOVIRUS-E1-TRANSFORMIERTEN ZELLEN	70
5.2.	DIE AUSWIRKUNGEN EINER ADENOVIRUS-INFESTION AUF DIE P53-MENGE UND -AKTIVITÄT	71
5.3.	STABILE ÜBEREXPRESSION VON P53 IN AD-E1-TRANSFORMIERTEN ZELLEN	72
5.4.	INAKTIVIERUNG VON P53-ZIELGENPRODUKTEN IN AD-E1-TRANSFORMIERTEN ZELLEN	74
5.5.	MODELLE ZUR MALIGNEN TRANSFORMATION HUMANER ZELLEN	76
5.6.	ROLLE DER P53-INAKTIVIERUNG DURCH E1B-55 kDa BEI DER MALIGNEN TRANSFORMATION	77
5.7.	KONSEQUENZEN FÜR DIE VERWENDUNG VON P53 ALS ZIELPROTEIN PHARMAKOLOGISCHER ANSÄTZE	78
6.	ZUSAMMENFASSUNG	80
7.	ABSTRACT	82
8.	ANHANG	84

8.1.	ABKÜRZUNGEN	84
8.2.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	85
9.	LITERATURVERZEICHNIS	86

1. Einleitung

1.1. Adenoviren – Epidemiologie und Molekularbiologie

Adenoviren wurden erstmals Mitte der 50er Jahre als Erreger respiratorischer Krankheiten beschrieben (zusammenfassend dargestellt in Shenk, 1996). Sie gehören jedoch eher zu den seltenen Auslösern von Erkältungskrankheiten und stellen lediglich bei Kindern einen Anteil von 5-10 % an diesem Krankheitsbild. Neben Erkältung lösen Adenoviren vor allem die epidemische Konjunktivitis (Augenbindehautentzündung) und – wiederum meist bei Kindern – Gastroenteritis mit Durchfall aus. Bis zum heutigen Tage sind über 100 verschiedene Virustypen identifiziert worden (davon allein über 40 humanpathogene), die eine große Zahl an Säugetieren und Vögeln infizieren können und gemeinsam die Familie *Adenoviridae* bilden.

Tabelle 1.1: Die Einteilung der humanen Adenoviren in Subgenera und Virustypen erfolgt unter anderem nach ihrem onkogenen Potential (modifiziert nach Shenk, 1996).

Subgenus	Virustyp	Zielorgane	Tumorbildung in Nagetieren
A	12, 18, 31	Gastrointestinaltrakt	hoch
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35	Lunge, Pharynx, Bindehaut	mittel
C	1, 2, 5, 6	Pharynx	niedrig
D	8, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 44-47	Bindehaut	niedrig
E	4	Respirationstrakt	niedrig
F	40-41	Gastrointestinaltrakt	niedrig

Ein besonderes Interesse zogen die Adenoviren auf sich, nachdem im Jahre 1962 erstmals gezeigt werden konnte, daß der humane Adenovirus Typ 12 maligne Tumoren in Nagetieren auslösen kann, wenn man die Tiere mit dem Virus inokuliert (Trentin *et al.*, 1962). Damit konnte zum ersten Mal eine Verbindung zwischen einem humanen Virus und der Entstehung von Krebs hergestellt werden. Trotz intensiver epidemiologischer Untersuchungen konnte bisher jedoch kein Adenovirus eindeutig als Erreger menschlicher Krebserkrankungen klassifiziert werden. Trotzdem dient die Fähigkeit der Viren, Tumoren in Nagetieren zu

verursachen, neben Homologien der DNS sowie Strukturen und Eigenschaften der Kapsidproteine als Kriterium für die Einteilung in verschiedene Subgenera (Tabelle 1.1).

Das Virion (Viruspartikel) der *Adenoviridae* hat die Form eines Ikosaeders von 70-110 nm Durchmesser (ohne Membranhülle). Diese sogenannten Capside bestehen aus mehreren Proteinen, welche aus historischen Gründen mit römischen Ziffern von II-XII bezeichnet werden; Protein I fehlt, da sich später herausstellte, daß es sich um einen Komplex aus zwei Proteinen handelte. Seine symmetrische Gestalt erhält das Capsid vor allem durch die beiden mengenmäßig am häufigsten vorkommenden Strukturproteine, das Pentonbasis- (III) und das Hexonprotein (II). Ein weiterer wesentlicher Bestandteil der Proteinhülle sind die von der Pentonbasis ausgehenden Fiberproteine (IV). Im Inneren des Capsids befindet sich das lineare, doppelsträngige DNS-Genom (36-38 kBp), welches durch die kovalent an beiden 5'-Enden der DNS angehefteten terminalen Proteine (TP), sowie durch unterschiedlich lange, invertierte terminale Wiederholungssequenzen (ITR) in einer quasizirkulären Struktur gehalten wird. Das TP vermittelt außerdem die Anheftung des Genoms an die Innenseite des Capsids und dient als Primer bei der Virusreplikation.

Das Genom der Adenoviren läßt sich in vier frühe (E1-E4), zwei mittlere (für die Strukturproteine IX und IVa2) und eine späte Transkriptionseinheit gliedern (siehe Abbildung 1.1). Jede dieser Einheiten wird durch alternatives Spleißen in verschiedene mRNS-Spezies prozessiert; auf diese Weise entstehen zum Beispiel aus der späten Transkriptionseinheit fünf Familien von mRNS-Spezies (L1-L5), welche die viralen Strukturproteine kodieren.

Der Infektions- und Replikationszyklus von Adenoviren beginnt mit der Adsorption der Viren an die zelluläre Membran. Diese wird durch direkte Interaktion der Fiberproteine mit ihrem – erst in jüngerer Zeit identifizierten – zellulären Rezeptor, dem Coxsackie- und Adenovirusrezeptor (CAR), vermittelt (Bergelson *et al.*, 1997; Bergelson *et al.*, 1998). Es folgt die rezeptorvermittelte Internalisierung der Viruspartikel, bei der das Pentonbasisprotein eine wichtige Rolle spielt. Nach Ansäuerung der Endozytose-Vesikel werden die Capside ins Zytoplasma freigesetzt, wo sie über Mikrotubuli zum Kern transportiert werden. Der Transport der DNS-Proteinkomplexe (ohne Capsidproteine) in den Kern leitet dann die eigentliche replikative Phase ein, die sich in vier Abschnitte gliedern läßt:

- Transkription / Translation der frühen Gene (E1A, E2A, E4orf6/7, schließlich der restlichen E-Proteine

- DNS-Replikation nach einem semikonservativen Mechanismus (jedoch ohne Synthese von Okazaki-Fragmenten); dazu Einleitung der S-Phase in der Zelle
- Transkription / Translation der mittleren und späten Gene
- Morphogenese der Viruspartikel im Zytoplasma

Ein einzelner replikativer Zyklus ist in humanen Tumorzellen (z. B. HeLa) nach ca. 24 Stunden abgeschlossen. Der Ablauf weiterer Zyklen führt schließlich zur Lyse der Zellen, gefolgt von Neuinfektion und erneuter Replikation.

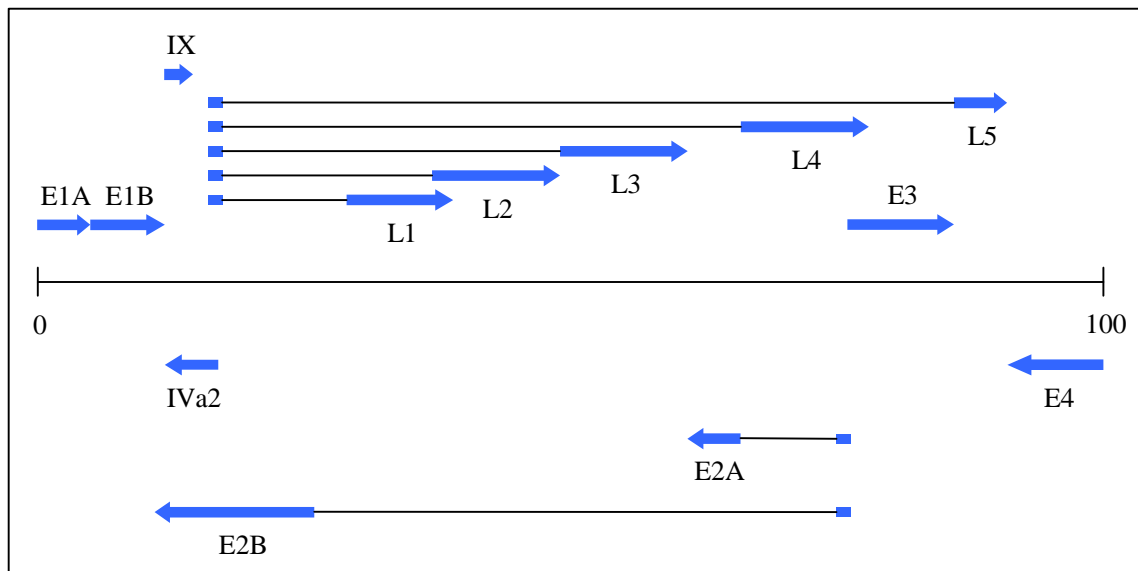


Abbildung 1.1: Genomorganisation der Adenoviren (verändert nach Shenk, 1996). Die Einteilung erfolgt in frühe (E1-E4), mittlere (IVa2, IX) und späte (L1-L5) Transkriptionseinheiten, die von beiden DNS-Strängen kodiert werden. Alle Primärtranskripte werden multipel gespleißt, was in einigen Fällen exemplarisch durch Linien dargestellt ist. Die Transkriptionseinheiten sind in ihrer relativen Position im Genom dargestellt. Zahlenstrahl = 0-100% des Genoms.

1.2. Der Tumorsuppressor p53

Das zelluläre p53-Protein stellt einen der wichtigsten zellzyklusregulierenden Faktoren dar. Aufgrund seiner herausragenden Rolle bei der Induktion von Zellzyklusarrest und

programmiertem Zelltod ("Apoptose") wird es auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Lane, 1992) und spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von malignen Tumoren. Diese Tatsache wird dadurch unterstrichen, daß das p53-Gen in mehr als 50% aller humanen Krebsarten mutiert ist (Hollstein *et al.*, 1994; Levine, 1997).

Auf molekularer Ebene kann man das humane p53, welches aus 393 Aminosäuren besteht, im wesentlichen in vier Domänen einteilen (Levine, 1997; Abbildung 1.2 (A)): Die N-terminalen 42 Aminosäuren bilden die Transaktivierungsdomäne von p53. In diesem Bereich bindet es an Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie, wie zum Beispiel TFIID (Lu und Levine, 1995; Thut *et al.*, 1995). Auch die Bindungsstellen für die p53-Antagonisten mdm2 (zellulär) und E1B-55 kDa (adenoviral) befinden sich hier (Lin *et al.*, 1994).

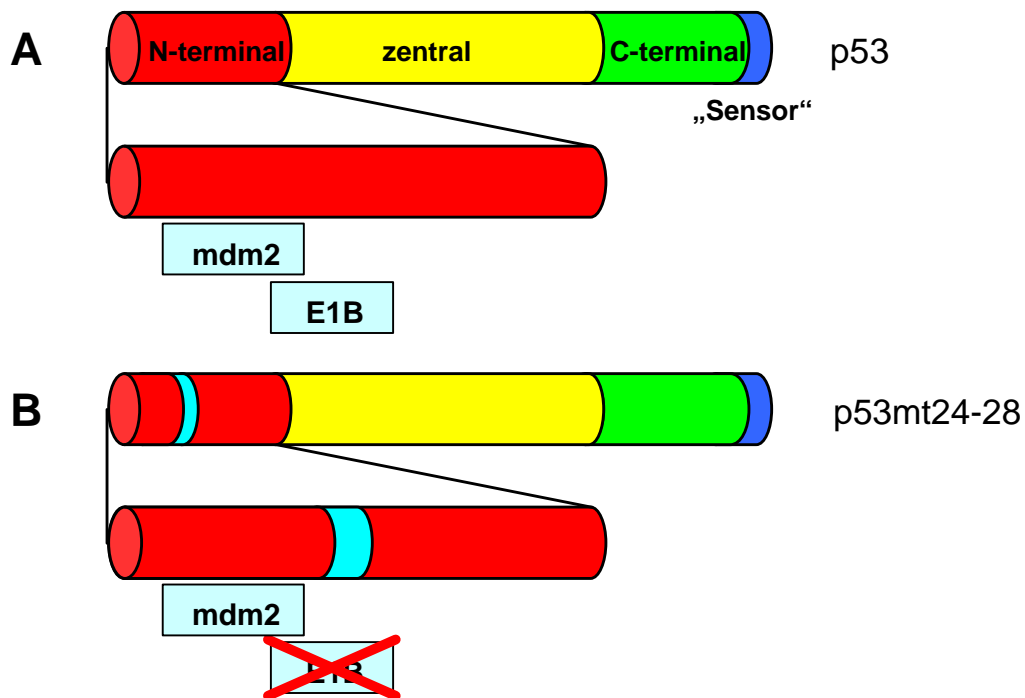


Abbildung 1.2: Aufbau des Tumorsuppressors p53 und der Mutante p53mt24-28. (A) p53 kann in eine N-terminale Transaktivierungsdomäne, eine zentrale DNS-bindende Domäne, eine C-terminale Oligomerisierungsdomäne und eine am äußersten C-Terminus gelegene „Sensor“-Domäne unterteilt werden. Der N-terminale Bereich von p53 (rot) ist vergrößert dargestellt. Die Bindungsstellen für mdm2 und E1B-55 kDa sind skizziert. (B) Bei der Mutante p53mt24-28 wurden 5 Aminosäuren gegen die homologen Residuen aus p73 ausgetauscht (hellblauer Abschnitt), so daß mdm2 weiterhin gebunden werden kann, E1B-55 kDa jedoch nicht.

Für die direkte, sequenzspezifische Bindung von p53 an DNS sind die Aminosäurereste 102 bis 292 verantwortlich, welche im weiteren als „zentrale Domäne“ bezeichnet werden. Mehr als 90% aller Punktmutationen von p53 in malignen Tumoren betreffen diesen Abschnitt des Tumorsuppressors, wobei einzelne „Hot Spots“ deutlich häufiger mutiert sind als andere Residuen (Cho *et al.*, 1994; Hollstein *et al.*, 1994; Levine, 1997). Eine der beiden am häufigsten mutierten Aminosäuren ist das Arginin an Position 273: Die aus einem Tumor gewonnene Mutante p53R273H weist keinerlei wachstumsbeschränkende Eigenschaften mehr auf und kann die bisher untersuchten p53-responsiven Promotoren nicht mehr aktivieren.

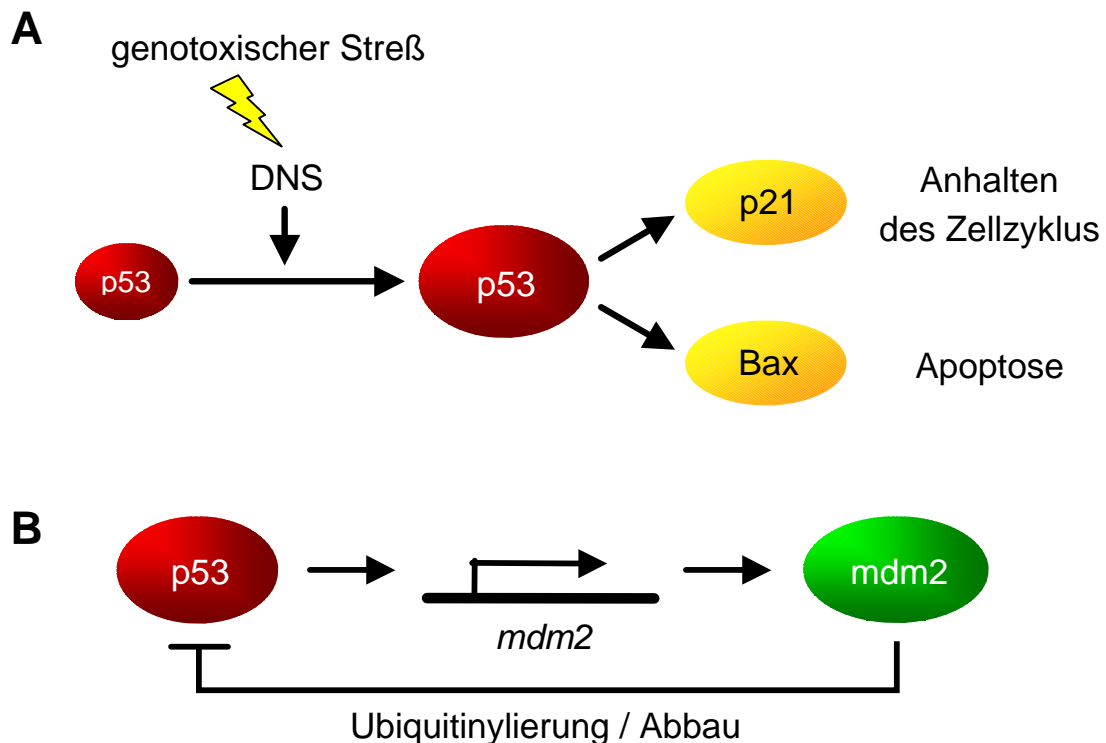


Abbildung 1.3: Effekte von p53 (A) Genotoxischer Streß (z.B. UV- / γ -Strahlung, Chemikalien) führt zu einem Anstieg der p53-Konzentration; mögliche Folgen sind entweder ein Anhalten des Zellzyklus (z.B. durch Induktion des Proteins p21) oder die Einleitung der Apoptose (z.B. über das Bax-Protein) (B) Regulatorische Schleife aus p53 und mdm2: Eine erhöhte p53-Konzentration führt schließlich zur vermehrten Transkription von *mdm2*; das mdm2-Protein ist eine Ubiquitinligase und führt durch Anheftung von Ubiquitinresten an p53 zu dessen Abbau im Proteasom.

In vivo liegt p53 in Form von Tetrameren vor, und zwar als Dimer eines Dimers (Jeffrey *et al.*, 1995). Für die Oligomerisierung sind die Aminosäurereste 325-356 notwendig, welche über einen flexiblen Bereich (AS 287-324) mit der zentralen Domäne verbunden sind. Gemeinsam bilden diese Abschnitte die „C-terminale Domäne“.

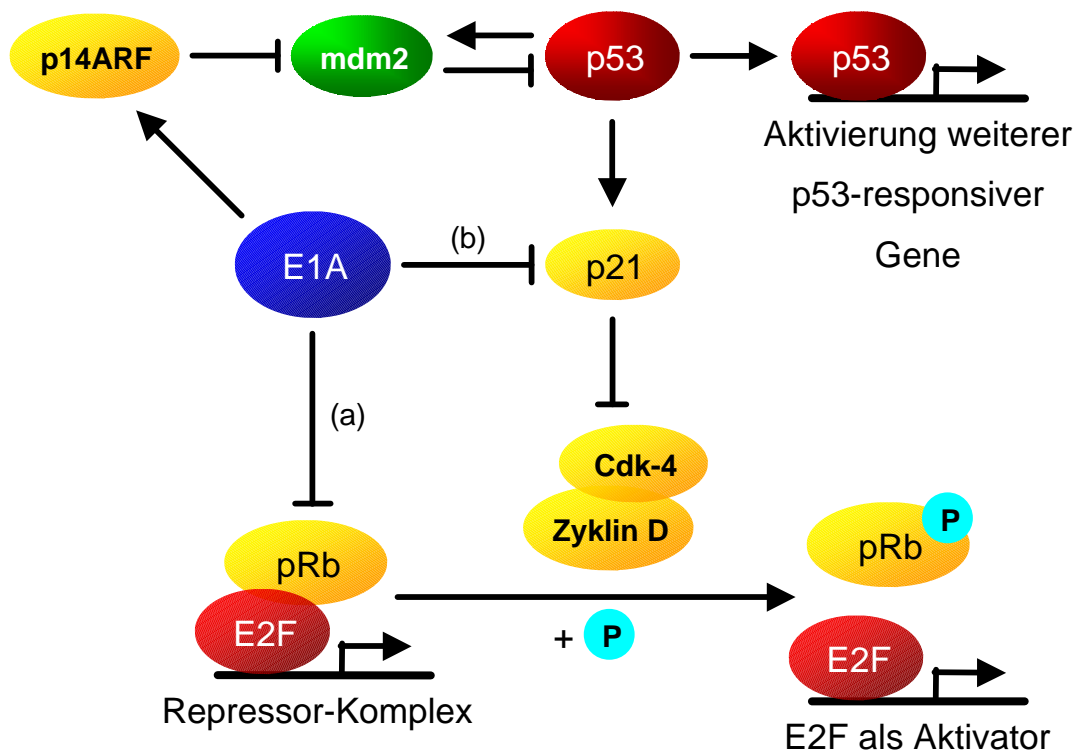


Abbildung 1.4: Effekte von E1A auf p53 und p53-abhängige Regulationsmechanismen. Durch Induktion von p14/19ARF bewirkt E1A die Inhibition von mdm2, was zu einem Anstieg der p53-Konzentration führt; die Aktivierung von E2F wird auf zwei Wegen sichergestellt: (a) E1A bindet pRb und setzt somit aktives E2F frei (b) durch Bindung und Inaktivierung von p21 kommt es zur Hyperphosphorylierung von pRb, wodurch wiederum E2F freigesetzt wird.

Die letzten 26 Aminosäuren (der tatsächliche C-Terminus von p53) bilden schließlich die „Sensor-Domäne“ von p53. Durch Bindung von kurzen DNS-Einzelsträngen (ca. 20-40 Nukleotide) an diese Domäne oder Anlagerung von geschädigter DNS kann die inaktive Form von p53 in die aktive, DNS-bindende Form überführt werden (Jayaraman und Prives, 1995; Lee *et al.*, 1995).

In einer normalen Zelle liegt p53 in einer relativ geringen Konzentration vor und hat eine Halbwertszeit von etwa 20 min. Erfährt die Zelle jedoch genotoxischen Streß (z.B. durch γ - und UV-Bestrahlung, oder durch DNS-modifizierende Chemikalien), so erhöht sich die Halbwertszeit des Proteins, und die intranukleäre p53-Konzentration wird ebenfalls signifikant erhöht (Levine, 1997; Perry *et al.*, 1993; Abbildung 1.3 (A)). Dieser Prozeß kann auch durch einen Mangel an Ribonukleosid-Triphosphaten ausgelöst werden (Linke *et al.*, 1996). In all diesen Fällen kommt es zunächst zu einem Anhalten des Zellzyklus in der G1-Phase, um den DNS-Reparatursystemen der Zelle genügend Zeit zur Verfügung zu stellen. Vermittelt werden kann ein solcher Arrest zum Beispiel durch den p53-induzierten Cdk-Inhibitor p21 (dieser wird auch als Cip1 oder Waf1 bezeichnet). Indem p21 an Komplexe aus Zyklin-abhängigen Kinasen (cyclin dependent kinase, Cdk) und Zyklinen bindet, verhindert es die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (pRb), einem weiteren Regulator des Zellzyklus (Abbildung 1.4). Die Folge ist, daß hypophosphoryliertes pRb mit dem Transkriptionsfaktor E2F assoziiert bleibt. Diese E2F-pRb-Komplexe wirken als Transrepressoren von E2F-responsiven Genen, wodurch die Transition von G1 nach S in der Zelle blockiert wird (Chin *et al.*, 1998; Dyson, 1998; Hiebert *et al.*, 1992).

Können die Schäden nicht behoben werden, oder ist der Zellzyklus nachhaltig gestört, so kann durch p53 der programmierte Zelltod („Apoptose“) eingeleitet werden (Lowe *et al.*, 1993). Das Bax-Protein gehört zu den am besten untersuchten Mediatoren der Apoptose (Abbildung 1.3 (A)). Nach Induktion durch p53 (Miyashita und Reed, 1995) wird Bax zur äußeren Membran der Mitochondrien transloziert, wo es eine Rolle bei der Veränderung des Membranpotentials spielt (Matsuyama *et al.*, 1998), sowie möglicherweise bei der Freisetzung von Cytochrom C aus dem Intermembranraum. Diese Ereignisse tragen zum Ablauf der Apoptose bei und können sowohl durch zelluläre (bcl-2) als auch durch adenovirale (E1B-19 kDa) Antagonisten von Bax beeinflusst werden (Chen *et al.*, 1996a; Han *et al.*, 1996; Shen und Shenk, 1994; siehe Kapitel 1.3).

Ein weiterer Weg zur Aktivierung von p53 beruht auf der Anwesenheit von aktivierten Onkogenen (z.B. Ras, Myc oder Adenovirus-E1A), die über die Induktion des zellulären Proteins p14/19ARF (Abbildung 1.4) zu einer Akkumulation von p53 in der Zelle führen (de Stanchina *et al.*, 1998; Palmero *et al.*, 1998; Zindy *et al.*, 1998). Erreicht wird dies durch Bindung und Inaktivierung von mdm2 durch p14/19ARF (Pomerantz *et al.*, 1998; Sherr, 1998; Stott *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998).

Bei *mdm2* handelt es sich um das Genprodukt des 'murine double minute gene 2', kurz *mdm2*. (Barak *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1993). Nach Transaktivierung durch p53 wird das *mdm2*-Protein synthetisiert, welches eine Ubiquitinligase-Aktivität besitzt. Durch kovalente Anbindung von Ubiquitinpeptiden an p53 wird letzteres zum Abbau in das zelluläre Proteasom überführt (Honda *et al.*, 1997; Oren, 1999). Da *mdm2* im Bereich der Transaktivierungsdomäne an p53 bindet (siehe Abbildung 1.2 (A)), wirkt es gleichzeitig als Transrepressor für p53-responsive Gene (Chen *et al.*, 1995). Durch Induktion seines eigenen Inhibitors etabliert p53 somit eine geschlossene regulatorische Schleife mit *mdm2* (Abbildung 1.3 (B)).

Neben p53 existieren in der Zelle mehrere homologe Proteine, die ebenfalls eine transaktivierende Wirkung besitzen und Apoptose induzieren können (Bian und Sun, 1997; De Laurenzi *et al.*, 1998; Kaghad *et al.*, 1997; Osada *et al.*, 1998; Schmale und Bamberger, 1997; Senoo *et al.*, 1998; Zeng *et al.*, 1998). Für eines dieser Proteine, p73, konnte gezeigt werden, daß adenovirale Onkoproteine (insbesondere E1B-55 kDa und E4-34 kDa) weder die intrazelluläre Stabilität des Proteins noch seine transaktivierenden Eigenschaften beeinflussen (Higashino *et al.*, 1998; Marin *et al.*, 1998; Roth *et al.*, 1998b; Steegenga *et al.*, 1999; Wienzek *et al.*, 2000). Um diese Untersuchungen durchzuführen, erfolgte die Herstellung von Chimären aus p53 und p73, bei denen jeweils 5 Aminosäuren im N-terminalen Bereich der beiden Proteine gegeneinander ausgetauscht wurden. Dadurch konnte eine p53-Mutante generiert werden, genannt p53mt24-28 (Abbildung 1.2 (B)), die von den E1B-55 kDa-Proteinen der Adenovirus-(Ad-)Typen 5 und 12 nicht gebunden werden kann (Koch *et al.*, 2001; Roth *et al.*, 1998b; Wienzek *et al.*, 2000) und nach Ad-Infektion nicht abgebaut wird (Koch *et al.*, 2001). Aufgrund der Tatsache, daß p53mt24-28 weiterhin eine transaktivierende Wirkung aufweist, welche vergleichbar zu wildtypischem p53 ist (Roth *et al.*, 1998b), eignet sich diese Chimäre hervorragend zu Untersuchungen in Adenovirus-transformierten Zellen.

1.3. Maligne Transformation durch die frühe Region 1 von Adenoviren

Obwohl Adenoviren die zur Replikation ihres Genoms notwendige Polymerase selbst exprimieren, geht man davon aus, daß sie bei diesem Prozeß zumindest auf Teile der zellulären Maschinerie zur DNS-Replikation angewiesen sind. Eine wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Vermehrung der Viren ist deshalb die Einleitung der S-

Phase in infizierten Zellen. Bewerkstelligt wird dies durch die Expression der frühen Adenovirus-Gene, insbesondere die der E1-Region (Shenk, 1996). Die Induktion der S-Phase wird dabei von der Abschaltung von Sicherheitsmechanismen begleitet, die im Normalfall eine unkontrollierte Proliferation der Zellen verhindern sollen. Dazu zählen vor allem die Möglichkeiten zum Anhalten des Zellzyklus oder der Einleitung des programmierten Zelltods, der Apoptose. Führt der replikative Zyklus der Viren zur Freisetzung neuer Viruspartikel durch Lyse der Zellen – wie dies in humanen Zellen der Fall ist – entsteht hieraus kein onkogenes Potential. In Nagerzellen haben dieselben viralen Mechanismen jedoch zur Folge, daß die Zellen maligne transformiert werden, sich also unkontrolliert teilen. Alle bekannten humanen Adenoviren können diesen Vorgang auslösen. Zellen werden in der Regel genau dann als „maligne transformiert“ bezeichnet, wenn sie vier Kriterien erfüllen:

- fehlende Kontaktinhibition des Zellwachstums (z. B. in einem konfluenten Zellrasen)
- Serum-unabhängiges Wachstum
- Anker-unabhängiges Wachstum (z. B. in Weich-Agar)
- Auslösen von Tumoren nach Injektion in Versuchstiere (Nacktmäuse)

Im Falle von Adenoviren wird die Transformation der Zellen fast immer durch das Zusammenspiel der frühen Proteine E1A (2 Spleißvarianten), E1B-55 kDa und E1B-19 kDa verursacht. Dieses Modell wird durch drei Befunde gestützt: Zum einen enthalten und exprimieren alle Adenovirus-(Ad-)transformierten Zellen diese Proteine; durch Transfektion von E1A- und E1B-Genen können Zellen transformiert werden; Viren mit Defekten in diesen Genen haben die Fähigkeit zur Transformation oft verloren (Shenk, 1996). In manchen Ad-transformierten Zellen findet man daneben noch das E4orf6-Protein in das Genom integriert, was auf eine zumindest transiente Rolle dieses Proteins bei der Transformation einiger Zelltypen schließen läßt; außerdem kann die Transformationseffizienz der E1-Region durch zusätzliche Expression von E4orf6 gesteigert werden (Nevels *et al.*, 2000; Nevels *et al.*, 1999).

