

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls – Universität

Heidelberg

**Immortalisierung embryonaler Fibroblasten aus Wildtyp
und Hupki (Human p53 knock-in) Mäusen durch
Veränderungen des p19Arf/p53 Kontrollweges
und Erst-Charakterisierung des neuen
Prolin 72-kodierenden
Hupki-Mausstammes**

Vorgelegt von

Dipl.-Biol. Djeda Belharazem

aus: Tlemcen / Algerien

- 2006 -

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls – Universität
Heidelberg

Vorgelegt von

Dipl.-Biol.

Djeda Belharazem

aus:

Tlemcen / Algerien

Tag der mündlichen Prüfung:

**Immortalisierung embryonaler Fibroblasten aus Wildtyp
und Hupki (Human p53 knock-in) Mäusen durch
Veränderungen des p19Arf/p53 Kontrollweges
und Erst-Charakterisierung des neuen
Prolin 72-kodierenden
Hupki-Mausstammes.**

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. **Lutz Gissmann**

Prof. Dr. rer. nat. **Werner Buselmaier**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Genetische Veränderungen und Karzinogenese am Deutschen Krebsforschungszentrum im Neuenheimer Feld 280 in Heidelberg durchgeführt. Die Arbeit wurde im Zeitraum vom 15. August 2002 bis 15. Dezember 2005 unter Anleitung von Frau Dr. **Monica Hollstein** erstellt.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig unter Anleitung verfaßt und keine anderen als angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Heidelberg, den 26.06.06

Djeda Belharazem

Meiner Mutter

DANKSAGUNG

Ich danke allen, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren, insbesondere:

Dr. Monica Hollstein für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und die ausgezeichnete Betreuung während der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Lutz Gissmann und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Werner Buselmaier, daß sie sich als Gutachter zur Verfügung gestellt haben.

Danken möchte ich auch meinen Mitarbeiter der Abteilung Genetische Veränderungen und Karzinogenese für das freundliche Arbeitsklima und die gute sowie freundschaftliche Zusammenarbeit insbesondere Annette Weninger, Karl- Rudolph Muehbauer und Manuella Reinbold für ihre Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit Ganz besonders

Herzlichen Dank an Mario Vitacolonna für seine nimmermüde Hilfe bei den Korrekturen sowie die hilfreiche und ermunternde Stütze in der Endphase der Arbeit.

Danke an Herrn Prof. Dr med. Berger und Herrn Dr. rer. nat. Schmeißer für die Korrektur der endgültigen Fassung.

Für ihre Geduld, ihr Verständnis und viele kleine und große Hilfeleistungen danke ich, meinem Bruder und seine Familie.

Meiner Familie möchte ich noch meinen aufrichtigsten Dank aussprechen, wobei ich zuallererst meiner Mutter erwähnen muss, die aufgrund der moralischen Unterstützung und Gebete während der Zeit meines Studiums stets eine war.

.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
AMV	<i>Avian Myeloblastosis Virus</i>
APAF-1	<i>Apoptosis activating factor 1</i>
ARF	<i>Alternative reading frame</i>
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated homolog</i>
Bax	Bcl2-associated X protein
Bis-Tris	2,2 Bis(Hydroxymethyl)-2,2',2''-nitrilotriethanol
Bmi-1	<i>mature B cell</i>
Bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Cytosin
C°	Grade Celsius
cDNA	<i>Complementary Desoxyribonucleic Acid</i>
CIP1	<i>ck interacting protein.</i>
DBD	DNA Bindungsdomäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Dinukleotide Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
Ds	Doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Egr1	<i>Early Growth Factor 1</i>
ES	Stammzellen
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FITCS	<u>F</u> luorescein <u>I</u> so <u>T</u> hio Cyanate
G	Guanin
G	Gramm
GADD 45	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45</i>
G418 Disulfate Salz	Geneticin® Disulfate Salz

HDM2	<i>human double minute 2</i>
HUF	HUpki embryonale Fibroblasten
H ₂ O ₂ ,	Wasserstoffperoxyd
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
M	Molar
MDM2	<i>Mouse Double Minute 2</i>
MEF	<i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i>
Min	Minuten
MOPS	3-(N-Morphino)-propansulfonsäure
MuL.V	<i>Murine Leukemia Virus</i>
M, μ, n, p, f-	milli-, micro-, nano-, femto-
Noxa	DPH oxidase
NaOH	Natrium Hydroxyde
NaCL	Natrium Chlorid
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphat Buffer Saline</i>
Perp	<i>P53 apoptosis effactor related to PMP22</i>
PI	Propidium- Iodit
PCR	<i>Poly Chain Reaction</i>
PML	<i>promyelocytic leukemia</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pmp22	<i>peripheral myelin protein</i>
PPD	Polyprolin Dmäne
P/P	Prolin/Prolin
P/R	Prolin/Arginin
PUMA	<i>P53 upregulated modulator of apoptosis</i>
P21	CDKN1A cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RT	Rumtemperatur
Rpm	Umdrehung per minute
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
R/R	Arginin/Argini
RT-PCR	Reverse Transkription
Sec	Sekunden

SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TE	Tris-EDTA (Puffer)
TEMED	N,N-Tetramethylethylendiamin
T _m	<i>Melting Temperatur</i> (Schmelztemperatur)
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
Tris	Hydroxymethylaminomethan
Tris base	2-Amino-2(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
TSR	<i>Template Suppression Reagent</i>
Tris-HCl	Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride
Tween-20	Polyoxyethylenesorbitan monolaurate
U	Units (Enzymeinheiten)
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett Licht
V	Volts
v/v	Volume per Volume
WAF1	<i>Wild-type p53 activated factor</i>
w/v	<i>Weight per volume</i>
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl β-D- Galtoypranoside
z.B.	zum Beispiel

IMMORTALISIERUNG EMBRYONALER FIBROBLASTEN AUS WILDTYP UND HUPKI (HUMAN P53 KNOCK-IN) MÄUSEN DURCH VERÄNDERUNGEN DES P19ARF/P53 KONTROLLWEGES UND ERST-CHARAKTERISIERUNG DES NEUEN PROLIN 72-KODIERENDEN HUPKI-MAUSSTAMMES.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. ZUSAMMENFASSUNG	1-1
1.1 Zusammenfassung – Englisch (Summary)	1-1
1.2 Zusammenfassung – Deutsch.....	1-2
2. EINLEITUNG	2-1
2.1 P53 Protein	2-1
2.1.1 P53 Struktur und Funktion.....	2-1
2.1.2 Regulation der p53-Aktivität	2-3
2.1.3 Stabilisierung von p53	2-4
2.1.4 Aktivierung der p53-abhängigen Transkription.....	2-5
2.1.5 P53 abhängige Zellzyklus- Kontrolle	2-5
2.1.6 P53 abhängige Apoptose.....	2-5
2.2 Alterung der Zellen.....	2-6
2.3 Seneszenz als zelluläres „Failsafe“-Programm.....	2-6
2.3.1 Intrinsische Seneszenz	2-8
2.3.2 Extrinsische Seneszenz	2-9
2.3.2.1 <i>Extrinsische Seneszenz in Murinen Fibroblasten (MEF)</i>	2-9
2.3.2.2 <i>Extrinsische Seneszenz in humanen Fibroblasten</i>	2-10
2.4 Immortalisierung	2-11
2.4.1 Allgemeines	2-11
2.4.2 Immortalisierung ->p53 Mutationen.....	2-12
2.4.2.1 <i>Humanes p53 Knock-in (Hupki) Maus Model</i>	2-13
2.4.2.2 <i>Invitro Immortalisierung der p53 Hupki Maus Fibroblasten (HUFs)</i>	2-15
2.5 P53 Polymorphismus	2-17
2.5.1 Polymorphismus in Codon 47 Prolin-> Serin.....	2-18
2.5.2 Polymorphismus in Codon 72 Arginin-> Prolin.....	2-18
2.5.3 Wechselwirkung des p53 Codon 72 Polymorphismus mit dem humanen Papilloma Virus (HPV) E6 Protein.....	2-18
2.6 Fragestellung	2-20

3. MATERIALIEN UND METHODEN	3-1
3.1 Materialien	3-1
3.1.1 Chemikalien und ihre Bezugsquellen	3-1
3.1.2 Kits und Säulen	3-3
3.1.3 Antikörper	3-3
3.1.4 Zellkultur Reagenzien	3-3
3.1.5 Mäusestämme	3-4
3.1.6 Zelllinien	3-4
3.1.7 Geräte	3-5
3.1.8 Computerprogramme und Datenbanken	3-6
3.2 Methoden	3-7
3.2.1 Isolierung von Maus- embryonalen primären Fibroblasten (MEF)	3-7
3.2.2 Kultivierung von Zellen	3-8
3.2.3 Passagieren von Zellen	3-9
3.2.4 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen	3-10
3.2.5 Bestimmung der Zellzahl	3-11
3.2.6 Immortalisierung primärer Zellen	3-11
3.2.6.1 Spontane Immortalisierung	3-11
3.2.6.2 Immortalisierung durch Benzo[a]pyren-Behandlung	3-12
3.2.7 Homologe Rekombination im Maus p53- Locus embryonaler Stammzellen (ES)	3-14
3.2.7.1 Embryonale Stammzellen in Kultur	3-14
3.2.7.2 Elektroporation und Selektion embryonaler Stammzellen	3-15
3.2.8 Durchflusszytometrie	3-18
3.2.9 Messung der Apoptose durch Annexin- V/ PI	3-19
3.2.10 Protein-Analyse	3-20
3.2.10.1 Proteinisolierung aus Gewebekulturzellen	3-20
3.2.10.2 Proteinquantifizierung nach Bradford	3-20
3.2.10.3 Westernblot- Analyse	3-21
3.2.11 Separation von DNA durch Agarose- Gel- Elektrophorese	3-23
3.2.12 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren: Messung der optischen Dichte	3-24
3.2.13 Präzipitation von DNA	3-24
3.2.14 Isolierung genomischer DNA	3-25
3.2.14.1 Isolierung von gDNA aus ES- Zellen	3-25
3.2.14.2 Isolierung von gDNA aus Schwanzbiopsien	3-26
3.2.14.3 Isolierung von Plasmid- DNA in großem Maßstab	3-26
3.2.15 Hydrolyse der DNA durch Restriktionsendonukleasen	3-28
3.2.16 Die Polymerase- Kettenreaktion	3-28
3.2.16.1 Prinzip der PCR	3-28
3.2.16.2 Duplex PCR	3-30

3.2.16.3	<i>Etablierung der Oligonukleotidstartsequenzen</i>	3-31
3.2.17	Aufreinigung des PCR- Produktes.....	3-32
3.2.18	Sequenzierung der DNA.....	3-32
3.2.18.1	<i>Cycle Sequencing</i>	3-32
3.2.18.2	<i>Aufreinigung mit Centri-Sep Säulen</i>	3-33
3.2.19	Überprüfung des Allel- Verlustes eines Gens.....	3-36
3.2.20	Analyse der RNA.....	3-37
3.2.20.1	<i>Isolierung von Gesamt- RNA aus Gewebekulturzellen</i>	3-37
3.2.20.2	<i>Reverse Transkription von RNA zu Einzelstrang-cDNA</i>	3-37
3.2.21	Quantitative LightCycler® real time PCR.....	3-38
3.2.22	Arbeiten mit Tieren.....	3-44
4.	ERGEBNISSE	4-1
4.1	spontane Immortalisierung der primären, embryonalen Maus und <i>Hupki</i> Arginin Fibroblasten (MEFs und HUFs R/R)	4-1
4.2	<i>In vitro</i> Immortalisierungsmechanismen der MEFs	4-3
4.3	Screening der genetischen Veränderungen in spontan immortalisierten MEF Zelllinien	4-5
4.3.1	P53 Mutationen in spontan immortalisierten MEF Zelllinien	4-5
4.3.2	P53 DNA-Sequenz Homologie zwischen Maus und Mensch	4-7
4.3.3	Untersuchung des P19 /ARF/Ink4a Lokus Verlustes in MEF Zelllinien	4-8
4.3.4	Untersuchung der Egr1, p53 und p19/ARF cDNA aus MEF Zelllinien.....	4-9
4.3.5	P53 Expressionsstatus und P19 Überexpression in immortalisierten MEFs mit mutiertem p53.	4-11
4.3.6	Egr1 Expression in den immortalisierten MEF Zelllinien.....	4-14
4.4	Vergleich von Primären, embryonalen Maus Fibroblasten mit embryonalen <i>Hupki</i> Arginin fibroblasten unter gleichen <i>in vitro</i> Zellkulturbedingungen	4-15
4.4.1	Die Morphologie der HUFs R/R und MEFs ist in der <i>in vitro</i> Zellkultur gut erhalten.....	4-17
4.5	Sind diese unterschiedlichen Beobachtungen in der Immortalisierung der MEFs und HUFs R/R molekularbiologisch bedingt?	4-19
4.6	Analyse der Apoptose der HUFs R/R und MEFs	4-22
4.7	Charakterisierung der zweiten hergestellten p53 <i>knock in</i> Maus: <i>Hupki</i> p53 Prolin Maus.	4-25
4.7.1	<i>In vitro</i> Untersuchung der <i>Hupki</i> p53 Arginin und Prolin primären embryonalen Fibroblasten (HUFs R/R und HUFs P/P).....	4-31
4.7.2	Screening der p53 Mutationen in <i>Hupki</i> Arginin / Prolin heterozygoten Zelllinien nach der Benzoapyren Behandlung primärer, embryonaler <i>Hupki</i> Arginin / Prolin heterozygoter Fibroblasten	4-33
4.8	Die Kreuzung der <i>Hupki</i> p53 Arginin Maus mit der p53 <i>knockout</i> Maus ergibt heterozygote p53 <i>Hupki</i>/null Mäuse	4-40

5.	DISKUSSION	5-1
5.1	Spontane <i>in vitro</i> Immortalisierung der primären, embryonalen HUFs R/R und MEFs mit Charakterisierung der etablierten MEFs Zelllinien	5-1
5.2	Charakterisierung der p53 Prolin Knock in Maus: <i>Hupki</i> Prolin Maus.....	5-8
5.3	Untersuchung der p21 und perp Induktion in primären, embryonalen RR und PP HUFs	5-9
5.4	Untersuchung der <i>in vitro</i> Immortalisierung durch Benzo(a)pyren (BaP) Behandlung von heterozygoten primären <i>Hupki</i> Arginin/Prolin heterozygoten Fibroblasten (B(a)P RP).....	5-10
5.5	Die hemizygoten p53 <i>Hupki</i>/ KO Mäuse leben länger als die Wt/KO Mäuse....	5-11
6.	LITERATUR.....	6-1
7.	PUBLIKATIONSLISTE, D. BELHARAZEM.....	7-1

1. ZUSAMMENFASSUNG

1.1 ZUSAMMENFASSUNG – ENGLISCH (SUMMARY)

Most mammalian cells do not divide indefinitely, owing to a process termed replicative senescence. In human cells, replicative senescence is caused by telomere shortening, but murine cells senesce despite having long stable telomeres.

It has also been previously shown that mouse embryo fibroblasts (MEFs) respond to oxidative stress with 20% oxygen tension, typical of standard culture conditions, by undergoing cellular senescence.

Senescence is generally defined as an irreversible state of G(1) cell cycle arrest in which cells are refractory to growth factor stimulation. In mouse embryonic fibroblasts, induction of senescence requires the presence of p19^{ARF} and p53, as genetic ablation of either of these genes allows escape from senescence and leads to immortalization.

Tumor suppressor proteins must be exquisitely regulated since they can induce cell death while preventing cancer. For example, the p19^{ARF} tumor suppressor (p14^{ARF} in humans) appears to stimulate the apoptotic function of the p53 tumor suppressor to prevent carcinogenesis induced by oncogene overexpression.

Activation of growth arrest and apoptotic pathways by the p53 tumor suppressor (known as "Guardian of the Genome") pathway promotes the removal of tumorigenic cells, thus protecting against cancer in humans and mice.

Most of the mutations that deactivate p53 in cancer usually occur in the DBD (DNA Binding Domain). The mutations destroy the ability of the protein to bind to its target DNA sequences, and thus prevents transcriptional activation of these genes.

Several p53 gene polymorphisms have been described, one of this intragenic polymorphism leads to the expression of two different p53 proteins, with Arginine or Proline in codon 72 in a region that is rich in proline residues (Harris et al., 1986). This region is involved in the apoptotic activity of p53 and associated with several cancers susceptibilities.

The generating of the human p53 arginin knock-in mouse strain (Luo et al., 2001) allowed new mammalian cell assays using gene targeting technology that select and score human p53 gene sequence mutations in human-p53 arginin knock-in (Hupki) murine embryonic fibroblasts (HUFs R/R) that have undergone immortalization.

The subject of the current dissertation was the investigation of the spontaneous immortalisation's rate of MEFs and the HUFs R/R mouse fibroblasts: MEFs exhibit a clearly higher sensitivity to the 20% oxygen atmosphere of the cell culture conditions than HUFs R/R. Only 10% (11 of 121) of the entire primary cell populations survived the senescence and occurred in immortalisation.

More than 60% of the established cell lines (7 of 11) exhibit either p53 mutations (5 of 7) of the type G to C or C to G Transversion, with a p19 protein overexpression, or p19/ARF DNA deletion (2 von 7).

90% HUFs R/R primary cell clones became immortalised cell lines (109/120) after the Senescence, it seems that they behaved clearly more resistant to reactive oxygen species (reactive oxygen species (ROS)) than the MEFs.

Only 20% HUFs R/R cell clones (4 of 20) exhibit a point mutation or a deletion in the p53-DNA-Binding domain. 80% of the remaining cell lines were not concerned.

The flow cytometry analysis of the Apoptosis by annexin V/PI kit showed the high sensitivity of primary MEFs than HUFs R/R in *in vitro* cell culture conditions.

The first Hupki mouse with the human p53 arginine variant (Luo et al., 2001) represents a quite good Model for *in vivo* and *in vitro* investigations of the human p53 gene, that why generating a second Hupki mouse strain in which a Proline variant at codon 72 in exon 4 would be of considerable benefit to research on cancer and p53 polymorphism.

First *in vitro* studies accomplished with Hupki Proline und Arginine mouse embryonic primary fibroblasts (HUFs PP, HUFs RR) showed a high expression of p21^{WAF} mRNA in the classical *in vitro* cell culture conditions in HUFs PP. However p21^{WAF} mRNA seems induced in HUFsRR only in response to gamma-irradiation. It was also observed an induction of p53 apoptosis effector related to PMP22 in HUFs RR cells but not in HUFs PP.

It is known that, p53 polymorphism is reportedly associated with lung cancer susceptibility. However, not all investigations have been consistent (Fan et al., 2000).

In the present study 47 Hupki arginine/proline heterozygote mouse embryonic primary fibroblasts cell populations (HUFs RP) were exposed to the tobacco smoke carcinogen benzo(a)pyrene (BaP) to explore the association of which allele arginine or proline in human lung tumors during *in vitro* immortalization of the primary cultures.

20 immortalised cell lines (42%) were established, 25% of them exhibit a p53 G to C, C to G or C to T point mutation on the prolin allele followed of loss the heterozygosity (LOH) of the arginin allele. The achieved result is clearly different from the Hupki arginin homozygotes fibroblasts immortalisation assay from Luo et al., 2005.

1.2 ZUSAMMENFASSUNG – DEUTSCH

Aufgrund zunehmenden Wissens um die Regulation des Wachstums maligner Zellen können neue Therapieansätze gefunden werden. Dafür ist es notwendig, mehr über die komplexen Mechanismen der Tumorentstehung und der unbegrenzten Proliferation, der Immortalisierung, von Zellen zu wissen. Die Hypothesen der Immortalisierung gehen davon aus, dass es in den jeweiligen Geweben zu mehreren unterschiedlichen Ereignissen kommen muss, die das normale Wachstum einer Zelle außer Kraft setzen. Immortale Zellen besitzen im Unterschied zu normalen Zellen kein begrenztes Teilungsvermögen, welches abhängig von der Anzahl der Zellteilungen und der Länge der Telomere (Harley *et al.*, 1990) ist. Genauso unterscheiden sich Zelllinien von primären embryonalen (normalen) Zellen. Diese teilen sich bereits nach wenigen Passagen nicht mehr und treten in die Seneszenz ein, die mit charakteristischen morphologischen, zellphysiologischen, molekularen und biochemischen Veränderungen verbunden ist (Kanungo, 1994).

Murine und humane Fibroblasten unterscheiden sich in den Mechanismen der Seneszenz: Der Hauptmechanismus der Seneszenz bei humanen Fibroblasten wird durch die Verkürzung der Telomere ausgelöst, dabei spielen p53 sowie p21 die wichtigste Rolle beim Beenden der Zellteilung.

Im Gegensatz dazu wird die Seneszenz der primären, embryonalen murinen Fibroblasten (MEFs) hauptsächlich von externen Signalen der Zellkulturbedingungen verursacht, dabei übt die 20%ige Sauerstoff Atmosphäre einen oxidativen Stress auf die Zellproliferation aus.