In beiden angeführten Fällen – Einleitung der Virusreplikation oder Onkogenese – spielen die Interaktionen der E1-Proteine mit zellulären Faktoren eine entscheidende Rolle. Nach dem Einschleusen des Virusgenoms in den Zellkern werden als erstes die E1A-Proteine exprimiert, die hauptsächlich in den Spleißvarianten 12S und 13S vorkommen (benannt nach dem

Sedimentationskoeffizienten ihrer mRNS). Diese sind in der Lage, die Expression zellulärer Gene in *trans* zu aktivieren. Ein Beispiel hierfür ist die Aktivierung E2F-responsiver Promotoren (Abbildung 1.4): beide E1A-Proteine können an das Retinoblastomprotein (pRb) binden (Whyte *et al.*, 1988), welches in der G1-Phase im Komplex mit dem Transaktivator E2F vorliegt (siehe Kap. 1.2). Dadurch wird E2F aus dem Komplex mit pRb verdrängt (Bagchi *et al.*, 1990; Bandara und La Thangue, 1991), so daß eine Aktivierung E2F-responsiver Promotoren erfolgen kann. Dazu zählen S-Phase-spezifische Proteine wie cdk2, cdc6 und Zyklin E (Leone *et al.*, 1998), sowie Dihydrofolatreduktase (DHFR), Thymidin-Kinase, Ribonukleotid-Reduktase, DNS-Polymerase α , c-myb, cdc2 und c-myc (Nevins, 1992).

Des Weiteren werden auch die intranukleären Mengen des Tumorsuppressors p53 durch E1A erhöht (Lowe und Ruley, 1993). Dies ist eine Folge der E1A-vermittelten Expression von p14/19ARF, welches den p53-Antagonisten mdm2 inhibiert (siehe Kap. 1.2). Ein Anhalten des Zellzyklus oder die Einleitung der Apoptose durch p53 werden dabei durch die adenoviralen E1B-Proteine (19 kDa und 55 kDa) und das E4-34 kDa-Protein verhindert (letzteres stammt aus dem offenen Leserahmen 6 der E4-Region, daher wird das Protein auch E4orf6 genannt). Das E1B-55 kDa-Protein von Adenovirus Typ 5 (Ad5) bindet direkt an p53 (Sarnow *et al.*, 1982) und inhibiert den Tumorsuppressor zumindest vorübergehend, eine Eigenschaft, die direkt mit den transformierenden Eigenschaften von E1B-55 kDa korreliert (Yew und Berk, 1992). Die Bindung erfolgt innerhalb der transaktivierenden, N-terminalen Domäne von p53 (Lin *et al.*, 1994) und führt zur Repression von p53-vermittelter Expression (Yew *et al.*, 1994). Dabei wird der Tumorsuppressor vom Nukleus in charakteristische, perinukleäre Proteinansammlungen („Cluster“ oder „Dots“) relokalisiert (Blair Zajdel und Blair, 1988; Zantema *et al.*, 1985). Aufgrund der Tatsache, daß p53 von E1B inaktiviert wird, kann eine starke Erhöhung der intrazellulären p53-Konzentration erfolgen, ohne daß dies die Zellen am Wachstum hindert. Befinden sich sowohl Ad5 E1B-55 kDa als auch das Ad5 E4orf6-Protein in der Zelle, so erfolgt zusätzlich ein rapider Abbau von p53, nicht aber von p53-homologen Proteinen (z. B. p73) (Roth *et al.*, 1998b; Steegenga *et al.*, 1998; Wienzek *et al.*, 2000).

Aufgrund des engen Zusammenhangs zwischen p53-Bindung und transformierenden Eigenschaften von E1B-55 kDa geht man bisher davon aus, daß p53 in Ad-transformierten Zellen kontinuierlich inaktiviert wird (Grand *et al.*, 1995). Diese Annahme wird noch durch den Befund unterstützt, daß die Zugabe von Peptiden, die die Interaktion zwischen E1B und

p53 unterbinden, zumindest zu einer temporären Wachstumsrestriktion von Ad5 E1-transformierten Zellen führt (Hutton *et al.*, 2000).

Das kleinere E1B-Protein (E1B-19 kDa) trägt durch Bindung und Inhibition des p53-induzierten Bax-Proteins direkt zur Verhinderung der Apoptose bei (Chen *et al.*, 1996a; Han *et al.*, 1996; Hashimoto *et al.*, 1991; Perez und White, 1998; Shen und Shenk, 1994).

Durch die Zusammenarbeit der drei adenoviralen Proteine E1A, E1B-19 kDa und E1B-55 kDa, eventuell unterstützt durch E4orf6, können also Zellen maligne transformiert werden, wobei die Effekte dieser Proteine auf den Tumorsuppressor p53 eine besondere Rolle spielen. Dabei ist die Transformation von humanen Zellen durch Adenoviren jedoch ein sehr seltenes Ereignis, das bisher nur im Labor beobachtet werden konnte.

1.4. Einfluß weiterer transformierender viraler Proteine auf p53

Aufgrund seiner zentralen Bedeutung bei Zellzyklusregulation und Apoptose ist p53 eines der Hauptziele transformierender Proteine von DNS-Tumoviren. Neben den frühen adenoviralen Proteinen E1A, E1B-55 kDa und E4-34 kDa sind hier noch das große T-Antigen des Simian Vacuolating Virus 40 (SV40) und das E6-Protein der humanen Papillomaviren (HPV) zu nennen.

Das große T-Antigen von SV40 hat eine ähnliche Wirkung auf den Tumorsuppressor p53 wie das adenovirale E1B-55 kDa-Protein. Es bindet p53 und inhibiert seine transaktivierenden Eigenschaften, führt jedoch nicht zu seiner Destabilisierung (Jiang *et al.*, 1993; McCormick *et al.*, 1981; Sarnow *et al.*, 1982).

Im Gegensatz hierzu führt die Anwesenheit des E6-Proteins von humanen Papillomaviren zur Destabilisierung von p53, so daß der Tumorsuppressor nahezu vollständig aus den Zellen eliminiert wird. Dies ist das Ergebnis der Bildung eines Komplexes zwischen HPV-E6 und dem zellulären Protein E6-AP, das – ähnlich dem mdm2-Protein – als Ubiquitinligase funktioniert und durch eine verstärkte Ubiquitynylierung von p53 zu seinem proteasomalen Abbau führt (Huibregtse *et al.*, 1991; Scheffner *et al.*, 1993; Scheffner *et al.*, 1990; siehe auch Kap. 1.2).

1.5. Aufgabenstellung

Aus den oben angeführten Erläuterungen ergeben sich folgende Fragen: Erfolgt tatsächlich eine vollständige Inaktivierung des gesamten p53-Pools einer Adenovirus-transformierten Zelle durch E1B-55 kDa, oder ist in den Zellen noch transkriptionell aktives p53 vorhanden? Wenn dies der Fall ist, so müßten in Adenovirus-transformierten Zellen endogene – und auch exogen eingebrachte – p53-responsive Promotoren aktiv sein. Dies sollte in Adenovirus-transformierten Zellen, aber auch für andere Virus-transformierte Zellen (HPV, SV40) vergleichend untersucht werden.

Wenn es in Adenovirus-transformierten Zellen tatsächlich aktives p53 gibt, so stellt sich im Anschluß daran die Frage, ob Adenovirus-transformierte Zellen aktives p53 – auch exogen eingebrachtes bzw. überexprimiertes p53 – tolerieren können. Um dies zu beantworten, wurde die Möglichkeit untersucht, Adenovirus-transformierte Zellen zur stabilen Überexpression von aktivem p53 zu bringen. Die erhaltenen Zelllinien wurden hinsichtlich ihres Wachstums charakterisiert.

2. Material

Wichtige Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt. Gesonderte Auflistungen der eingesetzten Medien, Puffer und Lösungen, Antikörper, Kits, Zelllinien sowie Viren, Bakterien und Vektoren befinden sich in nachfolgenden Unterkapiteln.

2.1. Chemikalien

Alkalische Phosphatase	Roche
Aprotinin („Trasylol“)	Bayer
BSA (Rinderserumalbumin)	Roche
Ciprofloxacin („Ciprobay“)	Bayer
DNS-Längenstandards	Roche
Fötale Kälberserum (FCS)	Life Technologies
Fluoprep	BioMérieux
FuGene (Transfektionsreagenz)	Roche
Gewebekulturmaterialien	Costar Greiner Life Technologies - Nalge Nunc
H ₂ O, RNase-frei	Ambion
Klenow-Fragment	Roche
L-Glutamin	Life Technologies
Lipofectamine 2000 (Transfektionsreagenz)	Life Technologies
Lipofectamine PLUS (Transfektionsreagenz)	Life Technologies
Nitrozellulose	Schleicher & Schuell
Oligonukleotide („Primer“)	MWG Biotech
Penicillin / Streptomycin-Gemisch	Life Technologies
<i>Pfu</i> Turbo DNS-Polymerase	Stratagene
Polyvinylidendifluorid-Membran 0,45µm (PVDF)	Millipore
Protein-Größenstandards („Rainbow“-Marker)	Amersham
Radiographiefilme (Biomax MR, X-Omat AR)	Eastman Kodak Company
Ribonuklease H (RNase H)	Life Technologies

Superfect (Transfektionsreagenz)	Qiagen
Superscript II (Reverse Transkriptase)	Life Technologies
SuperSignal West Ultra / Dura / Femto	P)erce
T4 DNA Ligase (High Concentration)	MBI
Tetracyclin	Life Technologies
Trixol	Life Technologies

2.2. Medien

Medien für die Bakterienkultur:

2YT-Medium (Fertigpulver)	Sigma
LB-Medium (Fertigpulver)	Sigma

Den verwendeten Medien wird nach dem Ansetzen und Autoklavieren das jeweils benötigte Antibiotikum (Ampicillin 200 µg/ml; Kanamycin 50 µg/ml) unter sterilen Bedingungen zugesetzt. Wenn statt des Flüssigmediums Agarplatten verwendet werden, wird den Medien vor dem Autoklavieren Bactoagar in einer Endkonzentration von 1,5 % (w/v) zugegeben.

Medium für die Zellkultur:

Dulbecco's Modified Eagle Medium (25 mM HEPES-gepuffert)	Life Technologies
---	-------------------

2.3. Puffer und Lösungen

Anodenpuffer I:

- 300 ml 1 M Tris Base
- 200 ml Methanol
- 500 ml H₂O bidest.

Anodenpuffer II:

- 25 ml 1 M Tris Base
- 200 ml Methanol
- 775 ml H₂O bidest.

Erststrang-Puffer für die reverse Transkription (5×):

- 250 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25 °C)
- 375 mM KCl
- 15 mM MgCl₂

Formamid-EDTA-Dextranblau-Probenpuffer:

- 1 Volumenteil 25 mM EDTA (pH 8,0 bei 25 °C)
- 5 Volumenteile Formamid
- 50 mg/ml Dextranblau

Kathodenpuffer:

- 25 ml 1M Tris Base
- 200 ml Ethanol
- 5,248 g (entsprechend 40 mM) ε-Aminocaprinsäure
- H₂O bidest. ad 1 l

Kristallviolettlösung (500 ml):

- 135 ml 37 % Formaldehyd
- 365 ml H₂O bidest.
- 0,5 g Kristallviolett

Laufpuffer für SDS-PAGE (10×):

- 151 g Tris
- 720 g Glycin
- 50 g SDS
- H₂O bidest. ad 5 l

pH-Wert nicht einstellen, die verdünnte Lösung hat einen pH von 8,3

PBS (Phosphat Buffered Saline):

- 8,0 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,15 g Na₂HPO₄
- 0,1 g MgCl₂ (fehlt bei PBS^{def})
- 0,2 g KH₂PO₄
- 0,13 g CaCl₂ (fehlt bei PBS^{def})
- H₂O bidest. ad 1 l
- autoklavieren

PBS^{def}:

- Zusammensetzung wie PBS, ohne MgCl₂ und CaCl₂
- autoklavieren

Ponceau S-Lösung zum Anfärben von Proteinen:

- 0,5 g Ponceau S in 1 ml Eisessig geben und kräftig schütteln
- 100 ml H₂O bidest. zugeben
- Lösung nicht länger als 1 Monat verwenden

Probenpuffer für Agarose-Gelelektrophorese (6×):

- 0,1 % Bromphenolblau
- 0,1 % Xylencyanol
- 30 % Glycerin
- in H₂O bidest.

Probenpuffer für SDS-PAGE (2×):

- 2 ml Glycerin
- 3 ml 20 % SDS
- 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8
- 0,25 ml 1 % Bromphenolblau
- 1 ml β-Mercaptoethanol (frisch zusetzen)

Puffer für SDS-PAGE-Trenngel (1,5 M Tris pH 8,8 + SDS):

- 90,8 g Tris
- in ca. 400 ml H₂O bidest. lösen, pH-Wert mit Salzsäure einstellen
- 20 ml 10 % SDS
- H₂O bidest. ad 500 ml

Puffer für SDS-PAGE-Sammelgel (0,5 M Tris pH 6,8 + SDS):

- 30,3 g Tris
- in ca. 400 ml H₂O bidest. lösen, pH-Wert mit Salzsäure einstellen
- 20 ml 10 % SDS
- H₂O bidest. ad 500ml

RIPA-Lysispuffer:

- 20 mM Tris-HCl pH 7,5
- 150 mM NaCl
- 10 mM EDTA
- Trasylol (100.000 KIE)
- 1 % Triton X-100
- 1 % DOC
- 0,1 % SDS

für 500 ml:

- 10 ml 1M Tris pH 7,5 Stammlösung
- 4,38 g NaCl
- 2,22 g EDTA
- 5× 5 ml-Ampulle
- 5 ml Triton X-100
- 50 ml 10 % DOC
- 5 ml 10 % SDS
- H₂O bidest. ad 500 ml

SSC (20×):

- 175,3 g NaCl (≡ 3 M)
- 88,2 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (≡ 0,3 M)
- in 800 ml H₂O lösen
- pH mit HCl auf 7,0 einstellen
- H₂O ad. 1 l

Transferpuffer für Naß-Blot:

- 100 ml 10× Western-Salze
- 750 ml H₂O bidest.
- 150 ml Methanol

Tris-Azetat-EDTA-(TAE)-Laufpuffer für Agarose-Gelelektrophorese (50×):

- 242 g Tris
- 57,1 ml Eisessig
- 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
- H₂O bidest. ad 1 l
- autoklavieren

Tris-Borat-EDTA-(TBE)-Laufpuffer für Sequenziergele (10×):

- 108 g Tris/HCl
- 35 g Borsäure
- 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
- H₂O bidest. ad 1 l
- autoklavieren

TSS-Puffer:

- 85 % (v/v) LB-Medium
- 10 % (w/v) PEG 8000
- 5 % (v/v) DMSO
- 50 mM MgCl₂
- in H₂O bidest.
- steril filtrieren

Western-Salze (10×):

- 60,55 g Tris
- 288,1 g Glycin
- 4 ml 10 % SDS (entsprechend 0,02 %)
- H₂O bidest. ad 2.000 ml
- pH-Wert der Lösung auf 8,3 einstellen

2.4. Antikörper

Proteinspezifische Antikörper („Erstantikörper“):

Anti-HA-Tag (Maus, monoklonal, „HA.11“)	BAbCo ¹
Anti-p53 (Maus, monoklonal, „1801“)	Calbiochem
Anti-p53 (Maus, monoklonal, „DO-1“)	Calbiochem
Anti-p53 (Maus, monoklonal, „421“)	Calbiochem
Anti-p53 (Kaninchen, polyklonal, „FL393“)	Santa Cruz
Anti-LaminB1 (Maus, monoklonal)	Zymed
Anti-E2A-72kDa (Maus, monoklonal, „B6-6“)	erhalten von J. Flint, Princeton
Anti-E1B-55kDa (Maus, monoklonal, „2A6“)	erhalten von A. J. Levine, Princeton
Anti-eGFP (Maus, monoklonal)	Clontech
Anti-mdm2 (Maus, polyklonal, „2A10“)	erhalten von A. J. Levine, Princeton

Speziesspezifische Antikörper („Sekundärantikörper“):

Anti-Maus-IgG FITC-gekoppelt (Kaninchen, monoklonal)	DAKO
Anti-Maus-IgG HRP-gekoppelt (Ziege, monoklonal)	Jackson
Anti-Maus-IgG „Alexa Fluor 594“ (rot)	Molecular Probes
Anti-Maus-IgG „Alexa Fluor 488“ (grün)	Molecular Probes
Anti-Kaninchen-IgG „Alexa Fluor 594“ (rot)	Molecular Probes
Anti-Kaninchen-IgG „Alexa Fluor 488“ (grün)	Molecular Probes

2.5. Kits

ABI PRISM BigDye Terminator	
Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer
Luciferase Assay Kit	Promega
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen

¹ Berkeley Antibody Company

QIAprep 8 Miniprep Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
TNT T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega

2.6. Plasmide & Vektoren

pBP100luc	Roth <i>et al.</i> , 1998a
pcDNA3	Life Technologies
pCGNAd5E1B	Dobbelstein <i>et al.</i> , 1997
pCGN β Gal	Roth und Dobbelstein, 1997
pCIN4	Rees <i>et al.</i> , 1996
pCIN4p53	hergestellt von N. Kartasheva
pCIN4p53R273H	hergestellt von K. Löhr
pCIN4p53mt24-28	hergestellt von C. Löber
pRCp53	Lin <i>et al.</i> , 1994
pRCp53mt24-28	Roth <i>et al.</i> , 1998b
pRSVluc	Ristea <i>et al.</i> , 2000

2.7. Bakterien

Folgende Bakterienstämme wurden für die Amplifikation der Plasmide verwendet:

Epicurian coli Sure electroporation-competent cells (Stratagene)

Genotyp: e14⁻ (*mcrA*⁻) Δ (*mcrBC-hsdSMR-mrr*)171 *endA1 supE44 thi-1 gyrA96*
relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kanr) uvrC [F' proAB
lacI^qZ Δ M15 Tn10 (Tetr)]

Escherichia coli ElektroMAX DH10B (Life Technologies)

Genotyp: $F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi80dlacZ\Delta M15 \Delta lacX74 endA1$
 $recA1 deoR \Delta(ara, leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsG rpsL \lambda^-$

Escherichia coli DH10B (Life Technologies)

Genotyp: wie oben

2.8. Viren

rAdGFP	rekombinantes Adenovirus auf der Grundlage des AdEasy-Systems, welches das GFP-Protein exprimiert
rAd5E1B	rekombinantes Adenovirus auf der Grundlage des AdEasy-Systems, welches GFP und das E1B-55kDa-Protein von Adenovirus Typ 5 exprimiert
rAdp53	rekombinantes Adenovirus auf der Grundlage des AdEasy-Systems, welches GFP und p53 exprimiert
rAdp53mt24-28	rekombinantes Adenovirus auf der Grundlage des AdEasy-Systems, welches GFP und p53mt24-28 exprimiert

Diese Viren wurden von Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dobbelsstein nach dem „AdEasy“-Verfahren hergestellt (Koch *et al.*, 2001).

2.9. Eukaryontenzellen

Verwendete permanente Zelllinien:

HeLa (American Type Culture Collection-(ATCC-)Nr. CCL2)

- humanes Uteruskarzinom (epitheloid); HPV 18-transformiert, enthalten E6-Protein und E7-Protein von HPV

H1299 (Gabe von A. J. Levine)

- humane Großzellen-Lungenkarzinomzellen; p53 -/-

COS7 (Gabe von A. J. Levine)

- Affennierenzellen; CV1-Zellen, transformiert mit Origin-deletierter SV40-Mutante, enthalten SV40-T-Antigen

HER911 (Introgene)

- *in vitro* hergestellt aus humanen Retina-Zellen durch Adenovirus-E1-Transformation (Fallaux *et al.*, 1996)

HEK293 (ATCC-Nr. CRL-1573)

- *in vitro* hergestellt aus humanen Nierenzellen durch Adenovirus-E1-Transformation (Graham *et al.*, 1977)

3. Methoden

3.1. Zellbiologische Methoden

3.1.1. Zellkulturtechnik

Zur Kultivierung von adhärennten Zelllinien werden ventilierte Kulturflaschen verwendet, welche bei einer konstanten Temperatur von 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit (RH) und einem CO₂-Gehalt von 5 % inkubiert werden. Dem verwendeten Nährmedium (*Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) mit 25 mM HEPES-Puffer) werden je 500 ml-Flasche noch folgende Zusätze beigefügt:

10 %	Fötale Kälberserum (FCS)
5 ml	L-Glutamin (200 mM)
2,5 ml	Penicillin / Streptomycin (5.000 U/ml Penicillin G [Na-Salz]; 5.000 µg/ml Streptomycin-Sulfat)
200 µl	Tetracyclin (5 mg/ml)
2,5 ml	Ciprofloxacin („Ciprobay“; 2 mg/ml)

Für das Umsetzen der Zellen erfolgt zunächst die Abnahme des Mediums; anschließend wird der Zellrasen mit PBS^{def} gewaschen, um Reste von Serum zu entfernen. Zum Ablösen der Zellen folgt eine Inkubation mit Trypsin-EDTA-Lösung für 2-10 Minuten (abhängig vom Zelltyp) bei 37 °C / 5 % CO₂ / 95 % RH. Durch den Chelatbildner Ethylendiaminetetraacetat (EDTA; 0,05 %) werden die für die Zell-Zell-Adhäsion wichtigen Ca²⁺-Ionen gebunden; die Protease Trypsin (0,025 %) sorgt für das Herauslösen der Zellen aus ihrem Verband durch Spaltung der Proteinbrücken zwischen den einzelnen Zellen und zum Gefäßboden. Nach dem Ablösen wird der Zellsuspension frisches Kulturmedium zugesetzt. Überschüssiges Trypsin wird durch die im Serum enthaltenen Protease-Inhibitoren inaktiviert. Es folgt das Aussäen der Zellen in ein neues Kulturgefäß (Passage); für die kontinuierliche Kultur werden HEK293- und HER911-Zellen nicht höher als 1:10 verdünnt; alle anderen verwendeten Zelllinien werden maximal 1:15 verdünnt. Alle Zellkulturarbeiten werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt, um mikrobielle Kontaminationen zu vermeiden.

Zur Bestimmung der Zellzahl wird eine Neubauer-Zählkammer verwendet (Kammerfaktor = 10^4). Frisch trypsinierte Zellen werden in einem kleinen Volumen Kulturmedium aufgenommen, und ein Tropfen der Suspension wird zwischen Deckglas und Zählkammer gegeben. Ausgezählt werden jeweils 5 Großquadrate; nach Berechnung des Mittelwerts für ein Quadrat erhält man durch Multiplikation mit dem Kammerfaktor die Anzahl der Zellen pro Milliliter.

Von den verwendeten Zellen werden von einer möglichst frühen Passage mehrere Aliquote in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu werden die Zellen trypsiniert und nach Zugabe von frischem Medium bei $100\times g$ für 5 Minuten zentrifugiert. Alle weiteren Schritte erfolgen auf Eis. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Zellpellet in einer vorgekühlten Lösung (circa $4\text{ }^{\circ}\text{C}$) aus 10 % DMSO in FCS resuspendiert und in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese werden zunächst in Papiertücher gewickelt und über Nacht bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ langsam abgekühlt, bevor der Transfer in flüssigen Stickstoff erfolgt.

Für das Auftauen der Zellen wird frisches Medium in eine Gewebekulturflasche vorgelegt. Nach Entnahme der tiefgefrorenen Zellen aus dem flüssigen Stickstoff werden diese mittels Handwärme aufgetaut und dann sofort in die Zellkulturflasche überführt. Es folgt die Inkubation bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 5 % CO_2 / 95 % RH.

3.1.2. Herstellung eines Virusstocks

Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Adenoviren, welche nach dem „AdEasy“-System hergestellt wurden und bei denen die E1-Region vollständig deletiert wurde, können nur in den E1-komplementierenden Zelllinien HEK293 und HER911 vermehrt werden.

Zunächst werden Zellen, die zu 60-80 % konfluent gewachsen sind, zweimal mit PBS^{def} gewaschen, um durch Entfernen des Serums eine effiziente Infektion der Zellen zu gewährleisten. Anschließend erfolgt die Inokulation der Zellen mit Virussuspension in einem geringen Volumen (5 ml für 162 cm^2 -Kulturflaschen) von serumfreiem Dulbecco's Medium (m.o.i. $\approx 0,5$ -1). Nach Adsorption des Virus an die Zellen bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 5 % CO_2 / 95 % RH auf einem Schwenkbrett für 1 Stunde folgt das Entfernen des Inokulums und die Zugabe von 30 ml 1x Dulbecco's Medium mit 10 % FCS.

Die Virusernte wird durchgeführt, sobald sich etwa 50 % der Zellen vom Boden abgelöst haben. Nach Abschaben der verbliebenen anhaftenden Zellen ins Medium werden diese durch

Zentrifugation für 5 min bei 800×g und 4 °C pelletiert. An das Waschen der Pellets mit PBS^{def} schließt sich eine erneute Zentrifugation unter gleichen Bedingungen an. Nun werden die Pellets in je 1 ml PBS^{def} aufgenommen und die Zellen durch dreimaliges Frieren und Tauen aufgeschossen. Die dadurch freigesetzten Viruspartikel werden zu je 1 ml aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.1.3. Titerbestimmung

Zur Titration der Virusstocks werden HER911-Zellen verwendet. Am ersten Tag werden je $5 \cdot 10^4$ Zellen in 500 µl 1x Dulbecco's Medium mit 10 % FCS auf Vierkammer-Objekträger ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Dann werden vom Virusstock serielle Verdünnungen (10^{-4} bis 10^{-7}) in 1 ml Medium ohne FCS hergestellt. Nach Abnahme des Mediums werden die Zellen mit je 500 µl Suspension (pro Kammer) der Verdünnungen inokuliert. Die weitere Inkubation bei 37 °C / 5 % CO₂ / 95 % RH erfolgt zunächst für eine Stunde auf einem Schwenkbrett und danach stehend. Am dritten Tag werden die Zellen fixiert, permeabilisiert und gegen das frühe DNA-bindende Adenovirusprotein E2A-72 kDa, sowie mit DAPI gefärbt (siehe Kapitel 2.4 und 3.2.1). Mittels Fluoreszenzmikroskop wird nun für zufällig ausgewählte Gesichtsfelder das Verhältnis von E2A-positiven Zellen (diffuse Kernfärbung in der frühen Infektionsphase, später ist das Protein in punktförmigen Replikationszentren lokalisiert) zu DAPI-gefärbten Zellkernen bestimmt. Für eine korrekte Titerbestimmung sollten nicht mehr als 10-30 % der Zellen infiziert sein (Vermeidung von Doppelinfektionen einzelner Zellen). Errechnet wird der Titer durch die Formel $T = [\text{Anteil der infizierten Zellen}] \times 5 \cdot 10^4 \times 2 \times \text{Verdünnung}$.

3.1.4. Transduktion von Eukaryontenzellen

Für die Infektion von Zellen mit rekombinanten Viren (Transduktion) werden in Sechskammer-Schalen (Kammerdurchmesser 30 mm), abhängig vom Zelltyp, am Tag zuvor 150.000-300.000 Zellen je Kammer ausgesät. Nach Inkubation im Brutschrank über Nacht wird das vorhandene Medium abgenommen, und die Zellen werden mit 500 µl Virussuspension in DMEM_{PUR} inokuliert. Es folgt eine einstündige Inkubation auf einem

Schwenkbrett im Brutschrank, danach wird mit DMEM_{VOLL} auf 3 ml aufgefüllt. Die m.o.i. (eingesetzte Viruspartikel pro Zelle) hängt dabei von Zelllinie und experimentellem Ansatz ab.

3.1.5. Kristallviolettffärbung von Zellen

Zur besseren Auswertung der Colony Forming Assays (Kapitel 3.3.2) werden die Zellen angefärbt. Nach 2maligem Waschen mit PBS werden diese dazu mit Kristallviolettlösung (Kap. 2.3) überschichtet und für 10 Minuten auf einem Schwenkbrett (60 upm) geschüttelt. Anschließend werden die Zellen erneut mehrmals mit PBS gewaschen, bis sich die Zellkolonien deutlich vom nicht angefärbten Untergrund abheben.

3.1.6. Liposomen-vermittelte Transfektion von Eukaryontenzellen

Die Aufnahme der Plasmid-DNS in die Zellen wird über Liposomen-vermittelte Transfektion erreicht (Felgner *et al.*, 1987; Felgner und Ringold, 1989). Hierbei erfolgt die Aufnahme der DNS in Form von Komplexen mit artifiziellen Liposomen, die eine Verschmelzung mit der Plasmamembran vermitteln. Das optimale Verhältnis zwischen DNS und den verwendeten Lipiden muß dabei experimentell ermittelt werden.

Für die Transfektion von Zellen in Sechskammer-Schalen (Kammerdurchmesser 30 mm) werden am Vortag 300.000 (HeLa) oder 200.000 (alle anderen permanenten Zelllinien) Zellen je Kammer in 1x Dulbecco's Medium mit 10 % FCS ausgesät und anschließend über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach erfolgter Transfektion ist für die meisten Studien eine Inkubationszeit von 24-48 Stunden bis zur Ernte oder Fixierung der Zellen optimal. In den folgenden Unterkapiteln sind jeweils die Mengen für eine Kammer angegeben.

3.1.6.1. Lipofectamine2000

Pro Transfektionsansatz werden 2,4 µg Plasmid-DNS in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 200 µl DMEM_{PUR} gemischt. In einem weiteren Gefäß werden je 200 µl DMEM_{PUR} mit 8 µl Lipofectamine2000 gemischt und für 4 bis maximal 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach dem Mischen der beiden Ansätze erfolgt eine Inkubation bei RT für weitere 20 min. Nun werden

die Transfektionsansätze zum vorhandenen Medium gegeben und die Zellen weiter im Brutschrank inkubiert.

3.1.6.2. Lipofectamine PLUS

Vor der Transfektion wird das vorhandene Medium abgenommen und gegen 800 μ l DMEM_{PUR} ausgetauscht. Pro Transfektionsansatz werden nun 1 μ g Plasmid-DNS in ein Reaktionsgefäß vorgelegt; dazu werden 100 μ l DMEM_{PUR} und 6 μ l PLUS-Reagenz gegeben und gut gemischt. In einem zweiten Gefäß werden jeweils 100 μ l DMEM_{PUR} mit 4 μ l Lipofectamine gemischt und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Die Ansätze werden nun vereinigt und für weitere 15 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe der Transfektionsansätze zu den Zellen. Nach einer Inkubation bei 37 °C / 5 % CO₂ / 95 % RH für 3 h wird der Ansatz abgenommen, und die Zellen werden mit 3 ml DMEM_{VOLL} weiter inkubiert.

3.2. Proteinchemische & Immunologische Methoden

3.2.1. Indirekte Immunfluoreszenz (IFA)

Für die Analyse von Proteinen in der indirekten Immunfluoreszenz werden zunächst Zellen in Vierkammer-Objektträger (4K-OT) ausgesät ($5 \cdot 10^4$ Zellen je Kammer in 500 μ l DMEM_{VOLL}) und über Nacht bei 37 °C / 5 % CO₂ / 95 % RH inkubiert.

Am darauffolgenden Tag werden die Zellen 2 \times kurz mit PBS gewaschen und dann für 15 min bei RT mittels 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS fixiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen erfolgt die Permeabilisierung der Zellen durch Behandlung mit 0,2 % Triton X100 in PBS für 20 min, erneut gefolgt von 2 Waschschritten. Nicht bewachsene Stellen des Objektträgers werden durch Zugabe von Blocklösung (10 % FCS in PBS) für 10 min bei RT abgesättigt. Hieran schließt sich die Inkubation mit dem proteinspezifischen Antikörper (verdünnt in Blocklösung) für 1 h an. Dann werden die Zellen zweimal kurz und einmal 5 Minuten in PBS gewaschen und anschließend mit dem speziesspezifischen, sekundären Antikörper („Alexa“-Antikörper, 1:500 in Blocklösung) für 30 min im Dunkeln inkubiert. Bei

Bedarf wird bei diesem Schritt gleichzeitig die DAPI-Färbung durchgeführt, indem eine Stammlösung DAPI (10 mg/ml in H₂O) 1:10⁴ in Blocklösung verdünnt und diese Lösung dann zum Ansetzen des speziesspezifischen Antikörpers verwendet wird. Danach schließen sich erneut Waschschriffe an (2× kurz, einmal 5 Minuten in PBS), bevor die Zellen in Fluoprep fixiert und nach dem Aushärten am Rand des Deckgläschens mit Corbitbalsam gegen Austrocknen geschützt werden. Zur Auswertung werden die Zellen unter einem Fluoreszenz-Mikroskop betrachtet.

3.2.2. Immunoblot

3.2.2.1. Ernten der Zellen für den Immunoblot

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen werden die jeweiligen Zellen zunächst ins vorhandene Medium abgeschabt und durch Zentrifugation für 5 min bei 200×g (RT) pelletiert. Der Überstand wird nun verworfen und das Zellsediment in 150 µl RIPA-Puffer lysiert (auf Eis). Nach Zugabe von 50 µl Laemmli-Puffer werden die Proben für mindestens 2 Stunden bei 4 °C geschüttelt, um die DNS zu scheren. Es schließt sich eine 5minütige Inkubation bei 95 °C an, gefolgt von einer Zentrifugation für 2 min bei 15.000×g und 4 °C. Die Proben können jetzt auf ein Gel aufgetragen oder bei -20 °C gelagert werden.

3.2.2.2. Halbtrocken-Verfahren

Zur immunologischen Detektion werden die Proteine nach ihrer Auftrennung durch Gelelektrophorese (siehe 3.5.2) im sogenannten Halbtrocken-Verfahren auf eine Membran übertragen. Dabei handelt es sich entweder um eine Polyvinylidifluorid-(PVDF-)Membran („Immobilon P“, Millipore) oder Nitrozellulose (Schleicher & Schuell). Die PVDF-Membran muß zuerst kurz in Methanol getaucht werden, um ein vollständiges Benetzen mit dem verwendeten Anodenpuffer (s.u.) zu gewährleisten; bei Nitrozellulose entfällt dieser Schritt. Zwischen zwei Kohlenstoff-Platten, welche als Kathode und Anode dienen, werden Gel, Membran und mehrere Lagen Filterpapier wie folgt plaziert:

Aufbau:

Kathode (negativ)

9 Lagen Filterpapier	getränkt in:	Kathodenpuffer
Polyacrylamidgel	getränkt in:	Anodenpuffer II
Membran	getränkt in:	Anodenpuffer II
3 Lagen Filterpapier	getränkt in:	Anodenpuffer II
6 Lagen Filterpapier	getränkt in:	Anodenpuffer I

Anode (positiv)

Durch Anlegen einer konstanten Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gel für eine Dauer von 1,5 h werden die Proteine auf die Membran übertragen. Beim Abbau des Blots wird die Membran sofort in PBS / 0,1 % Tween 20 eingelegt, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach dem Entfernen von Gelresten wird die Membran über Nacht in 5 % Milchpulver in PBS / 0,1 % Tween 20 („Milch“) eingelegt und bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert, um freie Proteinbindungsstellen abzusättigen. Die immobilisierten Proteine können dann immunologisch nachgewiesen werden.

3.2.2.3. Naß-Verfahren

Als alternative Methode zum Proteintransfer auf Membranen wird das Naß-Verfahren angewendet (auch in diesem Fall werden entweder PVDF-Membranen oder Nitrozellulose eingesetzt, siehe Kap. 3.2.2.2). Hierbei wird lediglich ein einzelner Puffer benötigt (Transferpuffer Naß-Blot, siehe Kapitel 2.3). Der Blot-Aufbau befindet sich senkrecht zwischen zwei von Platindrähten durchzogenen Plastikwänden, die als Kathode und Anode dienen, und ist vollständig im Transferpuffer eingetaucht. Auf diese Weise wird eine Pufferdepletion vermieden, so daß längere Transferzeiten möglich sind.

Aufbau:

Kathode (negativ)

Schwamm

2 Lagen Filterpapier

Polyacrylamidgel

Membran

2 Lagen Filterpapier

Schwamm

Anode (positiv)

Durch Anlegen einer konstanten Spannung von 37 V über Nacht werden die Proteine auf die Membran übertragen. Auch hier muß beim Abbau des Blots ein Austrocknen der Membran verhindert werden (siehe oben). Anschließend wird die Membran für 30 min in Milch eingelegt und bei RT auf einem Schwenkbrett (60-120 upm) inkubiert, um freie Proteinbindungsstellen abzusättigen. Die immobilisierten Proteine können wiederum immunologisch nachgewiesen werden.

3.2.2.4. Detektion der Proteine

An das Blocken der Membran in 5 % Milchpulver in PBS / 0,1 % Tween 20 („Milch“) schließt sich der immunologische Nachweis der Proteine an. Dazu wird die Membran zunächst mit dem proteinspezifischen Antikörper inkubiert; dieser wird ebenfalls in Milch verdünnt (Hybridoma-Überstände 1:100, monoklonale Antikörper 1:5.000). Um eine gleichmäßige Verteilung der Antikörpersuspension auf der Membran zu gewährleisten, wird diese nach Zugabe des Antikörpers für 2 Stunden auf einem Schwenkbrett bei 90 upm geschüttelt. Daran schließt sich ein intensiver Waschvorgang an: 3× kurz in PBS / 0,1 % Tween 20, 1× 15 min in Milch (ebenfalls auf einem Schwenkbrett bei 90 upm), erneut 3× kurz in PBS / 0,1 % Tween 20 und 1× 15 min in Milch, abschließend noch 3× kurz in PBS / 0,1 % Tween 20. Nun erfolgt die Behandlung mit dem speziesspezifischen Antikörper (an

Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper; Jackson) in gleicher Weise, jedoch nur für 1 Stunde, wiederum gefolgt vom oben dargelegten Waschvorgang.

Für die nun folgende Detektion der Proteine wird das ECL-Verfahren („Enhanced Chemoluminescence“) verwendet. Supersignal West Ultra [Pierce; als 1:1-Gemisch der Komponenten A (Luminol/Enhancer-Lösung) und B (Peroxidlösung)] wird auf die Membran gegeben, welche dann in einen Polyethylen-Beutel eingeschweißt wird. Durch die anschließende Exposition und Entwicklung eines für die Wellenlänge $\lambda = 425 \text{ nm}$ empfindlichen Films (Kodak Biomax MR oder Kodak X-Omat AR) kann die spezifische Antikörperreaktion mit den Proteinen sichtbar gemacht werden.

3.2.3. Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration werden zwischen 1 μl und 5 μl Zellysat in eine Küvette pipettiert und anschließend mit 1 ml des Bradford-Reagenzes (BioRad; 1:5 verdünnt) versetzt. Nach Messung der Extinktion bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ erfolgt entweder ein Abgleich der Proben nach relativem Proteingehalt oder eine Berechnung nach der Formel:

$$\text{Proteinkonzentration (mg / ml)} = \frac{\text{Extinktion bei } \lambda = 595 \text{ nm}}{0,059 \text{ ml/mg}}$$

3.3. Assays

3.3.1. Luziferase-Assay

Um die Transkriptionsaktivierung in eukaryontischen Zellen zu untersuchen, werden Luziferase-Assays durchgeführt. Dazu werden die Zellen in Sechskammer-Schalen ausgesät und am nächsten Tag mit einem Reporterplasmid transfiziert, welches das Gen für das Enzym Luziferase unter der Kontrolle eines bestimmten Promotors exprimiert. Die hier eingesetzte Luziferase enthält eine Punktmutation, wodurch sie im Zytoplasma lokalisiert ist (Clontech). Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Promotoren handelt es sich um den p53-

responsiven Anteil des *mdm2*-Promotors („BP100“) und den 3'-Long Terminal Repeat-(LTR)-Promotor des Rous Sarcoma Virus (RSV), welcher konstitutiv aktiv ist. Diese Konstrukte können entweder alleine in Zellen eingebracht (Untersuchung der basalen Aktivität des Promotors in der jeweiligen Zelllinie) oder zusammen mit einem Effektor kotransfiziert werden, dessen Auswirkung auf die Aktivierung des Promotors untersucht werden soll. Bereits 24 h nach Transfektion der Zellen kann die Analyse der Luziferaseaktivität erfolgen.

Dafür werden die Zellen zunächst in das vorhandene Medium abgeschabt und in einem Reaktionsgefäß bei 100×g für 10 min bei RT pelletiert. Das erhaltene Zellsediment wird in Reporter Lysis Buffer (Promega; 150 µl Puffer pro Kammer einer Sechskammer-Schale) resuspendiert und für 15 Minuten bei RT stengelassen. Bei dieser Methode bleiben die Zellkerne intakt. Nach erfolgter Lyse werden die Zellkerne und Organellen durch Zentrifugation bei 15.000×g und 4 °C für 2 min vom Zytoplasma abgetrennt, welches anschließend im Reporter-Assay eingesetzt werden kann. Je 20 µl der Lysate werden dazu in 96-Loch-Mikrotiterplatten gegeben und in einem Luminometer (LUMIstar; BMG LabTechnologies) mit je 100 µl Substrat (Promega; siehe Kap. 2.5) versetzt. Die gemessene Chemolumineszenz wird an einem PC mit der Software LUMIstar 3.00-0 und dem Programm Microsoft Excel ausgewertet. Anschließend wird die Gesamtproteinmenge der Lysate durch einen Test nach Bradford (siehe Kapitel 3.2.3) bestimmt, und die erhaltenen Fluoreszenzwerte werden dementsprechend abgeglichen.

3.3.2. Colony Forming Assay

Ein geeignetes analytisches Verfahren zur Überprüfung, ob die Herstellung von stabil p53 exprimierenden Zelllinien möglich ist, stellt der „Colony Forming Assay“ dar. Hierzu werden die betreffenden Zelllinien (HER911 und HEK293; H1299 dienen als Kontrolle) mit verschiedenen p53-Konstrukten transfiziert (als Transfektionsreagenzien werden Lipofectamine PLUS, Kap. 3.1.6.2 oder Lipofectamine2000, Kap. 3.1.6.1, verwendet). Das Ausgangsplasmid dieser Konstrukte ist der Vektor pCIN4 (Rees *et al.*, 1996; Abbildung 3.1). Bei diesem Plasmid schließt sich an die Expressionskassette für p53 (bzw. einer p53-Mutante) eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES) an, danach folgen die kodierende Region für ein Neomycin-Resistenzenzym und ein Polyadenylierungssignal (PolyA). Stabile Transfektanten

können dann durch Selektion mit Geneticin (G418) erhalten werden. Auf diese Weise wird – über die Expression einer bicistronischen mRNA – sichergestellt, daß fast alle erhaltenen Kolonien neben der Resistenz auch das Transgen exprimieren.

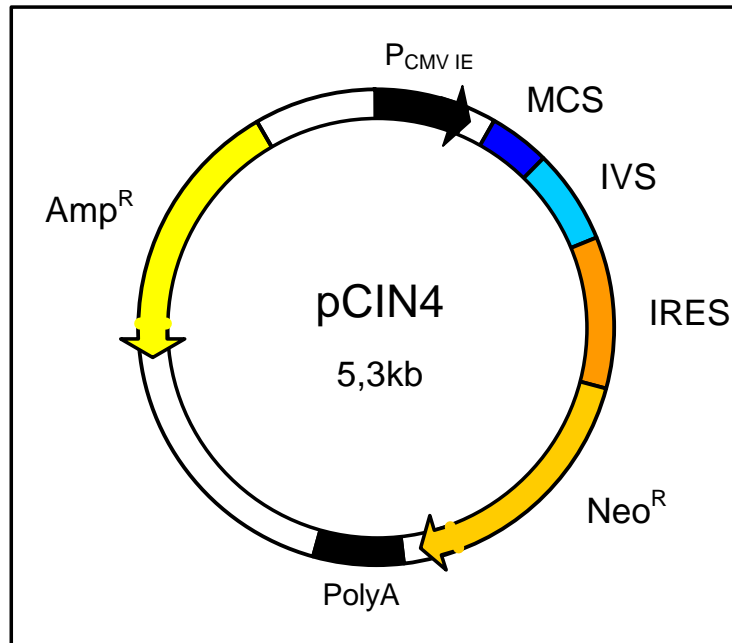


Abbildung 3.1: Schema des Vektors pCIN4. PCMV IE, Cytomegalovirus „immediate early“-Promotor; MCS, multiple Klonierungsstelle; IRES, interne Ribosomeneintrittsstelle; Neo^R, Neomycin-Resistenz; PolyA, Polyadenylierungssignal; Amp^R, Ampicillin-Resistenz.

Nach der Transfektion der Zellen in Sechskammer-Schalen ($\varnothing = 30$ mm) werden diese zunächst für 2 Tage in normalem DMEM_{VOLL} im Brutschrank inkubiert, um eine möglichst hohe Transfektions- bzw. Expressionsrate zu erreichen. Verwendet werden folgende Konstrukte:

untransfiziert	Negativkontrolle
pCIN4	leerer Vektor als Positivkontrolle
pCIN4-p53wt	wildtypisches p53
pCIN4-p53mt24-28	p53-Konstrukt, bei dem die Aminosäuren 24-28 mit den homologen Residuen des Tumorsuppressorproteins p73

vertauscht sind; dadurch wird dieses Protein insensitiv gegenüber dem Abbau durch adenovirales E1B-55 kDa p53-Konstrukt mit einer Substitution in der DNS-bindenden Domäne; besitzt keine transaktivierenden Eigenschaften

Anschließend werden die Zellen in 18 cm-Schalen umgesetzt (siehe Kap. 3.1.1) und unter Selektionsmedium mit Geneticin (Endkonzentration 0,6 mg/ml) inkubiert. Zur besseren Auswertung werden die Ansätze dabei aufgeteilt in 1/20-Volumen und Restvolumen. Nach ca. 16-20 Tagen, wenn die nicht transfizierten Zellen vollständig abgestorben sind, können die verbliebenen Ansätze charakterisiert und der Assay ausgewertet werden.

3.3.3. RT-PCR-Assay

Um das Verhältnis von wildtypischem p53 zu mutiertem p53^{mt24-28} zu bestimmen, wird ein RT-PCR-Assay durchgeführt. Aus Zellen isolierte mRNA wird durch Zugabe einer RNS-abhängigen DNS-Polymerase („Reverse Transkriptase“, aus dem Moloney Murine Leukemia Virus, MMLV) revers transkribiert, anschließend erfolgt die Amplifikation der erhaltenen DNS mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Dann werden die DNS-Fragmente mit dem Restriktionsenzym *SacI* verdaut, welches nur innerhalb der Sequenz des p53^{mt24-28}-Fragments schneidet, und über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Als erstes wird die Gesamt-RNS (inklusive mRNA) der zu untersuchenden Zellen aus dem Colony Forming Assay (Kap. 3.3.2) isoliert. Ein konfluenter Zellrasen wird zunächst mit PBS^{def} gewaschen und anschließend mit 6 ml Trizol überschichtet (alle Angaben beziehen sich auf 162 cm²-Kulturflaschen), gefolgt von einer Inkubation bei RT für 10 min. Nach Abschaben der Zellen in das Trizol werden 200 µl Chloroform je Milliliter Trizol zugesetzt und beide Substanzen durch mind. 15sekündiges Schütteln gut durchmischt. Es folgt eine 3minütige Inkubation bei RT und eine Zentrifugation bei 10.000×g / 4 °C für 10 min. Die wäßrige (obere) Phase wird in ein neues Gefäß transferiert und mit 500 µl Isopropanol je Milliliter ursprünglichem Trizol-Volumen versetzt. An das kräftige Mischen (s. o.) der Lösung schließt sich eine erneute Lagerung bei RT für 10 min an. Es folgt das Sedimentieren der RNS mittels Zentrifugation (10 min bei 10.000×g / 4 °C). Nach Verwerfen des Überstandes wird das Sediment in 70%igem Ethanol resuspendiert (1 ml je Milliliter Trizol-

Vol.) und erneut zentrifugiert (wie oben). Der Überstand wird entfernt und das Sediment etwa 5 min an der Luft getrocknet. Dann wird es in 25 μ l (je 162 cm^2 -Flasche) RNase-freiem Wasser (Ambion) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Vor der reversen Transkription wird die RNS-Konzentration bestimmt (analog Kap. 3.4.2.3) und die Qualität der Präparation mittels Auftrennung in einem analytischen Agarosegel (Kap.3.5.1) überprüft. Danach erfolgt die Reaktion mit folgendem Ansatz:

präparierte RNS	5 μ g
Primer (12,5 ng/ μ l)	1 μ l
nukleasefreies H_2O	ad 12 μ l

Bei dem verwendeten Primer handelt es sich um das p53-spezifische Oligonukleotid GGG AGC AGC CTC TGG CAT TCT G (komplementär zur p53-mRNS). Dieser Ansatz wird 10 min bei $70\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und anschließend sofort für wenigstens 1 min auf Eis gestellt, um die RNS zu denaturieren. Es folgt die Zugabe folgender Reagenzien:

5 \times Erststrang-Puffer	4 μ l
0,1 M DTT	2 μ l
10 mM dNTP	1 μ l
	$\Sigma = 20\text{ } \mu$ l

Nach 2 Minuten bei $42\text{ }^\circ\text{C}$ wird 1 μ l der RNS-abhängigen DNS-Polymerase zugefügt (Superscript II), gefolgt von einer weiteren Inkubation bei gleichbleibender Temperatur für 50 min. Durch 15minütiges Erhitzen auf $70\text{ }^\circ\text{C}$ erfolgt die Inaktivierung des Enzyms, danach wird der Ansatz auf Eis gelagert. Nach kurzem Zentrifugieren wird 1 μ l Ribonuklease H (RNase H) zugegeben und die RNS durch Inkubation für 20 min bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ verdaut.

Es folgt die PCR-Amplifikation (Kap. 3.4.5) dieser cDNS mit den p53-spezifischen Primern ATG GAG GAG CCG CAG TCA GAT C und GGG AGC AGC CTC TGG CAT TCT G. Für den analytischen Restriktionsverdau der erhaltenen DNS wird ein 20 μ l-Ansatz mit 2 μ l *SacI* über Nacht bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert (Kap. 3.4.4) und am nächsten Tag auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen (Kap. 3.5.1).

3.4. Arbeiten mit Plasmid-DNS

3.4.1. Transformation von *E.coli*

3.4.1.1. Herstellen kompetenter Zellen

Die Aufnahme freier DNS durch Bakterien verläuft unter natürlichen Bedingungen nicht sehr effizient. Daher müssen die Bakterien vor der Transformation zunächst für die Aufnahme von Plasmid-DNS vorbereitet werden (Chung *et al.*, 1989). Im vorliegenden Fall werden die Bakterien durch die TSS-Puffer-Methode (Chung und Miller, 1988) kompetent gemacht. Dazu werden zunächst 5 ml LB-Flüssigmedium mit einer Einzelkolonie von *E. coli* DH10B angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag werden 100 ml LB-Medium mit dieser Kultur (entsprechend 5 % (v/v)) inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Damit wird sichergestellt, daß sich die Zellen in der exponentiellen Phase befinden. Die Bakterien lagern dann für 20 Minuten auf Eis und werden anschließend für 10 Minuten bei 2.000×g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wird in 5 ml steril filtrierter „Transformation and storage solution“ (TSS; Kap. 2.3) aufgenommen und die Suspension für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakterien können sofort für die chemische Transformation verwendet oder, nach Zugabe von Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 15 %, bei -80 °C gelagert werden.

3.4.1.2. Chemische Transformation von *E. coli*

Für die Aufnahme von Plasmiden in *E. coli* (Transformation) wird die Hitzeschock-Methode verwendet. Um für eine Anlagerung der DNS an die bakteriellen Zellen zu sorgen, werden zunächst 1 µl Plasmid-DNS ($c \leq 100$ ng/µl) zusammen mit 100 µl kompetenten Zellen (siehe 3.4.1.1) in bereits gekühlten 1,5 ml-Reaktionsgefäßen für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgt ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden, um eine Aufnahme der DNS in die Zellen zu erleichtern und anschließend eine weitere dreiminütige Inkubation auf Eis. Im Falle einer Kanamycin-Selektion (ein Inhibitor der 30S-ribosomalen Untereinheit) erfolgt nun die Zugabe von 800 µl vorgewärmtem LB-Medium und eine Inkubation für 1 Stunde bei 37 °C, um die auf dem Plasmid kodierte Resistenz zu induzieren (entfällt bei Ampicillin, einem Inhibitor der Zellwandsynthese, der nur auf wachsende Zellen wirkt). Es schließt sich nun

eine Zentrifugation bei 1.200×g für 3 min an. Das Bakterienpellet wird anschließend in 100 µl LB-Flüssigmedium aufgenommen, auf Agarplatten (Kanamycin: 50 µg/ml; Ampicillin: 200 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.4.1.3. Elektroporation von *E.coli*

Bei dieser besonders effizienten Methode zum Einbringen von Plasmid-DNS in Bakterien darf nur eine geringe Menge DNS eingesetzt werden: 0,5-1 µl DNS ($c < 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$) werden in eine auf 4 °C gekühlte Elektroporationsküvette (Plattenabstand 0,1 cm) gegeben und anschließend mit 10 µl elektrokompetenten *E. coli* (ElektroMAX DH10B; Life Technologies) gemischt. Für Präparationen des Plasmids pCGN-Ad5E1B-55 kDa wird die gleiche Menge „*Epicurian coli* Sure electroporation-competent cells“ (Stratagene) verwendet.

Nun wird für ca. 5 ms ein elektrisches Feld angelegt (1,7 kV, 200 Ω, 25 µF). Nach erfolgreicher Transformation werden sofort 100 µl LB-Medium zugegeben. Auch in diesem Fall schließt sich bei einer Kanamycin-Selektion zunächst eine einstündige Inkubation bei 37 °C an (Resistenzbildung). Der Ansatz wird dann auf LB-Agarplatten, welche das benötigte Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) enthalten, ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.4.2. DNS-Isolation und Quantifizierung

Für alle DNS-Präparationen werden Kits der Firma Qiagen verwendet. Um 5 ml-Kulturen von *E.coli* zu erhalten, werden von LB^{Amp}-Agarplatten (siehe 3.4.1.2) Klone gepickt und in Flüssigmedium (2YT oder LB mit den Antibiotika Ampicillin (200 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml)) über Nacht angezogen. Diese Kulturen werden nun entweder direkt für Mini-Präparationen verwendet oder zum Animpfen von 250 ml-Kulturen für Maxi-Präparationen benutzt. Beide Isolationsverfahren basieren auf der modifizierten Alkali-Lysis-Methode (Birnboim und Doly, 1979) sowie der Adsorption von DNS an Silicat-Matrizes in Gegenwart von hohen Salzkonzentrationen (Vogelstein und Gillespie, 1979). Nach jeder DNS-Präparation werden die isolierten Plasmide durch Verdau mit geeigneten Endonukleasen (Bildung eines charakteristischen Musters) auf ihre Richtigkeit überprüft.

3.4.2.1. Mini-Präparationen

Die Aufreinigung von Plasmid-DNS im kleinen Maßstab wird mit Qiagen Spin Miniprep Kits oder Qiaprep 8 Miniprep Kits durchgeführt. Nach Anzucht von 5 ml-Kulturen von *E.coli* über Nacht in 2YT oder LB mit den entsprechenden Antibiotika erfolgt eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 1.200×g und 4 °C. Die Pellets werden dann in einem RNase-haltigen Puffer aufgenommen und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße transferiert. Es folgt die Lyse der Zellen unter alkalischen Bedingungen und Anwesenheit von SDS. Nach der Neutralisation wird durch eine Zentrifugation bei 10.000×g für 10 Minuten ein Präzipitat aus chromosomaler DNS, Zellbestandteilen, Proteinen und SDS von der löslichen Plasmid-DNS abgetrennt. Die Überstände mit der Plasmid-DNS werden anschließend auf Säulen gegeben und die DNS entweder durch Zentrifugation (Qiagen Spin Kit; 1 min bei 10.000×g / 4 °C) oder Anlegen eines Vakuums (Qiaprep 8 Kit) an die Säulenmatrix gebunden. Nach Waschen der Säulen mit PE-Puffer (im Kit enthalten) erfolgt die Elution der Plasmid-DNS mit 50 µl (Qiagen Spin Kit) oder 100 µl (Qiaprep 8 Kit) EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5; Qiagen) und die Lagerung bei -20 °C.

3.4.2.2. Maxi-Präparationen

Präparationen von Plasmid-DNS im größeren Maßstab erfolgen mittels Qiafilter Maxi Kit. Dafür werden zuerst Übernacht-Kulturen von *E.coli* (250 ml) in LB oder 2YT mit dem jeweiligen Antibiotikum (siehe Kap. 3.4.2.1) bei 6.000×g / 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Nach Aufnahme der Pellets in einem RNase-haltigen Puffer sowie Lyse unter den oben genannten Bedingungen (Kap. 3.4.2.1) erfolgt die Neutralisation des Lysats. Anschließend wird dieses durch einen Filter gepreßt (Entfernung von Präzipitaten), auf eine vorher equilibrierte Säule aufgetragen und die lösliche Plasmid-DNS somit an die Säulenmatrix gebunden. Nach Waschen der Säule und Elution der Plasmid-DNS mittels vorgeschriebenen Puffern wird die DNS durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol und Zentrifugation für 30 Minuten bei 15.000×g / 4 °C präzipitiert. Das Pellet wird zum Waschen mit 300 µl 70 % Ethanol überspült und nach dem Trocknen an der Luft direkt in 300 µl EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5; Qiagen) aufgenommen.