P19/ARF-p53 scheint der wichtigste Regulationsmechanismus für die Seneszenz in diesen Zellen zu sein. Mit der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie z.B. p53 oder pRb durch Punktmutationen oder Deletionen kann die zelluläre Seneszenz unterbrochen und die Zelle zur Immortalisierung gebracht werden.

Als Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor weist das p53- Gen Mutationen in 50% aller menschlichen Tumoren auf. Bekannt ist der p53- Polymorphismus im Codon 72 im Exon 4 in der Polyprolinomäne, das entweder für die Aminosäure Arginin (CGC) oder Prolin (CCC) kodiert. Beide Varianten zeigen biochemische Unterschiede im Zellzyklus, der Apoptose und der Tumorgenese-Regulation

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der spontanen Immortalisierungsrate der MEFs und der *Hupki* Maus Fibroblasten, die einen Teil des humanen Arginin p53- Gens vom Exon 4 zum Exon 9, HUFs R/R genannt, tragen (die HUFs wurden von der **H**umanen **P**53 **k**nock **i**n Maus (*Hupki* Maus) (Luo et al., 2001a) etabliert). Die MEFs weisen eine deutlich höhere Empfindlichkeit gegenüber der 20%igen Sauerstoffatmosphäre der Zellkulturbedingungen als die HUFs R/R auf. Nur ca. 10% (11 von 121) der gesamten primären Zellpopulationen überlebte die Seneszenz und traten in den Immortalisierungsprozess ein. Mehr als 60% der etablierten Zelllinien (7 von 11) weisen entweder p53 missense- Mutationen (5 von 7) vom Typ G>C oder C>G Transversion, mit einer Überexpression an p19 Protein, oder den p19/ARF- DNA Verlust (2 von 7) auf. Dagegen verhielten sich die HUFs R/R, die in 90% der primären Zellklone zu immortalisierten Linien auswuchsen (109/120), deutlich resistenter gegenüber den angewandten reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* (ROS)) als die MEFs.

Nur 20% der HUFs Zellklone (4 von 20) weisen eine Punktmutation oder eine Deletion in der p53-DNA-Bindungsdomäne auf. 80% der restlichen Zelllinien sind nicht dadurch betroffen

Die durchflusszytometrische Analyse der Apoptose mittels Annexin/PI- Kit zeigt, dass die stressigen *in vitro* Zellkulturbedingungen mehr primäre MEFs in die Apoptose treiben als HUFs R/R.

Nachdem die erste *Hupki* Maus mit dem p53 Arginin Protein ein recht gutes Model für *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen des humanen p53 Gens darstellt, wurde eine zweite *Hupki* Maus mit der Prolin- Variante hergestellt, um die multiplen Fragestellungen nach dem p53 Polymorphismus zu beantworten.

Die ersten im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vitro* Studien zeigen in den *Hupki* Prolin (HUFs PP) Fibroblasten eine hohe Menge an p21^{WAF} in den klassischen *in vitro* Zellkulturbedingungen auf, die in den primären, embryonalen *Hupki* Arginin Fibroblasten. Erst nach Induktion mit gamma-Strahlen erreicht wurde. Dagegen weisen die HUF Zellen mit der p53 Arginin Variante eine Induktion der Perp (*P53 apoptosis effector related to PMP22*) nach einer Gamma-Strahlen Exposition auf.

Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen dem heterozygoten Arg/Pro Genotyp und dem Lungenkarzinom (Fan *et al.*, 2000). Auch das Prolin- Codon Pro/ Pro Genotyp weist eine Assoziierung mit Lungentumoren (Kawajiri *et al.*, 1993) auf.

Von 47, mit dem Prokarzinogenen Benzo(a)pyren B(a)P behandelten, primären, embryonalen heterozygoten *Hupki* Arginin/Prolin (HUFs RP) Zellpopulationen ließen sich 20 (42%) als Zelllinien etablieren: Davon weisen 25% der Zellklone eine p53 G>C, C>G oder C>T Punktmutation auf dem Prolin- Allel auf, gefolgt vom einem Verlust der Heterozygotität (LOH) des Arginin-Allels. Dieses Ergebnis scheint sich von der Immortalisierung der mit B(a)P behandelten *Hupki* heterozygoten Arginin Fibroblasten (Liu *et al.*, 2005) deutlich zu unterscheiden.

2. EINLEITUNG

2.1 P53 PROTEIN

David Lane und Arnold Levine entdeckten 1979 unabhängig voneinander (das Tumorsuppressorprotein p53 (Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979). Das humane p53 Protein reguliert als Transkriptionsfaktor nach DNA-Schädigung die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der Induktion der Apoptose (des programmierten Zelltodes) oder an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Aufgrund dieser Eigenschaft wird p53 in der Literatur als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Lane, 1992). Die besondere medizinische Bedeutung erklärt sich aus dem Befund, dass p53 in ca 50 % aller menschlichen Tumore mutiert ist. Der Verlust der p53-Funktion spielt daher eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Krebs.

2.1.1 P53 Struktur und Funktion

Das Protein p53 ist ein nukleäres, tetrameres Phosphoprotein, das aus 393 (humanes p53 auf dem Chromosom 17: 17p13.1) bzw. 387 Aminosäuren (AS) (murines p53 auf dem Chromosom 11: 39.0CM) enthält (Abbildung 1)., es gliedert sich in:

1. Einen N-terminalen Bereich mit einer Transaktivierungsdomäne (AS 1-44). (Fields und Jang, 1990), die gleichzeitig auch die mdm2-Bindestelle (Zhang und Xiong, 2001) enthält.
2. Eine Prolin- reiche Domäne (AS 58-101), die bei Stress eine Rolle bei der Schadensvermeidung durch Apoptose spielt.
3. Eine spezifische DNA Bindungsdomäne (AS 102-292), die in vielen Tumoren mindestens eine Mutation aufweist.
4. Einen C-terminalen Bereich mit einer Oligomerisierungsdomäne (AS 325-356). Welche die Tetramerisierung von vier p53 Monomeren vermittelt. Er enthält auch nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS), sowie zwei nukleäre Export- Sequenzen (NES) und besteht überwiegend aus basischen Aminosäuren (basische Region).

Das p53-Gen besteht aus 11 Exons und 10 Introns und ist während der Evolution der Säugetiere relativ unverändert geblieben (Abbildung 2). Die Exons 4-8 enthalten die DNA-Bindungsdomäne; in diesem Bereich finden sich 90% aller in menschlichen Tumoren beschriebenen Missense-Mutationen. Eine Übersicht über die Struktur des

p53-Proteins und –Gens wird in Abbildungen 1 und 2 gegeben. Der Tumorsuppressor p53 reguliert eine Anzahl von zellulären Antworten auf DNA-Schäden, insbesondere bei der Kontrolle am G1-S-Kontrollpunkt (Zellzyklusarrest und Auslösen der Apoptose als Antwort auf irreparable DNA-Schäden) und ferner am Spindel-Kontrollpunkt (Cross, 1995) im Verlaufe der Mitose.

Die Fähigkeit von p53, die Transkription von bestimmten Genen zu aktivieren, lässt vermuten, dass durch p53 induzierte Gene eine biologische Rolle als Tumorsuppressor haben, z.B. p21, als direktes Ziel-Gen von Wildtyp p53; p21^{WAF1} wiederum bindet an CDK2 und inhibiert dessen Aktivität, wodurch die Phosphorylierung von kritischen Cyclin-abhängigen Kinase-Substraten verhindert und damit die Zellzyklus-Progression aufgehalten wird.

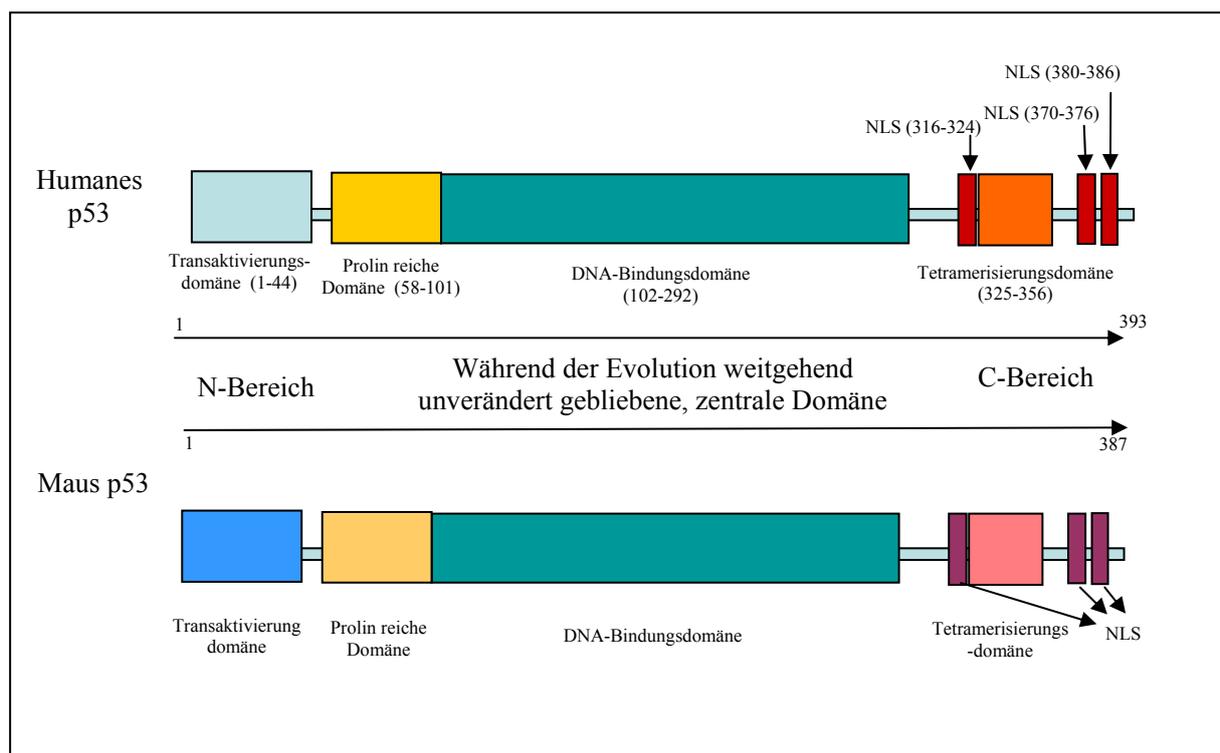


Abbildung 1: Struktur des humanen p53 Proteins. (Abgeleitet von IARC p53 database <http://www.iarc.fr/p53/>).

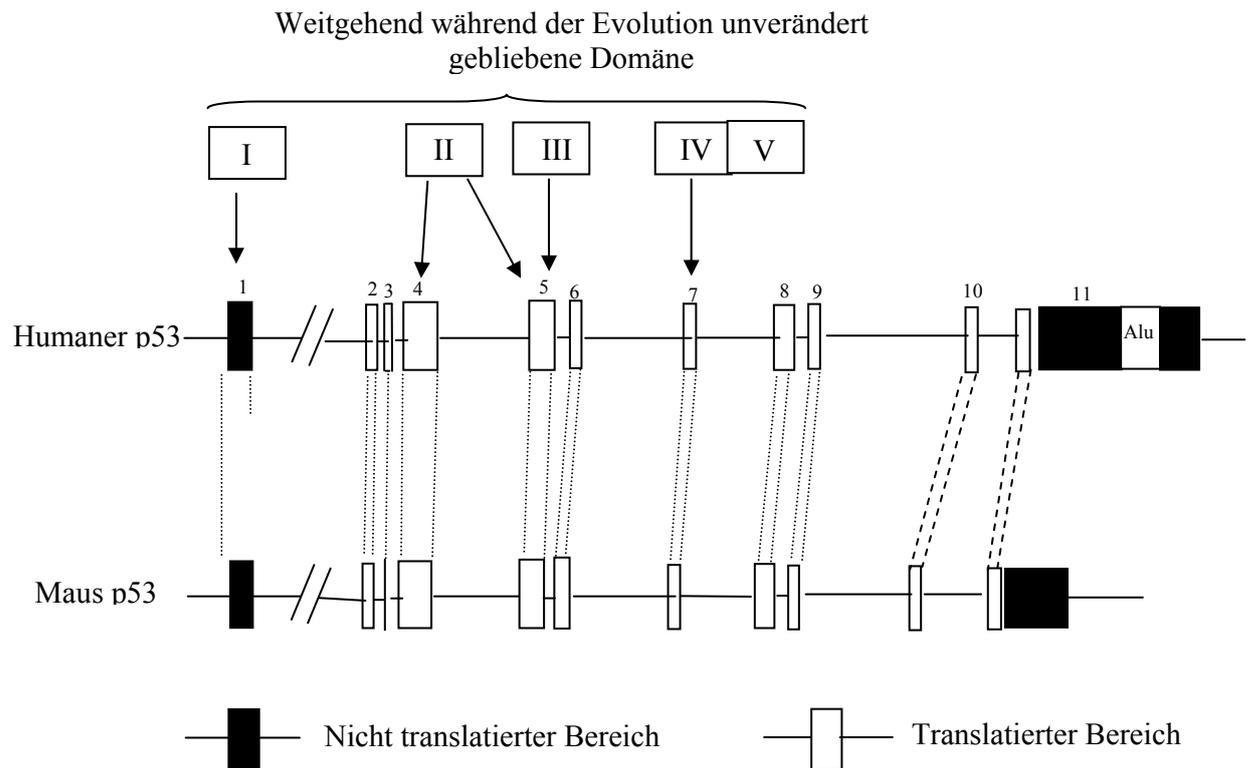


Abbildung 2: Struktur des genomischen murinen und humanen p53 Tumorrepressorgens. Die durch römische Ziffern gekennzeichneten Bereiche I bis V mit den entsprechenden Exons sind während der Evolution weitgehend unverändert geblieben. (Abgeleitet von Soussi, et al., 1990).

2.1.2 Regulation der p53-Aktivität

Biochemische Mechanismen, die die Aktivität von p53 infolge von genotoxischem (IR, UV-Strahlung, DNA-modifizierender Reagenzien) und nicht-genotoxischem (Hypoxie, Depletion von Ribonukleotiden, Aktivierung von Onkogenen) Stress regulieren, sind überaus komplex und konnten nur teilweise detailliert geklärt werden. Allerdings wird davon ausgegangen, dass für die Aktivierung von p53 als Transkriptionsfaktor zwei grundlegende Mechanismen verantwortlich sind: Stabilisierung und Aktivierung der p53-abhängigen Transkription (Appella und Anderson, 2001).

2.1.3 Stabilisierung von p53

In normalen Zellen sind die Halbwertszeit und die Konzentration von p53 sehr gering und korrelieren direkt mit der Aktivität von MDM2 (*murine double minute 2*). MDM2 bindet an den N-Terminus (Aminosäure 17-29) von p53 als Tetramer und katalysiert infolge der intrinsischen E3-Ligase-Aktivität die Ubiquitinierung verschiedener C-terminaler Lysin-Reste (Makie, 1999; Kussie *et al.*, 1996). Dadurch wird p53 für den proteolytischen Abbau durch das 26S Proteosom markiert. Eine geringe MDM2 – Aktivität bewirkt durch Mono-Ubiquitinierung den nuklearen Export und die cytoplasmatische Proteolyse von p53. Dagegen katalysiert eine hohe MDM2-Aktivität die Poly-Ubiquitinierung von p53, was die nukleäre Proteolyse von p53 zur Folge hat (Shmueli und Oren, 2004; Li *et al.*, 2003).

Die Konzentrationen des Tumorsuppressors p53 und des Onkogens MDM2 werden durch eine autoregulatorische Rückkopplungsschleife (*autoregulatory feedback loop*) kontrolliert (Wu *et al.*, 1993): p53 reguliert direkt die Expression von MDM2 durch Aktivierung des intronischen p53- spezifischen mdm2-Promoters (Zauberman *et al.*, 1995).

Die Regulation der p53 Stabilisierung durch MDM2 ist sehr komplex denn MDM2 interagiert auch mit anderen Proteinen wie pRb, p300 (Stott *et al.*, 1998), ebenso assoziiert sich MDM2 mit dem p19^{ARF} Tumorsuppressor (p14^{ARF} bei Menschen) und verhindert damit die P53 Degradation (Pomerantz *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 1999).

MDM2 wird auch vom MDMX Protein stabilisiert. Dieses bindet direkt C- terminale Region von MDM2 und blockiert die E3 Ligase Funktion. Auf diese Weise wird P53 vor Degradation geschützt. (Scharp *et al.*, 1999; Jackson und Berberich, 2000)

In vivo and *in vitro* Studien zeigten, dass HIF-1 α (*hypoxia- inducible factor1 α*) an MDM2, bindet und dass p53 mehr stabilisiert wird (Chen *et al.*, 2003).

Nach genotoxischem Stress wird p53 durch verschiedene Faktoren post- translational modifiziert und im Zellkern angereichert.

Phosphorylierungen im N-Terminus (ser15 und ser20) führen zur Verhinderung der p53-MDM2-Interaktion und damit zur Stabilisierung von p53 (Shieh *et al.*, 1997). Daneben regulieren auch C-terminale Acetylierungen diverser Lysin-Reste (Nakamura *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2000) und der Phosphorylierungsstatus zweier konstitutiv phosphorylierten Serin-Reste (Ser376 und 378) die Stabilität von p53 (Chernov *et al.*, 2001).

Da MDM2 zuerst in der Maus identifiziert wurde, wird MDM2 in der Literatur allgemein als Synonym für das humane HDM2 (*human double minute 2*) verwendet.

2.1.4 Aktivierung der p53-abhängigen Transkription

Die bisherige Hypothese, dass p53 als latenter Transkriptionsfaktor erst nach Aktivierung durch genotoxischen Stress an spezifische Promotor-Elemente bindet, konnte durch aktuelle Untersuchungen widerlegt werden. *In vivo* bindet p53 konstitutiv an Promotoren der entsprechenden Zielgene und genotoxischer Stress hat nur einen geringen Einfluss auf die Bindungsaffinität von p53 (Kaeser und Iggo, 2002). Die Transkriptionsaktivität von p53 wird durch Acetylierung stimuliert und durch Deacetylierung inhibiert (Murphy *et al.*, 1999; Vaziri *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2004).

2.1.5 P53 abhängige Zellzyklus- Kontrolle

Nach genotoxischem Stress kann ein p53-induzierter Wachstumsarrest sowohl am G1- als auch am G2/M-Kontrollpunkt des Zellzyklus erfolgen. Beide Signalwege sind eng mit der Funktion von p53 als Transkriptionsfaktor verbunden. Bei einem DNA-Schaden wird der Zellzyklus vor dem Eintritt in die replikative S-Phase durch die p53-abhängige Transaktivierung von p21 in der G1-Phase gestoppt (El-Deiry, 1998). Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit, die Progression des Zellzyklus vor dem Eintritt in die M-Phase zur Kontrolle der genomischen Integrität in der G2-Phase zu verlangsamen. Dieser G2-Kontrollpunkt wird durch die p53-abhängige Transaktivierung von p21 und/ oder GADD 45 (*growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45*) induziert (Taylor und Stark, 2001).

2.1.6 P53 abhängige Apoptose

Bei einem irreparablen DNA-Schaden kann durch die p53-abhängige Transaktivierung spezieller Gene Apoptose induziert werden. Die resultierenden Genprodukte werden einem intrinsischen bzw einem extrinsischen Signalweg zugeordnet. Die Regulation des intrinsischen Signalweges erfolgt durch die p53-abhängige Transaktivierung von pro-apoptotischen Genen der BCL-2-Familie (*B cell lymphoma 2*), wie BAX (*Bcl2-associated X protein*), NOXA (*NADPH oxidase*) und PUMA (*p53 upregulated modulator of apoptosis*), oder durch die p53-abhängige Expression von Proteinen, wie

PIG3 (*p53-induced gene 3*), die die Konzentration von ROS (*reactive oxygen species*) erhöhen. Durch die Freisetzung von Cytochrom C, aus den Mitochondrien und Interaktion mit APAF-1 (*Apoptosis activating factor 1*) wird die Caspase- Kaskade aktiviert und folglich die apoptotischen Prozesse eingeleitet. Der extrinsische Signalweg wird hingegen durch die p53-abhängige Transkription von Oberflächenrezeptoren der TNFR-Familie (*tumor necrosis factor receptors*), wie Fas/APO-1 und Killer/DR5 reguliert. Die Bindung spezifischer Liganden führt direkt zur Aktivierung der Caspase- Kaskade.

Alternativ dazu ist p53 in der Lage, durch einen Transkriptions-unabhängigen Prozess Apoptose zu induzieren. Dabei führt die stress- induzierte Akkumulation von p53 zu seiner mitochondrialen Lokalisierung. Die damit verbundene Freisetzung von Cytochrom C und die anschließende Aktivierung der Caspase- Kaskade induziert den programmierten Zelltod (Fridman und Lowe, 2003; Haupt *et al.*, 2003)

2.2 ALTERUNG DER ZELLEN

Bereits 1965 beschrieben Hayflick *et al.* die begrenzte Teilungsfähigkeit reifer Zellen. Fibroblasten scheinen sich maximal nur etwa 50 Mal teilen zu können.