3.4.2.3. Quantifizierung

Die Quantifizierung der aus den Plasmid-Präparationen gewonnenen DNS wird über photometrische Messungen erreicht. Nach Verdünnung (1:100 und 1:200) in bidestilliertem Wasser erfolgt die Messung der Extinktion bei 260 nm mit einem GeneQuantII-Photometer (Pharmacia Biotech). Dabei entspricht eine Extinktion (E_{260}) von 1 etwa 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNS. Aus einer 250 ml-Kultur können unter optimalen Bedingungen bis zu 1 mg Plasmid-DNS gewonnen werden. Die Quantifizierung von (einzelnsträngiger) RNS erfolgt analog zur beschriebenen DNS-Messung. Hierbei entspricht eine Extinktion (E_{260}) von 1 etwa 40 $\mu\text{g/ml}$ RNS.

3.4.3. Fällung von DNS

Um DNS aus einer Lösung zu präzipitieren wird zunächst 0,5-1 μl Glycogen (10 mg/ml) als Trägermolekül zugegeben. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 6,2) wird die Lösung gut gemischt (Bindung der DNS an das Glycogen), anschließend werden 2,5 Volumenteile Ethanol zugefügt. Daran schließt sich eine Zentrifugation für 45 min bei $10.000\times g / 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ an. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (Bedingungen wie oben) für 30 min und Abnahme des Überstandes wird die DNS an der Luft oder durch Zentrifugation im Vakuum getrocknet. Soll die DNS anschließend für eine Elektroporation verwendet werden, wird sie in einem 1:2-Gemisch aus EB-Puffer (10mM Tris-HCl, pH 8,5; Qiagen) und H_2O bidest. aufgenommen, andernfalls in reinem EB-Puffer.

3.4.4. Restriktionsverdau von DNS

Das Schneiden der DNS erfolgt über Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (NEB). Bei doppelten Verdauen erfolgt die Inkubation in einzelnen Fällen über Nacht, wenn aufgrund von Differenzen in der Pufferzusammensetzung keine optimalen Bedingungen gegeben sind. Soweit nicht anders angegeben, enthält ein üblicher Ansatz folgende Komponenten:

DNS	1 µg
10x Reaktionspuffer	1 µl
Enzym (10 U/µl)	1 µl
10x BSA (Rinderserumalbumin)	1 µl
H ₂ O bidest.	ad 10 µl

Die Ansätze werden für 1 Stunde (oder über Nacht) inkubiert. Von einigen Enzymen wird Rinderserumalbumin (BSA) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml benötigt; es stört jedoch in keinem Fall den Restriktionsverdau. In analytischen Ansätzen mit nicht quantifizierter DNS aus Mini-Präparationen werden jeweils 2 µl (von insgesamt 50 µl) oder 3 µl (von 100 µl) der eluierten DNS eingesetzt.

3.4.5. Polymerase-Kettenreaktion

Für die Amplifikation von DNS-Fragmenten wird die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet (Saiki *et al.*, 1988; Saiki *et al.*, 1985). Die dabei verwendeten Start-Oligonukleotide, welche das zu synthetisierende DNS-Fragment begrenzen, werden im weiteren als „Primer“ bezeichnet.

Das Zyklusprotokoll wird mit einem GeneAmp 2400 PCR System (Perkin Elmer) durchgeführt; ein exemplarischer 100 µl-Ansatz enthält folgende Komponenten:

Matrizen-DNS (300 ng/µl oder RT-Ansatz)	1 µl
3'-Primer (50 ng/µl)	6 µl
5'-Primer (50 ng/µl)	6 µl
10x Reaktionspuffer	10 µl
dNTP-Mix (20 mM)	1 µl
H ₂ O bidest.	75 µl
<i>Pfu</i> Turbo DNS-Polymerase (2,5 U/µl)	1 µl
	Σ = 100 µl

Zyklus-Parameter:

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95 °C	2-5 min
2	35	95 °C	30 sec
		60 °C	30 sec
		70 °C	2 min
3	1	70 °C	5 min
		4 °C	∞

Anschließend werden die PCR-Produkte über ein präparatives Agarosegel (siehe 3.5.1) aufgetrennt und bei korrekter Fragmentlänge ausgeschnitten und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) gereinigt.

3.4.6. Mutagenese

3.4.6.1. Entwerfen der Mutagenese-Oligonukleotide

Die zielgerichtete Mutagenese erfolgt mittels QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Dazu werden zunächst je Mutante zwei Mutagenese-Oligonukleotide (Primer) entworfen, welche die gewünschten Mutationen enthalten. Dabei werden folgende Regeln berücksichtigt:

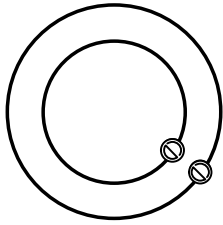
- 1) die Primer sollten eine Länge von etwa 25-45 Nukleotiden besitzen und die Schmelztemperatur² (T_m) sollte bei > 60 °C liegen:

$$T_m = [81,5 + 0,41 \cdot (\% GC) - 675/N - (\% \text{ Fehlpaarungen})] \text{ } ^\circ\text{C}$$
(N = Basenzahl des Primers)
- 2) links und rechts von den gewünschten Mutationen sollten noch jeweils etwa 10-15 komplementäre Basen vorhanden sein
- 3) Basenzusammensetzung:

² Formel entnommen aus dem QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual

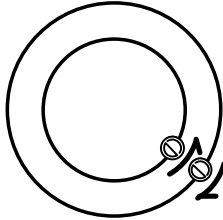
- (a) der GC-Gehalt sollte mindestens 40 % betragen
- (b) für optimale Ergebnisse sollten die Primer in einem oder mehreren G oder C enden
- 4) bei der Mutagenese-Reaktion sollten die Primer im Überschuß vorhanden sein
- 5) um eine spätere Identifizierung korrekter Klone zu erleichtern, sollte mit dem Mutagenese-Primer eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym eingefügt oder deletiert werden

Die Synthese der Primer wird bei der Firma MWG Biotech (München) in Auftrag gegeben.



1. Plasmid-Präparation:

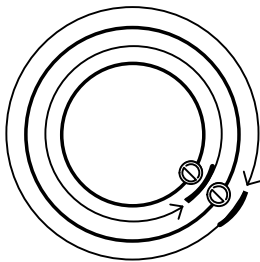
Plasmid mit dem gewünschten Gen und dem Zielpunkt der Mutagenese (⊗)



2. Oligonukleotid-vermittelte Mutagenese

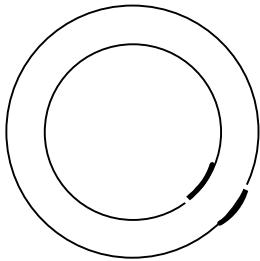
2a. Denaturierung und Anlagerung:

Nach dem Denaturieren des Plasmids folgt die Anlagerung der Oligonukleotide (⋈) mit der gewünschten Mutation



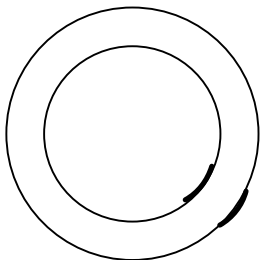
2b. Elongation:

Durch die *Pfu* Turbo DNS-Polymerase erfolgt die Elongation der Oligonukleotide, was schließlich zu zirkulären Strängen mit einem Bruch im Zuckerphosphatgerüst führt



3. Verdau:

Die methylierte parentale DNS (ohne Mutation) wird mit dem Enzym *DpnI* verdaut



4. Transformation:

Nach der Transformation von *E. coli* DH10B werden die Strangbrüche durch bakterielle Enzyme repariert

Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der QuickChange-Mutagenesemethode (verändert aus QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual, Stratagene).

3.4.6.2. Mutagenese-Reaktion

Mutagenese-Reaktionen werden mit dem QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene durchgeführt (Schema siehe Abbildung 3.2). Dabei handelt es sich im wesentlichen um eine Oligonukleotid-vermittelte Mutagenesemethode: Die parentale Plasmid-DNS wird zunächst durch Erhitzen auf 95 °C denaturiert. Es folgt eine Anlagerung der Mutagenese-Oligonukleotide (Primer) an die DNS-Stränge durch Abkühlung auf 55 °C und die Elongation der Primer durch die *Pfu* Turbo DNS-Polymerase bei 68 °C (diese Polymerase wird verwendet, weil sie eine Korrekturlesefunktion und daraus resultierend eine 6fach niedrigere Fehlerrate als die *Taq*-Polymerase hat (Cline *et al.*, 1996)). Durch häufige Wiederholung dieses Vorgangs amplifiziert man automatisch ein Plasmid, welches die gewünschte(n) Mutation(en) enthält.

Abhängig von der Anzahl der zu mutierenden Nukleotid-Positionen wird vom Hersteller eine unterschiedliche Zahl an Zyklen vorgeschlagen. Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Mutagenese-Reaktion betrifft der Austausch 11 Nukleotide. Es werden daher 22 Zyklen gefahren, was der höchsten empfohlenen Zyklusanzahl entspricht. Die bei dieser Methode verbleibenden Brüche in der DNS (zwischen 3'-Ende des über die Polymerase-Reaktion generierten Stranges und dem 5'-Anfang des Mutagenese-Primers) werden erst später, nach der Transformation von *E.coli*, durch bakterielle Enzyme repariert.

Der in einem GeneAmp 2400 PCR System von Perkin Elmer amplifizierte Ansatz enthält folgende Komponenten:

10x Reaktionspuffer	5 µl
Matrizen-DNS (50 ng/µl)	1 µl
5'-Primer (50 ng/µl)	2,5 µl
3'-Primer (50 ng/µl)	2,5 µl
dNTP-Mix (20 mM)	0,5 µl
H ₂ O bidest.	38,5 µl
	Σ 50 µl
<i>Pfu</i> Turbo DNS-Polymerase (2,5 U/µl)	1 µl

Zyklus-Parameter:

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	95 °C	30 sec
2	22	95 °C	30 sec
		55 °C	1 min
		68 °C	12 min (2 min/kBp)
3	1	4 °C	∞

Nach Abkühlung des Ansatzes auf 37 °C schließt sich eine Behandlung mit der *DpnI*-Endonuklease an (Zugabe von 2 µl Enzym und Inkubation bei 37 °C für 1 h). Diese Endonuklease mit der Zielsequenz 5'-G^{m6}ATC-3' ist spezifisch für methylierte und hemimethylierte DNS. Da Plasmid-DNS, welche aus *E.coli* DH10B stammt, *dam*-methyliert ist (und damit sensitiv gegenüber *DpnI*-Verdau), erfolgt auf diese Weise der Verdau der parentalen DNS, während die mutierte DNS erhalten bleibt. Nach Fällung des Mutagenese-Produktes (Kap. 3.4.3) und Transformation (Kap. 3.4.1.3) von *E.coli* DH10B („ElektroMAX DH10B“, Life Technologies) werden diese auf Agarplatten (mit Selektions-Antibiotikum) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von den erhaltenen Kolonien werden ca. 16 Klone gepickt und nach Mini-Präparation der Plasmid-DNS (Kap. 3.4.2.1) erfolgt die Identifizierung korrekter Klone durch einen Restriktionsverdau (siehe Regel 5 in Kap. 3.4.6.1). Daran schließt sich noch die Sequenzierung der Plasmid-DNS an, um unerwünschte Punktmutationen auszuschließen (Kap. 3.4.7).

3.4.7. Sequenzierung von DNS

Die DNS-Sequenzierung erfolgt nach der modifizierten Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977), welcher folgendes Prinzip zugrunde liegt: Als erstes wird eine Polymerisationsreaktion durchgeführt, bei der neben den zur Elongation des DNS-Stranges notwendigen Desoxynukleotiden (dNTPs) in geringerer Menge auch Didesoxynukleotide (ddNTPs) zugesetzt werden. Dadurch kommt es immer wieder zu Kettenabbrüchen, da nach Einbau von ddNTPs in die DNS keine 3'-Hydroxylgruppe mehr für die weitere Polymerisation zur Verfügung steht. Man erhält DNS-Fragmente unterschiedlicher Länge, die anschließend im

elektrischen Feld aufgetrennt werden (Gelelektrophorese). Mittels unterschiedlicher fluoreszierender Gruppen an den ddNTPs können diese nach Anregung durch einen Laser unterschieden werden. Aus der Wanderungsgeschwindigkeit der unterschiedlichen DNS-Fragmente ergibt sich dann die Sequenz.

3.4.7.1. Polymerase-Reaktion

Vor der Gelelektrophorese wird zunächst die Polymerase-Reaktion mit dNTPs und fluoreszenzmarkierten ddNTPs durchgeführt. Ein Ansatz enthält folgende Komponenten:

Terminationsmix	4 μ l
DNS aus Mini-Präparationen (\approx 200-500 ng)	3 μ l
Sequenzier-Primer (100 ng/ μ l)	1 μ l
H ₂ O bidest.	7 μ l
	Σ 15 μ l

Der Terminationsmix (Perkin Elmer) enthält die *AmpliTaq* DNS-Polymerase FS mit einer thermostabilen Pyrophosphatase. Hierbei handelt es sich um eine Variation der DNS-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq*-Polymerase) mit zwei Punktmutationen, welche den Einbau von Didesoxynukleotiden erleichtern und die 5'→3'-Nukleaseaktivität fast vollständig inhibieren. Weitere Bestandteile sind dNTPs (dATP, dCTP, cITP, dUTP), ddNTPs (jeweils mit Dichlororhodamin und einem spezifischen Fluoreszenzmarker gekoppelt) und Magnesiumchlorid in Tris-HCl-Puffer pH 9,0. Der Ansatz durchläuft 25 Zyklen in einem GeneAmp 2400 PCR System von Perkin Elmer mit folgenden Parametern:

Zyklus-Parameter:

Segment	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	96 °C	2 min
2	25	96 °C	10 sec
		50 °C	10 sec
		60 °C	4 min
3	1	4 °C	∞

Die Produkte der Sequenzier-Reaktion werden anschließend gefällt (Kap. 3.4.3). Nach dem Waschen und Trocknen des Pellets durch Anlegen eines Vakuums wird die DNS in 4 µl Formamid-EDTA-Dextranblau-Probenpuffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf das Sequenziergel (3.5.3) werden die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt.

3.4.7.2. Sequenzierung

Die elektrophoretische Auftrennung der erhaltenen Fragmente erfolgt mit einem automatisierten Sequenziergerät, dem Abi Prism 377 DNA Sequenzer (Perkin Elmer). Die Durchführung ist in Kapitel 3.5.3 beschrieben. Daran anschließend werden die Daten mit der Abi Prism-Software (für Apple Macintosh) ausgewertet.

3.5. Elektrophoretische Methoden

3.5.1. Agarose-Gelelektrophorese

DNS-Fragmente können aufgrund ihrer Größe in Abhängigkeit von der Agarosekonzentration elektrophoretisch aufgetrennt werden. Für die im Verlauf dieser Arbeit durchzuführenden Gelelektrophoresen werden, abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNS-Fragmente, 0,8-2%ige Agarosegele mit einem Ethidiumbromid-Gehalt von 0,1 µl/ml einer 1%igen Stammlösung verwendet. Die DNS-Proben werden mit einer entsprechenden Menge 6× Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zum Vergleich werden 2 µl oder 4 µl eines geeigneten DNS-Längenstandards aufgetragen. Nach einer elektrophoretischen Auftrennung (meist ≈ 1 Stunde) bei einer konstanten Spannung von 115 V (entsprechend 7 V/cm) wird das Ergebnis unter UV-Licht mit einer Polaroid-Kamera dokumentiert.

3.5.2. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen werden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgele verwendet. Bei dieser Methode versieht das Natriumdodecylsulfat (SDS) die Proteine mit einer einheitlichen negativen Ladung, so daß ihr Laufverhalten bei einer Auftrennung im elektrischen Feld nicht mehr durch eine variierende Ladung beeinflußt wird, sondern nur noch von ihrer Größe (und Konformation) abhängt. Aufgrund der negativen Ladung wandern die Proteine von der Kathode zur Anode. Das Gießen der Gele erfolgt folgendermaßen:

Zusammensetzung Trenngel (10 %)

30%ige Polyacrylamidlösung	3,4 ml
1,5 M Tris pH 8,8 mit SDS	2,6 ml
H ₂ O bidest.	3,9 ml
10%ige Ammoniumpersulfatlösung (APS)	50 µl
TEMED	7,5 µl

Nach dem Gießen erfolgt die Überschichtung mit 100 % Isopropanol für die Dauer der Polymerisation ($\approx \frac{3}{4}$ h), um eine gleichmäßige Oberfläche zu erhalten. Nun schließt sich das Gießen des Sammelgels und Einsetzen des Kammes an, um die Taschen zu generieren.

Zusammensetzung Sammelgel (4,5 %)

30%ige Polyacrylamidlösung	750 µl
0,5 M Tris pH 6,8 mit SDS	1,3 ml
H ₂ O bidest.	2,9 ml
Pyronin G in H ₂ O bidest. (1 mg/ml)	10 µl
10%ige Ammoniumpersulfatlösung (APS)	50 µl
TEMED	5 µl

Nach dem Einbau des polymerisierten Gels in eine Kammer sowie Zugabe des Laufpuffers für SDS-PAGE (Zusammensetzung siehe 2.3) wird der Kamm entfernt und die Taschen mit Puffer gespült, um nicht polymerisierte Gelreste und überschüssigen Farbstoff (Pyronin G) zu

entfernen. Es folgt das Auftragen der Proben, welche 1:1 mit 2fach-Probenpuffer (PP) für SDS-PAGE versetzt (soweit noch nicht in 1fach-PP vorliegend, siehe 3.2.2.1) und durch Erhitzen (5 min bei 95 °C) denaturiert werden. Zur Abschätzung der Proteingröße wird der Längensstandard Rainbow Markers RPN756 (Amersham) verwendet. Der Gellauf vollzieht sich bei einer konstanten Spannung von zunächst 80 V (zum Einlaufen der Proteine ins Sammelgel) und anschließend 150 V, bis eine optimale Auftrennung der zu untersuchenden Proteine erreicht ist.

3.5.3. Harnstoff-Polyacrylamid-Sequenziergel

Für die Auftrennung von DNS-Fragmenten aus der Sequenzier-PCR (Kap. 3.4.7) werden zwei verschiedene Gele verwendet. Vor dem Gießen des jeweiligen Sequenziergels erfolgt das Reinigen der Glasplatten mit einer 1%igen Lösung des Detergenz' Alconox (Aldrich Chemical Company) in destilliertem Wasser, 70 % Isopropanol sowie abschließend mit reinem destilliertem Wasser. Anschließend wird die Gelapparatur zusammengesetzt und das Gel gegossen:

5%iges Polyacrylamidgel:

Harnstoff	21,0 g
30%ige Acrylamidlösung	8,4 ml
10x TBE	6,0 ml
H ₂ O bidest.	20,0 ml

4,5%iges Polyacrylamidgel:

Harnstoff	18,0 g
30%ige Acrylamidlösung	7,5 ml
10x TBE	6,0 ml
H ₂ O bidest.	23,0 ml

Der Harnstoff wird durch ca. 30minütiges Rühren gelöst. Anschließend erfolgt eine Filtration durch einen 0,2 µm-Filter. Zum Starten der Polymerisationsreaktion werden 300 µl frisch angesetztes 10%iges Ammoniumpersulfat (APS) und 20 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED) zugegeben und das Gel in die Gießvorrichtung gegossen. Nach einer Polymerisationszeit von 1-2 Stunden werden mit einem Haifischkamm die Taschen generiert und das Gel in das Sequenziergerät (Abi Prism; Kap. 3.4.7.2) eingebaut. Die Oberfläche der Glasplatten wird dann mit dem Laser auf Verschmutzungen überprüft. Nach Einfüllen des Laufpuffers (1x TBE; siehe 2.3) in die obere und untere Pufferkammer wird das Gel mittels 20minütigem Vorlauf auf die Betriebstemperatur von 51 °C gebracht. Um ein Vermischen der Proben zu verhindern, erfolgt das Beladen des Gels in 2 Stufen. Zunächst wird jede zweite Tasche des Gels mit 2 µl des Sequenzieransatzes beladen; dann wird für ca. 2 Minuten Spannung angelegt, um die Proben einlaufen zu lassen. Nach Beladen der restlichen Taschen folgt der Start des Laufs, wobei die Laufzeit 8 h für das 5%ige und 4 h für das 4,5%ige Gel beträgt. Mittels eines Argon-Ionenlasers werden die Daten während der Elektrophorese aus jeweils einer Spur pro Sequenzierprobe detektiert und mit Hilfe der Abi Prism-Software (für Apple Macintosh) ausgewertet (siehe 3.4.7.2).

4. Ergebnisse

4.1. Ein p53-responsiver Promotor ist in Adenovirus-transformierten Zellen aktiv

Zur Untersuchung der p53-Aktivität in Adenovirus-(Ad-)transformierten Zellen wurden die humanen Zelllinien HEK293 („*human embryonic kidney*“) und HER911 („*human embryonic retina*“) verwendet, welche die adenovirale E1-Region enthalten und die frühen viralen Proteine E1A, E1B-19 kDa und E1B-55 kDa exprimieren.

Die Zellen wurden mit einem Luziferase-Reporterkonstrukt transfiziert, welches das *luc*-Gen unter der Kontrolle des p53-responsiven Teils des *mdm2*-Promotors exprimiert (pBP100luc). Vierundzwanzig Stunden nach der Transfektion folgte das Ernten der Zellen und die Messung

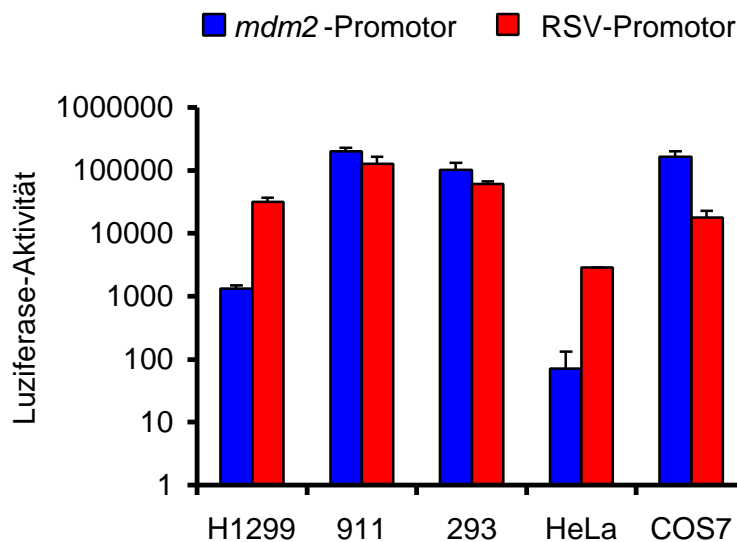


Abbildung 4.1: basale Aktivitäten eines p53-responsiven Promotors (*mdm2*) im Vergleich zu einem konstitutiv aktiven Promotor (Rous Sarcoma Virus, RSV). 2×10^5 Zellen je Ansatz wurden mittels Lipofectamine PLUS (HeLa) oder Lipofectamine2000 (alle anderen Zelllinien) mit Luziferase-Reporterkonstrukten transfiziert und nach 24 h geerntet. Die Expressionshöhe der Luziferase wurde anschließend durch Fluoreszenz-Analyse in einem Luminometer ermittelt. Luziferaseaktivitäten sind in willkürlichen Einheiten (erhalten vom Luminometer) dargestellt; die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten (angegeben mit Standard-Fehler).

der Luziferaseaktivität mittels eines Luminometers. Zum Vergleich wurden in parallelen Ansätzen auch H1299-Zellen transfiziert, welche weder endogenes p53 enthalten noch adenovirale Proteine exprimieren. Um eventuelle Unterschiede zu anderen Virus-transformierten Zellen zu untersuchen, erfolgte gleichzeitig die Transfektion von HeLa- (HPV-transformiert) und COS7-Zellen (SV40-transformiert). Beide Zelllinien enthalten wildtypisches p53, exprimieren gleichzeitig jedoch das HPV E6-Protein bzw. das große SV40-T-Antigen. Diese viralen Proteine haben ebenfalls Einfluß auf die Aktivität von p53 (siehe Kap. 1.4). Als Kontrolle diente ein Reporterkonstrukt, welches den 3'-long terminal repeat-(LTR)-Promotor des Rous Sarcoma Virus (RSV) vor das *luc*-Gen vorgeschaltet hatte (pRSVluc). Dieser starke retrovirale Promotor war in allen verwendeten Zellen konstitutiv aktiv.

Wie in Abbildung 4.1 zu sehen, führte die Expression des *mdm2*-Promotorkonstruktes in Adenovirus-(Ad-)transformierten Zellen zu einer vergleichbaren Luziferaseaktivität wie das RSV-LTR-Kontrollplasmid, während die Aktivität des *mdm2*-Promotors in H1299-Zellen deutlich geringer war (ca. um den Faktor 25). Auch in COS7-Zellen lieferten beide Reporterkonstrukte vergleichbare Resultate, während die Ergebnisse in HeLa-Zellen denen in H1299-Zellen entsprachen. Offenbar ist ein p53-responsiver Promoter also in Ad-transformierten und SV40-transformierten Zellen aktiv.

4.2. Die transiente Überexpression von aktivem p53 führt in Adenovirus-transformierten Zellen zu einer geringeren relativen Induktion des *mdm2*-Promotors als in p53 -/- Zellen

Um zu ermitteln, ob die vorhandene Aktivität des p53-responsiven *mdm2*-luc-Reporters (pBP100luc; siehe Kap. 4.1) in Adenovirus-(Ad-) und SV40-transformierten Zellen durch Zugabe von exogenem p53 noch gesteigert werden konnte, wurden H1299- (p53 -/-), HEK293- und HER911- (Ad-transformiert), HeLa- (HPV-transformiert) sowie COS7-Zellen (SV40-transformiert) jeweils mit den Reporterkonstrukten (pBP100luc oder pRSVluc, siehe Kap. 4.1) und einem Expressionsplasmid für p53 kotransfiziert.

Auch in diesem Fall erfolgte die Messung der Luziferaseaktivität 24 Stunden nach Transfektion. Neben wildtypischem p53 fand ein Expressionsplasmid Verwendung, welches für die p53-Mutante p53mt24-28 kodierte. Hierbei handelte es sich um ein chimäres Molekül

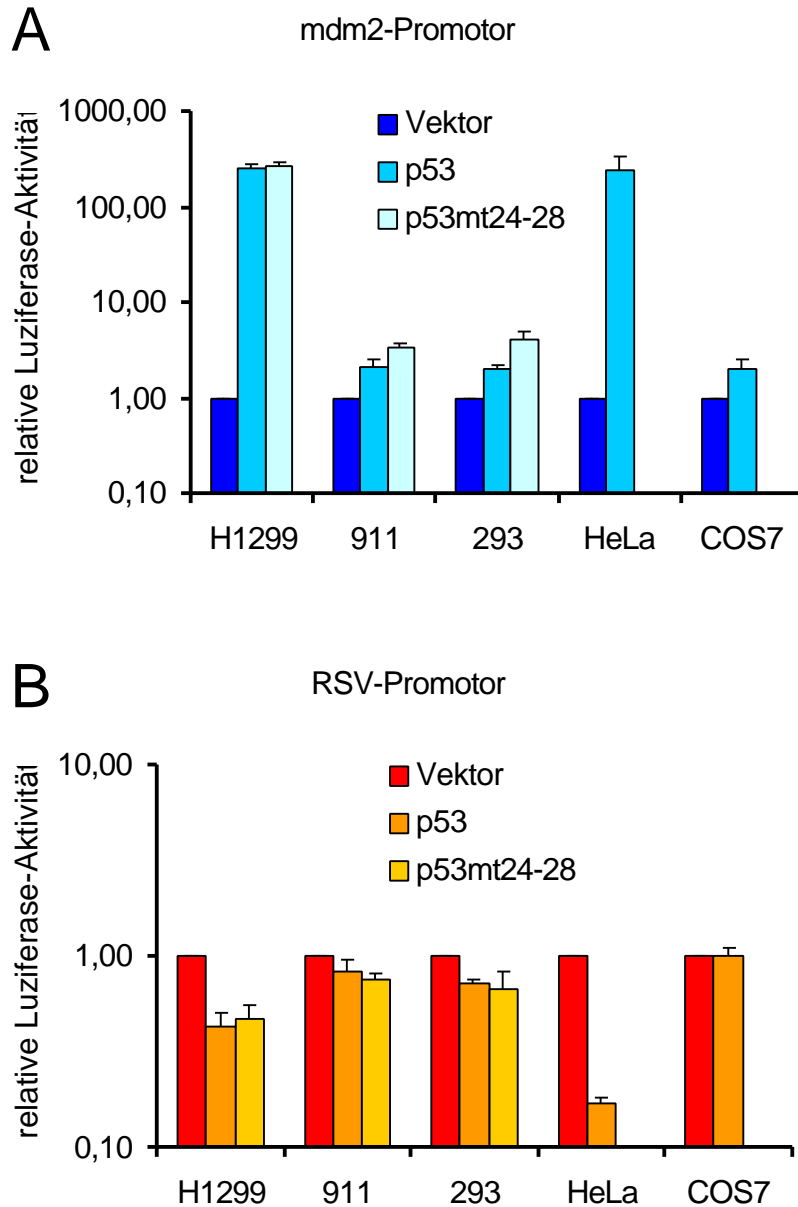


Abbildung 4.2: Aktivitäten zweier Luziferase-Reporterkonstrukte nach Transfektion von p53-Expressionsplasmiden. 2×10^5 Zellen je Ansatz wurden mittels Lipofectamine PLUS (HeLa) oder Lipofectamine2000 (alle anderen Zelllinien) mit den angegebenen p53-Expressionskonstrukten sowie mit Reporterplasmiden, die den angegebenen Promotor enthalten, transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die Expressionshöhe der Luziferase anschließend durch Messung der Fluoreszenzintensität in einem Luminometer ermittelt. Auf einer logarithmischen Skala sind die Werte relativ zur Aktivität des Reporters ohne p53-Expressionsplasmid dargestellt. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten (angegeben mit Standardfehler) (A) *mdm2*-Promotor (p53-responsiv) (B) RSV-Promotor (konstitutiv aktiv). Vektor = pcDNA3, p53 = Wildtyp-p53, p53mt24-28 = E1B-55 kDa-resistentes p53.

aus p53 und dem p53-Homologen p73, bei dem fünf Aminosäuren (Position 24-28) aus dem N-Terminus von p53 mit den entsprechenden Resten aus p73 vertauscht worden waren. Die erhaltene Chimäre p53mt24-28 wies eine mit wildtypischem p53 vergleichbare transkriptionelle Aktivität auf, war jedoch vollständig insensitiv gegenüber der Bindung und Inaktivierung durch adenovirales E1B-55 kDa (siehe Kap. 1.2).

Wie in Abbildung 4.2 (A) dargestellt, erhöhte sowohl p53 als auch p53mt24-28 die Aktivität des *mdm2*-luc-Reporters (pBP100luc) in Ad-transformierten Zellen, jedoch lieferte selbst die E1B-55 kDa-resistente Mutante p53mt24-28 lediglich eine maximal fünffach höhere Aktivität als das Reporterkonstrukt alleine. Auch in COS7-Zellen führte die exogene Expression von p53 nur zu einer leichten Erhöhung der Aktivität des *mdm2*-Promotors. Im Gegensatz dazu wiesen H1299- und HeLa-Zellen nach Transfektion von p53 oder p53mt24-28 eine wenigstens 200fache Aktivierung des *mdm2*-luc-Reporters auf.

Beim verwendeten Kontrollkonstrukt mit dem RSV-LTR-Promotor (pRSVluc) konnte hingegen keine Erhöhung der Luziferaseaktivität festgestellt werden (Abbildung 4.2 (B)). Dennoch traten Unterschiede zwischen p53^{-/-} und HPV-transformierten Zellen einerseits (H1299, HeLa) und Ad- und SV40-transformierten Zellen andererseits (HER911, HEK293, COS7) auf. Im ersten Fall wurde eine leichte Repression des RSV-LTR-Promotors beobachtet, die bereits früher beschrieben wurde (Chen *et al.*, 1995; Shen und Shenk, 1994). Bei Ad- und SV40-transformierten Zellen konnte diese Repression jedoch nicht dargestellt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die bereits vorhandene p53-Aktivität in Ad- und SV40-transformierten Zellen selbst bei Überexpression von exogenem p53 nicht mehr wesentlich gesteigert wird.

4.3. Die Aktivität des *mdm2*-Promotors kann in Adenovirus-transformierten Zellen durch transiente Überexpression von E1B-55 kDa reduziert werden

Wenn die in den Kapiteln 4.1 und 4.2 dargestellte Aktivität des *mdm2*-Promotors in Adenovirus-(Ad-) und SV40-transformierten Zellen (HEK293, HER911 bzw. COS7) auf freies, aktives p53 zurückzuführen ist, so sollte es möglich sein, diese durch transiente Überexpression des p53-inaktivierenden, adenoviralen E1B-55 kDa-Proteins (siehe Kap. 1.4) zu reduzieren.

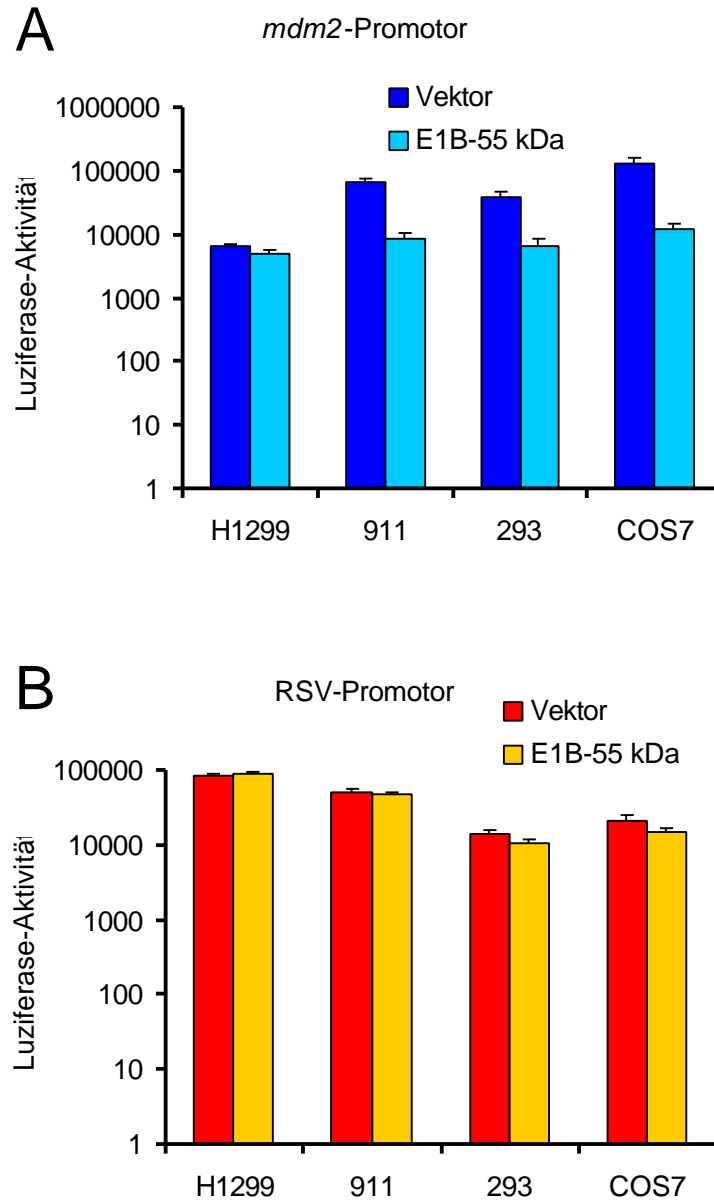


Abbildung 4.3: Effekt der transienten Expression von E1B-55 kDa auf die transkriptionelle Aktivität von p53. 2×10^5 Zellen je Ansatz wurden mittels Lipofectamine2000 mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und nach 24 h geerntet. Die Expressionshöhe der Luziferase wurde anschließend durch Messung der Fluoreszenzintensität in einem Luminometer ermittelt. Auf einer logarithmischen Skala sind die Werte in willkürlichen Einheiten (erhalten vom Luminometer) dargestellt. Die Daten repräsentieren die Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten (angegeben mit Standardfehler) (A) *mdm2*-Promotor (p53-responsiv) (B) RSV-Promotor (konstitutiv aktiv). Vektor = pcDNA3.

Um diese Fragestellung zu bearbeiten, wurden die oben genannten Zelllinien (sowie H1299-Zellen als Kontrolle) mit den Reporterkonstrukten pBP100luc (*mdm2*-Promotor) oder pRSVluc (siehe Kap. 4.1) und einem Expressionsplasmid für E1B-55 kDa kotransfiziert. Aufgrund ihrer bereits sehr geringen basalen p53-Aktivität (siehe Abbildung 4.1) wurden HeLa-Zellen in diesem Versuch nicht berücksichtigt.

Während die Expression von exogenem E1B-55 kDa in H1299-Zellen keinen Einfluß auf die Aktivität des *mdm2*-Promotors hatte, führte sie in Ad- und SV40-transformierten Zellen zu einer Reduzierung der *mdm2*-luc-Reporteraktivität um den Faktor 10 (Abbildung 4.3 (A)). Bei Verwendung des RSV-luc-Reporters konnte kein Einfluß von E1B-55 kDa auf die Luziferaseaktivität festgestellt werden (Abbildung 4.3 (B)).

Damit konnte dargestellt werden, daß die transiente Überexpression eines p53-Antagonisten in Ad- und SV40-transformierten Zellen zu einer erheblichen Verminderung der vorhandenen p53-Aktivität beiträgt.

4.4. Die Expression eines endogenen, p53-responsiven Gens verhält sich analog zur Expression des Luziferase-Reporterkonstruktes

Untersucht man die Expression eines Proteins von einem definierten Promotor aus über plasmidgestützte Systeme, so kann sich das Ergebnis von der Regulation eines chromosomal integrierten Promotors unterscheiden. Um mögliche Abweichungen der in den Kap. 4.1 - 4.3 dokumentierten Luziferase-Assays vom Verhalten endogener, p53-responsiver Gene zu ermitteln, wurde die Expression des zellulären p53-Antagonisten *mdm2* durch Messungen der intrazellulären Konzentration des Proteins in Adenovirus-(Ad-)transformierten Zellen überprüft. Hierzu wurden zunächst Zelllinien ausgewählt, die sich besonders gut transfizieren ließen, nämlich HER911- (Ad-transformiert), H1299- (p53 ^{-/-}) und HeLa-Zellen (HPV-transformiert). Vierundzwanzig Stunden nach der transienten Transfektion mit Expressionsplasmiden für β -Galaktosidase (β Gal), p53, p53mt24-28 oder E1B-55 kDa wurden die Zellen geerntet, über SDS-PAGE aufgetrennt und die *mdm2*-Mengen mittels Immunoblot ermittelt.

In Abbildung 4.4 kann man erkennen, daß die Menge an detektiertem *mdm2* in Adenovirus-transformierten Zellen (HER911) durch Expression von exogenem p53 oder E1B-55 kDa-resistentem p53mt24-28 kaum erhöht wird, während in H1299- und HeLa-Zellen in diesen

Fällen eine deutliche Zunahme des Proteins zu verzeichnen ist. Transfiziert man die genannten Zelllinien hingegen mit einem Plasmid für E1B-55 kDa, so erfolgt in Ad-transformierten HER911-Zellen eine Reduktion der mdm2-Menge, wohingegen H1299- und HeLa-Zellen keinerlei Abweichungen von den β Gal-transfizierten Kontrollen aufweisen. Damit reflektieren die Ergebnisse der Immunoblots exakt diejenigen der Luziferase-Assays.

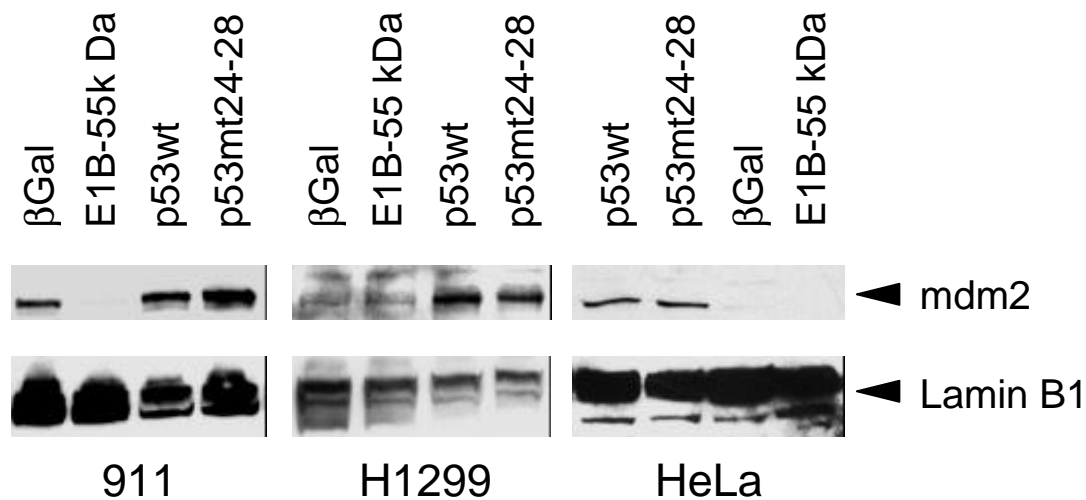


Abbildung 4.4: Auswirkung exogen exprimierter Effektorproteine (E1B-55 kDa, p53-Wildtyp, E1B-55 kDa-resistentes p53mt24-28) auf die Mengen an endogenem mdm2 in transformierten Zelllinien. 2×10^5 Zellen je Ansatz (HeLa: 3×10^5) wurden mittels Lipofectamine2000 (HeLa: Lipofectamine PLUS) mit den angegebenen Expressionsplasmiden transfiziert und nach 48 h geerntet. Die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Antikörpern gegen mdm2 und Lamin B1 (als Ladekontrolle) detektiert. β Gal = β -Galaktosidase (Kontrolltransfektion).

4.5. Adenovirus-Infektion reduziert die p53-Aktivität in Adenovirus-transformierten Zellen

Ad-transformierte HER911-Zellen enthalten und exprimieren die E1-Region von Adenoviren, also auch das E1B-55 kDa-Protein (Fallaux *et al.*, 1998; Fallaux *et al.*, 1996). Während E1B-55 kDa alleine einen stabilisierenden Effekt auf p53 hat (van den Heuvel *et al.*, 1993), konnte gezeigt werden, daß der Tumorsuppressor durch das Zusammenwirken der adenoviralen Proteine E1B-55 kDa und E4orf6 abgebaut wird (Moore *et al.*, 1996; Querido *et al.*, 1997; Roth *et al.*, 1998b; Steengenga *et al.*, 1998).

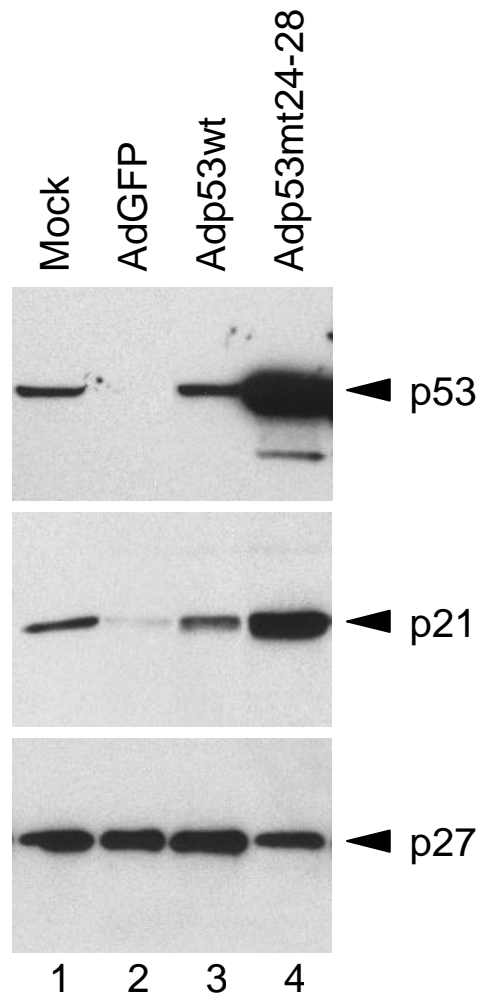


Abbildung 4.5: Menge und Aktivität von p53 in Ad-E1-transformierten Zellen nach Infektion mit rekombinanten Adenoviren. HER911-Zellen wurden mit den angegebenen Adenovirus-Vektoren infiziert (m.o.i. = 5), welche an Stelle der E1-Region die Proteine GFP (AdGFP), GFP + p53-Wildtyp (Adp53wt) oder GFP + p53mt24-28 (Adp53mt24-28) exprimierten. 24 h p.i. wurden die Zellen in RIPA geerntet. Es folgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE, Transfer auf PVDF-Membran und Nachweis mit Antikörpern gegen die Proteine p53, p21 (p53-responsiv) und p27 (p53-unabhängige Regulation). Mock = nicht infizierte Zellen.

Für die vorliegende Untersuchung wurden HER911-Zellen mit rekombinanten, E1-deletierten Adenoviren infiziert. Diese exprimierten statt der E1-Region entweder das grün fluoreszierende Protein (GFP) alleine (= AdGFP) oder in Kombination mit p53-Wildtyp (Adp53) bzw. der E1B-55 kDa-resistenten Mutante p53mt24-28 (Adp53mt24-28), jeweils unter der Kontrolle des Cytomegalovirus-(CMV)-immediate early-(IE-)Promotors. Da

HER911-Zellen die fehlende E1-Region der Viren komplementieren, entsprach dies einer Infektion mit (vollständigen) Wildtyp-Adenoviren. Über diesen Ansatz sollte ermittelt werden, ob eine Virus-induzierte p53-Depletion in Ad-transformierten Zellen einen Einfluß auf die Expressionshöhe von p53-responsiven Genen hat. Vierundzwanzig Stunden nach Infektion wurden die intrazellulären Mengen der zellzyklusregulatorischen Proteine p21 (p53-responsiv) und p27 (nicht p53-responsiv) mittels Immunoblot überprüft.

Aus Abbildung 4.5 geht hervor, daß in mock-infizierten Zellen (= ohne Virus) sowohl p53, als auch p21 und p27 detektierbar waren. In Übereinstimmung mit bekannten Daten (siehe Kap. 1.4) resultierte aus der Infektion mit AdGFP ein Abbau von p53. Zusätzlich führte AdGFP jedoch noch zu einer Abnahme des p53-responsiven p21-Proteins, während die Mengen an (nicht p53-responsivem) p27 nahezu konstant blieben. Eine Überexpression von exogenem p53 durch Infektion mit Adp53 hatte eine Stabilisierung der Mengen an p53 und p21 auf dem Niveau von mock-infizierten Zellen zu Folge, während Adp53mt24-28 in beiden Fällen zu einem weiteren Anstieg der Proteinkonzentration führte. Auch in diesen Ansätzen konnte keine Veränderung der p27-Konzentration nachgewiesen werden.

Damit konnte gezeigt werden, daß die Infektion Ad-E1-transformierter Zellen durch ein vollständiges Adenovirus zu einer starken Reduktion der p53-Menge und -Aktivität führt. Die gleichzeitige Überexpression von p53 kann diesen Effekt rückgängig machen.

4.6. Herstellung der Mutante p53mt24-28 im Vektor pCIN4

Für nachfolgende Untersuchungen (siehe Kap. 4.7) wurde die E1B-55 kDa-resistente Form von p53, genannt p53mt24-28, im Kontext des Vektors pCIN4 benötigt (Abbildung 3.1). Zu diesem Zweck erfolgte die Umwandlung der kodierenden Sequenz für 5 Aminosäuren am N-Terminus von wildtypischem p53 (Residuen 24-28: KLLPE) in die homologe Sequenz von p73 (Residuen 20-24: SSLEP). Durch diesen Austausch entstand das Plasmid pCIN4-p53mt24-28, welches für den „Colony Forming Assay“ (Durchführung siehe Kap. 3.3.2) verwendet werden konnte (zur Erläuterung der Mutante p53mt24-28 siehe Kap. 1.2).

Zunächst wurde mit den p53-spezifischen Primern CAG ACC TAT GGA GCT CCC TCG AGC CAA ACA ACG TTC TGT CC (Positivstrang) und GGA CAG AAC GTT GTT TGG CTC GAG GGA GCT CCA TAG GTC TG (Negativstrang) die Mutagenese-Reaktion („Quickchange“) mit dem Plasmid pCIN4-p53 (Wildtyp) durchgeführt (Kap. 3.4.6). Dabei

wurde für die spätere Identifizierung korrekt mutagenisierter Klone eine *XhoI*-Schnittstelle (**CTC GAG**) in die Sequenz integriert. Dieses Enzym schnitt daher nur in der Plasmidsequenz von pCIN4-p53mt24-28 und nicht in pCIN4-p53.

Nach dem „Quickchange“ wurde das PCR-Produkt gefällt und in *E. coli* DH10B („ElektroMAX DH10B“; Life Technologies) eingebracht. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht, dann wurden 16 Klone gepickt und deren Plasmid-DNS isoliert. Mittels Restriktionsverdau mit *XhoI* sowie nachfolgende Sequenzierung konnte ein korrekter Klon identifiziert werden (zur Durchführung siehe Kap. 3.4.6).

4.7. Adenovirus-transformierte Zellen können mit einem p53-Expressionskonstrukt stabil transfiziert werden

Die aus den transienten Assays gewonnenen Daten deuteten darauf hin, daß p53 in Adenovirus-(Ad-)transformierten Zellen konstitutiv aktiv ist. Trotzdem sind diese in der Lage zu wachsen, und erfüllen alle Kriterien, die mit einem transformierten Phänotyp einhergehen (siehe Kap. 1.3). Dies steht jedoch im Widerspruch zu den wachstumsinhibierenden und Apoptose-auslösenden Eigenschaften von p53.

Es stellte sich daher die Frage, ob Ad-transformierte Zellen aktives p53 tolerieren können, selbst wenn es überexprimiert wird. Um dies zu überprüfen, wurden HEK293- und HER911-Zellen (sowie H1299-Zellen als Kontrolle) mit Expressionskonstrukten für wildtypisches p53 oder p53mt24-28 stabil transfiziert („Colony Forming Assay“, Kap. 3.3.2). Erreicht wurde dies durch die Kombination von zwei Expressionskassetten – je eine für das p53-Konstrukt und für ein Neomycin-Resistenzgen – auf einer bicistronischen mRNS. Damit eine optimale Expression des nachfolgenden Resistenzgens gewährleistet war, befand sich eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES) zwischen den beiden Kassetten. Anschließend wurden stabile Transfektanten durch Zugabe des Antibiotikums G418 selektioniert. Diese Methode erlaubte es, den „Hintergrund“ an Zellen äußerst gering zu halten, die das Transgen nicht exprimierten, jedoch trotzdem eine Resistenz gegenüber G418 entwickelten. Des weiteren wurden die Zellen entweder mit leerem Vektor (pCIN) oder einer p53-Mutante transfiziert (p53R273H), welche keinerlei wachstumsinhibierende Eigenschaften mehr aufweist. Die anschließende Auswertung erfolgte zunächst durch Auszählen der gebildeten Kolonien bei allen Ansätzen.

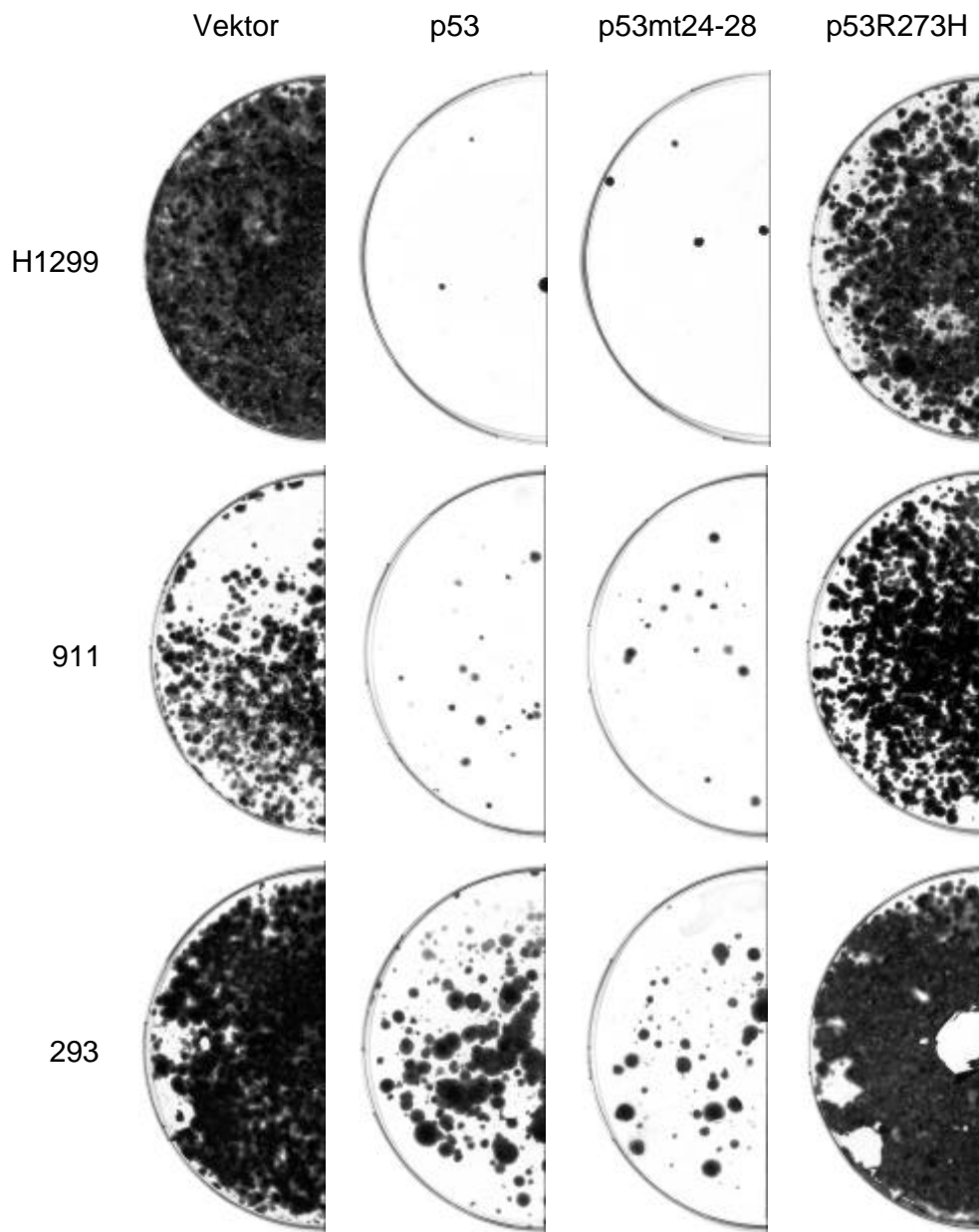


Abbildung 4.6: Koloniebildung nach Transfektion von Expressionsplasmiden für p53-Wildtyp, p53mt24-28 und p53R273H. 2×10^5 Zellen je Ansatz wurden mittels Lipofectamine PLUS (HER911) oder Lipofectamine2000 (HEK293, H1299) mit den angegebenen Plasmiden transfiziert. Nach 2 Tagen erfolgte das Umsetzen in 18 cm-Schalen und die Selektion stabiler Transfektanten mit Geneticin (0,6 mg/ml). 18-20 Tage danach wurde die Hälfte der Zellen geerntet und die andere Hälfte mit Kristallviolett gefärbt. Vektor = pCIN4; p53 = Wildtyp-p53; p53mt24-28 = E1B-55 kDa-resistente p53-Mutante; p53R273H = Tumor-abgeleitete, inaktive p53-Mutante.

In allen Fällen hatte die Transfektion der Zellen mit p53 oder p53mt24-28 im Vergleich zu leerem Vektor eine verringerte Koloniebildung zur Folge (Abbildung 4.6). Das Ausmaß der Kolonierepression war in Ad-transformierten Zellen jedoch deutlich geringer, besonders, wenn man die Relationen von Vektor- zu p53-Transfektanten in HER911- / HEK293-Zellen mit der in H1299-Zellen vergleicht. Die Unterschiede zwischen Vektor und p53R273H innerhalb einer Zelllinie waren jeweils nur marginal, wobei in H1299-Zellen ein leichter Wachstumsvorteil der Vektor-transfizierten Zellen festgestellt werden konnte. Hierbei ist aber zu beachten, daß letztere nur eine kodierende Region – für das Resistenzenzym – exprimieren mußten, um erfolgreich Kolonien zu bilden.

Als nächstes mußte ermittelt werden, ob die erhaltenen Kolonien das Transgen tatsächlich stabil exprimierten. Hierfür wurden die Zellen aus einer Hälfte der Kulturschalen vom Boden abgeschabt, die Hälfte dieser Zellen wurde lysiert, und die Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt. Im Immunoblot erfolgte dann der Nachweis von p53 bzw. Lamin B1 als Auftragungskontrolle (Abbildung 4.7 (A)). In H1299-Zellen konnte lediglich die Expression von p53R273H nachgewiesen werden, nicht jedoch die Synthese von detektierbarem p53 oder p53mt24-28. Dies deutete darauf hin, daß in diesen Fällen Zellen selektiert wurden, die zwar G418-resistent waren, aber das Transgen nicht exprimierten. In HER911- und HEK293-Zellen konnten keine eindeutigen Unterschiede in den p53-Mengen der einzelnen Ansätze detektiert werden.