Differenzierte Zellen teilen sich bereits nach wenigen Passagen nicht mehr. Dieses maximale Teilungsvermögen wird auch als *Hayflick-Limit* bezeichnet (Hayflick, 1961). Die replikative Seneszenz beginnt nach Erreichen des *Hayflick-Limits*. Unter den Zellkulturbedingungen von primären Zellen geht die Teilungsfähigkeit verloren. Dieser Verlust ist irreversibel und mit charakteristischen morphologischen, zellphysiologischen, molekularen und biochemischen Veränderungen verbunden (Kanungo, 1994).

2.3 SENESZENZ ALS ZELLULÄRES „FAILSAFE“-PROGRAMM

Im Gegensatz zum vorübergehenden Zellzyklus-Stopp stellt die zelluläre Seneszenz einen terminalen Wachstumsblock dar, der seneszente Zellen irreversibel aus dem Pool sich aktiv teilender Zellen eliminiert. Seneszenz wurde vor mehr als vier Dekaden erstmalig von Hayflick und Moorhead (1961) beschrieben, die mit diesem Begriff der „Zellalterung“ den terminalen Teilungsstopp von kultivierten Fibroblasten nach Ausschöpfung einer endlichen Zahl an Zelldivisionen, („Hayflick-Limit“ s o), charakterisierten. Etwa eine von 10^7 Zellen ist dabei in der Lage, sich weiter zu teilen (Wright *et al.*, 1989; Shay and Wright, 2005). Der Zugrunde liegende Mechanismus

dieser „mitotischen Uhr“ ist die progressive Verkürzung und konsekutive verminderte Protektion der Chromosomenenden bei jeder Zellteilung (Harley *et al.*, 1990; Karlseder *et al.*, 2002), falls die Telomer- Länge nicht enzymatisch restauriert wird (Blasco *et al.*, 1997). Phänotypisch von der intrinsischen replikativen Seneszenz ununterscheidbar ist die akut induzierbare und daher vorzeitige Seneszenz. Diese Telomer- unabhängige Form der Seneszenz kann durch zellulären Stress wie z.B. aktivierte Onkogene, reaktive Sauerstoff-Spezies oder DNA-Schädigung (Abbildung 3) ausgelöst werden (Serrano *et al.*, 1997; Weinberg, 1997; Chang *et al.*, 1999; Lundberg *et al.*, 2000 and Campisi, 2001) und wird als extrinsische Seneszenz bezeichnet. Da seneszente Fibroblasten ein charakteristisches Genexpressionsprofil aufweisen (Shelton *et al.*, 1999) wurde vermutet, dass vorzeitige Seneszenz ähnlich wie die Apoptose ein spezifisches, genetisch kodiertes Stress-Response-Programm darstellt. In Kultur besitzen die seneszenten Zellen eine flache Form mit vakuolenreichem Zytoplasma (Abbildung 4).

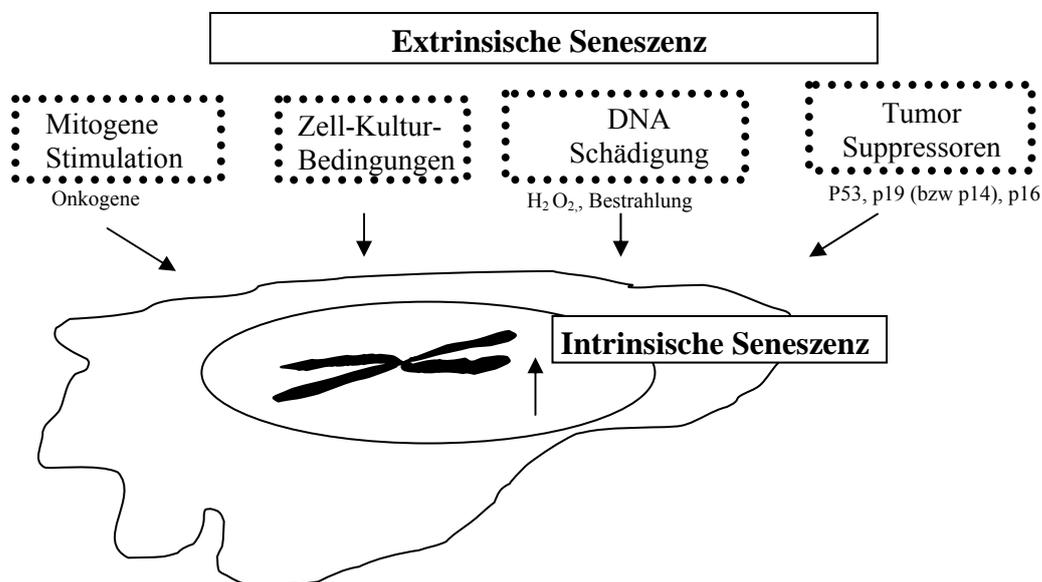


Abbildung 3: Zwei Klassen der Seneszenz. Intrinsische replikative Seneszenz, bei der die Telomere sich verkürzen, und die extrinsische Seneszenz, die von den verschiedenen externen Parametern, wie z.B. Onkogenen, Tumorsuppressoren, DNA-Schäden und *in vitro* Zellkultur-Bedingungen ausgelöst wird. Abgeleitet von Itahana, *et al.*, 2004, *Biogerontology*.

2.3.1 Intrinsische Seneszenz

Humane Fibroblasten treten nach etwa 50 bis 100 Verdopplungen in die Seneszenz ein (Itahana *et al.*, 2004). Dieses Phänomen ist meistens abhängig von der Telomer-Verkürzung (Allsopp *et al.*, 1992; Vaziri *et al.*, 1993). Das Telomer ist die Endstruktur eines Chromosoms und verhindert chromosomale Fusionen (Greider *et al.*, 1996). Bei jeder DNA-Replikation einer Zellteilung werden 50 bis 200 Basen am 3' Ende der Telomer- DNA- Sequenzen ignoriert und damit das Telomer nach jeder DNA-Replikationsrunde entsprechend verkürzt (Greider, 1990 und 1996; Campisi, 2000; Lundberg., 2000). Dadurch wird an den freien Chromosom-Enden über unbekannte Faktoren das Signal der replikativen Seneszenz in den Zellen eingeschaltet (Abbildung 5) (Itahana *et al.*, 2004).

Diese replikative Seneszenz verläuft hauptsächlich nach dem p53/p21 Mechanismus (Abbildung 5) und wird deshalb als „p53/p21 STOP“ bezeichnet, (Itahana *et al.*, 2004), denn p53 ist in der Lage, an Telomer-DNA zu binden (Stansel *et al.*, 2002; Artandi und Attardi, 2005).

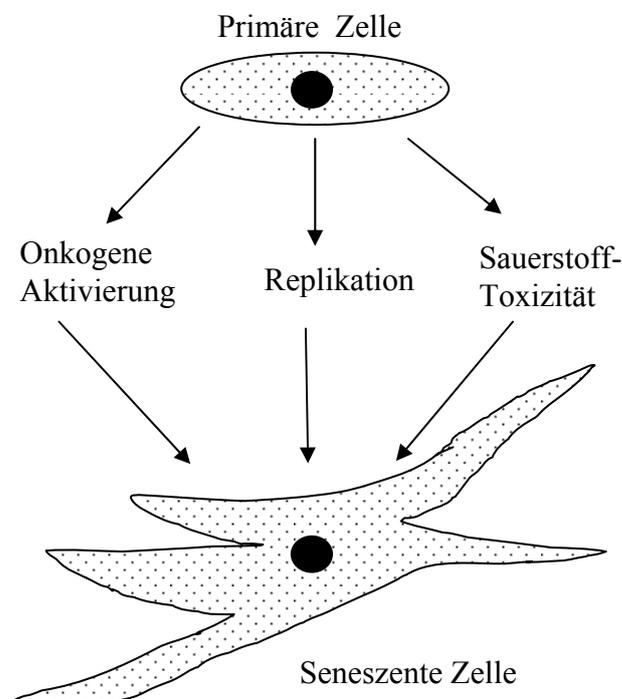


Abbildung 4: Morphologischer Unterschied zwischen primären und seneszenten Zellen.

Adaptiert von Lundberg, *et al.*, 2000. *Current Opinion in Cell Biology*.

2.3.2 Extrinsische Seneszenz

Die zelluläre Seneszenz der Fibroblasten kann nach einer Stress Situation verursacht werden, bekannte Auslöser dieses Zustandes sind externe Faktoren wie z.B. UV-Strahlung, H₂O₂, exprimierte Onkogene, Tumorsuppressoren oder Wachstumsfaktoren der Umgebung (Abbildung 5).

Murine und humane Fibroblasten unterscheiden sich in den Mechanismen der Seneszenz.

2.3.2.1 Extrinsische Seneszenz in Murinen Fibroblasten (MEF)

Die Seneszenz muriner Zellen wird hauptsächlich von externen Signalen der Zellkulturbedingungen verursacht (Sherr und DePinho 2000, Wright and Shay 2000) (Abbildung 3), dabei spielt der oxidative Stress des Kulturmediums eine wichtige Rolle, diese ist vom Sauerstoff abhängig. MEFs reagieren sehr sensitiv auf eine 20%ige Sauerstoffatmosphäre und treten nach 10 bis 20 Zellverdopplungen direkt, in die Seneszenz ein, im Gegensatz dazu wurde keine Seneszenz bei 3% O₂ festgestellt (Parrinello *et al.*, 2003). Zwei Mechanismen regulieren die Seneszenz: p19/ARF-p53 und p16/pRb.

Die p16/pRb- abhängige Seneszenz-Kontrolle ist in ihrer Funktion noch nicht vollständig gesichert, denn p16 oder pRb *knock out* Fibroblasten zeigen zwar einen seneszenten Phänotyp (Sherr, und DePinho, 2000; Krimpenfort *et al.*, 2001; Sharpless *et al.*, 2001) aber die Deletion des p16 *target* Proteins CDK4 (*Cyclin dependent kinase 4*) sowie allen Rb- Proteine (pRb, p107 und p130) ermöglichen den Fibroblasten eine unbeschränkte Zellteilung (Dannenbergh *et al.*, 2000; Sage *et al.*, 2000, Rane., *et al.*, 2002).

Im Gegensatz zu p16/pRb scheint p19/ARF-p53 der wichtigste Regulationsmechanismus der Seneszenz zu sein, denn die von p19 oder p53 *knock out* Mäusen abgeleiteten Fibroblasten teilen sich ständig und zeigen keine Seneszenz bei Standard- Kultur- Bedingungen (20% O₂) (Harvey *et al.*, 1993; kamijo *et al.*, 1997).

P53 wird selbst von anderen Tumorsuppressoren aktiviert, bzw. inaktiviert.

Das PML (*Promyelocytic Leukemia*) Protein ist auch in der zellulären Seneszenz in MEFs überexprimiert (Abbildung 5), es bindet unabhängig von p19^{ARF} an MDM2 und verhindert somit den p53- Abbau (Bernardi *et al.*, 2004).

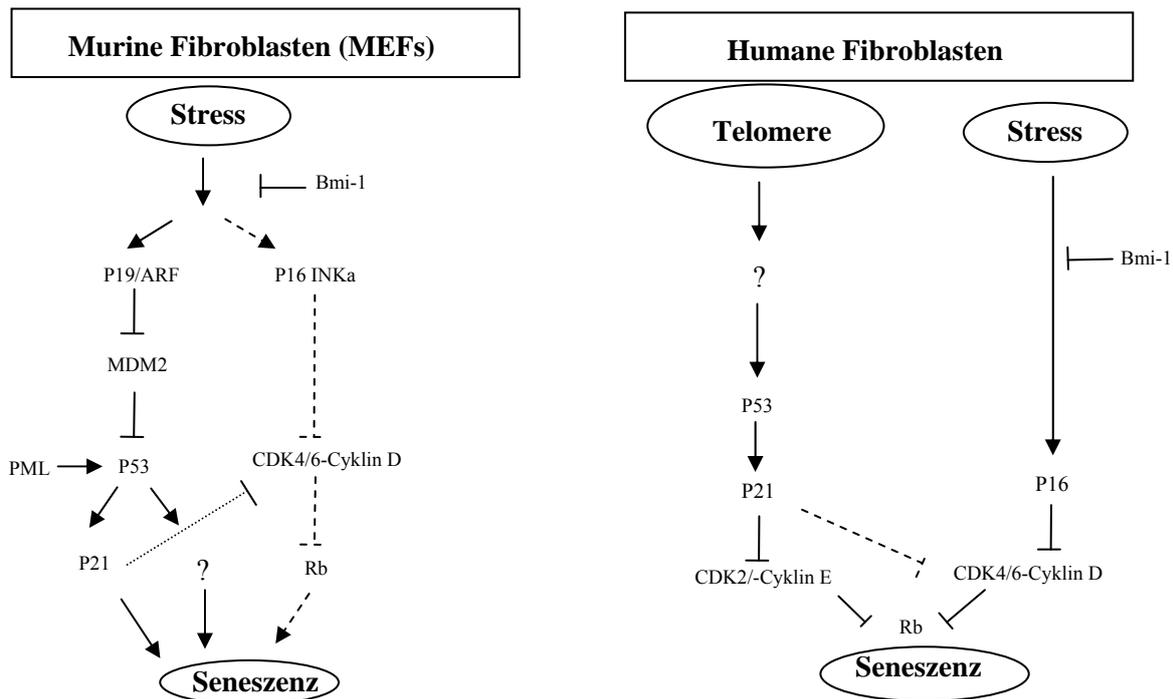


Abbildung 5: Mechanismus der Seneszenz in murinen- und humanen Fibroblasten. In Mauszellen verläuft die zelluläre Seneszenz hauptsächlich über den p19/ARF- p53- Weg. In humanen Fibroblasten übernimmt der Telomer-p21- p53- Weg die dominante Rolle in der Seneszenz. Adaptiert von (Itahana, et al., 2004, *Biogerontology*).

2.3.2.2 Extrinsische Seneszenz in humanen Fibroblasten

Der Hauptmechanismus der Seneszenz in humanen Fibroblasten wird von der Telomer- Verkürzung ausgelöst, dabei spielen p53 sowie p21 die wichtigsten Rollen für das Anhalten der Zellteilung (Noda *et al.*, 1994; Atadja *et al.*, 1995; Itahana *et al.*, 20002). Der durch ausgeübte Stress (die *in vitro* Zellkulturbedingungen) ermöglicht den Fibroblasten den Eintritt in die Seneszenz, diese scheint vom p16 Tumorrepressor auszugehen und wird damit „p16 STOP“ Mechanismus bezeichnet (Itahana *et al.*, 2004). (Abbildung 5).

Das Polycomb Protein Bmi-1 ist ein transkriptionaler Repressor, der als Inhibitor der durch Stress ausgelösten Seneszenz in der Maus sowie in humanen Fibroblasten funktioniert. Seine Abwesenheit in Bmi-1 *knockout* Zellen beschleunigt den Seneszenz Zustand mittels Aktivierung von p16- und p19-Proteinen (Jacobs *et al.*, 1999; Itahana

et al., 2003). Das Bmi-1 Protein zwingt Fibroblasten, in die Immortalisierung einzutreten (Jacobs *et al.*, 1999).

2.4 IMMORTALISIERUNG

2.4.1 Allgemeines

Vor 40 Jahren konnte Hayflick nachweisen, dass in Zellkultur gezüchtete Fibroblasten nach einer gewissen Anzahl von Zellteilungen ihr Wachstum einstellen und sich nicht weiter teilen. Mit der Inaktivierung von Tumorsuppressorproteinen wie p53 oder pRb konnte dieses so genannte „Hayflick-Limit“ umgangen werden. Die Immortalisierung ist ein wichtiges Charakteristikum von Tumorzellen *in vivo*, in denen keine Zellteilungsbegrenzung existiert. Meistens geht diese Situation einher mit dem Verlust der Tumorsuppressor-Funktion durch Punktmutationen oder Deletionen, z.B p53 oder p16 Verluste erhöhen die zelluläre Immortalisationsrate (Donehower *et al.*, 1992; Serrano *et al.*, 1996), (Abbildung 6).

Studien von Weinberg und Hahn haben gezeigt, dass ein humanes Krebsmodell *in vitro* etabliert werden kann, wenn die zelluläre Seneszenz blockiert wird (Hahn *et al.*, 1999; Boehm und Hahn, 2005). Dieses Modell zeigt die Transformation humaner Fibroblasten mittels Viren. Ebenso übernehmen Mutationen im INK4a/ARF Locus die Aufgabe der Immortalisierung humaner Fibroblasten (Hahn *et al.*, 1999; Seger *et al.*, 2002; Voorhoeve und Agami, 2003; Boehm und Hahn, 2005).

Maus- Fibroblasten können auch durch unterschiedliche genetische Mutationen immortalisiert werden. Die betroffenen Proteine sind zumeist p53 oder p19^{ARF} (Rangarajan und Weinberg, 2003). Generell werden die Immortalisierungsmechanismen der Maus und der humanen Zellen in einer Umgebung mit inaktiven Tumorsuppressor Proteinen, besonders mit mutiertem p53, erleichtert (Abbildung 7).

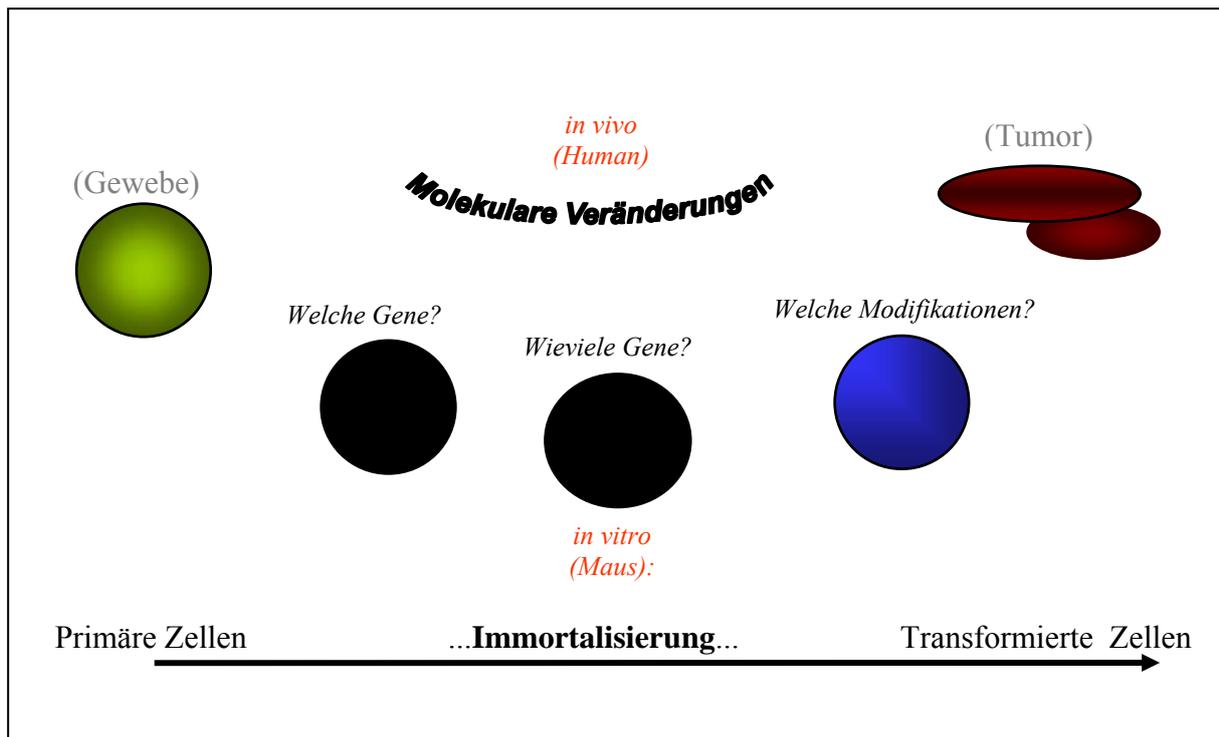


Abbildung 6: Signifikanz der *in vitro* Immortalisierung in der Tumorgenese.
(Dr.M.Hollstein)

2.4.2 Immortalisierung ->p53 Mutationen

P53 Mutationen treten nahezu in allen Tumorarten, und in etwa 50% aller Tumoren des Menschen auf. 21717 Mutationen wurden bis heute in Krebspatienten oder anhand von Zelllinien identifiziert (http://p53.free.fr/Database/p53_database.html), (Olivier *et al.*, 2002) und betreffen als Punktmutationen (*single missense* Basensubstitution) die DNA-Bindungsdomäne am häufigsten in den Codon-Sequenzen z.B an den Basen 175, 245, 248, 273 und 282 (auch „Hotspots“ genannt) (Abbildung 7) (Olivier *et al.*, 2002). Damit kann das p53 Protein entweder seine Fähigkeit als Transkriptionsfaktor sowie als Tumorsuppressor verlieren (Kato *et al.*, 2003), oder funktionelle Eigenschaften wie eine dominant negative Aktivität oder Temperatur-Empfindlichkeit übernehmen (Tp53MUTFunctionR9 databse, IARC). P53 Mutationen wurden ebenso *in vitro* in der immortalisierten Zellen identifiziert. Die Studien bestätigten teilweise die bekannten Mutationen, die bei Krebspatienten gefunden wurden.

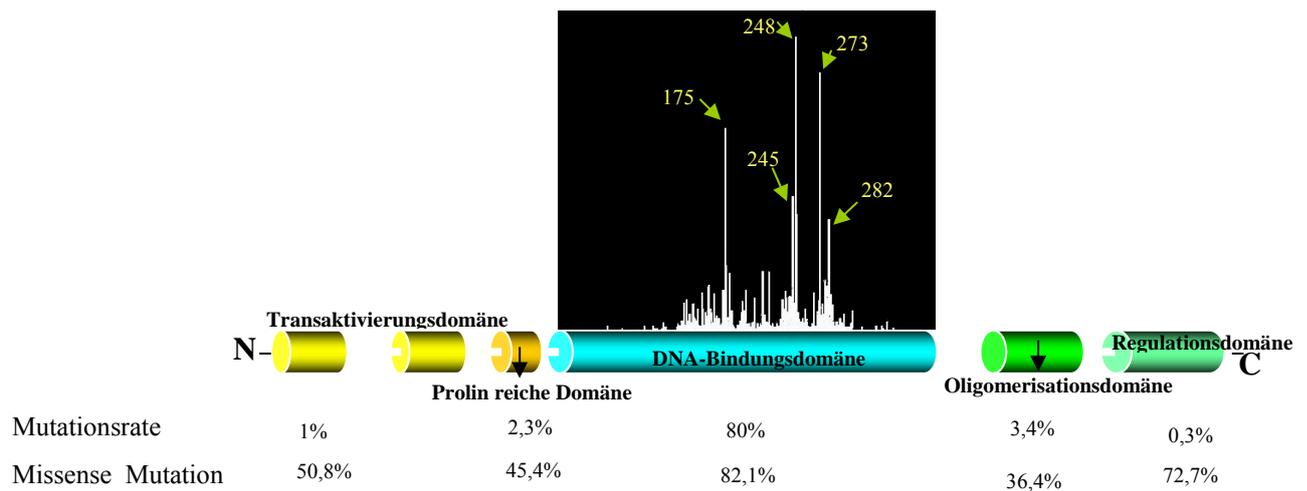


Abbildung 7: Lokalisierung der p53 Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne in der meistbetroffenen Sequenz-Stellen des Gens: Codon 175, 245, 248, 273 und 282. (adaptiert von <http://www-p53.iarc.fr>).

Maus- Fibroblasten sind ein gutes *in vitro* Modell für die Laborstudien zur Immortalisierung.

Trotz der großen Homologie von p53 zwischen Maus und Mensch (85% der DNA-Sequenzen und 90% der Aminosäuren) existieren einige Unterschiede (Hergenahn *et al.*, 2004). Ebenso wurden unterschiedliche Immortalisierungsmechanismen zwischen humanen und murinen Fibroblasten gefunden (Boehm und Hahn, 2005). Das deutet auf einen wesentlichen Unterschied zwischen der humanen und murinen Krebsbiologie hin. (Rangarajan *et al.*, 2003).

80% der p53 Mutationen in Krebspatienten betrifft die DNA-Bindungsdomäne (Abbildung 8) und um sie *in vitro* zu untersuchen, wurde ein transgenes **H**umanes **p**53 **k**nock-**i**n (*Hupki*) Maus Modell hergestellt (Luo *et al.*, 2001a).

2.4.2.1 *Humanes p53 Knock-in (Hupki) Maus Model*

Die Rekombination ist ein in allen Organismen vorkommender, durch spezialisierte Enzyme (Rekombinasen) katalysierter Prozess, der eine Spaltung und Neuknüpfung von DNA-Abschnitten beinhaltet. Hierdurch wird genetische Diversität und die Reparatur geschädigter mutierter DNA ermöglicht.

Die homologe Rekombination wurde 1964 zuerst von Robin Holliday beschrieben. Sie beruht auf der Paarung ausgedehnter homologer Sequenzen, ist in Bakterien und Hefen häufig, in Säugerzellen hingegen ineffizient. Dies hängt mit der Komplexität

und Größe höherer Genome zusammen und beschränkt die Einsatzmöglichkeiten des Prozesses zur gezielten genetischen Modifikation dieses Zelltyps.

Mit der *gene-targeting* Technologie wurde der *Hupki* Mausstamm im Labor etabliert (Luo *et al.*, 2001a), in der die Maus DNA-Sequenzen von Exon 4 bis 9 eines endogenen p53 Allels durch humane p53 DNA-Sequenzen mittels homologer Rekombination ausgetauscht wurden. Dieses rekombinierte Fragment enthält die vollständige DNA-Bindungsdomäne (DBD) sowie die prolinreiche Domäne ((PPD): *polyprolin domain*) (Abbildung 9).

Damit ermöglicht das *Hupki* Maus-Modell vielfältige *in vivo* Untersuchungen zur Funktion humaner p53 DBD sowie der polymorphen PPD Varianten des Menschen (Hergenahn *et al.*, 2004).

Der homozygote *Hupki* Mausstamm ist phenotypisch nicht anderes als der Wildtyp-Stamm und hat bisher keine biochemischen oder biologischen Abnormalitäten aufgewiesen. Der chimäre p53 Transkriptionsfaktor wird richtig und vollständig transkribiert und lässt sich durch p53 Konsensus-Sequenzen im Gel Mobilität *shift Assay* detektieren (Luo *et al.*, 2001a). Bei DNA-Schädigungen (UV- oder Gamma-Strahlung) sammelt sich das p53 *Hupki* Protein im Zellkern und zeigt zusätzliche andere Eigenschaften des p53 Wildtyps, es reguliert als Transkriptionsfaktor andere p53 *Target Gene* (Luo *et al.*, 2001a).

Zusammengefasst findet das *Hupki*-Maus-Modell Anwendung als praktisches, experimentelles Werkzeug für:

- funktionelle Studien über humanspezifische PPD- und DBD-Eigenschaften.
- die Aufklärung von menschlichen p53-Tumormutationsspektren durch experimentelle Induktion von Mutationen.
- Pre-klinisches *Screening* von neuen Pharmazeutika zur Wiederherstellung der Funktion des mutierten menschlichen p53 Proteins.

2.4.2.2 *Invitro* Immortalisierung der p53 Hupki Maus Fibroblasten (HUFs)

Es ist bekannt, dass p53 in fast allen Krebsarten des Menschen eine oder mehrere Mutationen aufweist. Aus diesem Grunde stellen die primären embryonalen *Hupki*-Maus- Fibroblasten ein neues *in vitro* Untersuchungsmodell für diese Mutationen dar. Die Arbeitstrategie in diesem Bereich ist einfach: Primäre, embryonale *Hupki*- Maus- Fibroblasten werden mit einer karzinogenen Substanz eine bestimmte Zeit lang behandelt und dann weiter gezüchtet, bis sie in die Immortalisierung eintreten. Die etablierten, immortalisierten Zelllinien werden dann auf p53 Mutationen untersucht (Tabelle 1) (Liu *et al.*, 2004 und 2005; Feldmeyer *et al.*, *in press*).

Tabelle 1: Einige p53 Punktmutationen wurden sowohl in humanen Tumoren (Hussein und Harris, 1999; Pfeifer *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2003; Pfeifer und Hainaut, 2003) als auch in immortalisierten HUFs identifiziert. (Luo *et al.*, 200b; Liu *et al.*, 2004 und 2005; Feldmeyer *et al.*, *in press*).

Karzinogen	p53Mutation(en) in Tumoren	Tumorart	Mutation(en) in Hupki p53	Mutationsstelle in Tumoren sowie in HUFs	Referenz
UV-Licht (UVC)	C->T	Haut-Tumore	C->T	Codon: 248	Luo <i>et al</i> 2001b Liu <i>et al.</i> , 2004
Aristolochiasäure	A->T	Harnleiter- Tumore	A->T	Codon:139	Feldmeyer <i>et al.</i> , <i>in press</i>
Benzo(a)pyren (B(a)P)	G->T	Lungen- Tumore	G->T	Codon: 157 Codon: 158	Liu <i>et al.</i> , 2005

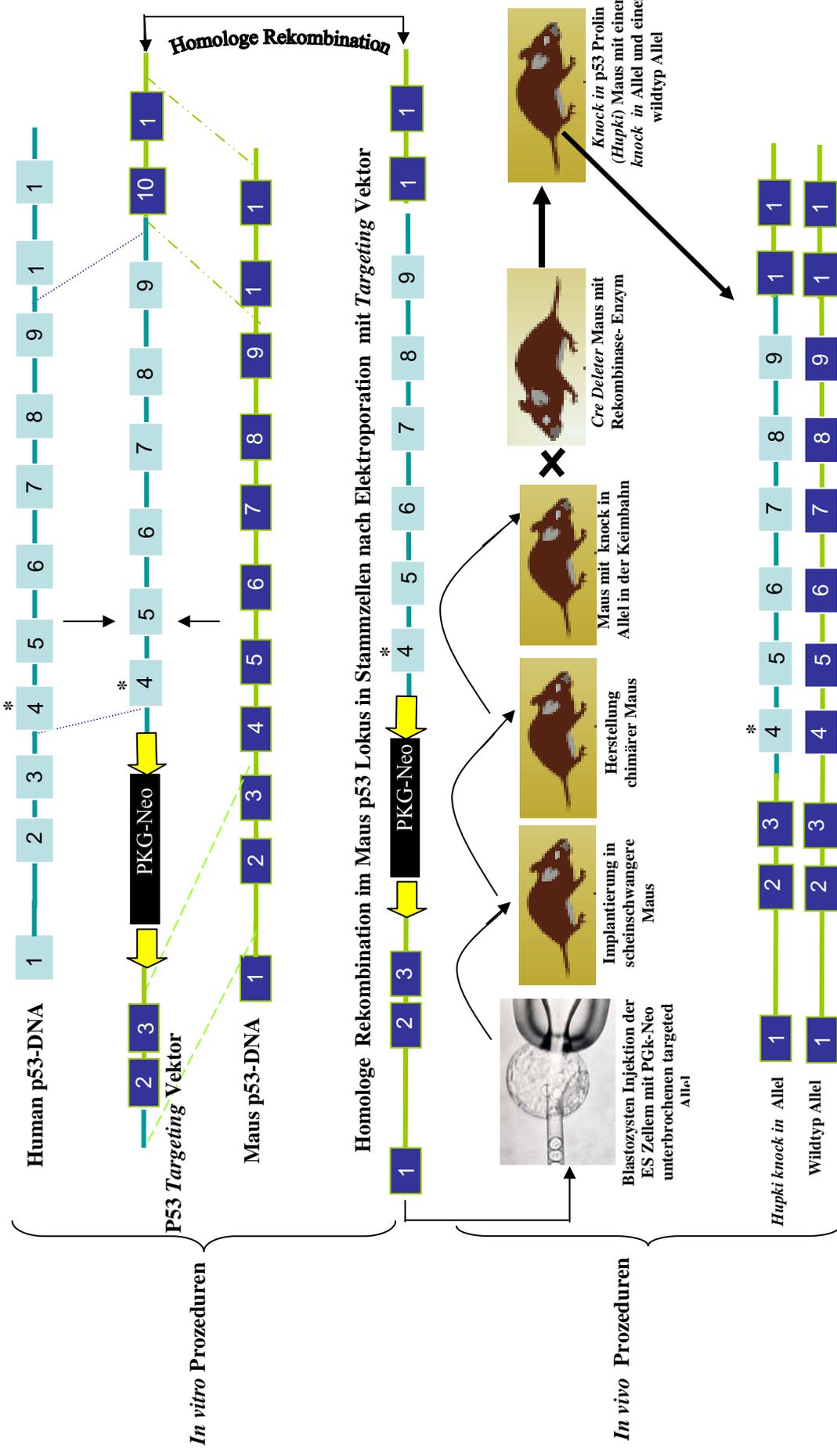


Abbildung 8: Gene Targeting Strategie.

Die Technik wird zuerst *in vitro* dann *in vivo* durchgeführt. Der Targeting Vektor trägt den humanen p53 DNA-Abschnitt (Exon 4-Exon 9) sowie zwei seitliche Maus p53 DNA-Fragmente (Exon 2-Exon 3) am 5' und (Exon 10 –Exon11) am 3' Ende, die zu 100% identisch mit der DNA der embryonalen Stammzellen (ES) sein sollten um die homologe Rekombination zu gewährleisten. Der Vektor enthält eine Selektionskassette (PGK-Neo: (Phosphoglycerat kinase Promoter und) Neomycin Resistenz) flankiert von 2 unidirektionellen Lox P Sequenzen um die Entfernung der Kassette nach dem Screening der homologen Rekombinanten ES Klone zu ermöglichen (Siehe Abschnitt 3.2.7.2 im Kapitel der Methoden). Die Entfernungszprozedur erfolgt *in vivo* nachdem die ES Zellen in die Blastozysten injiziert dann in einer scheinchwangeren Maus implantiert. Die chimären Nachkommen werden weiter gepaart um das knock-in Allel durch die Keimbahn zu übertragen, dann mit Cre deleter Mäusen gepaart, diese lässt die *in vivo* hergestellte Rekombinase die Selektionskassette an den Lox P herausschneiden. Die Nachkommen tragen das ununterbrochene *Hupki* targeted Allel und das Maus p53 wildtyp Allel. Eine Paarung innerhalb dieser Tiere ergibt homozygote Prolin *Hupki* Mäuse.

2.5 P53 POLYMORPHISMUS

Es existieren 3 unterschiedliche Klassen des p53 Polymorphismus:

- Polymorphismus, der keine Veränderung der Aminosäure Sequenz des p53 Proteins aufweist. Dies betrifft das Codon 21 in Exon 2 (Ajuha *et al.*, 1990), Codon 34 und 36 in Exon 4 (Felix *et al.*, 1994; Vos *et al.*, 2003) und Codon 213 in Exon 6 (Carbone *et al.*, 1991).
- Polymorphismus, der den nicht kodierenden Bereich der Introns 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9 und 10 des Gens betrifft (Futreal *et al.*, 1991; Lazar *et al.*, 1993, Pleasants und Hansen, 1994; Ito *et al.*, 2004; Buller *et al.*, 1995; Sjalander *et al.*, 1996, Berggren *et al.*, 2001, Fiszer-Meliszewska *et al.*, 2003).
- Polymorphismus mit Veränderungen in den Aminosäuren Sequenzen stattfinden; die betroffenen Codons sind: Codon 47 (C->T/ Prolin->Serin) (Felley-Bosco *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2005) und 72 in Exon 4 (G->C/ Arginin->Prolin) (Harris *et al.*, 1986; Beckman *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1999). Dies beeinflusst die p53 Funktion (Abschnitt 1.5.1) und gibt damit als der wichtigste Polymorphismus.

2.5.1 Polymorphismus in Codon 47 Prolin-> Serin

Die Serin 47 Variante von p53 ist sehr selten und spielt eine Rolle bei der Reduzierung der p53- abhängigen Apoptose, dies wurde in *in vitro* Studien bewiesen (Li *et al.*, 2005).

2.5.2 Polymorphismus in Codon 72 Arginin-> Prolin

Im p53 Tumorsuppressorgen, das eine zentrale Rolle im Zellzyklus spielt, ist in Codon 72/Exon 4 im Prolinreichen Bereich (PPD: *polyprolin domaine*) ein Polymorphismus bekannt, der entweder homozygot für Arginin (Arg) oder Prolin (Pro) oder heterozygot für Arg/ Pro codiert. Untersuchungen bei Bronchial-, Zervix- und Colonkarzinomen beschreiben eine erhöhte Karzinomsuszeptibilität in Abhängigkeit vom Genotyp des Codons 72 (Bosse *et al.*, 2004). Zum Beispiel ist der Genotyp mit dem Prolin- Codon Pro/ Pro mit Lungenkrebs assoziiert (Kawajiri *et al.*, 1993). Andere Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen dem heterozygoten Arg/Pro Genotyp und dem Lungenkarzinom (Fan *et al.*, 2000).

Biochemisch sowie biologisch, verhalten sich die beiden p53 Varianten p53 Arginin und p53 Prolin ziemlich unterschiedlich (Thomas *et al.*, 1999). Die Arginin Isoform bindet stärker an MDM2 und wird besser zu den Mitochondrien transportiert, indem sie mit Bcl-2/Bcl-xL interagiert und die Spaltung des Enzyms Caspase- 3 auslöst (Dumont *et al.*, 2003; Bonafe *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2004).

In manchen *in vitro* Studien wurde teilweise gezeigt, dass das P21^{WAF1} Gen stärker von der Prolin p53 Variante als der Arginin Isoform transkribiert wird (Thomas *et al.*, 1999; Sullivan *et al.*, 2004).

2.5.3 Wechselwirkung des p53 Codon 72 Polymorphismus mit dem humanen Papilloma Virus (HPV) E6 Protein

Sowohl für „low risk“ als auch „high risk“ E6 Proteine wurde eine Bindung an p53 beschrieben, wobei die Affinität von „low risk“ E6 Proteinen zu p53 wesentlich geringer ist als von „high risk“ Homologen (Crook *et al.*, 1991; Li und Coffino, 1996). Nur im Falle von „high risk“ E6 Proteinen wird zudem ein Abbau von p53 über das ubiquitin-Proteasom-System (E6AP) induziert.

Im Rahmen der Erforschung des E6-vermittelten Abbaus von p53 konnte ein essentieller zellulärer Kofaktor identifiziert werden, der als E6AP8 (E6-assoziiertes-Protein) bezeichnet wurde (Huibregtse., 1991 und 1993) und die Funktion einer Protein-Ubiquitin-Ligase besitzt (Abbildung 9) (Scheffner *et al.*, 1993).

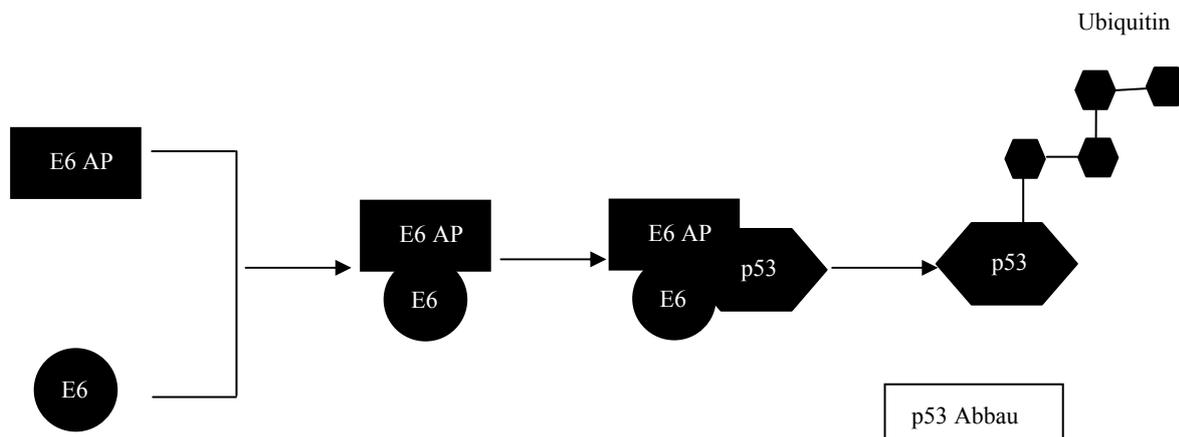


Abbildung 9: Das HPV E6 Onkoprotein interagiert mit p53 und löst dessen Abbau durch das Ubiquitin– Protein Ligase E6-AP aus. (Adaptiert von Tommasino *et al.*, 2003).

Der Polymorphismus von p53 in Codon 72 des Exon 4 wird als mitverantwortlich für eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber der durch das virale Onkoprotein E6 vermittelten Degradierung des Tumorsuppressorproteins beschrieben (Hellweg *et al.*, 2005). Beim Cervixkarzinom ist eine erhöhte Karzinomsuszeptibilität für den Arg/Arg Genotyp nach HPV-Infektion bewiesen worden, die an einem größeren Patientenkollektiv verifiziert wurde (Storey *et al.*, 1998; Klug *et al.*, 2001; Koushig *et al.*, 2004). Laborstudien zeigten eine hohe Affinität des E6-AP zur p53 Arginin Isoform (Storey *et al.*, 1998; Tommasino *et al.*, 2003).

2.6 FRAGESTELLUNG

Die von der Abteilung C040 hergestellte **Human p53 knock in (Hupki)** Maus (Luo *et al.*, 2001a) bietet die Möglichkeit den humanen p53- DNA- Teil *in vivo* als auch *in vitro* zu studieren und die Funktion des p53 Tumorsuppressors zu untersuchen.