Mittels eines RT-PCR-Assays sollte anschließend die Expression der transfizierten p53-Mutante p53mt24-28 auf transkriptioneller Ebene untersucht werden. Um dies zu erreichen, wurde aus allen Ansätzen in HER911- und HEK293-Zellen zunächst die Gesamt-RNS isoliert und dann revers transkribiert. Anschließend erfolgte die PCR-Amplifikation eines Teilstücks der p53-kodierenden Region, die sich zwischen p53 Wildtyp und p53mt24-28 unterscheidet. Letztere enthält eine zusätzliche Schnittstelle für das Restriktionsenzym *SacI*. Durch Verdau der PCR-Produkte mit diesem Enzym erhielt man nach Auftrennung im Agarosegel drei verschiedene Banden: Eine 213Bp-Bande, die dem ungeschnittenen Fragment entsprach und daher sowohl wildtypisches p53 als auch p53R273H repräsentierte. Bei den p53mt24-28-transfizierten Zellen traten noch zwei zusätzliche Banden mit einer Größe von 142Bp und 71Bp auf, die dem geschnittenen Fragment entsprachen. Aus Abbildung 4.7 (B) geht hervor, daß die Mengen von p53 und p53mt24-28 auf mRNA-Ebene circa einem 1:1-Verhältnis entsprachen. Dies wies darauf hin, daß Adenovirus-transformierte HER911- und HEK293-Zellen die Mutante p53mt24-28 tatsächlich in großer Menge exprimierten.

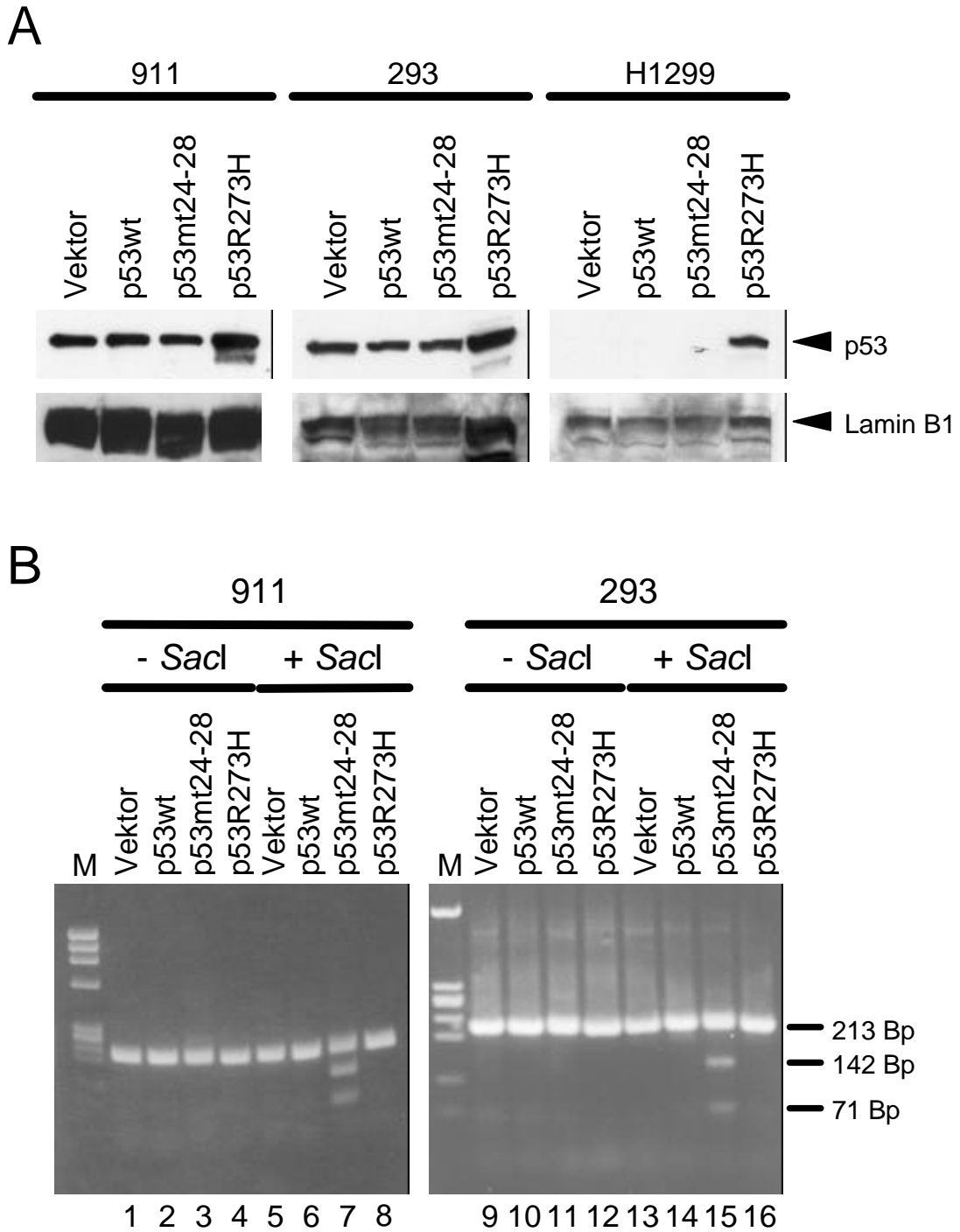


Abbildung 4.7: Expression von p53 in den stabilen Transfektanten. (A) vereinigte Kolonien der angezeigten Ansätze wurden mit RIPA-Puffer lysiert, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Dann erfolgte der immunologische Nachweis von p53 und Lamin B1 (Ladekontrolle) (B) Ergebnis des RT-PCR-Assays zur Unterscheidung zwischen endogenem p53 und exogenem p53mt24-28. Aus den

Transfektanten der Zelllinien HER911 und HEK293 wurde Gesamt-RNS präpariert. Ein N-terminales Fragment der mRNA von p53 (und p53mt24-28) wurde revers transkribiert und über PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden zum Teil mit dem Restriktionsenzym *SacI* verdaut, welches nur die DNS-Fragmente schneidet, die von der p53mt24-28-kodierenden Region abgeleitet sind. Es folgte die Auftrennung der Fragmente über Agarose-Gelelektrophorese. M = Marker (DNS-Längenstandard), Vektor = pCIN4.

4.8. Nach stabiler Expression ist p53 überwiegend im Zellkern lokalisiert

Der Tumorsuppressor p53 weist in normalen Zellen in der Immunfluoreszenz eine diffus nukleäre Lokalisation auf, was im Einklang mit seinen transaktivierenden Fähigkeiten steht. In Ad-transformierten Zellen (zum Beispiel in HER911- und HEK293-Zellen) wird p53 jedoch vom E1B-55 kDa-Protein in perinukleäre Ansammlungen („Cluster“ oder „Dots“) relokalisiert (siehe Kap. 1.4). Um herauszufinden, ob p53 in den stabil transfizierten Zelllinien (Kap. 4.7) in diesen Clustern verbleibt oder in seine normale, diffus nukleäre Verteilung entlassen wird, wurden Immunfluoreszenzen von den G418-selektionierten Zellen angefertigt. In den Vektor-transfizierten HER911- und HEK293-Zellen konnte die charakteristische Kolo-kalisation von E1B-55 kDa und p53 in perinukleären Dots beobachtet werden (Abbildung 4.8 (A) und (B), Bilder (a)-(d)). Bei allen anderen Transfektanten konnte eine Zunahme von diffus nukleär lokalisiertem p53 verzeichnet werden, wenngleich in unterschiedlichem Ausmaß (Abbildung 4.8 (A) und (B), Bilder (e)-(p)). Das heißt, während ein Anteil von p53 in den perinukleären Dots und assoziiert an E1B-55 kDa verblieb, erfolgte gleichzeitig die Freisetzung von p53 in den Zellkern, wo es nicht mehr durch das E1B-Protein inhibiert werden konnte.

Um eine statistische Aussage treffen zu können, wurde mittels IFA ein Blindversuch durchgeführt. Die stabil transfizierten Zelllinien wurden dabei von einer Person ausgezählt, die über die Identität der Zellklone im Unklaren gelassen wurde. Dabei erfolgte die Einteilung der p53-Fluoreszenz in zwei verschiedene Kategorien:

- (a) p53 liegt in den Zellen vorwiegend assoziiert mit E1B-55 kDa in perinukleären Proteinansammlungen vor
- (b) p53 liegt in den Zellen überwiegend dissoziiert von E1B-55 kDa vor und ist zu einem großen Teil diffus im Nukleus lokalisiert

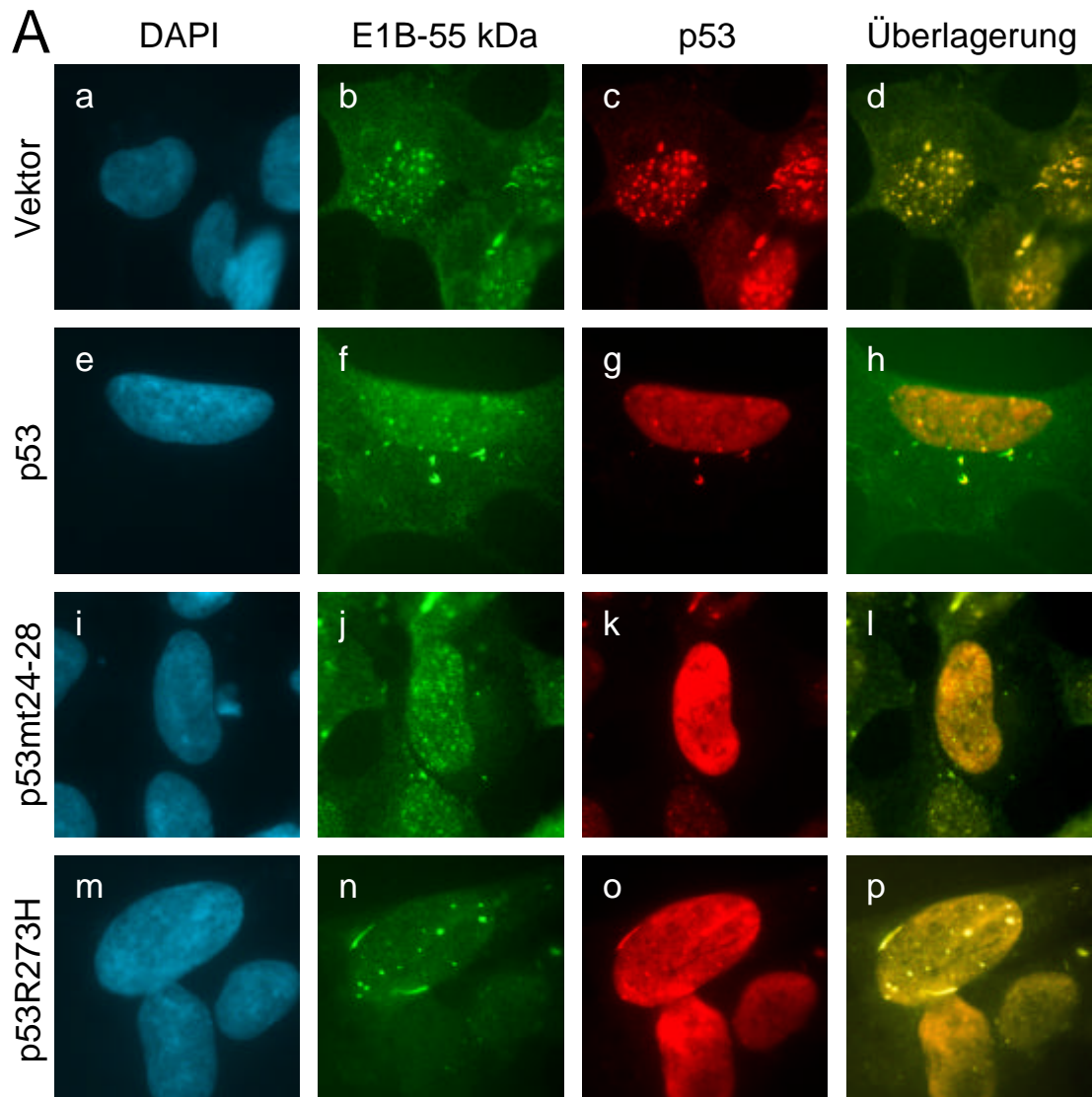


Abbildung 4.8: Intrazelluläre Lokalisation von p53 in den stabilen Transfektanten. Ad-E1-transformierte Zellen, die mit dem Resistenzgen alleine oder zusätzlich mit p53, p53mt24-28 bzw. p53R273H transfiziert worden waren, wurden fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen E1B-55 kDa (grün) und p53 (rot) behandelt. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit 4',6-diamino-2-phenylindol (DAPI). Kolokalisation (gelb) von p53 und E1B-55 kDa wurde durch Überlagerung der beiden Bilder gezeigt. (A) Transfektanten von HER911-Zellen (B) Transfektanten von HEK293-Zellen.

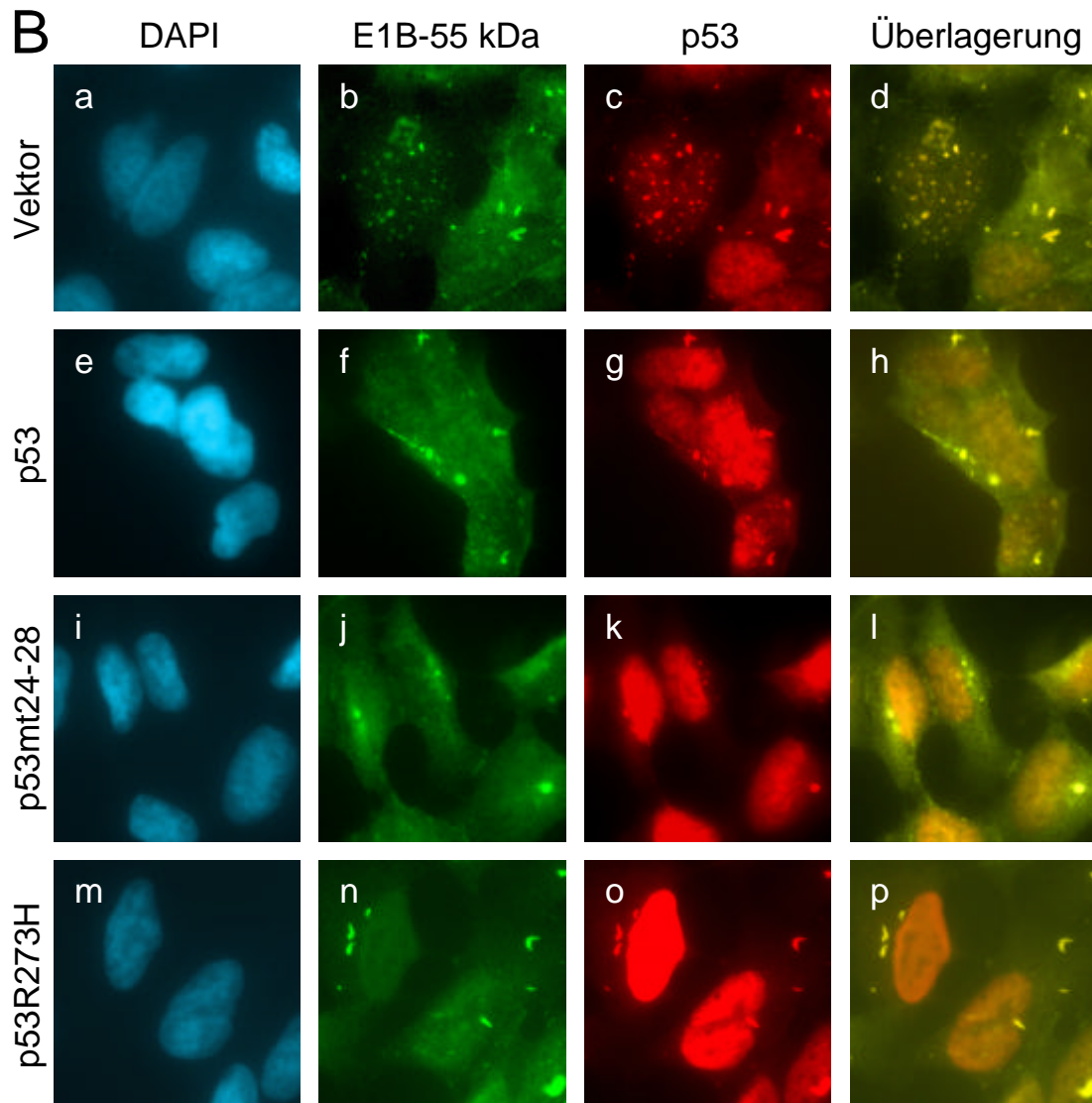


Abbildung 4.8, Fortsetzung

Aus dieser Auswertung ergab sich folgendes Schema: In den p53-transfizierten Zellen war die Menge an nukleärem p53 gegenüber Vektor-transfizierten Zellen erhöht (Abbildung 4.9). Sowohl die Transfektion von p53mt24-28 als auch von p53R273H führte zu einer weiteren Steigerung dieser p53-Lokalisation. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, daß ein großer Anteil der in den Ad-transformierten Zellen jeweils synthetisierten p53-Spezies nicht mit dem E1B-55 kDa-Protein assoziierte.

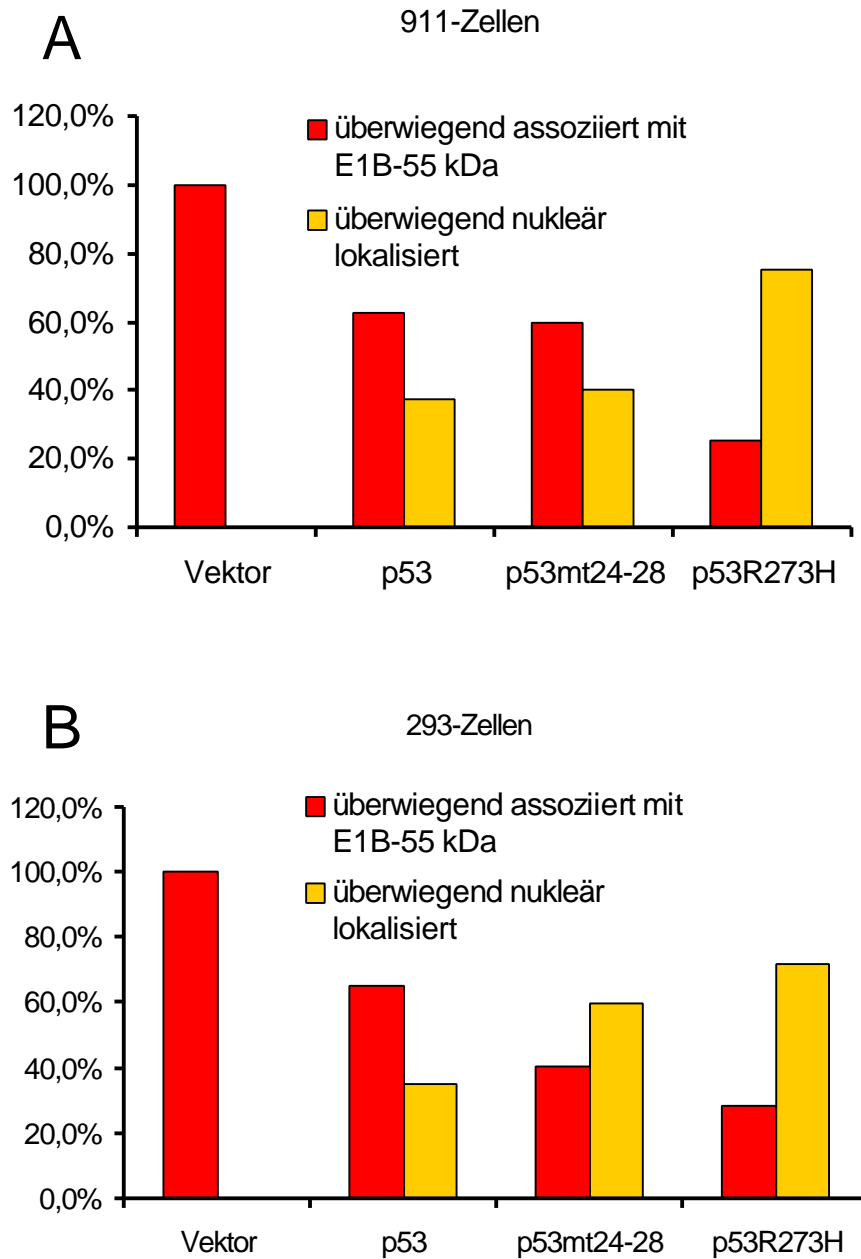


Abbildung 4.9: quantitative Analyse der Lokalisation von p53 in den stabilen Transfektanten. Die in Abbildung 4.8 dargestellten Zellen wurden nach ihrer p53-Lokalisation kategorisiert. Eine Person, die über die Identität der Zellklone im Unklaren gelassen wurde, zählte wenigstens 100 Zellen pro Klon aus und gruppierte diese dann in eine der beiden Kategorien „p53 ist vorwiegend assoziiert mit E1B-55 kDa in perinukleären Proteinansammlungen“ (rote Balken) und „p53 ist überwiegend dissoziiert von E1B-55 kDa und zu einem großen Teil diffus im Nukleus lokalisiert“ (orange Balken) (A) Transfektanten von HER911-Zellen (B) Transfektanten von HEK293-Zellen.

4.9. Die stabile Überexpression von p53 verhindert nicht das Wachstum von Adenovirus-transformierten Zellen

Aus den vorangegangenen Untersuchungen (Kap. 4.7 und 4.8) ging hervor, daß Adenovirus-transformierte Zellen mit aktivem p53 stabil transfiziert werden können, dieses tatsächlich in hohem Maß exprimieren, und daß die verwendeten p53-Spezies (Wildtyp, p53mt24-28 und p53R273H) überwiegend dissoziiert von E1B-55 kDa im Nukleus vorliegen. Es bestand jedoch immer noch die Möglichkeit einer durch p53-Aktivität ausgelösten, mehr oder minder starken Wachstumsrestriktion. Um dies zu untersuchen, wurden Wachstumskurven für jeweils alle vier verschiedenen Transfektanten der Zelllinien HER911 und HEK293 erstellt. Am ersten Tag erfolgte die Aussaat von je 50.000 Zellen, anschließend wurden diese an vier aufeinanderfolgenden Tagen vom Boden der Kulturgefäße abgelöst und in einer Neubauer-Zählkammer quantifiziert.

In HER911-Zellen konnte kein Einfluß der transfizierten Konstrukte p53, p53mt24-28 oder p53R273H festgestellt werden (Abbildung 4.10 (A)). HEK293-Zellen wiesen in Anwesenheit von p53 oder p53mt24-28 lediglich eine leichte Wachstumsrestriktion auf (um den Faktor 2), wenn man sie mit Vektor-transfizierten Zellen verglich (Abbildung 4.10 (B)). Dieser Versuch zeigte, daß Ad-transformierte Zellen trotz der Anwesenheit von aktivem p53 wachsen konnten.

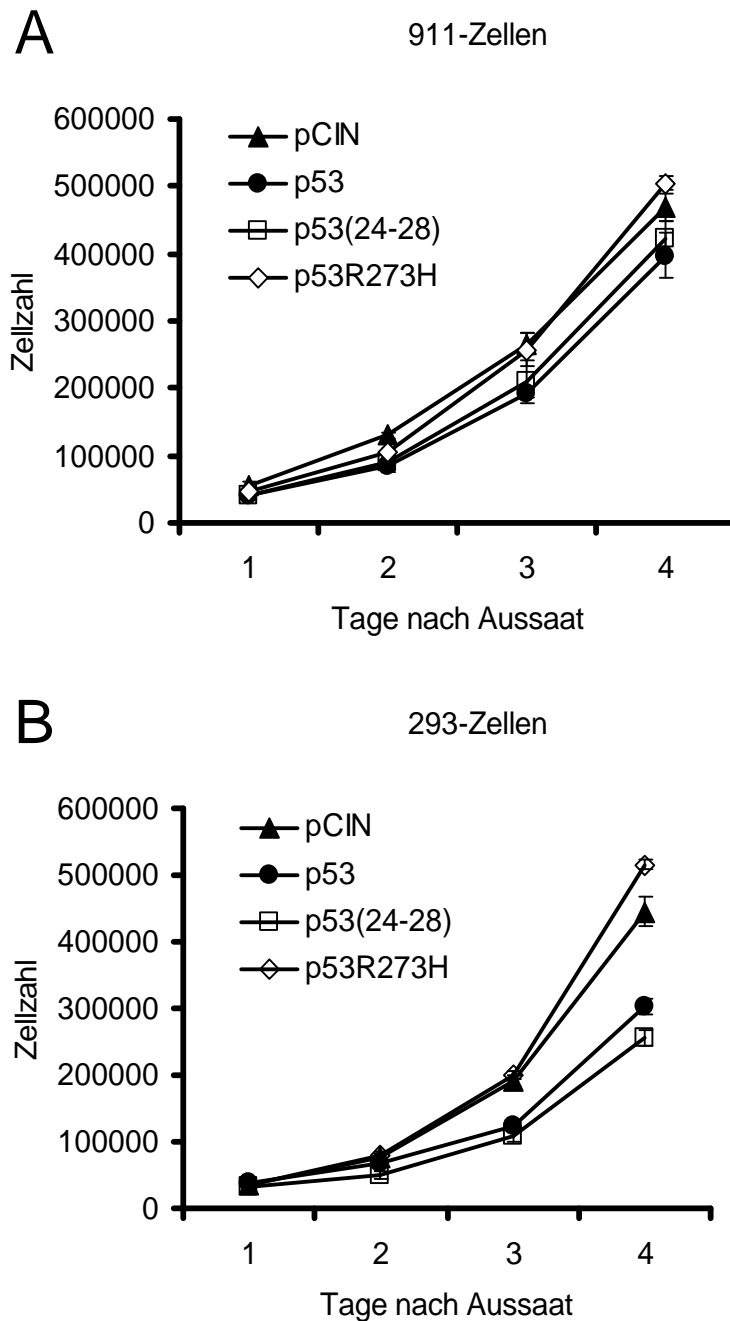


Abbildung 4.10: Wachstum von Ad-E1-transformierten Zellen nach stabiler Transfektion von Expressionsplasmiden für p53, p53mt24-28 oder p53R273H. Je 5×10^4 Zellen der dargestellten stabilen Transfektanten von HER911- und HEK293-Zellen wurden in 6-Lochschalen ausgesät. An 4 aufeinanderfolgenden Tagen wurden die Zellen erneut in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die Ergebnisse von wenigstens 4 unabhängigen Experimenten sind zusammen mit dem Standardfehler dargestellt.

5. Diskussion

5.1. Aktivität von p53 in Adenovirus-E1-transformierten Zellen

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse weisen deutlich darauf hin, daß p53 in Adenovirus-(Ad-)E1- und Simian Vacuolating Virus 40-(SV40-)transformierten Zellen aktiv ist. In Übereinstimmung mit dieser Aussage weist ein Luziferase-Reporterkonstrukt unter der Kontrolle des *mdm2*-Promotors in Ad-E1- und SV40-transformierten Zellen das gleiche – oder sogar ein höheres – Niveau auf wie ein Reporter mit dem konstitutiv aktiven RSV-Promotor (Abbildung 4.1). In p53(-/-)-Zellen (H1299) liefert der *mdm2*-Reporter dagegen eine um den Faktor 25 niedrigere Aktivität als das RSV-Konstrukt. Des weiteren führt die transiente Überexpression von aktivem p53 oder p53mt24-28 in Ad-E1- und SV40-transformierten Zellen zu einer wesentlich geringeren relativen Induktion des *mdm2*-Promotors als in p53-negativen Zellen (Abbildung 4.2). Dies gilt sowohl für die untersuchten Reporterkonstrukte als auch für den endogenen *mdm2*-Promotor und ist ein Hinweis dafür, daß sich die p53-Aktivität in untransfizierten Zellen dieser Spezies bereits in der Nähe des erreichbaren Maximums befindet. Lediglich in HPV-transformierten HeLa-Zellen, welche das E6-Protein exprimieren, wird die p53-Aktivität dauerhaft eliminiert. Dies dürfte daran liegen, daß p53 durch die Ubiquitinligase-Aktivität des Komplexes aus viralem E6 und zellulärem E6-AP (siehe Kap. 1.4) verstärkt ubiquitinyliert und dadurch vollständig dem proteasomalen Abbau zugeführt wird. Dementsprechend führt die Transfektion von HeLa-Zellen mit p53 zu einer vergleichbaren relativen Aktivierung des *mdm2*-Promotors wie in p53-losen H1299-Zellen (Abbildung 4.2). Diese Ergebnisse widersprechen der allgemein verbreiteten Auffassung vom Beitrag der Proteine E1B-55 kDa (Ad) und T-Antigen (SV40) zur malignen Transformation von Zellen. Bisher ging man davon aus, daß E1B-55 kDa durch die permanente Inaktivierung von p53 dessen wachstumsbehindernde Eigenschaften unterbindet und auf diesem Weg wesentlich zur Transformation beiträgt (Grand *et al.*, 1995; Hutton *et al.*, 2000). In ähnlicher Weise soll das große T-Antigen („Large T“; T) mittels einer kontinuierlichen Inhibition von p53 die Proliferation von Zellen unterstützen (Pipas und Levine, 2001). Die hier gemachten Beobachtungen legen jedoch ein anderes Modell nahe, in welchem die viralen Onkoproteine höchstens vorübergehend zu einer vollständigen Inaktivierung von p53 führen. Auf die Dauer scheint sich jedoch in Ad-E1- und SV40-transformierten Zellen ein Gleichgewicht herauszubilden zwischen an E1B-55 kDa bzw. T

gebundenem, und freiem, transkriptionell aktivem p53 (Abbildung 5.1 (A)). Die Einstellung eines solchen Equilibriums ist möglich, da beide virale Onkoproteine den Tumorsuppressor p53 inaktivieren, jedoch nicht zu seinem Abbau führen. In diesem Modell führt die in Ad-E1- und SV40-transformierten Zellen beobachtete Akkumulation von p53 (zu sehen auch in Abbildung 4.8, Bild (c)) schließlich zu einer Sättigung von E1B-55 kDa bzw. T, und damit zu einer Anhäufung von transkriptionell aktivem p53. Dieser Prozeß setzt sich so lange fort, bis die regulatorische Schleife mit dem zellulären p53-Antagonisten mdm2 wieder hergestellt ist (Abbildung 5.1 (A); siehe auch Kap. 1.2). Übereinstimmend mit diesen Thesen hatte die transiente Überexpression von E1B-55 kDa in den durchgeführten Luziferase-Assays und mdm2-Proteinanalysen zur Folge, daß die Aktivität des p53-responsiven *mdm2*-Promotors in Ad-E1- und SV40-transformierten Zellen reduziert wurde (Abbildung 4.3; Abbildung 4.4), obwohl in diesen Zellen kontinuierlich endogenes E1B-55 kDa bzw. T exprimiert wird. Diese Ergebnisse können mit der Inaktivierung von überschüssigem, freiem p53 erklärt werden.