Eine der möglichen *in vitro* Studien ist die Untersuchung der spontanen Immortalisierungsmechanismen der primären *Hupki*- und Maus- Fibroblasten (HUFs und MEFs) mit den Fragestellungen:

- die Charakterisierung der Immortalisierung in HUFs und MEFs unter gleichen Zellkultur-Bedingungen, da bekannt ist, dass primäre humane embryonale Fibroblasten deutliche Unterschiede zu den murinen Zellen aufweisen
- die molekularbiologische Untersuchung der Gen- Expression in primären embryonalen *Hupki*- und Maus- Fibroblasten vor und nach DNA-Schädigung
- die quantitative Bestimmung der sterbenden Zellpopulationen der HUFs und MEFs anhand Durchflußzytometrie
- die Untersuchung immortalisierter MEF Zelllinien: *screening* der p53 Mutationen sowie des p19 Verlustes

Die *Hupki*- Maus enthält das p53- Arginin- Isoform Protein und da p53 in Exon 4, Codon 72 den Polyprolin- Domäne einen Polymorphismus besitzt, und somit zwei funktionell unterschiedliche Proteinvarianten aufweist, war es wichtig, eine neue *Hupki*- Maus mit dem Prolin- p53- Isoform- Protein mittels *gene-targeting* Strategie herzustellen.

Die Prolin- *Hupki*- Maus wurde in der Abteilung C040 (Dr. M. Hollstein) mit Hilfe der Firma RCC (Berlin) hergestellt: Der *gene targeting* Vektor mit den unterschiedlichen, jeweils murinen und humanen p53 DNA-Fragmenten, mit Prolin als Codon 72 im Exon 4 (Abbildung 8) wurde in embryonale Stammzellen (ES) E14.1 elektroporiert. Die positiv bewerteten ES Klone (Abbildung 10) wurden in Blastozysten injiziert (RCC) um chimäre Mäuse herzustellen (Abbildung 8).

Der zweite Teil der Doktorarbeit bestand aus:

- Der Charakterisierung der Prolin *Hupki* Maus.
- Der Immortalisierung von Arginin/Prolin heterozygoten embryonalen, primären Fibroblasten (Arg/Pro HUFs) nach Behandlung mit dem Karzinogen Benzo(a)pyren (B(a)P) und dem Nachweis von p53 Mutationen in den immortalisierten Zelllinien.

Ein dritter Teil der Doktorarbeit bestand aus:

- Der Kreuzung der p53 *Hupki* Arginin Mäuse (Mausstamm 129) mit den p53 *knock out* 129/C/57BL/6) Mäusen von Tyler Jacks (Jacks *et al.*, 1994) um p53 *Hupki* Arginin/*knock out* Mäuse herzustellen. Die Tumorgenese einiger heterozygoter Tiere wurde untersucht.

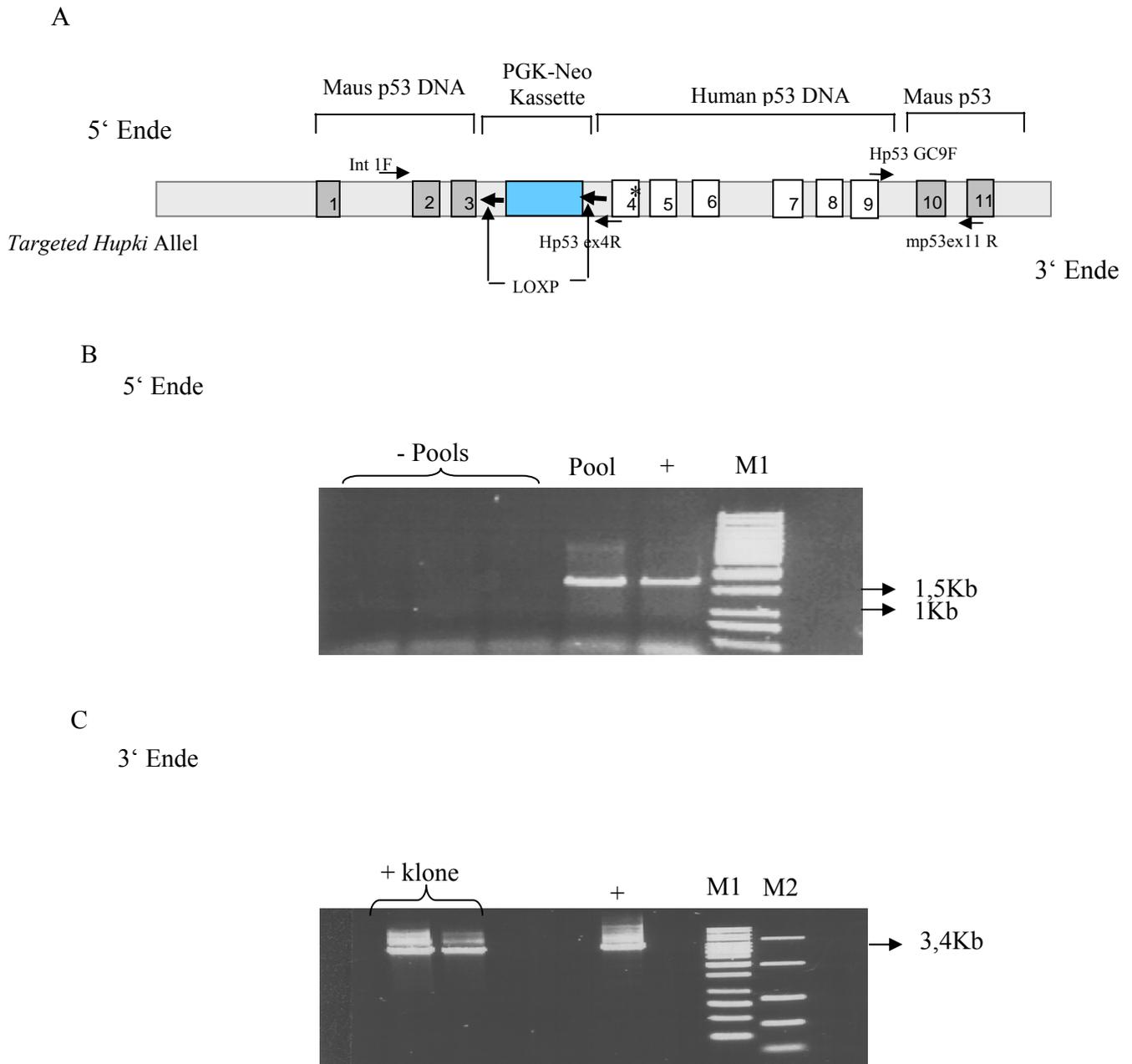


Abbildung 10: *Screening* der Neo-resistenten ES Klone.

Die DNA gepoolter Klone wurden jeweils das 5' Ende mittels Primer GC9F (human p53) mp53 e 11R (Maus p53 Exon 11) (1,8Kpb) für die Überprüfung der richtigen Integration des humanen p53 Gens in dem Maus p53 Locus (B), und das 3' Ende mit den m int1F (Maus Intron 1) und hp53 e4R (humaner p53 Exon 4) (3,4Kbp) für die Bestätigung richtiger Integration (C). Die Skizze in A zeigt die Bindungstellen der verwendeten Primer. +: Positiv, -: Negativ M1: 1Kb Marker, M2: 10Kb Marker, Pool: zusammenpipettierte DNA von einer Reihe der 96 Platte (Abbildung 14 im nachfolgenden Kapitel 3.2.7.2 (Elektroporation und Selektion embryonaler Stammzellen). (*): Codon 72 im Exon 4. (Unpublizierte Daten/ Bild, von der Abteilung C040, m. Hollstein).

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 MATERIALIEN

3.1.1 Chemikalien und ihre Bezugsquellen

Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma- Aldrich, Taufkirchen
Borsäure p. A.	Fluka, Neu-Ulm
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	J. T. Baker, Deventer, Holland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Serva, Heidelberg
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure, HPLC-grade	Fluka, Neu-Ulm
Ethanol p. A.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylacetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck Biosciences, Schwalbach
Formaldehyd (37 %) p. A.	AppliChem, Darmstadt
Formamid p. A	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Merck Biosciences, Schwalbach
Glycin	Serva, Heidelberg
Milchpulver, entfettet	Fluka, Neu-Ulm
Natriumacetat p. A.	Merck Biosciences, Schwalbach
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Gerbu, Gaiberg
Natriumformiat	Merck Biosciences, Schwalbach
3-(N-Morphino)-propansulfonsäure (MOPS)	Gerbu, Gaiberg
PBS, Dulbecco	Biochrom AG, Berlin
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S, rein	Serva, Heidelberg
2-Propanol p. A. (Isopropanol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteinase K	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Salzsäure (25 %)	MerckBiosciences, Schwalbach
12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

N´N´Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Tween 20 (Polyethylensorbitanmonolaurat)	Gerbu, Gaiberg
Wasser, HPLC-grade bidest	Fluka, Neu-Ulm
MES Monohydrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NuPAGE Bis-Tris precast Gel	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE MES Laufpuffer (20X)	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphase Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenol:Chloroform:Isoamyl Alkohol (25:24:1)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Protease Inhibitor Coktail	Sigma, Taufkirchen
Bio-Rad Protein Assay	Bio Rad, Munich
Page Ruler TM Protein Marker	MBI Fermantas, St.Leon-Roth
Proteinase K (20mg/ml)	MBI Fermantas, St.Leon-Roth
Lyse Puffer	Promega, Mannheim
Restriktionsendonuklease und Puffer	MBI Fermantas, St.Leon-Roth
SeeBlue Prestained Standard	Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Größenstandard;1Kb-DNA-Leiter	MBI Fermantas, St.Leon-Roth
DNA-Größenstandard:pUCMIX8-Marker	MBI Fermantas, St.Leon-Roth
Natrium Chlorid (NaCl)	Sigma, Taufkirchen
Natrium Hydroxyde (NaOH)	Merck, Darmstadt
SYBR Green 1DNA Markierungslösung	Sigma, Taufkirchen
Tag DNA Polymerase (rekombinant)	Sigma, Taufkirchen
Taq DNA Polymerase, Platinum	Invitrogen, Karlsruhe
Template Suppression Reagent(TSR)	Appleid Biosystems, Darmstadt
Trizma Base (Tris)	Sigma, Taufkirchen
Trizma Hydrochlorid Tris-HCl)	Sigma, Taufkirchen
Trypton	Sigma, Taufkirchen
Wasser PCR Grade	Invitrogen, Karlsruhe
5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl β-D-Gaktoypranoside (X-Gal)	Sigma,Taufkirchen
Trypan Blau	Sigma, Taufkirchen

3.1.2 Kits und Säulen

AMV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
BigDye Terminator Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
CentriCep Spin Säulen	Piscataway, Separations, USA
DNA Master SYBR Green I kit	Roche Diagnostics, Mannheim
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN, Hilden
Lumi-Light Western Blotting Substrate	Roche Diagnostics, Mannheim
Microcon YM-100 und YM-50 Säulen	Millipore, Schwalbach
RevertAid™ M-MuLV Transkription	Promega, Mannheim
QIAQuick® Gel Extraktion Kit	QIAGEN, Hilden
Ready Mix™ Red Taq™ PCR Reaktionsmix	Sigma, Taufkirchen
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden
RNase freie DNase Set	QIAGEN, Hilden
SuperScript II Reverse Transkriptionskit	Invitrogen, Karlsruhe
Apo-Annexin V-PI	Becton & Dickinson, Heidelberg

3.1.3 Antikörper

Kaninchen Anti-humaner p53 (NCL-p53-CM1)	Novocastra Laboratories Ltd, UK
Kaninchen Anti-Maus p53 (NCL-p53-CM5)	Novocastra Laboratories Ltd, UK
Kaninchen Anti-Maus p19 (Ab-1)	Oncogene, USA
Maus Anti-Gapdh (6C5)	Ambion, UK
Ziege Anti-Kaninchen, HRP-Konjugiert	Santa Cruz, Heidelberg
Ziege Anti-Maus, HRP Konjugiert	Santa Cruz, Heidelberg

3.1.4 Zellkultur Reagenzien

Dulbecco's modifizierte Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin (200mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Natrium Pyruvat1 (100mM)	Invitrogen, Karlsruhe
MEM Non-essential Aminosäure Lösung (100x)	Sigma, Taufkirchen
Fetal Kalb Serum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin Lösung (100x)	Sigma, Taufkirchen

Gelatin	Sigma, Taufkirchen
Leukemia Inhibitor Faktor (LIF) vom Maus	Sigma, Taufkirchen
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA Lösung (10x und 1x)	Sigma, Taufkirchen
Geneticin® Disulfate Salz (G418 Disulfate Salz)	Sigma, Taufkirchen

3.1.5 Mausstämme

<i>Hupki</i> Arginin/ <i>Hupki</i> Arginin	129/Ola
<i>Hupki</i> Prolin/wildtyp	C57BL/6
<i>Hupki</i> Arginin/ <i>Hupki</i> Prolin	C57BL/6
<i>Hupki</i> Prolin/ <i>Hupki</i> Arginin	129/C57BL6
Wildtyp	129, Charles River
P53 <i>Knockout</i>	129/B6
<i>Hupki</i> /Null	129/B6
Emryonale Stammzellen (E14.1)	129/Sv

3.1.6 Zelllinien

Tabelle:2 Etablierte Zelllinien

Name	P53 Status	Nukleinsäure-Veränderung	Aminosäure-Veränderung	Klasse
WT1	Mutante	CGC>CGG	R245G	Missense
WT7	Wildtyp	-	-	-
WT10	Wildtyp	-	-	-
WT12	Wildtyp	-	-	-
WT14	Wildtyp	-	-	-
WT19	Mutante	TGC>TGG	C135W	Missense
WT24D	Mutante	TGC>TGG	C135W	Missense
WT25	Mutante	TGC>TGG	C138P	Missense
WT26	Wildtyp	-	-	-
WT29	Wildtyp	-	-	-
WT42	Mutante	Deletion	-	Deletion

Diese Zelllinien stammen aus primären embryonalen Maus Fibroblasten (MEFs). Andere primäre embryonale Fibroblasten wurden aus transgenen Mäusen: *Hupki* Arginin (HUFs R/R) und homozygoten *Hupki* Prolin (HUFs P/P), oder heterozygoten *Hupki* Arginin/Prolin (HUFs R/P) gewonnen.

3.1.7 Geräte

Autolumat LB953	EG&GBerthold, Bad Wldbad
Biorad Power PAC 300	Bio-rad, Munich
Zellkultur Sterilbank	Heraeus Instrument, Hanau
Zentrifuge 5416	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank für Zellen	Forma Scientific, USA
Gammacell 100 Irradiator	MDS Nordion, USA
Light Cycler Instrument	Roche Diagnostics, Mannheim
Kühlzentrifuge	Sigma, Taufkirchen
Kühlzentrifuge Avanti J-25	Beckma, Palo Alto, CA,USA
Magnetrührer	Heidolph, Kehlheim
Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Olympus Ck40	Olympus, Hamburg
Neubauerzählkammer	Brand, Wertheim
PCR Sterilbank	Herolab, Wiesloch
PRISM™ 310 Genetic Analyser	Applied Biosystems, Darmstadt
PTC-100tm programmierter thermal kontrolller	MJ research, USA
Spektrophotometer Unkon 931	Kontron Instrument, Schweiz
Spektrophotometer	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Transfer Blotkammer SD1	CTI, Idstein
Wasser Bad	Grant Instrument, UK
Fluorescence Activate Cell Sorting (FACS)	Becton & Dickinson, Heidelberg

3.1.8 Computerprogramme und Datenbanken

HUSAR	DKFZ, Heidelberg
KromaSystem 3000	Bio-Tek instrument, Inc, USA
P53 MH Algorithm	http://linkage.rockefeller.edu/p53
Gene runner, version3.05	Hasting Software Inc
Sequencing analysis Software (version 5.0)	Applied Biosystems, Darmstadt
Light cyclers Software (version 3.5)	Roche Diagnostics, Mannheim
ENSEML	www.ensembl.org/index.html
BLAST search	www.ncbi.nlm.nih.gov/blast

3.2 METHODEN

3.2.1 Isolierung von Maus- embryonalen primären Fibroblasten (MEF)

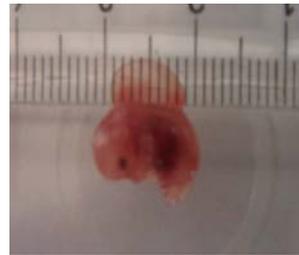
Die primären embryonalen Fibroblasten wurden aus dem Uterus schwangerer Weibchen herauspräpariert.

Dazu wurden die Weibchen nach einer natürlichen Befruchtung in der Zuchtstation täglich nach einem vaginalen Plaue (VP) untersucht, der eine geglückte Befruchtung anzeigt. Der erste Tag, an dem eine vaginale Plaue festgestellt wurde, wurde als Tag 0 betrachtet. Nach 13,5 Tagen wurde das Weibchen mit CO₂ getötet und der perlenkettenförmige Uterus (Abbildung 11), der die Föten steril umschließt, entfernt und mehrere Male mit PBS gewaschen.

Die folgenden Schritte sollten unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden.



Perlenkettensstruktur des Uterus



13,5 Tage alter Embryo

Abbildung 11: Struktur des 13,5 Tage alten Embryos im Uterus

Die 13,5 Tage alten und circa 12mm langen Embryonen wurden von der Uterusmembran befreit, und wie folgt bearbeitet:

- Der Kopf wurde abgeschnitten, um die zerebralen Nervenzellen zu entfernen
- Ebenso wurde der größte Teil der Blutzellen durch Entnahme der Leber, des Herzens und der Milz entfernt
- Der Rest des Embryos wurde in sehr kleine Teile geschnitten, und 2-3ml Medium (Tabelle1) hinzu pipettiert
- Indem man die so zerkleinerten Teile etwa 10mal durch eine 20G- Kanüle in eine Spritze zieht, und sie mit hohem Druck wieder herauspresst, und diesen Schritt nochmals ca. 5 mal mit einer 25G- Kanüle wiederholt, erhält man eine homogene Zellsuspension.

- Die Zellsuspension wurde in 10ml Platten pipettiert und in den Inkubator (37°C) gestellt.
- Das Medium wurde regelmäßig gewechselt, bis die Platten konfluent waren.
- Die konfluenten Platten wurden durch splitten 1:3 oder nach Bedarf 1:6 verdünnt und als Zellen in Passage 0 bezeichnet (p 0).
- Sobald die Platten eine hohe Zelldichte erreichten, so dass man sie als fast vollständig konfluent bezeichnen konnte, wurden sie geerntet und nach entsprechender Vorbehandlung (siehe Abschnitt: Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen) in flüssigem Stickstoff eingelagert.

3.2.2 Kultivierung von Zellen

Alle Zellen wachsen in einem geeigneten Nährmedium, das eine genau definierte Mischung an L-Aminosäuren, Vitaminen, anorganischen Salzen, Glucose und anderen essentiellen Molekülen, unter Zusatz von 10 % (V/V) fötalem Kälberserum (FCS), enthält. FCS unterstützt durch seine Wachstums- und Anheftungsfaktoren das Zellwachstum. Ein pH-Indikator (Phenolrot) zeigt sofort jegliche Abweichung vom physiologischen pH-Wert von 7.4 an. Eine Kontamination mit Bakterien wird durch Zugabe eines Antibiotika-Gemisches (Penicillin/Streptomycin) unterdrückt. Die Mausfibroblasten werden im Brutschrank bei 37 °C in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und 95 % Luft inkubiert. Alle Arbeiten mit Zellen finden unter einer Sterilbank mit sterilen Lösungen und Arbeitsgeräten statt, welche ausschließlich für die Arbeit mit Zellkulturen genutzt werden.

Folgende Tabelle (Tabelle 3) beschreibt die genaue Zusammensetzung der spezifisch auf die einzelnen Zelllinien abgestimmten Medien.

Tabelle 3:

Zellen	Medium	Zusammensetzung
Mausfibroblasten	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	90 % (V/V) DMEM mit 4.5 g Glucose 10 % (V/V) FCS 2 mM L-Glutamin 100U-100µg/ml Penicillin/Streptomycin 1 mM Natriumpyruvat
ES-Zellen	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	85 % (V/V) DMEM mit 4.5 g Glucose 15 % (V/V) FCS Penicillin/Streptomycin (10 mg/ml) 5 ml MEM nicht-essentielle Aminosäuren (100 x) + 1000 U/ml LIF ESGRO™

3.2.3 Passagieren von Zellen

Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Zellen handelt es sich um adhärenente Zellen. Adhärenente Zelllinien wachsen als Monolayer auf dem Boden des Kulturgefäßes. Die Anheftung ist für ihre Proliferation notwendig. Alle 3 – 4 Tage erreichen die Zellen Konfluenz, werden einmal mit PBS gewaschen und durch 1:3 bis 1:5 Verdünnung zur Stammerhaltung passagiert. Zur Ablösung der Zellen wird zuerst das Kulturmedium abgesaugt. Anhaftende, die Trypsinbehandlung störende Serumreste, werden durch zweimaliges Waschen mit sterilem 1x PBS beseitigt und die Zellen mit einem geringen Volumen an Trypsin/EDTA-Lösung überschichtet. Die Zellen werden für ca. 2-3 Min. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und anschließend in Kulturmedium aufgenommen. Dann werden die Zellen entweder im entsprechenden Verhältnis ausgesät oder aber die Zellzahl in der Suspension mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Anzahl an Zellen auf frische Zellkulturgefäße verteilt.

PBS:

NaCl	136.9	mM
KCl	2.7	mM
Na ₂ HPO ₄	8.1	mM
KH ₂ PO ₄	1.15	mM

3.2.4 Kryokonservierung und Revitalisierung von Zellen

Zellen haben in der Regel eine endliche Lebensdauer und sollten daher nicht beliebig oft passagiert werden. Deshalb wurden mehrere Aliquots von Zellen einer möglichst niedrigen Passagennummer (primäre Zellen) oder höherer Passagen (Zelllinie) bei Minus 80°C oder in flüssigem Stickstoff bei Minus 196°C konserviert. Zur Kryokonservierung wird eine 1:1 Mischung aus Wachstumsmedium und Einfriermedium verwendet. Etwa $2 - 5 \times 10^6$ Zellen wurden in 1.5 – 1.8 ml Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen pipettiert. Das Einfrieren sollte langsam erfolgen, um Schäden durch Kristallisationsprozesse zu vermeiden. Die Zellen lässt man 30 – 60 min auf 4 °C kühlen und in isolierenden Styroporschachteln mit ca. 1°C Temperaturerniedrigung pro min über Nacht bis –80 °C gefrieren. Die Zellen können nun in flüssigem Stickstoff langfristig gelagert werden. Im Fall der Maus Stammzellen (ES) wurden die Zellen in 96 Well-Platten eingefroren. Nachdem die Klone mit 15µl Trypsin abgelöst waren, wurden 35µl ES Medium dazugegeben, eine Hälfte der Zellsuspension wurde weiter kultiviert, während die andere mit 45µl Quintsch- Medium (normales ES-Medium mit 50% zusätzlichem FCS) vermischt wurde. Am Ende wurden 70µl Einfriermedium hinzu pipettiert. Die Platten wurden 20min bei -20°C gelagert bevor sie bei -80°C für eine spätere Verwendung gelagert wurden.

Einfriermedium:

spezifisches Zellkulturmedium	30%
FCS	50%
steriles DMSO als Gefrierschutz	20%

Eingefrorene Zellen werden zur Revitalisierung zügig bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Zur Entfernung von zellschädigendem DMSO aus dem Einfriermedium werden die Zellen zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, RT), das Zellsediment in wenig Kulturmedium suspendiert, die Suspension in eine Zellkulturflasche (75 cm²) mit 10ml vorgelegtem Komplettmedium gegeben und im Brutschrank kultiviert.

3.2.5 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität der Zellen wurden 30 µl Zellsuspension im Volumen 1:1 mit Trypanblau vermischt. Trypanblau wird aufgrund der Membrandurchlässigkeit nur von toten Zellen absorbiert, die dann unter dem Lichtmikroskop blau erscheinen. Das Deckglas wird auf die Zählkammer gesetzt und durch Ansetzen der Pipette an die Kante der Zählkammer wird die Zellsuspension durch die Kapillarkräfte in den Raum zwischen Deckglas und Kammer gesaugt. Unter dem Mikroskop werden die lebenden Zellen in mindestens zwei äußeren Großquadraten, bestehend aus je 16 Kleinquadraten ausgezählt, wobei ein Großquadrat einem Volumen von 0.1 µl entspricht. Die Zellkonzentration ergibt sich aus der Multiplikation von Zellzahl, Verdünnungsfaktor und Zellkammerfaktoren (10^4) nach folgender Formel:

↳ Zellzahl pro ml = Mittelwert gezählter Großquadrate x Verdünnungsfaktor x 10^4

3.2.6 Immortalisierung primärer Zellen

3.2.6.1 Spontane Immortalisierung

Normale Zellen wachsen in einem bestimmten Rhythmus, das unterscheidet sie von Tumorzellen. Das bedeutet, dass sie einem Zellzyklus unterliegen.

Genauso verhalten sich die aus 13,5 Tage alten Embryonen isolierten, primären Fibroblasten, abgekürzt MEF.

Sie wachsen sehr schnell *in vitro* bis zu einer bestimmten Passage (p4->p8), dann treten sie in eine kritische Phase ein: Die Seneszenz, in der viele Zellen sterben und nur diejenigen, die genetische Modifizierungen, wie zum Beispiel p53 Mutationen, tragen, proliferieren weiter.

Die Zellen wurden in Passage 1 aufgetaut und in vier 6-Lochplatten gesät, am nächsten Tag wurde frisches Medium dazupipetiert.

Sobald die Platten eine etwa 100%ige Konfluenz erreichten, wurden sie 1:3 gesplittet.

Auf diese Art wurden die Zellen *in vitro* bis zur Seneszenz kultiviert. Sobald sie diese erreichten, wurde das alte Wachstumsmedium regelmäßig durch neues ersetzt. Nachdem die Zellen sich langsam von der Krise erholten, wurden sie von den Lochplatten in T25 cm² Flaschen transferiert.

Die Zellen wurden weiter bis zur *Passage* 12 in den Flaschen gezüchtet.

Sobald die Zellen den kritischen Zustand (die Krise) verlassen hatten, wurden sie in einer T25 Zellkulturflasche zur größeren Zellpopulation expandiert, ferner wurde die DNA der Zellen extrahiert und für die Analyse (Sequenzierung verwendet. (Siehe Abbildung 12).

3.2.6.2 *Immortalisierung durch Benzo[a]pyren-Behandlung*

Die Zellen wurden in der Passage 2 bei einer Konfluenz von etwa 70% mit 5µM Benzo[a]pyren (B[a]P) behandelt. Zuerst wurde die Substanz in Komplettmedium verdünnt: Es wurde eine Stocklösung einer 10mM B[a]P- Lösung in DMSO verwendet (Lösung A). Von dieser Lösung A wurden 9µl entnommen und mit 18ml Wachstumsmedium gemischt (Lösung B). So wurde eine Endkonzentration der Behandlungslösung (Lösung B) von 5µM erhalten. Andere Zellen in den 6-Well-Platten wurden als Kontrolle nur mit DMSO behandelt.

Nach Absaugen des alten Mediums wurden 3µl Behandlungslösung (Lösung B) in jedes Loch der 6-Loch-Platten zugegeben. Die Behandlung dauerte 48 Stunden. Danach wurde das toxische Medium mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Der Inhalt wurde als flüssiger Giftabfall entsorgt. Die Zellen wurden dann mit PBS einmal gewaschen, wie gewohnt 1:2 passagiert und anschließend in den Brutschrank gestellt. Weitere Mediumwechsel fanden etwa alle 3-4 Tage statt, bis sich die Zellen von der Behandlung erholt hatten.

Die Zellen wurden jeden Tag unter dem Mikroskop untersucht, um deren Konfluenz zu beurteilen. Sobald ihre Morphologie derer gesunder Zellen entsprach, und sie gut wuchsen, wurden die Zellen nun in T25 Zellkulturflaschen und dann in T75 Flaschen transferiert um sie zum Schluss einzufrieren. In den frühen Passagen 5-7 wurden Zellpellets für die DNA-Isolierung zur Sequenzierung vorbereitet. (Abbildung 12).

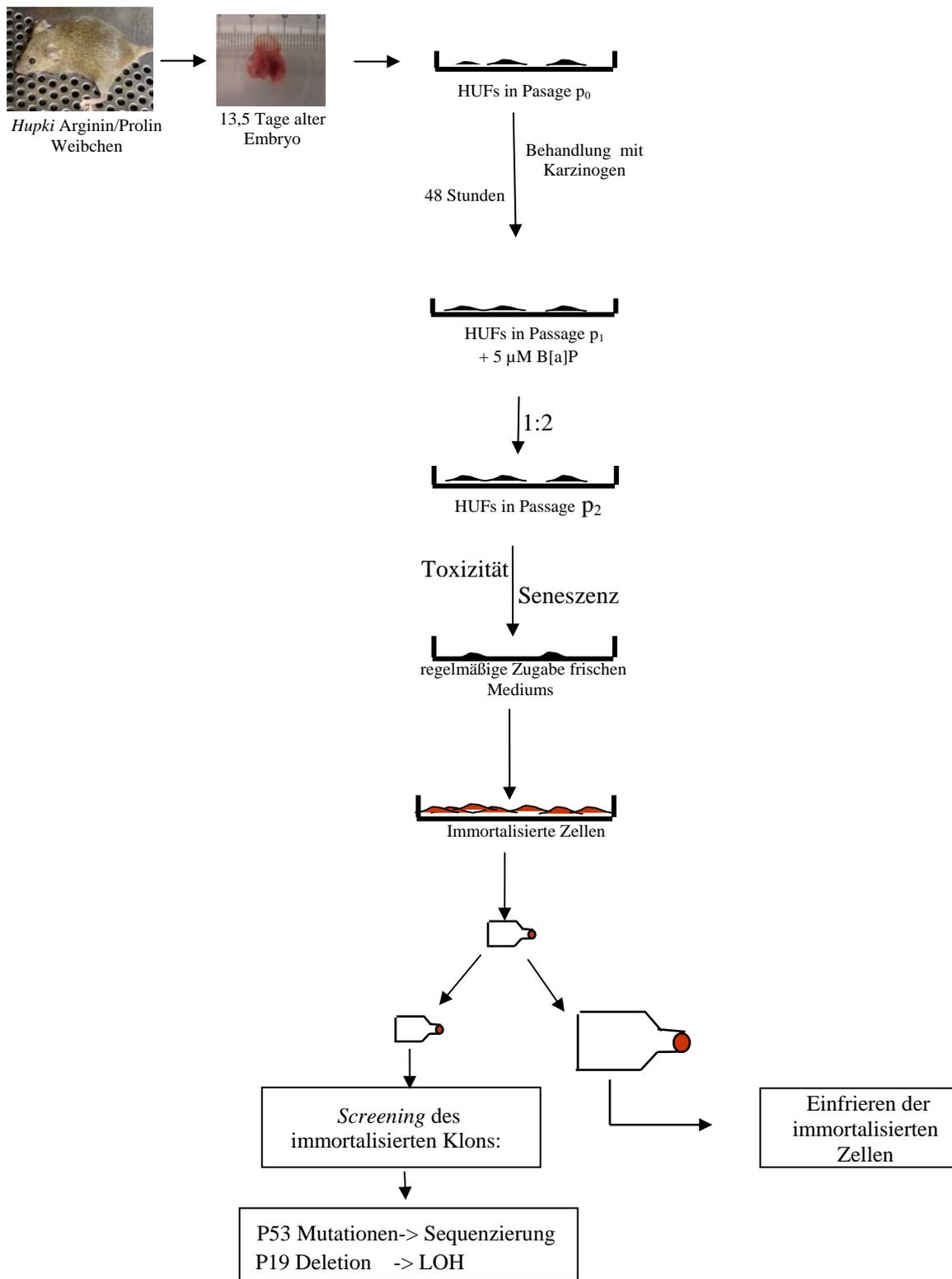


Abbildung 12: *In vitro* Experiment für die Untersuchung von p53 Mutationen in Arginin/Prolin heterozygoter Hupki Fibroblasten.

3.2.7 Homologe Rekombination im Maus p53- Lokus embryonaler Stammzellen (ES)

Die verwendete *Gene-Targeting*-Strategie basiert auf dem Prinzip des homologen Rekombinationsverfahrens. Ein *Targeting* Vektor mit den humanen p53 DNA Sequenzen (von Exon 4 bis Exon 9 Abbildung 8) wurde verwendet. Damit diese DNA-Sequenzen im Maus p53- Lokus eingebaut werden können, sollte der Vektor andere Maus DNA- Sequenzen besitzen, die das humane DNA- Fragment beinhalten. Diese bilden zwei Arme und müssen homolog zur Maus p53- DNA der ES Zellen (Abbildung 9) sein, in welche die humane p53 DNA eingebaut werden soll. Nun ist ein Sequenzaustausch zwischen Maus p53 DNA der Zellen und der humanen p53 DNA möglich.

Der *Targeting*- Vektor sollte eine Kasette (Abbildung 8) mit einem Selektionsmarker beinhalten. Die Resistenz gegen Antibiotika ist meistens gut dafür geeignet. Die Kasette sollte nach der Selektion der positiven Zellklone herausgeschnitten werden. Deshalb enthält sie selbst zwei DNA-Sequenzen (34bp) LOX P genannt (LOX p: *locus of X-ing over of P1 phage*). Diese besteht aus zwei 13 bp invertierten Sequenz-Wiederholungen, die durch einen 8 bp genannten *Spacer* getrennt sind. Die LOXP Sequenzen sind die Erkennungsstellen des Cre- Rekombinase Enzyms um die Kasette durch eine Exzision herauszuschneiden. Um das Ganze zu gewährleisten, sollten die LOXP gleich gerichtet sein.

3.2.7.1 Embryonale Stammzellen in Kultur

Um die Differenzierung der ES-Zellen zu unterbinden, wurden diese auf durch Gammabestahlung mitotisch inaktivierten embryonalen Fibroblasten, den sogenannten Feederzellen, (Torres und Kühn 1997), die als Matrix für die ES-Zellen fungieren, kultiviert oder mit dem leukaemia inhibitory factor (LIF) behandelt. Für die Herstellung der Neomycinresistenten Feederzellen wurden embryonale Mausfibroblasten (MEF) verwendet, die von G418- resistenten Mäusen extrahiert und für den späteren Gebrauch kryokonserviert wurden. Im Fall der direkten Verwendung der Neomycinresistenten MEFs, wurden die Zellen bis zur Konfluenz in einer 150 mm Schale in DMEM vermehrt, mit PBS gewaschen, trypsiniert und in 15 bzw. 50ml Gefäßen zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in einer entsprechenden Menge Mediums (DMEM) resuspendiert und gammabestrahlt (60Gy/8min) um die Zellen zu inaktivieren. Anschließend wurden die Feederzellen in -80°C eingefroren oder in den

gewünschten Kulturschalen ausgesät und kultiviert. Nach dem Anhaften der Feederzellen ließen sich die ES Zellen gut darauf kultivieren. Um Verunreinigungen durch Feederzellen zu vermeiden, wurden die ES-Zellen zur Isolierung der gDNA auf mit Gelatine beschichteten Kulturplatten kultiviert.

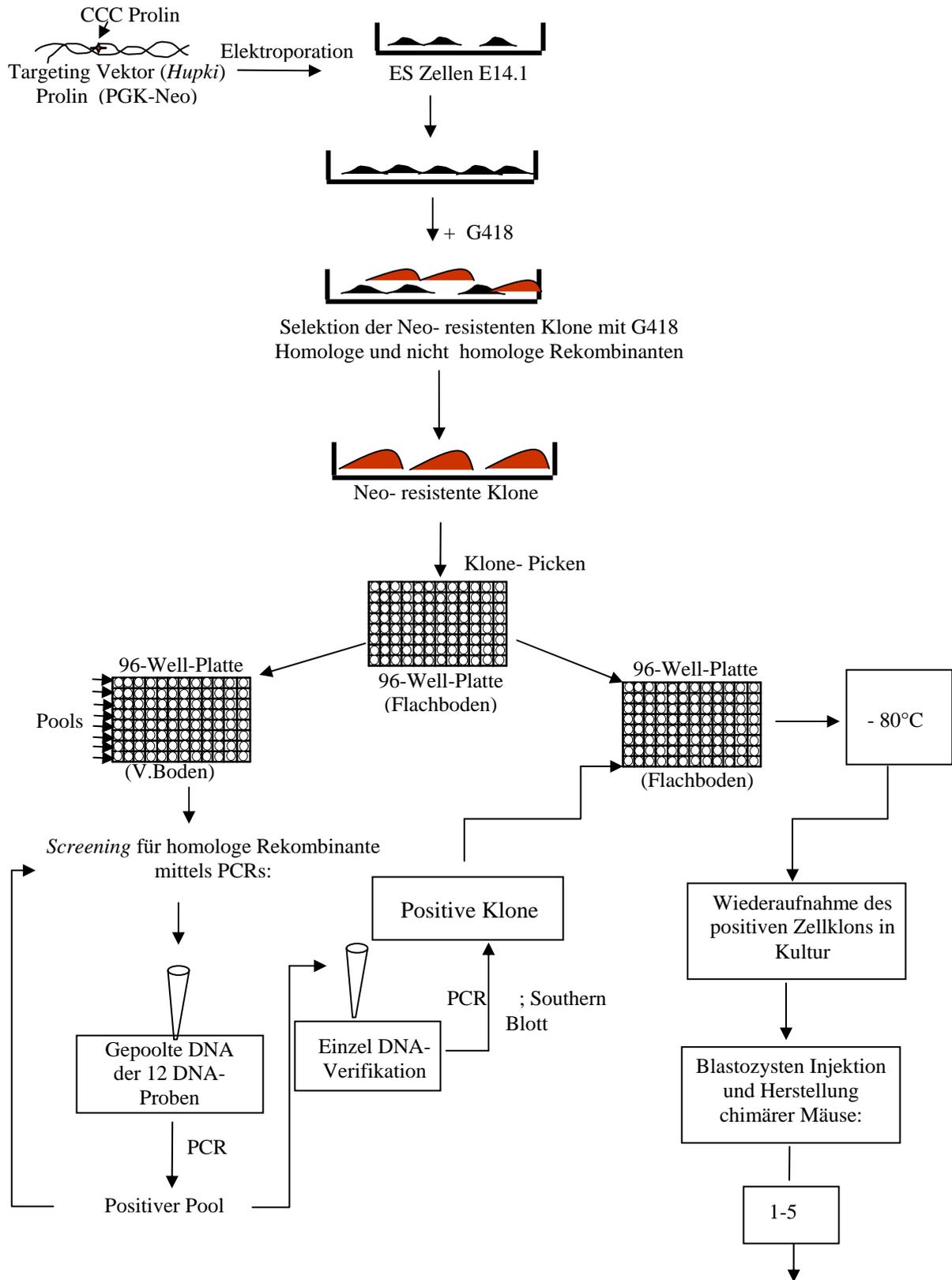
Abbildung 13 zeigt die verschiedenen verwendeten Arbeitsschritte mit den Stammzellen für die Herstellung einer transgenen *Knock in* Maus.

Meine Arbeit wurde im DKFZ unter der Aufsicht des Transgene Services durchgeführt. Dort wurden die neomycin-resistenten, lethal bestrahlten Maus-Fibroblasten (Feeder Layer) vorbereitet sowie die Stammzellen E14.1 zur Verfügung gestellt.

3.2.7.2 *Elektroporation und Selektion embryonaler Stammzellen*

ES-Zellen müssen mindestens einmal vor der Elektroporation passagiert werden. Sie wurden trypsiniert, fünf Minuten bei 200 g zentrifugiert, mit PBS gewaschen und dann ausgezählt. $1-2 \times 10^7$ ES-Zellen wurden in 960µl PBS resuspendiert und davon 160µl zur Kontrolle der G418- Selektion ausplattiert. Die verbliebenen Zellsuspension wurde mit 40µg linearisiertem Vektor DNA versetzt und in einer Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand: 0,4 cm, Biorad) 5min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Elektroporation (500µF und 250 V) mit einem Gen- Pulser (Bio-Rad) durchgeführt und weitere 20 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden in ES- Medium resuspendiert und auf 8 mit Feederzellen beschichteten Kulturschalen (90mm) verteilt.

Nach 24 Stunden wurde das ES- Medium gegen Selektionsmedium /ES- Medium mit 300µg/ml G418 ausgetauscht. Auch die nicht elektroporierten ES- Zellen wurden mit dem Selektionsmedium kultiviert. Das Medium wurde täglich gewechselt. Nach 8-10 Tagen wurden G418- resistente ES- Klone in PBS unter dem Mikroskop mit einer Eppendorf- Pipette isoliert, in 96-Wellplatten pipettiert, 5 min trypsiniert und nach resuspendieren auf frische 96 Wellplatten in 250 µl ES- Medium mit G418 auf Feederzellen ausplattiert. Nach 3-4 Tagen wurden die Platten trypsiniert. 3/4 der Zellen einer Platte wurden eingefroren und der Rest wurde zur Präparation genomischer DNA ausplattiert und weiter kultiviert (Abbildung 13).