5.2. Die Auswirkungen einer Adenovirus-Infektion auf die p53-Menge und -Aktivität

Infiziert man Ad-E1-transformierte HER911-Zellen mit rekombinanten, E1-defizienten Adenoviren, so entspricht dies einer Infektion mit wildtypischem Adenovirus, weil eine Komplementation der fehlenden Virusproteine durch die Zellen gewährleistet wird (Kap. 4.5). Erwartungsgemäß führte die Infektion von HER911-Zellen mit AdGFP (Δ E1) daher zu einem Abbau von p53 in diesen Zellen (Abbildung 4.5; Spur 2), höchstwahrscheinlich durch das Zusammenspiel der Proteine E1B-55 kDa (exprimiert von HER911-Zellen) und E4orf6 (exprimiert vom Virus) (Querido *et al.*, 1997; Steegenga *et al.*, 1998). Auch die Konzentration des p53-responsiven Cdk-Inhibitors p21 (siehe Kap. 1.2) wurde erniedrigt, während ein p53-unabhängiger Cdk-Inhibitor (p27) in seiner Konzentration unverändert blieb (Abbildung 4.5). Dies deutet erneut auf eine vorhandene p53-Aktivität in Ad-E1-transformierten Zellen hin, die durch die Infektion eliminiert wurde. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, daß eine Überexpression von p53 durch Infektion mit Adp53 die p21-Mengen wieder herstellte. Noch stärker trat dieser Effekt bei Einsatz von Adp53mt24-28 zutage, was mit der Insensitivität dieser Mutante gegenüber E1B-55 kDa erklärt werden kann.

5.3. Stabile Überexpression von p53 in Ad-E1-transformierten Zellen

Im Verlauf dieser Arbeit konnten zum ersten Mal Zellen generiert werden, die – nach Transfektion eines Expressionsplasmids für p53 bzw. p53mt24-28 und anschließender Selektion mit G418 – p53 stabil überexprimieren („Colony Forming Assay“ (CFA); Kap. 4.7 - 4.9; Abbildung 4.6). Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß p53 bzw. p53mt24-28 in diesen Zellen nicht nur in großer Menge exprimiert werden (Abbildung 4.7). Sie sind darüber hinaus auch in erhöhtem Maße diffus im Nukleus verteilt und weniger häufig in perinukleären Punkten zusammen mit E1B-55 kDa lokalisiert (Abbildung 4.8; Abbildung 4.9). In dieser Lokalisation ist p53 in der Lage, seine responsiven Promotoren zu aktivieren. Die Selektion von p53-exprimierenden Transfektanten gelang jedoch ausschließlich mit Ad-E1-transformierten Zellen, nicht aber mit H1299-Zellen, welche ebenfalls einen transformierten Phänotyp aufweisen (Abbildung 4.6 und Abbildung 4.7 (A)). Die Tatsache, daß Zellen maligne transformiert sind, bedingt demnach nicht automatisch eine Toleranz gegenüber aktivem p53. Dies wird unterstützt durch den Befund, daß die Herstellung p53-überexprimierender Zellen bisher nicht gelang und schon die transiente Transfektion von Zellen mit p53 zur Einleitung der Apoptose führt. Nur wenn p53 unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors exprimiert wird, ist die Herstellung von stabil p53-exprimierenden Zellen möglich (Chen *et al.*, 1996b). Nachdem bereits dargestellt wurde, daß p53 in Ad-E1-transformierten Zellen aktiv ist (Kap. 4.1 - 4.5), konnte mit diesem CF-Assay gezeigt werden, daß nicht einmal die weitere Steigerung der p53-Menge in Ad-E1-transformierten Zellen diese vom Wachstum abhält (Abbildung 4.10).

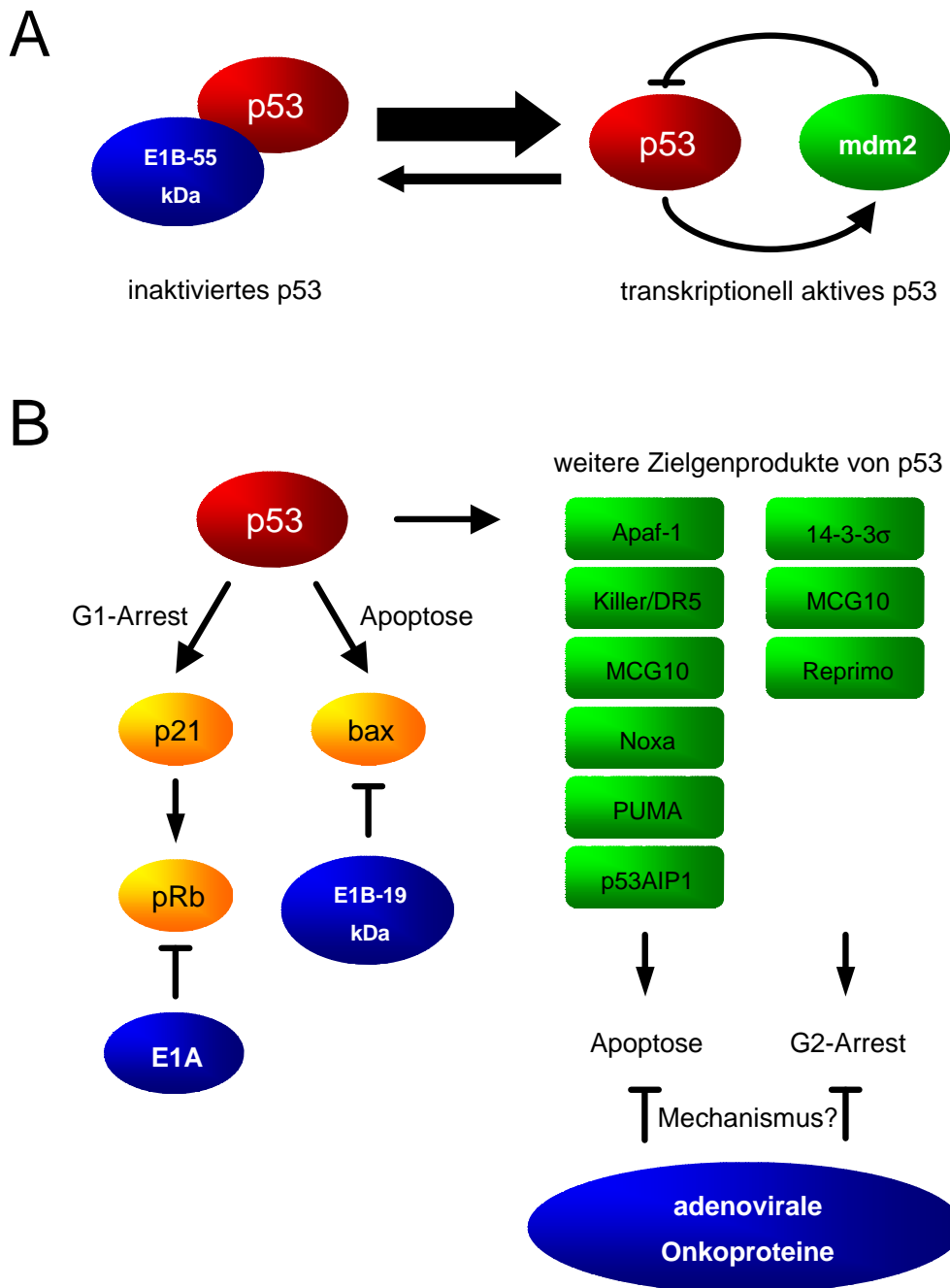


Abbildung 5.1: p53-Aktivität in Adenovirus-(Ad-)E1-transformierten Zellen (A) Neues Modell zur p53-Aktivität in Ad-E1-transformierten Zellen; es besteht ein Gleichgewicht zwischen E1B-55 kDa-gebundenem, inaktiven p53 und freiem, aktivem p53; freies p53 akkumuliert, bis die regulatorische Schleife mit mdm2 etabliert ist, d. h. ein signifikanter Anteil von p53 ist in den Zellen aktiv (B) die zellulären Proteine p21 und Bax werden von p53 induziert, ihre wachstumsinhibierende Wirkung wird durch die adenoviralen Proteine E1A bzw. E1B-19 kDa aufgehoben; weitere p53-Zielgenprodukte (grüne Rechtecke) könnten ebenfalls durch adenovirale Onkoproteine der E1-Region reguliert werden.

5.4. Inaktivierung von p53-Zielgenprodukten in Ad-E1-transformierten Zellen

Mit dem Colony Forming Assay konnte gezeigt werden, daß Ad-E1-transformierte Zellen auch nach Überexpression von aktivem p53 in der Lage sind, zu wachsen. Dies steht im Widerspruch zu den wachstumsinhibierenden und Apoptose-auslösenden Eigenschaften von p53 (Bates und Vousden, 1999; Levine, 1997; Prives und Hall, 1999). Es ist daher zu postulieren, daß in den untersuchten Zelllinien HER911 und HEK293 die E1-Proteine dafür sorgen, daß alle relevanten Zielgenprodukte von p53 direkt oder indirekt inhibiert werden. Nur so kann erklärt werden, daß ein Anhalten des Zellzyklus und das Einleiten der Apoptose verhindert werden.

Für einige dieser p53-Ziele konnte diese Hypothese bereits bewiesen werden (Abbildung 5.1 (B)). Zu diesen gehört der Zyklin-abhängige Kinase-Inhibitor p21/cip1/waf1. Nach Induktion durch p53 (el-Deiry *et al.*, 1993) inhibiert p21 die Phosphorylierung des Retinoblastomproteins (pRb) und verhindert dadurch seine Inaktivierung. Hypophosphoryliertes pRb wirkt jedoch als aktiver Repressor von zellzyklusregulatorischen Genen (Chin *et al.*, 1998; Dyson, 1998; Hiebert *et al.*, 1992), wodurch der Übergang des Zellzyklus von G1 nach S verhindert wird (Bartek und Lukas, 2001). Dieser Effekt wird durch das adenovirale E1A-Protein antagonisiert, welches an pRb und möglicherweise auch an p21 bindet und diese Regulatoren dadurch inaktiviert (Bandara und La Thangue, 1991; Bulavin *et al.*, 1999; Keblusek *et al.*, 1999; Whyte *et al.*, 1988) (siehe auch Abbildung 1.4). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, daß die Varianz der p21-Mengen in HER911-Zellen exakt mit der Veränderung der p53-Konzentration einhergeht (Abbildung 4.5). Demnach ist die Induktion von p21 durch p53 in Ad-E1-transformierten Zellen möglich. Man kann daher postulieren, daß adenovirale Proteine zumindest in einigen Fällen auch „stromabwärts“ von p53 dessen wachstumsinhibierende Eigenschaften zu ihrem Vorteil modulieren. Im Fall von p21 erscheint folgende Erklärung für diese Theorie plausibel: Der Cdk-Inhibitor p21 kann auch unabhängig von p53 aktiviert werden, zum Beispiel durch E2F-1, einem Mitglied der E2F-Familie von Transkriptionsaktivatoren (Gartel *et al.*, 1998; Gartel *et al.*, 1996). Da E2F seinerseits durch adenovirales E1A aktiviert wird (Shenk, 1996), reicht eine Blockierung des p53-abhängigen Weges zur Transkriptionsaktivierung von p21 nicht aus, um ein Anhalten des Zellzyklus zu verhindern.

Ein weiteres Beispiel ist das humane zelluläre Bax-Protein (siehe hierzu auch Kap. 1.2 und 1.3), welches ebenfalls durch p53 induziert wird und Apoptose auslösen kann (Miyashita und

Reed, 1995). Dieser Mechanismus wird jedoch blockiert durch die Interaktion des kleineren der beiden E1B-Proteine (E1B-19 kDa) mit Bax (Chen *et al.*, 1996a; Han *et al.*, 1996). Der Promotor von murinem Bax enthält hingegen keine p53-responsive Sequenz (Schmidt *et al.*, 1999), was auf die Möglichkeit einer p53-unabhängigen Regulation von Bax hinweist. In jüngerer Zeit wurden erste Hinweise gefunden, daß auch in humanen Zellen eine p53-unabhängige Induktion der Bax-Expression möglich ist (Butt *et al.*, 2000; Ng *et al.*, 2000). Ähnlich wie im Fall von p21 benötigten Adenoviren daher wohl einen zusätzlichen Weg zur Neutralisierung der Effekte von Bax, um eine Apoptose der Zellen zu verhindern. Diese beiden Beispiele lassen vermuten, daß eine dauerhafte Inhibition von p53 in Ad-E1-transformierten Zellen weder notwendig noch hinreichend für eine maligne Transformation ist.

Neben den oben bereits erwähnten existieren jedoch viele weitere p53-Zielgenprodukte, für die eine wachstumshemmende Wirkung nachgewiesen wurde. Hierzu gehören zum einen Inhibitoren der Zellzyklustransition von G2 nach M wie 14-3-3 σ (Hermeking *et al.*, 1997), MCG10 (Zhu und Chen, 2000) und Reprimo (Ohki *et al.*, 2000), genauso aber auch Auslöser der Apoptose wie Apaf-1 (Kannan *et al.*, 2001; Moroni *et al.*, 2001), Killer/DR5 (Wu *et al.*, 1997), MCG10 (Zhu und Chen, 2000), Noxa (Oda *et al.*, 2000a), p53AIP1 (Oda *et al.*, 2000b), PUMA (Nakano und Vousden, 2001) und andere (Vousden, 2000). Dennoch sind Ad-E1-transformierte Zellen auch bei Überexpression von aktivem p53 in der Lage, zu wachsen (Kap. 4.7 - 4.9; Abbildung 4.6 - Abbildung 4.10). Als Erklärung für diese Beobachtung kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht. Zum einen könnte die p53-Aktivität in Ad-E1-transformierten Zellen zu gering sein, um eine für eine Wachstumsinhibition ausreichend starke Expression der angeführten p53-Ziele zu gewährleisten. Dies ist jedoch aufgrund der beobachteten starken Expression der p53-responsiven Gene *mdm2* und *p21* unwahrscheinlich. Außerdem müßte in einem solchen Fall die Überexpression von p53 zu einem Absterben der Zellen führen, da dann ein Anstieg in der Expression der Zielgenprodukte zu erwarten wäre. Dies ist jedoch nicht der Fall (Abbildung 4.6 - Abbildung 4.10). Weiterhin könnte es sein, daß die Expression der p53-Zielgenprodukte das Zellwachstum nicht behindert. Dies stünde jedoch im Widerspruch zu ihren bisher beschriebenen Eigenschaften (Bates und Vousden, 1999; Vogelstein *et al.*, 2000). Drittens wäre es denkbar, daß viele der erwähnten Proteine in Ad-E1-transformierten Zellen ebenfalls mutiert und damit inaktiviert sind. Es erscheint aber eher unwahrscheinlich, daß eine so große Zahl an Mutationen spontan während einer *in vitro*-Transformation auftritt, wie sie zur Generierung der Zelllinien HER911 und HEK293

durchgeführt wurde (Fallaux *et al.*, 1996; Graham *et al.*, 1977). Lediglich bei der Krebsentstehung *in vivo*, bei der eine Vielzahl von Mutationen über eine große Zeitspanne hinweg im Genom einer Zelle angehäuft wird, kann ein solches Szenario angenommen werden (Kinzler und Vogelstein, 1996). Eine sehr viel wahrscheinlichere Erklärung ist daher, daß zumindest ein Teil der p53-Zielgenprodukte von Proteinen der E1-Region auf einem direkten oder indirekten, p53-unabhängigen Weg inhibiert oder in seiner Wirkung moduliert wird. Damit könnten Adenoviren zum einen dafür sorgen, daß die wachstumsbehindernden Eigenschaften von p53-responsiven Genprodukten trotz aktivem p53 eliminiert werden. Gleichzeitig würden auch die Effekte einer p53-unabhängigen Aktivierung dieser Gene kompensiert.

5.5. Modelle zur malignen Transformation humaner Zellen

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit müssen auch Modelle zur Entstehung humaner Tumorzelllinien neu überdacht werden. In jüngerer Zeit konnte gezeigt werden, daß primäre humane Epithelzellen und Fibroblasten durch das Einbringen einer kleinen Auswahl von Genen transformiert werden können. Dabei handelt es sich um die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase (hTERT), eine aktivierte Form des zellulären Proto-Onkogens H-Ras und das große T-Antigen von SV40 (Elenbaas *et al.*, 2001; Hahn *et al.*, 1999). Die Autoren postulieren, daß das T durch Inaktivierung von p53 und pRb zur Tumorgenese beiträgt (Hahn *et al.*, 1999; Weitzman und Yaniv, 1999). Aufgrund der in der vorliegenden Studie gemachten Beobachtungen kann man jedoch spekulieren, daß zumindest die Inaktivierung von p53 auch in diesen Fällen nur transient ist. Des weiteren ist T ein multifunktionales Protein, welches auf vielfältige Weise in die Zellzyklusregulation eingreift (Ali und DeCaprio, 2001). Daher könnten noch andere Funktionen von T bei der Transformation eine entscheidende Rolle spielen. Unterstützt werden diese Annahmen durch folgende Tatsache: Die Transfektion humaner Fibroblasten mit hTERT, den Proteinen E6 und E7 des HPV-Typs 16, sowie aktiviertem H-Ras führt nicht zur Ausbildung eines voll transformierten Phänotyps (Morales *et al.*, 1999), obwohl in diesem Fall von einem vollständigen Abbau von p53 auszugehen ist (und auch pRb inhibiert wird). Die Eliminierung der p53-Aktivität durch HPV-E6 ist also offenbar nicht ausreichend, um im Zusammenspiel mit den Proteinen hTERT und H-Ras zur Tumorgenese zu führen. Es ist daher anzunehmen,

daß in den oben angeführten Studien neben der Inaktivierung von p53 und pRb noch andere Eigenschaften von T für die Ausbildung des malignen Phänotyps erforderlich waren.

5.6. Rolle der p53-Inaktivierung durch E1B-55 kDa bei der malignen Transformation

Die bisher erörterten Aspekte legen den Schluß nahe, daß die Bindung und Inaktivierung von p53 durch adenovirales E1B-55 kDa für das Wachstum von Ad-E1-transformierten Zellen nicht zwingend notwendig ist. Dies steht scheinbar im Widerspruch zu dem Befund, daß das onkogene Potential von E1B-55 kDa und seine Fähigkeit, an p53 zu binden, in engem Zusammenhang stehen (Yew und Berk, 1992). Hierbei muß jedoch berücksichtigt werden, daß die meisten der bisher untersuchten E1B-Mutanten mehrere Funktionen zugleich verloren haben (Kao *et al.*, 1990; Rubenwolf *et al.*, 1997; Yew *et al.*, 1990). Es ist anzunehmen, daß dabei auch solche Eigenschaften berührt wurden, die zur Transformation von Zellen notwendig sind. Erst vor kurzem konnten Punktmutationen identifiziert werden, die selektiv die p53-Bindung des viralen Proteins eliminieren (Shen *et al.*, 2001). Zukünftige Untersuchungen mit diesen Mutanten könnten wichtige Hinweise zur Bedeutung der p53-Inaktivierung durch E1B-55 kDa liefern. Denkbar wäre zum Beispiel der Versuch, humane Zellen mit einer entsprechend mutierten E1-Region zu transformieren. Dies könnte nur dann gelingen, wenn auch die transiente Blockierung der p53-Aktivität durch andere E1B-Effekte kompensiert werden kann. Da sich in der Vergangenheit jedoch immer wieder gezeigt hat, daß E1B-55 kDa bereits durch kleinere Mutationen mehrere Funktionen verliert (wahrscheinlich bedingt durch eine fragile Konformation des Proteins), muß eine solche Möglichkeit auch bei den oben erwähnten Punktmutationen in Betracht gezogen werden. Des weiteren könnte die p53-Bindestelle zusätzliche Funktionen ausführen, die durch Mutation oder Bindung von Liganden beeinträchtigt werden. Dies würde erklären, warum die Zugabe eines von p53 abgeleiteten Peptids zu Ad-E1-transformierten Zellen zu einem Anhalten des Zellzyklus führt (Hutton *et al.*, 2000), während die Überexpression der E1B-55 kDa-resistenten Mutante p53mt24-28 im Colony Forming Assay (Kap. 4.7 - 4.9) zu keiner ausgeprägten Wachstumsrestriktion führte.

Auch ein Modell, in dem E1B-55 kDa nur bei den ersten Schritten der malignen Transformation benötigt wird, erscheint nicht plausibel. Warum sollte es dann in allen untersuchten Ad-transformierten Zellen weiterhin exprimiert werden, wie dies der Fall ist

(Hutton *et al.*, 2000)? Erklären läßt sich diese Tatsache nur mit zusätzlichen Funktionen des viralen Onkoproteins. Denkbar ist jedoch, daß während der ersten Schritte einer malignen Transformation eine transiente, nahezu vollständige Inhibition von p53 durch E1B-55 kDa erfolgt (und auch notwendig ist). Sind die Zellen erst einmal immortalisiert und weisen einen transformierten Phänotyp auf, ist eine strikte p53-Inhibition womöglich nicht mehr nötig. Dies würde die in Ad-E1-transformierten Zellen vorhandene Aktivität des Tumorsuppressors mit dem beobachteten Zellwachstum in Einklang bringen.

5.7. Konsequenzen für die Verwendung von p53 als Zielprotein pharmakologischer Ansätze

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal erwiesen werden, daß es möglich ist, die wachstumsinhibierenden Eigenschaften von p53 zu eliminieren, ohne die transkriptionelle Aktivität des Tumorsuppressors vollständig auszuschalten. Damit eröffnen sich neue Betrachtungsweisen für die Entstehung und Behandlung von Tumoren im allgemeinen. Zur Zeit wird die Möglichkeit diskutiert, Tumorzellen durch das Reaktivieren der transkriptionellen Aktivität von p53 zu eliminieren (Selivanova *et al.*, 1998; Sigal und Rotter, 2000). Diese Strategie fußt auf dem Befund, daß p53 in den meisten Krebszellen mutiert ist (Hollstein *et al.*, 1994; Hollstein *et al.*, 1991) und so zum transformierten Phänotyp beiträgt. Erste Erfolge in dieser Richtung konnten durch den Einsatz von Chemikalien (Wadhwa *et al.*, 2000) und synthetischen Peptiden (Selivanova *et al.*, 1997; Selivanova *et al.*, 1999) erzielt werden. Die Transaktivierung p53-responsiver Gene konnte in diesen Fällen zumindest teilweise wiederhergestellt werden, außerdem wurde das selektive Einleiten von Zellzyklusarrest oder Apoptose in Tumorzellen beobachtet. In anderen Studien konnte gezeigt werden, daß in HeLa-Zellen nach Elimination der HPV-Proteine E6 und E7 die transkriptionelle Aktivität von p53 wieder etabliert wird und dies zu einer Wachstumsinhibition führt (Goodwin und DiMaio, 2000; Goodwin *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 1993). Gleichzeitig gibt es jedoch auch Untersuchungen, aus denen hervorgeht, daß eine Reaktivierung von p53 und die Expression p53-responsiver Gene in HeLa-Zellen nicht zwangsläufig zur Revertierung des transformierten Phänotyps, bzw. zu Zellzyklusarrest und Apoptose führt (Athassiou *et al.*, 1999; Boylan *et al.*, 1996). Unter dem Aspekt betrachtet, daß die Entstehung von Tumoren möglicherweise auch ohne eine permanente Inhibition der

transkriptionellen Aktivität von p53 möglich ist, muß damit gerechnet werden, daß die Reaktivierung von p53 nicht in allen Fällen zu einer Rückbildung des anvisierten Tumors führen wird.

Die durch die vorliegenden Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse über p53-Aktivität in Ad-E1- und SV40-transformierten Zellen tragen also zu einem besseren Verständnis der Tumorgenese bei und können bei der gezielten Entwicklung pharmakologischer Ansätze helfen. Auch bei zukünftigen Experimenten zur Identifizierung von Mechanismen, die zur malignen Transformation von Zellen führen, sollte das vorgestellte Modell zur p53-Aktivität in Ad-E1-transformierten Zellen (Abbildung 5.1) berücksichtigt werden.

6. Zusammenfassung

Eines der am besten untersuchten Systeme zur Entstehung von Tumoren ist die maligne Transformation von Zellen durch Adenoviren (Ad). Bei diesem Prozeß wird fast immer die frühe Transkriptionseinheit 1 (E1) der Viren in das Genom der Zellen integriert, wie dies zum Beispiel bei HER911- und HEK293-Zellen der Fall ist. Nach vorherrschender Lehrmeinung ermöglicht das virale E1B-55 kDa-Protein solchen Zellen das Wachstum, indem es das zelluläre Tumorsuppressorprotein p53 permanent bindet und inaktiviert. Um dieses Konzept zu überprüfen, wurden Untersuchungen zur transkriptionellen Aktivität von p53 in Ad-E1-transformierten Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß ein exogen eingebrachter, p53-responsiver Promotor in diesen Zellen aktiv ist und diese Aktivität mit der eines starken retroviralen Promotors (Rous Sarcoma Virus, RSV) vergleichbar ist. Für weitere Untersuchungen wurde neben Wildtyp-p53 noch eine Mutante eingesetzt, genannt p53mt24-28, welche resistent gegenüber Bindung und Inaktivierung durch E1B-55 kDa ist, jedoch die gleichen transaktivierenden Eigenschaften aufweist wie wildtypisches p53. Die transiente Transfektion von Ad-E1-transformierten Zellen mit p53 oder p53mt24-28 führte lediglich zu einer 3-4fachen Steigerung der Aktivität eines p53-responsiven Promotors über das basale Niveau, während der gleiche Versuchsansatz in p53(-/-)-Zellen zu einer wenigstens 200fachen Induktion führte. Des weiteren hatte die transiente Überexpression von E1B-55 kDa in Ad-E1-transformierten Zellen die deutliche Repression eines p53-responsiven Promotors zur Folge, während in p53(-/-)-Zellen kein Unterschied zur basalen Promotoraktivität festgestellt werden konnte. Das gleiche Muster ergab sich bei der Analyse der Expressionsstärke des endogenen, p53-responsiven mdm2-Proteins. Dies zeigt, daß in Ad-E1-transformierten Zellen p53-Aktivität vorhanden ist und sich diese in der Nähe des erreichbaren Maximums befindet. Auch in COS7-Zellen, welche durch Simian Vacuolating Virus 40 (SV40) transformiert wurden, konnte auf diese Weise p53-Aktivität detektiert werden, während dies in durch das humane Papillomavirus (HPV) transformierten HeLa-Zellen nicht der Fall war. Nach Infektion von Ad-E1-transformierten Zellen mit rekombinanten Adenoviren (dadurch wurde eine Infektion mit Wildtyp-Ad nachgestellt) erfolgte die Reduktion sowohl der p53-Proteinmengen als auch des Niveaus des p53-responsiven Proteins p21. Dies kann durch das Zusammenwirken der viralen Proteine E1B-55 kDa und E4orf6 erklärt werden, die gemeinsam p53 destabilisieren. Um die Toleranz von Ad-E1-transformierten Zellen gegenüber exogen eingebrachtem, aktivem p53 zu ermitteln, wurden diese Zellen mit

Expressionsplasmiden für p53 oder p53mt24-28 transfiziert. Diese standen unter der Kontrolle des Cytomegalovirus Immediate Early-Promotors, eines der stärksten bekannten Promotoren. Nach Selektion von stabilen Transfektanten konnten nur bei Ad-E1-transformierten HER911- und HEK293-Zellen, nicht aber bei p53-negativen H1299-Zellen, Kolonien identifiziert werden, die aktives p53 oder p53mt24-28 überexprimierten und dennoch fast mit wildtypischer Kinetik wuchsen.

Aufgrund dieser Daten wird ein Modell vorgeschlagen, nach dem endogenes p53 in Ad-E1- oder SV40-transformierten Zellen von E1B-55 kDa (Ad) bzw. großem T-Antigen (SV40) gebunden wird, bis die viralen Proteine gesättigt sind. Anschließend akkumuliert aktives p53, bis eine regulatorische Schleife mit dem zellulären p53-Antagonisten mdm2 etabliert ist. Dabei bleibt ein wesentlicher Teil der p53-Menge in der Zelle aktiv. Im Gegensatz dazu wird p53 in HPV-transformierten HeLa-Zellen durch das virale E6-Protein destabilisiert und abgebaut, was zur vollständigen Eliminierung der p53-Aktivität führt. Damit konnte erstmalig gezeigt werden, daß es möglich ist, die wachstumsinhibierenden Eigenschaften von p53 zu kompensieren, ohne seine Eigenschaften als Transaktivator dauerhaft zu unterbinden. Möglich erscheint dies nur durch eine Inaktivierung aller relevanten p53-Zielgenprodukte durch die in den Zellen enthaltenen viralen Onkoproteine. Der bisherigen Lehrmeinung widersprechend, enthalten und tolerieren Ad-E1-transformierte Zellen demnach aktives p53.

7. Abstract

Malignant transformation of cells by adenovirus (Ad) is one of the most established model systems for tumorigenesis. During this process, the E1 region of Ad type 5 is integrated into the genome of cells that are transformed by the virus, as is the case with the human HEK293 or HER911 cell lines. According to current concepts, the viral E1B-55 kDa protein enables these cells to grow by constantly binding and inactivating the cellular tumor suppressor protein p53. To test this hypothesis, we examined the transcriptional activity of p53 in Ad-E1-transformed cells. In disagreement with the generally accepted model, we found that an exogenously introduced, p53-responsive promoter is active in these cells and that its activity is comparable to that of a strong retroviral promoter from the rous sarcoma virus. For further investigations, a p53 mutant, termed p53mt24-28, was used. This mutant cannot be bound by E1B-55 kDa but is fully transcriptionally active. Upon transient transfection of Ad-E1-transformed cells, p53 or p53mt24-28 led only to a 3-4fold increase in the activity of a p53-responsive reporter construct when compared to the expression level of the reporter alone. In contrast, the same assay, using p53 $-/-$ H1299 cells, yielded at least a 200fold activation of reporter expression. On the other hand, the transient overexpression of E1B-55 kDa significantly downregulated the expression of a p53-responsive promoter relative to its baseline activity in Ad-E1-transformed cells but not in p53 $-/-$ cells. Analysis of the expression levels of the endogenous, p53-responsive mdm2 protein yielded the same pattern of activation and downregulation after transient transfection of either p53, p53mt24-28 or E1B-55 kDa. These findings corroborate the concept of a continuous p53 activity in Ad-E1-transformed cells that is already near its achievable maximum. Also, in COS7 cells, transformed by simian vacuolating virus 40 (SV40), p53 activity was readily detectable and could be downregulated by E1B-55 kDa, whereas HeLa cells, transformed by the human papilloma virus (HPV), behaved like p53 $-/-$ cells. Next, Ad-E1-transformed cells were infected with recombinant adenoviruses (rAd). The deleted E1-region of the viruses was complemented by the infected cell lines. Both p53 itself and a p53-responsive gene product, p21, were reduced upon infection. This can be explained by the presence of the two adenovirus proteins, E1B-55 kDa and E4orf6, that co-operate to destabilize p53.

To assess the tolerance of Ad-E1-transformed cells for the expression of exogenously introduced, active p53, the cells were stably transfected to express either wild type p53 or p53mt24-28 under the control of the cytomegalovirus major immediate early promoter. While

Ad-E1-transformed cells gave rise to colonies that overexpressed active p53 but nonetheless grew with near wild type efficiency, p53 ^{-/-} cells did not.

Based on these observations, a new model that explains the activity of p53 in Ad-E1-transformed cells is suggested. We propose that endogenous p53 is bound by Ad E1B-55 kDa or SV40 T antigen until these proteins are saturated. Then, free, active p53 accumulates in the transformed cells, until the regulatory feedback loop with the cellular mdm2 protein is re-established, leaving a proportion of p53 molecules active. In contrast to that, HPV E6 proteins lead to an efficient elimination of p53 in HPV-transformed cells. Remarkably, the transformation of cells by the Ad E1 genes leads to a condition where all growth-inhibitory effects of p53 are compensated without compromising the transcriptional activity of the tumor suppressor. Conceivably, this is achieved via inactivation of all relevant p53 downstream targets that would otherwise prevent cell growth. In contrast with the current concept, Ad-transformed cells contain and tolerate high levels of active p53.

8. Anhang

8.1. Abkürzungen

4K-OT	Vierkammer-Objektträger
6K-S	Sechskammer-Schale
Ad	Adenovirus
Amp	Ampicillin
β Gal	β -Galaktosidase
BSA	bovines Serumalbumin
CFA	Colony Forming Assay
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMEM _{VOLL}	Dulbecco's Medium mit 10% FCS und allen anderen Zusätzen
DMEM _{PUR}	Dulbecco's Medium ohne Zusätze / FCS
ECL	enhanced chemiluminescence
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoreszin-Isothiocyanat
IFA	indirekter Immunfluoreszenz-Assay
Kan	Kanamycin
LB	Luria-Bertani Broth-Medium
m.o.i.	multiplicity of infection
OD	Optische Dichte
PBS ^{def}	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne Kalzium und Magnesium
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Kalzium und Magnesium
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
p.i.	post infection
RH	relative humidity
RT	Raumtemperatur
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TSS	Transformation and Storage Solution

8.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Genomorganisation der Adenoviren	3
Abbildung 1.2: Aufbau des Tumorsuppressors p53 und der Mutante p53mt24-28	4
Abbildung 1.3: Effekte von p53.....	5
Abbildung 1.4: Effekte von E1A auf p53 und p53-abhängige Regulationsmechanismen.....	6
Abbildung 3.1: Schema des Vektors pCIN4.....	33
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der QuickChange-Mutagenesemethode	43
Abbildung 4.1: basale Aktivitäten eines p53-responsiven Promotors (<i>mdm2</i>) im Vergleich zu einem konstitutiv aktiven Promotor (Rous Sarcoma Virus, RSV)	51
Abbildung 4.2: Aktivitäten zweier Luziferase-Reporterkonstrukte nach Transfektion von p53-Expressionsplasmiden	53
Abbildung 4.3: Effekt der transienten Expression von E1B-55 kDa auf die transkriptionelle Aktivität von p53	55
Abbildung 4.4: Auswirkung exogen exprimierter Effektorproteine auf die Mengen an endogenem mdm2 in transformierten Zelllinien.....	57
Abbildung 4.5: Menge und Aktivität von p53 in Ad-E1-transformierten Zellen nach Infektion mit rekombinanten Adenoviren	58
Abbildung 4.6: Koloniebildung nach Transfektion von Expressionsplasmiden für p53-Wildtyp, p53mt24-28 und p53R273H.....	61
Abbildung 4.7: Expression von p53 in den stabilen Transfektanten	63
Abbildung 4.8: Intrazelluläre Lokalisation von p53 in den stabilen Transfektanten.....	65 / 66
Abbildung 4.9: quantitative Analyse der Lokalisation von p53 in den stabilen Transfektanten	67
Abbildung 4.10: Wachstum von Ad-E1-transformierten Zellen nach stabiler Transfektion von Expressionsplasmiden für p53, p53mt24-28 oder p53R273H.....	69
Abbildung 5.1: p53-Aktivität in Adenovirus-E1-transformierten Zellen	73

9. Literaturverzeichnis

- Ali, S.H. und DeCaprio, J.A. (2001) Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. *Semin Cancer Biol*, **11**, 15-23.
- Athanassiou, M., Hu, Y., Jing, L., Houle, B., Zarbl, H. und Mikheev, A.M. (1999) Stabilization and reactivation of the p53 tumor suppressor protein in nontumorigenic revertants of HeLa cervical cancer cells. *Cell Growth Differ*, **10**, 729-37.
- Bagchi, S., Raychaudhuri, P. und Nevins, J.R. (1990) Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. *Cell*, **62**, 659-69.
- Bandara, L.R. und La Thangue, N.B. (1991) Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. *Nature*, **351**, 494-7.
- Barak, Y., Juven, T., Haffner, R. und Oren, M. (1993) mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *Embo J*, **12**, 461-8.
- Bartek, J. und Lukas, J. (2001) Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett*, **490**, 117-22.
- Bates, S. und Vousden, K.H. (1999) Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 28-37.
- Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L. und Finberg, R.W. (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, **275**, 1320-3.
- Bergelson, J.M., Krithivas, A., Celi, L., Droguett, G., Horwitz, M.S., Wickham, T., Crowell, R.L. und Finberg, R.W. (1998) The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. *J Virol*, **72**, 415-9.
- Bian, J. und Sun, Y. (1997) p53CP, a putative p53 competing protein that specifically binds to the consensus p53 DNA binding sites: a third member of the p53 family? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14753-8.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-23.
- Blair Zajdel, M.E. und Blair, G.E. (1988) The intracellular distribution of the transformation-associated protein p53 in adenovirus-transformed rodent cells. *Oncogene*, **2**, 579-584.

- Boylan, M.O., Athanassiou, M., Houle, B., Wang, Y. und Zarbl, H. (1996) Activation of tumor suppressor genes in nontumorigenic revertants of the HeLa cervical carcinoma cell line. *Cell Growth Differ*, **7**, 725-35.
- Bulavin, D.V., Tararova, N.D., Aksenov, N.D., Pospelov, V.A. and Pospelova, T.V. (1999) Deregulation of p53/p21Cip1/Waf1 pathway contributes to polyploidy and apoptosis of E1A+cHa-ras transformed cells after gamma-irradiation. *Oncogene*, **18**, 5611-9.
- Butt, A.J., Firth, S.M., King, M.A. und Baxter, R.C. (2000) Insulin-like growth factor-binding protein-3 modulates expression of Bax and Bcl-2 and potentiates p53-independent radiation-induced apoptosis in human breast cancer cells. *J Biol Chem*, **275**, 39174-81.
- Chen, G., Branton, P.E., Yang, E., Korsmeyer, S.J. und Shore, G.C. (1996a) Adenovirus E1B 19-kDa death suppressor protein interacts with Bax but not with Bad. *J Biol Chem*, **271**, 24221-5.
- Chen, J., Lin, J. und Levine, A.J. (1995) Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the mdm-2 oncogene. *Mol Med*, **1**, 142-52.
- Chen, X., Ko, L.J., Jayaraman, L. und Prives, C. (1996b) p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev*, **10**, 2438-51.
- Chin, L., Pomerantz, J. und DePinho, R.A. (1998) The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene--two products--two pathways. *Trends Biochem Sci*, **23**, 291-6.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D. und Pavletich, N.P. (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*, **265**, 346-55.
- Chung, C.T. und Miller, R.H. (1988) A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells. *Nucleic Acids Res*, **16**, 3580.
- Chung, C.T., Niemela, S.L. und Miller, R.H. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2172-5.
- Cline, J., Braman, J.C. und Hogrefe, H.H. (1996) PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res*, **24**, 3546-51.
- 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**, 1763-8.

- de Stanchina, E., McCurrach, M.E., Zindy, F., Shieh, S.Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A.V., Prives, C., Roussel, M.F., Sherr, C.J. und Lowe, S.W. (1998) E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev*, **12**, 2434-42.
- Dobbelstein, M., Roth, J., Kimberly, W.T., Levine, A.J. und Shenk, T. (1997) Nuclear export of the E1B 55-kDa and E4 34-kDa adenoviral oncoproteins mediated by a rev-like signal sequence. *Embo J*, **16**, 4276-4284.
- Dyson, N. (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev*, **12**, 2245-62.
- 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**, 817-25.
- Elenbaas, B., Spirio, L., Koerner, F., Fleming, M.D., Zimonjic, D.B., Donaher, J.L., Popescu, N.C., Hahn, W.C. und Weinberg, R.A. (2001) Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev*, **15**, 50-65.
- Fallaux, F.J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D.J., Hehir, K.M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S.J., van Ormondt, H., van der Eb, A.J., Valerio, D. und Hoeben, R.C. (1998) New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther*, **9**, 1909-17.
- Fallaux, F.J., Kranenburg, O., Cramer, S.J., Houweling, A., Van Ormondt, H., Hoeben, R.C. und Van Der Eb, A.J. (1996) Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors. *Hum Gene Ther*, **7**, 215-22.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. und Danielsen, M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7413-7.
- Felgner, P.L. und Ringold, G.M. (1989) Cationic liposome-mediated transfection. *Nature*, **337**, 387-8.
- Gartel, A.L., Goufman, E., Tevosian, S.G., Shih, H., Yee, A.S. und Tyner, A.L. (1998) Activation and repression of p21(WAF1/CIP1) transcription by RB binding proteins. *Oncogene*, **17**, 3463-9.
- Gartel, A.L., Serfas, M.S. und Tyner, A.L. (1996) p21--negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med*, **213**, 138-49.

- Goodwin, E.C. und DiMaio, D. (2000) Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12513-8.
- Goodwin, E.C., Naeger, L.K., Breiding, D.E., Androphy, E.J. und DiMaio, D. (1998) Transactivation-competent bovine papillomavirus E2 protein is specifically required for efficient repression of human papillomavirus oncogene expression and for acute growth inhibition of cervical carcinoma cell lines. *J Virol*, **72**, 3925-34.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. und Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, **36**, 59-74.
- Grand, R.J., Lecane, P.S., Owen, D., Grant, M.L., Roberts, S., Levine, A.J. und Gallimore, P.H. (1995) The high levels of p53 present in adenovirus early region 1-transformed human cells do not cause up-regulation of MDM2 expression. *Virology*, **210**, 323-34.
- Hahn, W.C., Counter, C.M., Lundberg, A.S., Beijersbergen, R.L., Brooks, M.W. und Weinberg, R.A. (1999) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, **400**, 464-8.
- Han, J., Sabbatini, P., Perez, D., Rao, L., Modha, D. und White, E. (1996) The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev*, **10**, 461-77.
- Hashimoto, S., Ishii, A. und Yonehara, S. (1991) The E1b oncogene of adenovirus confers cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor and monoclonal anti-Fas antibody. *Int Immunol*, **3**, 343-51.
- 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**, 3-11.
- Hiebert, S.W., Chellappan, S.P., Horowitz, J.M. und Nevins, J.R. (1992) The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev*, **6**, 177-85.
- Higashino, F., Pipas, J.M. und Shenk, T. (1998) Adenovirus e4orf6 oncoprotein modulates the function of the p53-related protein, p73. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15683-7.
- Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M.S., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R. und Harris, C.C. (1994) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*, **22**, 3551-5.

- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. und Harris, C.C. (1991) p53 mutations in human cancers. *Science*, **253**, 49-53.
- Honda, R., Tanaka, H. und Yasuda, H. (1997) Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett*, **420**, 25-7.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M. und Howley, P.M. (1991) A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *Embo J*, **10**, 4129-35.
- Hutton, F.G., Turnell, A.S., Gallimore, P.H. und Grand, R.J. (2000) Consequences of disruption of the interaction between p53 and the larger adenovirus early region 1B protein in adenovirus E1 transformed human cells. *Oncogene*, **19**, 452-62.
- Hwang, E.S., Riese, D.J., 2nd, Settleman, J., Nilson, L.A., Honig, J., Flynn, S. und DiMaio, D. (1993) Inhibition of cervical carcinoma cell line proliferation by the introduction of a bovine papillomavirus regulatory gene. *J Virol*, **67**, 3720-9.
- 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**.
- Jeffrey, P.D., Gorina, S. und Pavletich, N.P. (1995) Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science*, **267**, 1498-502.
- Jiang, D., Srinivasan, A., Lozano, G. und Robbins, P.D. (1993) SV40 T antigen abrogates p53-mediated transcriptional activity. *Oncogene*, **8**, 2805-12.
- 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**, 809-19.
- Kannan, K., Kaminski, N., Rechavi, G., Jakob-Hirsch, J., Amariglio, N. und Givol, D. (2001) DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. *Oncogene*, **20**, 3449-55.
- Kao, C.C., Yew, P.R. und Berk, A.J. (1990) Domains required for in vitro association between the cellular p53 and the adenovirus 2 E1B 55K proteins. *Virology*, **179**, 806-14.
- Keblusek, P., Dorsman, J.C., Teunisse, A.F., Teunissen, H., van der Eb, A.J. und Zantema, A. (1999) The adenoviral E1A oncoproteins interfere with the growth-inhibiting effect of the cdk-inhibitor p21(CIP1/WAF1). *J Gen Virol*, **80**, 381-90.
- Kinzler, K.W. und Vogelstein, B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, **87**, 159-70.

- Koch, P., Gatfield, J., Löber, C., Hobom, U., Lenz-Stöppler, C., Roth, J. und Dobbelstein, M. (2001) Efficient replication of adenovirus despite the overexpression of active and nondegradable p53. *Cancer Res*, **61**, 5941-7.
- Lane, D.P. (1992) p53, guardian of the genome. *Nature*, **358**, 15-6.
- 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**, 1013-20.
- Leone, G., DeGregori, J., Yan, Z., Jakoi, L., Ishida, S., Williams, R.S. und Nevins, J.R. (1998) E2F3 activity is regulated during the cell cycle and is required for the induction of S phase. *Genes Dev*, **12**, 2120-30.
- Levine, A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **88**, 323-31.
- Lin, J., Chen, J., Elenbaas, B. und Levine, A.J. (1994) Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein. *Genes Dev*, **8**, 1235-46.
- Linke, S.P., Clarkin, K.C., Di Leonardo, A., Tsou, A. und Wahl, G.M. (1996) A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes Dev*, **10**, 934-47.
- Lowe, S.W. und Ruley, H.E. (1993) Stabilization of the p53 tumor suppressor is induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. *Genes Dev*, **7**, 535-45.
- Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A. und Jacks, T. (1993) p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, **362**, 786-7.
- Lu, H. und Levine, A.J. (1995) Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5154-8.
- Marin, M.C., Jost, C.A., Irwin, M.S., DeCaprio, J.A., Caput, D. und Kaelin, W.G., Jr. (1998) Viral oncoproteins discriminate between p53 and the p53 homolog p73. *Mol Cell Biol*, **18**, 6316-24.
- Matsuyama, S., Xu, Q., Velours, J. und Reed, J.C. (1998) The Mitochondrial F0F1-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol Cell*, **1**, 327-36.
- McCormick, F., Clark, R., Harlow, E. und Tjian, R. (1981) SV40 T antigen binds specifically to a cellular 53 K protein in vitro. *Nature*, **292**, 63-5.
- Miyashita, T. und Reed, J.C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, **80**, 293-9.

- Moore, M., Horikoshi, N. und Shenk, T. (1996) Oncogenic potential of the adenovirus E4orf6 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11295-301.
- Morales, C.P., Holt, S.E., Ouellette, M., Kaur, K.J., Yan, Y., Wilson, K.S., White, M.A., Wright, W.E. und Shay, J.W. (1999) Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet*, **21**, 115-8.
- Moroni, M.C., Hickman, E.S., Denchi, E.L., 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**, 552-8.
- Nakano, K. und Vousden, K.H. (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, **7**, 683-94.
- Nevels, M., Rubenwolf, S., Spruss, T., Wolf, H. und Dobner, T. (2000) Two distinct activities contribute to the oncogenic potential of the adenovirus type 5 E4orf6 protein. *J Virol*, **74**, 5168-81.
- Nevels, M., Spruss, T., Wolf, H. und Dobner, T. (1999) The adenovirus E4orf6 protein contributes to malignant transformation by antagonizing E1A-induced accumulation of the tumor suppressor protein p53. *Oncogene*, **18**, 9-17.
- Nevins, J.R. (1992) E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science*, **258**, 424-9.
- Ng, A.Y., Bales, W. und Veltri, R.W. (2000) Phenylbutyrate-induced apoptosis and differential expression of Bcl-2, Bax, p53 and Fas in human prostate cancer cell lines. *Anal Quant Cytol Histol*, **22**, 45-54.
- 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**, 1053-8.
- 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**, 849-62.
- Ohki, R., Nemoto, J., Murasawa, H., Oda, E., Inazawa, J., Tanaka, N. und Taniguchi, T. (2000) Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *J Biol Chem*, **275**, 22627-30.
- Oren, M. (1999) Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem*, **274**, 36031-4.

- Osada, M., Ohba, M., Kawahara, C., Ishioka, C., Kanamaru, R., Katoh, I., Ikawa, Y., Nimura, Y., Nakagawara, A., Obinata, M. und Ikawa, S. (1998) Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat Med*, **4**, 839-43.
- Palmero, I., Pantoja, C. und Serrano, M. (1998) p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature*, **395**, 125-6.
- Perez, D. und White, E. (1998) E1B 19K inhibits Fas-mediated apoptosis through FADD-dependent sequestration of FLICE. *J Cell Biol*, **141**, 1255-66.
- 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**, 11623-7.
- Pipas, J.M. und Levine, A.J. (2001) Role of T antigen interactions with p53 in tumorigenesis. *Semin Cancer Biol*, **11**, 23-30.
- 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**, 713-23.
- Prives, C. und Hall, P.A. (1999) The p53 pathway. *J Pathol*, **187**, 112-26.
- Querido, E., Marcellus, R.C., Lai, A., Charbonneau, R., Teodoro, J.G., Ketner, G. und Branton, P.E. (1997) Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells. *J Virol*, **71**, 3788-98.
- Rees, S., Coote, J., Stables, J., Goodson, S., Harris, S. und Lee, M.G. (1996) Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. *Biotechniques*, **20**, 102-4, 106, 108-10.
- Ristea, S., Dobbstein, M. und Roth, J. (2000) Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 and cellular exportin 1 protein relocalize each other to a subnucleolar structure. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **16**, 857-65.
- Roth, J. und Dobbstein, M. (1997) Export of hepatitis B virus RNA on a Rev-like pathway: inhibition by the regenerating liver inhibitory factor IkappaB alpha. *J Virol*, **71**, 8933-8939.
- Roth, J., Dobbstein, M., Freedman, D.A., Shenk, T. und Levine, A.J. (1998a) Nucleocytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *Embo J*, **17**, 554-564.

- Roth, J., König, C., Wienzek, S., Weigel, S., Ristea, S. und Dobbelstein, M. (1998b) Inactivation of p53 but not p73 by adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton and E4 34-kilodalton oncoproteins. *J Virol*, **72**, 8510-8516.
- Rubenwolf, S., Schutt, H., Nevels, M., Wolf, H. und Dobner, T. (1997) Structural analysis of the adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton-E4orf6 protein complex. *J Virol*, **71**, 1115-23.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-91.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. und Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-4.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-7.
- Sarnow, P., Ho, Y.S., Williams, J. und Levine, A.J. (1982) Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell*, **28**, 387-94.
- Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D. und Howley, P.M. (1993) The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, **75**, 495-505.
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J. und Howley, P.M. (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, **63**, 1129-36.
- Schmale, H. und Bamberger, C. (1997) A novel protein with strong homology to the tumor suppressor p53. *Oncogene*, **15**, 1363-7.
- Schmidt, T., Korner, K., Karsunky, H., Korsmeyer, S., Muller, R. und Moroy, T. (1999) The activity of the murine Bax promoter is regulated by Sp1/3 and E-box binding proteins but not by p53. *Cell Death Differ*, **6**, 873-82.
- Selivanova, G., Iotsova, V., Okan, I., Fritsche, M., Strom, M., Groner, B., Grafstrom, R.C. und Wiman, K.G. (1997) Restoration of the growth suppression function of mutant p53 by a synthetic peptide derived from the p53 C-terminal domain. *Nat Med*, **3**, 632-8.
- Selivanova, G., Kawasaki, T., Ryabchenko, L. und Wiman, K.G. (1998) Reactivation of mutant p53: a new strategy for cancer therapy. *Semin Cancer Biol*, **8**, 369-78.

- Selivanova, G., Ryabchenko, L., Jansson, E., Iotsova, V. und Wiman, K.G. (1999) Reactivation of mutant p53 through interaction of a C-terminal peptide with the core domain. *Mol Cell Biol*, **19**, 3395-402.
- Senoo, M., Seki, N., Ohira, M., Sugano, S., Watanabe, M., Tachibana, M., Tanaka, T., Shinkai, Y. und Kato, H. (1998) A second p53-related protein, p73L, with high homology to p73. *Biochem Biophys Res Commun*, **248**, 603-7.
- Shen, Y., Kitzes, G., Nye, J.A., Fattaey, A. und Hermiston, T. (2001) Analyses of single-amino-acid substitution mutants of adenovirus type 5 E1B-55K protein. *J Virol*, **75**, 4297-307.
- Shen, Y. und Shenk, T. (1994) Relief of p53-mediated transcriptional repression by the adenovirus E1B 19-kDa protein or the cellular Bcl-2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8940-4.
- Shenk, T. (1996) Adenoviridae: The viruses and their replication. In Fields, B.N., Knipe, D.M. und Howley, P.M. (eds.), *Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, Vol. 2, pp. 2111-2148.
- Sherr, C.J. (1998) Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev.*, **12**, 2984-2991.
- Sigal, A. und Rotter, V. (2000) Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res*, **60**, 6788-93.
- Steeenga, W.T., Riteco, N., Jochemsen, A.G., Fallaux, F.J. und Bos, J.L. (1998) The large E1B protein together with the E4orf6 protein target p53 for active degradation in adenovirus infected cells. *Oncogene*, **16**, 349-57.
- Steeenga, W.T., Shvarts, A., Riteco, N., Bos, J.L. und Jochemsen, A.G. (1999) Distinct regulation of p53 and p73 activity by adenovirus E1A, E1B, and e4orf6 proteins. *Mol Cell Biol*, **19**, 3885-94.
- Stott, F.J., Bates, S., James, M.C., McConnell, B.B., Starborg, M., Brookes, S., Palmero, I., Ryan, K., Hara, E., Vousden, K.H. und Peters, G. (1998) The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *Embo J*, **17**, 5001-14.
- Thut, C.J., Chen, J.L., Klemm, R. und Tjian, R. (1995) p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science*, **267**, 100-4.
- Trentin, J.J., Yabe, Y. und Taylor, G. (1962) The quest for human cancer viruses. *Science*, **137**, 835-49.

- van den Heuvel, S.J., van Laar, T., The, I. und van der Eb, A.J. (1993) Large E1B proteins of adenovirus types 5 and 12 have different effects on p53 and distinct roles in cell transformation. *J Virol*, **67**, 5226-34.
- Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 615-9.
- Vogelstein, B., Lane, D. und Levine, A.J. (2000) Surfing the p53 network. *Nature*, **408**, 307-310.
- Vousden, K.H. (2000) p53. Death star. *Cell*, **103**, 691-4.
- Wadhwa, R., Sugihara, T., Yoshida, A., Nomura, H., Reddel, R.R., Simpson, R., Maruta, H. und Kaul, S.C. (2000) Selective toxicity of MKT-077 to cancer cells is mediated by its binding to the hsp70 family protein mot-2 and reactivation of p53 function. *Cancer Res*, **60**, 6818-21.
- Weitzman, J.B. und Yaniv, M. (1999) Rebuilding the road to cancer. *Nature*, **400**, 401-2.
- Whyte, P., Buchkovich, K.J., Horowitz, J.M., Friend, S.H., Raybuck, M., Weinberg, R.A. und Harlow, E. (1988) Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature*, **334**, 124-9.
- Wienzek, S., Roth, J. und Dobbstein, M. (2000) E1B 55-kilodalton oncoproteins of adenovirus types 5 and 12 inactivate and relocalize p53, but not p51 or p73, and cooperate with E4orf6 proteins to destabilize p53. *J Virol*, **74**, 193-202.
- Wu, G.S., Burns, T.F., McDonald, E.R.r., Jiang, W., Meng, R., Krantz, I.D., Kao, G., Gan, D.D., Zhou, J.Y., Muschel, R., Hamilton, S.R., Spinner, N.B., Markowitz, S., Wu, G. und el-Deiry, W.S. (1997) KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet*, **17**, 141-3.
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D. und Levine, A.J. (1993) The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*, **7**, 1126-32.
- Yew, P.R. und Berk, A.J. (1992) Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature*, **357**, 82-5.
- Yew, P.R., Kao, C.C. und Berk, A.J. (1990) Dissection of functional domains in the adenovirus 2 early 1B 55K polypeptide by suppressor-linker insertional mutagenesis. *Virology*, **179**, 795-805.
- Yew, P.R., Liu, X. und Berk, A.J. (1994) Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes Dev*, **8**, 190-202.

- Zantema, A., Fransen, J.A., Davis-Olivier, A., Ramaekers, F.C., Vooijs, G.P., DeLeys, B. und Van der Eb, A.J. (1985) Localization of the E1B proteins of adenovirus 5 in transformed cells, as revealed by interaction with monoclonal antibodies. *Virology*, **142**, 44-58.
- Zeng, X., Levine, A.J. und Lu, H. (1998) Non-p53 p53RE binding protein, a human transcription factor functionally analogous to P53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6681-6.
- 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**, 725-34.
- Zhu, J. und Chen, X. (2000) MCG10, a novel p53 target gene that encodes a KH domain RNA-binding protein, is capable of inducing apoptosis and cell cycle arrest in G(2)-M. *Mol Cell Biol*, **20**, 5602-18.
- Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J. und Roussel, M.F. (1998) Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev*, **12**, 2424-33.