In vitro Arbeit

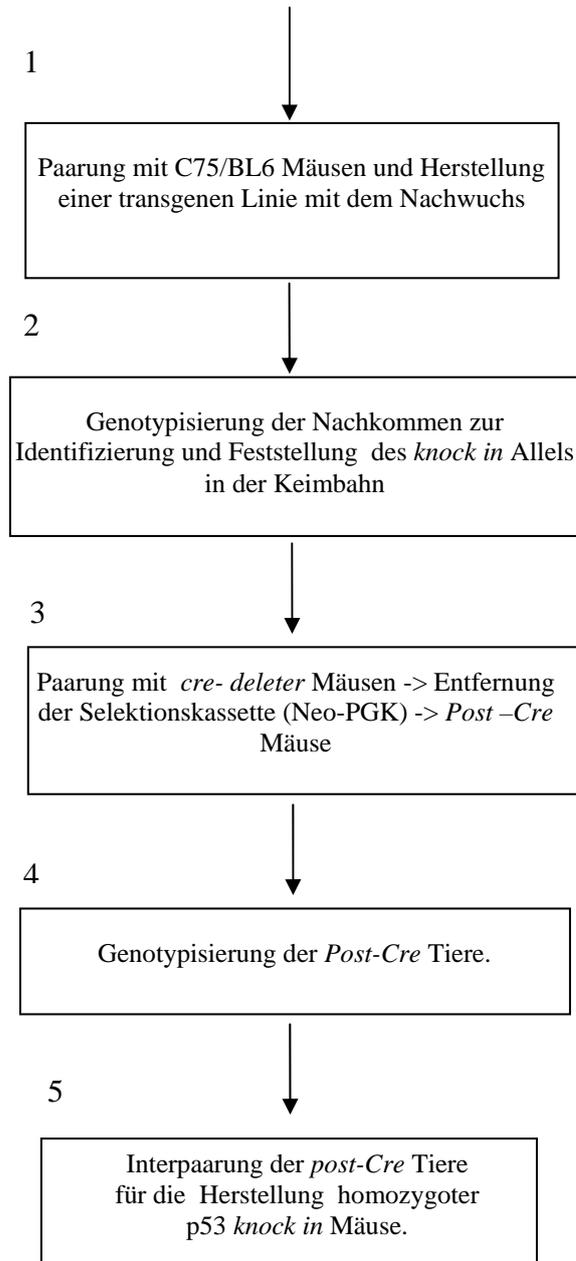


Abbildung 13: Die *In vitro*-Arbeitsstrategie für die Herstellung einer transgenen *Knock-in* Maus.

Die Stammzellen wurden mit dem *Targeting* Vektor (*Hupki* Prolin PGK-Neo) transfiziert. Es besteht eine Wahrscheinlichkeit von mehr als 1%, dass der Vektor (*Hupki* Prolin PGK-Neo) an den p53 Locus im Chromosom 11 bindet. In dem Fall fand die homologe Rekombination, bei der bestimmte DNA- Stücke sich zwischen dem Vektor und den ES Zellen austauschten, statt. Die Neomycin- Resistenz wurde als Selektionsmarker verwendet. Die Neo- resistenten Klone wurden in 96 Well-Platten (mit flachem Boden) gepickt, bis zur Konfluenz weiter betreut, dann wurden

sie 1:3 passagiert. Aus einem Teil wurde DNA extrahiert und mittels PCR überprüft. Die restlichen Zellen wurden bis zur Feststellung positiver Klone eingefroren. Die positiven Klone wurden wieder in Kultur genommen und in Blastozysten einer weiblichen Maus injiziert. Die geborenen transgenen Mäuse mussten mit bestimmten anderen transgenen Mäusen (*Cre-deleter*) gepaart werden, um die Kasette der Selektionsmarker, die das Gen unterbrach, zu entfernen (Abbildung 13).

Cre-deleter Mäuse sind Tiere, die eine Rekombinase exprimieren. Diese besitzt die Fähigkeit, die PGK-Neo Kasette herauszuschneiden. Die Rekombinase braucht aber dafür LOXP DNA. Die Mäuse -Nachkommen wurden als transgene p53- Prolin *Knock-in* Tiere bezeichnet.

3.2.8 Durchflusszytometrie

FACS steht für **F**luorescence **a**ctivated **c**ell **s**orting und beschreibt ein Verfahren, das in der Biologie und in der Medizin häufig zur Anwendung kommt.

Die Durchflusszytometrie stellt ein optisches Meßsystem zur Analyse physikalischer, chemischer, biologischer und physiologischer Eigenschaften von einzelnen in einem Flüssigkeitsstrom hydrodynamisch fokussierten Partikeln dar (Zellen oder Zellkerne). Die Methode basiert auf dem Prinzip der quantitativen Fluorochromierung, d.h. die mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff angefärbten Zellen werden kontinuierlich hintereinander an einer Anregungslichtquelle (meist Laser) vorbeigeführt, wobei die Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt werden und jede Zelle ein Lichtsignal proportional zur stöchiometrisch gebundenen Fluorochrommenge emittiert. Aufgrund des „Stokes-Shifts“ ist das emittierte Photon energieärmer als das absorbierte Photon. Das Fluoreszenzlicht der verschiedenen Fluorochrome wird durch Teilerspiegel und farbselektive Bandfilter in Fluoreszenzspektren aufgetrennt, durch Photomultiplier verstärkt, in ein elektrisches Signal und schließlich ein digitales Signal umgewandelt. Die Daten werden als 2D-„Punkt-Diagramme“ („dot-plots“) oder als 1D-Histogramme dargestellt und analysiert.

Hierzu dienen zwei Parameter: Das Vorwärtsstreulicht FSC (*Forward Scatter*) als Maß für die Zellgröße und Seitwärtsstreulicht SSC (*Side Scatter*) als Maß für die Granularität (Größe und Struktur des Zellkerns etc.). Mit diesen beiden Parametern lassen sich zum Beispiel die Zellen des Blutes bereits recht gut auftrennen, die sonst unter dem Lichtmikroskop morphologisch kaum zu unterscheiden sind.

3.2.9 Messung der Apoptose durch Annexin- V/ PI

Zum Nachweis der Apoptose in Zellen wurde der Annexin- V/ Propidium- Iodit Kit während der Apoptose durchgeführt.

Phosphatidylserin (PS) findet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle. Während der Apoptose (dem "programmierten Zelltod") wird PS auf die Außenseite der Membran transloziert. Annexin- V bindet an PS. Durch Markierung von Zellen mit Annexin- V- FITC (Fluorescein Iso Thio Cyanate) kann man apoptotische Zellen durchflusszytometrisch nachweisen.

Werden Zellen nekrotisch und ihre Membran durchlässig, kann Annexin-V- FITC in die Zellen eindringen und an die Innenseite der Membran binden. Daher können bei alleiniger Färbung von Zellen mit Annexin- V- FITC apoptotische nicht von nekrotischen Zellen unterschieden werden.

Man kombiniert daher die Annexin- V- FITC Markierung mit einer Propidiumiodidfärbung. Das Propidiumiodid (PI) dringt nur in Zellen mit durchlässiger Membran, also in nekrotische Zellen, ein.

Lebende Zellen sind daher Annexin-negativ und PI-negativ, apoptotische Zellen sind Annexin-positiv und PI-negativ, nekrotische Zellen sind Annexin-positiv und PI-positiv (Abbildung 14).

Primäre Fibroblasten (Hupki und wildtyp) in Passage null (p_0) wurden aufgetaut und in 60mm Zellkulturschalen mit DMEM Medium (mit zusätzlich 10% FCS) aufgenommen. Nach vollständiger Konfluenz (ca. 80-100%) wurden die Zellen trypsinisiert und 1:2 bis 1:3 verdünnt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für die Induktion der Apoptose Gammastrahlung ausgesetzt (20Gy). 4 Stunden nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, trypsinisiert, und bei 1000rpm 5min zentrifugiert. Das Pellet wurde nochmals mit PBS gewaschen, und dann mittels ApoAlert Annexin- V- FITC Apoptose- Kit (Clontech) wie folgt analysiert: Das Zellpellet wurde mit 1x Bindungspuffer (*Binding-Buffer*) gewaschen, bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, und in 200µl Bindungspuffer aufgenommen. 5µl Annexin- V- FITC und 10µl Propidium- Iodit (PI) wurden pro Probe hinzupipettiert. Die Proben wurden bei Raumtemperatur 5- 15 min inkubiert, dann mit 300µl Bindungspuffer auf ein Gesamtvolumen von 500µl aufgefüllt. Die Zellen wurden dann quantitativ mittels Durchflußzytometrie analysiert.

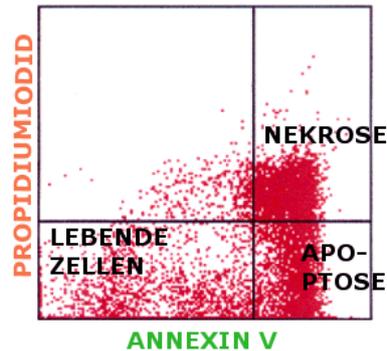


Abbildung 14: Durchflußzytometrische Trennung der apoptotischen, nekrotischen und lebenden Zellen mittels Annexin- V/PI Analyse.

3.2.10 Protein-Analyse

3.2.10.1 Proteinisolierung aus Gewebekulturzellen

Für die Proteinextraktion wurden die Zellen zuerst in Zellkulturschalen für 16 bis 20 Stunden inkubiert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, dann wurde direkt der SDS- Protein- Lysepuffer auf die Zellen verteilt, die Menge des Lysepuffers hängt von der Größe der Zellkulturschale ab (für 6cm Schalen wurden 100µl und für 10cm Schalen wurden 400µl pipettiert). Die Zellplatten wurden mit einem Zellschaber ausgeschabt, in Eppendorf- Tubes transferiert und für 5min bei 99°C (um die DNA zu denaturieren) erhitzt. Das Lysat wurde dann durch die QIAshredder- Säulen 10 min bei 14.000rpm zentrifugiert. Die gesamten Proteine wurden in frische Eppendorf- Reaktionsgefäße transferiert und bei -20°C gelagert. Für die Immunoblot- Analyse wurde die Konzentration der gesamten Proteine mit Bio-Rad Protein- Assay- Puffer nach der Bradford- Methode bestimmt.

3.2.10.2 Proteinquantifizierung nach Bradford

Die Proteinbestimmung wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay der Firma Bio-Rad durchgeführt. Diese Methode basiert nach Bradford auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie[®] BrilliantBlue G-250 (bei der Bindung von Proteinen im sauren Milieu) von 465 nm ohne Protein zu 595 nm mit Protein. Grund dafür ist die Stabilisierung des Farbstoffs in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonat- Form durch Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein.

Der Farbstoff bindet dabei ziemlich unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine. Dies führt zu einer intensiven Blaufärbung, deren Intensität direkt mit der Konzentration der reagierenden Gruppen korreliert und damit ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung darstellt. Die Intensität des Farbstoffs kann in einem Spektralphotometer bei 595 nm gemessen werden.

Es wurde immer eine Doppelbestimmung jeder Probe durchgeführt. Als Proteinstandard wurde eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin (BSA, 1 mg/ml) erstellt. Zur Bestimmung der Proteinmenge in den Proben wurden 2 – 4 µl (1 – 10 µg) der Proteinlösung gemessen. 2µl Standard und die zu bestimmenden Proben wurden mit 200 µl BIO-Rad- Reagenz und 800µl Aqua dest. vermischt. Nach 15 – 20 min Inkubation bei RT wurde jede Probe bei 559 nm mittels eines Photometers gemessen. Die Absorption der Proben wurde mit der des Standards verglichen und daraus die Konzentration bestimmt.

3.2.10.3 Westernblot- Analyse

Im Westernblot werden Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung durch das vertikale Semidry-Verfahren auf eine Polyvinylidendifluorid- Membran (PVDF) transferiert und mittels spezifischer Antikörperbindungen lassen sie sich dort detektieren.

10 bis 20µg Proteine wurden auf ein 4 bis 12% Bis-Tris Gel (Invitrogen) geladen. Die Elektrophorese sowie der Membran-Transfer erfolgten nach der empfohlenen Prozedur der Firma Invitrogen.

20x MES- SDS- Laufpuffer (*Running Buffer*) wurde für die Elektrophorese verwendet und 20x Transferpuffer mit 20% Methanol für das Transferieren der Proteine vom Gel zur Membran. Zuerst wurden die beiden Puffer verdünnt. Zur Trennung der Proteine wurde das Netzgerät für anderthalb Stunden auf 200V und 120mA eingestellt. Für den Proteintransfer wurde eine in 1x Transferpuffer getränkte äquilibrierte Membran auf ein ebenfalls in Transferpuffer getränktes 3mm- Whatmann- Papier gelegt, darauf dann das Gel, und zum Schluss nochmals 3 Lagen getränktes Whatmann- Papier auf das Gel luftblasenfrei aufgelegt. Die Kammer wurde verschlossen und der Proteintransfer erfolgte 2 Stunden bei 0.8 mA/cm² Blotfläche. Nach dem Blotten färbt man die Membran für 1 min in Ponceau-Rot- Lösung, markiert die Banden des

Proteinstandards und entfärbt anschließend die Membran wieder mit 1 x TBS/T. Zur Absättigung unspezifischer Membranbindungsstellen wurde die Membran in einer 5% Milchpulverlösung (W/V in 1 x TBS/T) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran 1 Stunde bei RT in 5 % (W/V) Milchpulverlösung mit dem primären Antikörper (in entsprechender Verdünnung) geschwenkt. Überschüssiger, nicht gebundener Antikörper, wurde durch dreimaliges waschen (10min) in 1 x TBS/T entfernt. Die Membran wurde mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (in jeweiliger Verdünnung, in 5 % Milchpulverlösung) für 45 min bei RT inkubiert und wieder dreimal 10min mit 1 x TBS/T. gewaschen. Spezifisch detektierte Proteinbanden werden mit Hilfe des an den Primärantikörper bindenden, Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörpers durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Die Chemilumineszenz wird von der Meerrettich-Peroxidase unter Anwesenheit von H₂O₂ katalysiert und basiert auf der Oxidation eines Substrats, bei der Licht freigesetzt wird. Hierzu wird die Membran 1min in einer frisch zubereiteten 1:1 Mischung der Reagenzien 1 und 2 des ECL- Chemilumineszenz- Kits (Amersham) inkubiert und anschließend in einer Photokassette mit einem Fuji- Super- RX Röntgenfilm je nach Bandenstärke 30s bis 15min exponiert.

TBST Puffer:

	Tris, pH 7.5	50 mM
	NaCl	150 mM
	Tween-20	0,1%
Ponceau-Rot-	Ponceau S	0.5 % (W/V)
Lösung:	Essigsäure	1 % (V/V)

Antikörperverdünnungen in 5% Milchpulver-Lösung:

Primäre Antikörper

CM5, polyklonaler Antikörper gegen Maus p53	1:1500
Ab-1, polyklonaler Antikörper gegen Maus p19	1:1000
6C5, polyklonaler Antikörper gegen Gapdh	1.5000

Sekundäre Antikörper

Ziege Anti Kanninchen, HRP-konjugiert	1:1000
Ziege Anti Maus, HRP-konjugiert	1.5000

3.2.11 Separation von DNA durch Agarose- Gel- Elektrophorese

Die horizontale Agarose- Gel- Elektrophorese wird zur Reinigung und Charakterisierung von doppelsträngiger DNA eingesetzt. Agarose ist ein aus Seetang extrahiertes, lineares Polysaccharid, das in der Lage ist, eine homogene Gelmatrix zu bilden, deren Dichte durch die Agarosekonzentration definiert wird. Die Migration der negativ geladenen DNA- Moleküle durch das Gel hängt dabei von der angelegten elektrischen Feldstärke, der Ionenstärke des Puffer und der Ionenbeweglichkeit ab. Letztere stellt eine molekulare Funktion der Ladung, Größe und Konformation dar und wird vom Reibungswiderstand, der durch die Porengröße und den Vernetzungsgrad der Gelmatrix geprägt ist, beeinflusst.

Zur Herstellung der Agarosegele wird die erforderliche Menge an Agarose in 1x TBE- Puffer in der Mikrowelle aufgekocht und nach kurzem Abkühlen Ethidiumbromid (Stammlösung: 10mg/ml) in einer Endkonzentration von 1µg/ml Gelvolumen zugegeben. Je nach zu separierenden Fragmentgrößen variiert die Agarosekonzentration zwischen 0.7 – 1.4 %. Die Gellösung wird blasenfrei in eine Vertikalgelkammer gegossen und der Taschenformer eingesetzt. Nach dem Erhärten kann das Gel mit den DNA-Proben, die im Verhältnis 1:6 mit 6x Ladepuffer versetzt worden sind, beladen werden. Die Elektrophorese wird bei einer Spannung von ca. 10 V/cm Elektrodenabstand durchgeführt, dabei verhält sich die Wanderungsgeschwindigkeit linearer dsDNA umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl ihrer Nukleotidpaare. Je nach Gelgröße erfolgt die Elektrophorese für 1-2 Stunden. Die DNA- Moleküle lassen sich durch Bestrahlung mit UV-Licht auf einem Transilluminator lokalisieren, da die Interkalation des Ethidumbromids in die DNA eine unter diesen Bedingungen detektierbare rot-orange Fluoreszenz hervorruft.

10 x TBE:	Tris/HCl	890 mM
	Borsäure	890 mM
	Na ₂ EDTA	200 mM
	pH 8.3	

3.2.12 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren: Messung der optischen Dichte

Spektrophotometrische UV-Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm liefern qualitative und quantitative Angaben über Nucleinsäurelösungen. Für die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA wird das mittlere Absorptionsmaximum der Nucleinsäuren bei 260 nm herangezogen, für das die aromatischen Ringsysteme der Basen verantwortlich sind. Empirisch entspricht eine $A_{260\text{nm}}$ - Einheit (Optische Dichte, OD) 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA, aber nur 40 $\mu\text{g/ml}$ ssDNA oder RNA, da es infolge des zunehmenden Verlustes der Basenpaarung zu einer hyperchromen Absorptionsverschiebung kommt. Damit ergibt sich unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors folgende Formel zur Berechnung der Konzentration von Nucleinsäuren:

$$\hookrightarrow c [\text{pg}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50 \mu\text{g/ml (dsDNA)}$$

$$\hookrightarrow c [\text{pg}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \mu\text{g/ml (ssDNA/RNA)}$$

Die Reinheit der Nucleinsäurelösung kann über das Verhältnis $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ abgeschätzt werden, da sich das Absorptionsmaximum von Proteinen wegen deren aromatischer Seitenketten zu 280 nm verschiebt. Der Quotient einer reinen Nucleinsäurelösung sollte zwischen 1.8 – 2.0 liegen. Die spektrophotometrische Messung im Gene- Quant- RNA/DNA- Calculator erfolgt in Quarzküvetten, die das UV-Licht nicht absorbieren. Bei dieser Methode müssen die Messlösungen auf Absorptionseinheiten zwischen 0.1 – 0.8 verdünnt werden, um Messschwankungen aufgrund nicht homogen gelöster DNA zu vermeiden. Für die Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren auf dem NanoDrop[®] ND-1000 Spektrophotometer wird 1 μl der Nucleinsäurelösung eingesetzt und mit dem NanoDrop 3.1.0 Programm die genaue Konzentration ermittelt.

3.2.13 Präzipitation von DNA

Durch Ethanol lassen sich Nucleinsäuren aus wässrigen Lösungen ausfällen. Zur DNA- Präzipitation mischt man den Reaktionsansatz mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5.5) und 2,5x Volumen 100 % Ethanol. In diesem Gemisch sind die Alkalisalze der DNA praktisch unlöslich und DNA lassen sich als weiße Fasern präzipitieren. Durch Zentrifugation (13500 rpm, 15 min, RT) wird die DNA

sedimentiert. Das Sediment wird mit 250 - 500µl 70 % (V/V) Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (13500 rpm, 10 min, RT) und für 10 - 30 min bei RT je nach Größe des DNA- Pellets getrocknet. Schließlich wird die gefällte DNA im gewünschten TE- Puffer gelöst und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

TE-Puffer: 10 mM Tris
1 mM Na₂EDTA
pH 8.0

3.2.14 Isolierung genomischer DNA

3.2.14.1 Isolierung von gDNA aus ES- Zellen

Um Kontaminationen durch Feederzellen bei der Isolierung von gDNA aus ES- Zellen zu verhindern, wurden die ES- Zellen bei der letzten Passage auf mit Gelatine beschichtete 96-Wellplatten (V-Boden) ausgesät. Sind die Zellen konfluent, wird das Medium entfernt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit 50µl Lyse ersetzt und in den Inkubator bei 37°C über Nacht gestellt. Für die Isolierung der DNA wurden pro Well 50µl eiskaltes Isopropanol zu den lysierten Zellen gegeben, 10min auf dem Schüttler gemischt und bei 2000rpm/15 min bei RT zentrifugiert. Die DNA- Pellets wurden mit 50µl 70%igem Ethanol getrocknet und in 100µl TE- Puffer resuspendiert. Die so vorbereiteten DNA- Proben wurden, um zusätzliche unnötige Arbeitsschritte zu sparen, in der 96-well Platte belassen, und in horizontaler oder vertikaler Reihe gepoolt und dann mittels PCR gescreent.

Die von mir gewählte Verteilung der 96well- Platte ist der Abbildung 14 zu entnehmen.

DNA Lysepuffer: 100mM Tris pH8.5
5mM EDTA
0,2% SDS
200mM NaCl
150µg/ml Proteinase- K (frisch dazugegeben).

3.2.14.2 Isolierung von gDNA aus Schwanzbiopsien

Zur Isolierung der gDNA aus Schwanzenden zur Genotypisierung der Tiere wurden die Biopsien bei 56°C in 500µl 1x Proteinase- K- (1µg/ml)- haltigem Lysepuffer über Nacht aufgeschlossen. Nach Zugabe von 300 µl Phenol- Chloroform- Isoamyl für 2min in der Hand schütteln und mit 13,000rpm (Eppendorf 5415C) 10min zentrifugieren. Dadurch wurde die DNA in die obere Schicht extrahiert. Diese wurde mit 300µl Chloroform gemischt und 10min mit der gleichen Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Überstand wurde in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt und durch die Zugabe von 1/10 3M Natriumacetat und 2,1 (V/V) 100%igem Ethanol Volumen gefällt. Das Ganze wurde dann zentrifugiert (13500 rpm, 20 min, RT). Das Pellet wurde einmal mit 70%igem (V/V) eiskaltem Ethanol gewaschen, für ca. 30min luftgetrocknet und in 30 - 50µl TE- Puffer bei 37 °C unter Schütteln gelöst. Die Konzentration der gDNA wurde mit dem NanoDrop[®] ND-1000 Spektrophotometer (Abschnitt 2.2. 14) ermittelt.

3.2.14.3 Isolierung von Plasmid- DNA in großem Maßstab

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid- DNA wurde das QIAfilter™ Plasmid Maxi- Kit der Firma QIAGEN verwendet. Das Kit basiert auf denselben Prinzipien wie der QIAprep[®]- Spin- Miniprep- Kit. Zur Isolierung von Plasmid- DNA im großen Maßstab wurden zunächst 10 - 15ml eines LB-Mediums mit entsprechendem Selektionsantibiotikum mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft und 8 Stunden bei 37°C geschüttelt. Nach Verdünnung dieser Vorkultur in 300 - 400ml desselben LB-Mediums wurde über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde zentrifugiert (4000rpm, 10min, 4°C) und das Sediment in 10ml Puffer P1 suspendiert. Nach Zugabe von 10ml Lysispuffer P2 wurde vorsichtig gemischt und 5min bei RT inkubiert. Anschließend wurde mit Puffer P3 neutralisiert, gut gemischt, die Suspension in eine Filterkartusche überführt und nochmals 10min bei RT inkubiert. Das Lysat gab man mit Hilfe eines Stempels durch die Filterkartusche auf die mit 10ml Puffer QBT äquilibrierte QIAGEN- Säule. Die Säule wurde zweimal mit je 30ml Puffer QC gewaschen. Die gereinigte Plasmid DNA wurde mit 15ml Puffer QF in ein Corex zentrifugenröhrchen eluiert und durch Zugabe von 10.5ml Isopropanol und Zentrifugation (9000rpm, 30min, 4°C) präzipitiert. Das Sediment wurde mit 5ml 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 - 200µl EB-Puffer gelöst. Die

Konzentration der Plasmid DNA wurde spektrophotometrisch bestimmt (Abschnitt 2.2. 14).

LB-Medium: 25 g Luria Broth Base pro 1 l dH₂O

Puffer P1: 50 mM Tris/HCl
10 mM Na₂EDTA
100 µg/ml RNase A
pH 8.0

Puffer P2: 200 mM NaOH
1% (W/V) SDS

Puffer P3: 3.0 M KaOAc
pH 5.5

Puffer QBT: 750 mM NaCl
50 mM MOPS
15 % (V/V) Isopropanol
15 % (V/V) Triton® X-100
pH 7.0

Puffer QC: 1.0 M NaCl
50 mM MOPS
15 % (V/V) Isopropanol
pH 7.0

Puffer QF: 1.25 M NaCl
50 mM Tris/HCl
15 % (V/V) Isopropanol
pH 8.5

3.2.15 Hydrolyse der DNA durch Restriktionsendonukleasen

Um DNA an spezifischen Stellen innerhalb ihrer Sequenz zu spalten, benutzt man Restriktionsenzyme. Restriktionsendonukleasen sind artspezifische, bakterielle Enzyme, deren Hauptaufgabe im Schutz des bakteriellen Organismus vor Fremd-DNA besteht, wobei die zelleigene DNA durch Modifikation (z. B. Methylierung) der betreffenden Sequenz geschützt bleibt. Restriktionsenzyme besitzen Erkennungssequenzen, die aus einigen wenigen Nukleotiden bestehen und hydrolysieren in dieser Sequenz in jedem Strang eine bestimmte Phosphodiesterbindung. Entstehen nach der Hydrolyse glatte Enden spricht man von „blunt ends“, eine versetzte Spaltung führt zur Bildung sogenannter überhängender Enden „sticky ends“.

Zum Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen wurden die von den Herstellern mitgelieferten Reaktionspuffer unter den empfohlenen Reaktionsbedingungen benutzt. Pro μg dsDNA wurden 2 - 10 U Enzym verwendet, dabei sollte das Enzymvolumen aufgrund des Glyceringehalts der Enzymlösung 10% des Endvolumens nicht überschreiten. Sollte beim Verdau mit mehreren Enzymen kein gemeinsamer Reaktionspuffer gefunden werden, fällt man die DNA (Abschnitt 2.2.13) zwischen beiden Schritten. Der Abbruch der Enzymreaktion erfolgt, wenn möglich, durch Hitzeinaktivierung. Die enzymatische Spaltung wurde durch Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 2.2.11) überprüft.

3.2.16 Die Polymerase- Kettenreaktion

3.2.16.1 Prinzip der PCR

Die Polymerase- Kettenreaktion (PCR) dient der hochspezifischen, enzymatischen *in vitro* Amplifikation von definierten DNA- Fragmenten. Das Prinzip dieser „zellfreien Vermehrung“ beruht auf der repetitiven Temperaturabfolge des folgenden dreistufigen Prozesses:

- Thermische **Denaturierung** der dsDNA- Matrizen in Einzelstränge
- **Hybridisierung** (Annealing) der verwendeten Oligonukleotidstartsequenzen (Primer) an die jeweils komplementären Zielregionen auf den DNA- Einzelsträngen

- **DNA- Kettenverlängerung** (Elongation) durch die von der DNA-Polymerase katalysierte Addition der 4 dNTP's nach der Matrizensequenz an das von den angelagerten Primern bereitgestellte 3'-OH Ende

Ideale Reaktionsbedingungen sind ausschlaggebend für die Effizienz, die Spezifität und die Amplifikationspräzision der PCR. So beeinflussen die Auswahl und Konzentration der einzelnen Reaktionskomponenten (Polymerase, Mg^{2+} , dNTPs, DNA-Matrize, Primer), die Puffer- und Systembedingungen (pH- Wert) sowie die Zeiten und Temperaturen der einzelnen Zyklusschritte im Temperaturprogramm den Erfolg der Reaktion. Konformation, Konzentration, Basenzusammensetzung und Präparation der DNA-Matrize spielen bei der PCR ebenfalls eine wichtige Rolle. Alle 4 Nukleotide müssen in exakt gleicher Konzentration vorliegen, ansonsten wird ein Fehleinbau gefördert. DNA-Polymerasen benötigen freie divalente Magnesiumionen als Cofaktoren beim Einbau der Nukleotide.

Die PCR- Amplifizierungen wurden wie folgt angesetzt:

Reaktionsmischung für PCR:

Genomische DNA oder cDNA	1µl (minimale Menge war 10ng)
2x Ready mix™ RedTaq™ PCR-Reaktionsmix	1x:
Tris-Hcl, pH8,3	20 mM
KCL	100 mM
MgCl	3 mM
Gelatine	0,002%
dNTP	0,4 mM
Taq- DNA- Polymerase	0,06U/µl
Primer vorwärts	0,2 µM
Primer rückwärts	0,2 µM
Wasser	auf 50µl aufgefüllt

Die PCR- Reaktanten wurden in der PCR- hood pipettiert, auf Eis gelagert und in die PCR Maschine (Master- Cycler) gestellt. Dort startete die Reaktion mit einer DNA-Denaturierung (5min bei 94°C). Diese wurde mit 40 Zyklen (94°C für 1min, 60°C für 1min und 72°C für 1min) amplifiziert, am Ende wurde die Reaktion mit einem Elongations-Schritt (5 bis 10min, je nach PCR-Produktgröße) bei 72°C abgeschlossen.

3.2.16.2 Duplex PCR

Ein anderes, verwendetes PCR-Verfahren bezeichnet man als Duplex-PCR. Der wesentliche Unterschied der Duplex-PCR besteht darin, dass zwei Paare Primer in einer Reaktion verwendet werden. Daher wurde die Reaktionsmischung wie folgt pipettiert:

Genomische DNA oder cDNA	1µl (minimale Menge war 10ng)	
2x Ready mix™ RedTaq™ PCR-Reaktionsmix	1x:	
Tris-Hcl, pH8,3	20 mM	
KCL	100 mM	
MgCl	3 mM	
Gelatine	0,002%	
dNTP	0,4 mM	
Taq- DNA- Polymerase	0,06U/µl	
Primer vorwärts	0,2 µM	} Primer Paar 1
Primer rückwärts	0,2 µM	
Primer vorwärts	0,2 µM	} Primer Paar 2
Primer rückwärts	0,2 µM	
Wasser	auf 50µl aufgefüllt	

Das Duplex-PCR-Verfahren ist sehr geeignet für die Analyse heterogener DNA, deshalb wurde es für die Genotypisierung heterozygoter Mäuse verwendet. Jedes Primerpaar bindet spezifisch an ein Allel der DNA und ermöglichte damit deren Amplifizierung.

Die ausgesuchten Primerpaare sollten ähnliche Annealing-Temperaturen haben, um die Reaktion zu vereinfachen.

Die PCR-Reaktion erfolgte mit dem folgenden Programm:

Denaturierung	94°C	5 min	
Amplifikation			
Denaturierung	94°C	1 mn	} x 40 Zyklen
Annealing	60°C	1 mn	
Elongation	72°C	5 mn	

Mit einer Gelelektrophorese wurden die amplifizierte DNA geprüft.

3.2.16.3 Etablierung der Oligonukleotidstartsequenzen

Zur Etablierung der Oligonukleotidsequenzen wird das Programm Oligo eingesetzt. Die Sequenzen der eingesetzten Startmoleküle sind aus den flankierenden Bereichen des zu amplifizierenden DNA-Fragments abgeleitet und liegen auf den Matrizensträngen. Die Erstellung basiert auf einer Reihe empirischer, in nachfolgender Tabelle zusammengestellter Regeln:

Tabelle 4: Empirische Regeln für die Erstellung geeigneter Oligonukleotide

Eigenschaft	Optimales Design	Begründung
Basenzusammensetzung	spezifische Sequenz	spezifische Amplifikation
	GC-Gehalt von 50 – 60 %	gutes und spezifisches Annealing
	Keine repetitiven Sequenzfolgen	Vermeidung unspezifischer Produkte
Länge	nicht zu lange (18 – 24 bp)	sonst schlechte Hybridisierung und zu lange Annealingzeit
Sekundärstruktur	keine Palindrome	Haarnadelstrukturen aufgrund selbstkomplementärer Rückfaltung
	keine Intra-/Interkomplementarität	Primer-Dimer-Artefakt-Bildung
	ähnliche T_m	Produktspezifität, da ideale Hybridisierung

In der Regel werden Hybridisierungstemperaturen von bis zu 5 °C unter der Schmelztemperatur (T_m) der Oligonukleotide gewählt, wobei die PCR- Reaktion allerdings immer für das eingesetzte Primerpaar und die spezielle PCR- Methode optimiert werden muss. Die T_m von Startsequenzen mit 15 – 20 Nukleotiden lässt sich empirisch mit der „Wallace-Regel“ berechnen (n = Anzahl eines Basentyps):

$$\hookrightarrow T_m [^{\circ}\text{C}] = 2 (A_n + T_n) + 4 (G_n + C_n)$$

Bei einer zu hohen Anlagerungstemperatur erfolgt keine ausreichende Hybridisierung und Amplifikation der DNA, während eine zu tiefe Temperatur die unspezifische Anlagerung, und damit die Vermehrung unerwünschter Sequenzen fördert.

3.2.17 **Aufreinigung des PCR- Produktes**

Zur Aufreinigung des PCR- Produkts wurden die MiCROCON-100 oder -50 Filter der Firma Millipore verwendet. Sie bieten neben der Schnelligkeit der Aufreinigung auch die gleichzeitige Entsalzung des PCR- Produktes. Wegen der geringen Porengröße werden während der Zentrifugation nur Nukleotide und Primer durchgelassen, während die PCR- Produkte auf dem Filter verbleiben (Porenausschlußgröße). Für die Aufreinigung wurde ein 100µl Ansatz mit sterilem Aqua bidest. hergestellt, auf 500µl aufgefüllt und in einer Eppendorf 5414S Tischzentrifuge für 8min bei 3500rpm (MC-100) oder 6min bei 14,000rpm (MC-50) zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und der Filter nochmals mit 500µl Aqua bidest. gewaschen. Mit ca. 20 - 50µl, je nach im MC-Filter verbleibenden Volumen, wurde die Membran benetzt und das MICROCON- Filter umgedreht in ein Eppendorf- Reaktionsgefäß gestellt. Durch eine Zentrifugation mit 3500rpm für 3min (MC-100) oder (MC-50) wurde die gelöste DNA wiedergewonnen.

3.2.18 **Sequenzierung der DNA**

3.2.18.1 *Cycle Sequencing*

Die Sequenzierung wurde mit Hilfe des ABI PRISM[®]- BigDye[™]- Terminator- Cycle-Sequencing- Ready- Reaction- Kit der Firma PE Biosystems basierend auf der Dideoxy- Methode von SANGER durchgeführt. Grundlage stellt die kontrollierte Unterbrechung der enzymatischen Replikation durch die Anwesenheit eines definierten Gemisches an Desoxy- (dNTP's) und 2'-3'-Dideoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs) in der Polymerisierungsreaktion dar. Sobald ein 2'-3'-Dideoxynanalogon eingebaut worden ist, kommt es zur Blockierung des Kettenwachstums, da keine 3'-OH Gruppe mehr zur Knüpfung der nächsten Phosphodiesterbindung zur Verfügung steht. Zur Detektion der verschieden langen Abbruch- Fragmente sind die 4 ddNTP's über einen Linkerarm mit 4 verschiedenen, hochsensitiven Rhodaminfluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Reaktion ist dadurch in einem einzigen Ansatz durchführbar. Außer den Oligonukleotidsequenzen enthält der „BigDye“ Terminator- Ready- Reaction- Mix des verwendeten Reaktionskits, neben den ddNTP's und dNTP's, sämtliche für eine PCR- Reaktion notwendigen Komponenten inklusive einer thermostabilen AmpliTaq[®]DNA Polymerase-FS (= Fluoreszenz Sequenzierung).

Für die Sequenzierung von DNA- Sequenzen wurde folgender Ansatz hergestellt:

Oligonukleotid (10mol/μl)	0,2μM
BigDye“ Terminator- Ready- Reaction- Mix	4μl
aufgereinigte PCR- Produkt- DNA (Abschnitt 2.2.17 <i>Microcon extraktion</i>)	14μl
Wasser	auf 20μl aufgefüllt

Der Ansatz der Sequenzierungsreaktion wurde im Thermocycler in Abhängigkeit von der Startsequenzlänge unter folgenden Bedingungen durchgeführt ➤ *Tabelle*.

Tabelle 5: Temperaturprogramm des DNA- Cycle sequencing

	18 – 20	20 - 24	Zykluszahl
Denaturierung	96°C, 15s	96°C, 15s	30
Annealing	55°C, 8s	58°C, 8s	
Elongation	60°C, 1min	60°C, 1min	

Nach beendeter Reaktion wird die DNA mit 75μl dH₂O verdünnt, mit EtOH/NaOAc präzipitiert (Abschnitt 2.2. 13) oder mit Hilfe der Centri-Sep Säulen aufgereinigt.

3.2.18.2 *Aufreinigung mit Centri-Sep Säulen*

Anschließend wurde das Produkt der Sequenzierungsreaktion mit Hilfe von CentriSep- Säulen (Princeton, Applied Biosystems) von überschüssigen markierten ddNTP gereinigt. Die Centri-Sep Aufreinigung erfolgte nach dem unten beschriebenen Protokoll:

Zu Beginn wurde auf jede verwendete Säule 750μl steriles Aqua bidest. pipettiert und wenige Male mit geschlossenem Deckel invertiert, bis sich eine homogene Gelschicht gebildet hatte. Die Säule wurde dann mindestens 30 min bei Raumtemperatur hydratisiert. Falls Luftblasen entstanden waren, wurde die Säule solange geschüttelt und invertiert, bis sie verschwunden waren. Zur Verwendung wurde nun erst der Deckel und dann der untere Verschluss der Säule entfernt und diese auf einen

Waschreaktionsgefäß gesetzt. Ca. 200 - 250µl Wasser sollte aus den Säulen getropft sein, bevor sie verwendet wurden.

Die Flüssigkeit wurde verworfen, die Säule ein weiteres Mal aufgesetzt und für 2 min bei 3000rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Waschgefäß mit der Flüssigkeit verworfen und die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt. Sofort wurden nun 20µl des *Cycle-sequencing* Produkts in die Mitte des Gelbettes geladen, um ein Austrocknen der Säule zu verhindern. Es folgte eine Zentrifugation von 2 min bei 3000rpm. Beim Einsetzen der Säulen muss der höchste Punkt der Gelmatrix zur Außenseite des Rotors zeigen.

Nachdem das *Cycle-Sequencing* Produkt mittels Centri-Sep-Säule aufgereinigt war, wurden 4µl davon mit 20µl TSR („Template Suppression Reagent“) in einem speziellen Analysegefäß gemischt. Präzipitierte aber das *Cycle-Sequencing* Produkt, wurde das Sediment in 20µl TSR („Template Suppression Reagent“) gelöst und in ein spezielles Analysegefäß überführt und anschließend durch Hitze denaturiert (2min bei 94°C). Der TSR- Probenpuffer unterstützt die DNA- Denaturierung und stabilisiert die Proben während einer längeren Lagerung. Außerdem verhindert der Puffer das Eindringen hochmolekularer Verbindungen in die Kapillare und damit deren Verstopfung bei der automatischen Sequenzierung.

Die automatische Sequenzierung erfolgte auf dem ABI- PRISM 310 Genetic-Analyser von PE Biosystems. Das Prinzip basiert auf der Trennung der Proben über Kapillarelektrophorese und dem fluoreszenzgekoppelten Nachweis des multifluorophormarkierten Systems durch Laser-Detektions-Technologie. Bei der Sequenzanalyse wurden die Proben nach der elektrokinetischen Injektion in eine mit viskosem Trenn-Polymer (BigDye POP-6) gefüllte Kapillare gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Trennwirkung beruht dabei auf der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität der verschieden großen, gelösten und fluoreszenzmarkierten DNA- Fragmente. Mit Hilfe von monochromatischem Laserlicht lassen sich die Fluorophore anregen, so dass es zur Emission des längerwelligen Fluoreszenzlichts kommt. Dieses wird detektiert, über eine im Gerät integrierte Elektronik digitalisiert und zur Auswertung auf einen MacIntoshTM-Computer übertragen. Die Elektropherogramme der sequenzierten DNA- Proben wurden mit dem Analyseprogramm „Sequencing Analysis 3.3“ analysiert und bearbeitet.

Tabelle 6: PCR Primer für die Sequenzierung genomischer humaner p53 DNA

Exon	Primer	Sequenzen in 5'->3' Richtung	Produktgröße
4	GC4F	GTCCTCTGACTGCTCTTTTCACCCATCTAC	368 bp
	GC4R	GGGATACGGCCAGGCATTGAAGTCTC	
	polymorph F	TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA	200 bp
	polymorph R	TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC	
	Arg F	TCCCCCTTGCCGTCC CAA	141 bp
	Arg R	CTGGTGCAGGGGCCACGC	
	Pro F	GCC AGAGGCGTCCCCC	171 bp
	Pro R	CGTGCAAGTCACAGACTT	
5	GC5F	CTTGTGCCCTGACTTTCAACTCTGTCTC	272 bp
	GC5R	TGGGCAACCAGCCCTGTCGTCTCTCCA	
6	GC6F	CCAGGCCTCTGATTCTCACTGATTGCTC	204 bp
	GC6R	GCCACTGACAACCACCCTTAACCCCTC	
7	GC7F	GCCTCATCTTGGGCCTGTGTTATCTCC	175 bp
	GC7R	GGCCAGTGTGCAGGGTGGCAAGTGGCTC	
8	GC8F	GTAGGACCTGATTTCTTACTGCCTCTTGC	241 bp
	GC8R	ATAACTGCACCCTTGGTCTCCTCCACCGC	
9	GC9F	CACTTTTATCACCTTTCCTTGCTCTTTCC	146 bp
	GC9R	AACTTCCACTTGATAAGAGGTCCCAAGAC	

Tabelle 7: PCR- Primer für die Sequenzierung genomischer Maus- p53- DNA

Exon	Primer	Sequenzen in 5'->3' Richtung	Produktgröße
Exon 2-3	me2F	ATGACTGCCATGGAGGAGTC	390 bp
	m e3R	AGGATATCTTCTGGAGGAA	
Exon 4	m e4F	TCACCTCACTGCATGGACG	382 bp
	m i 4R	TCTCTCTCTCTTCCAGTAC	
Exon 5	mi4F	AGTTCCCCACCTTGACACCT	329 bp
	me5R	AGAGCAAGAATAAGTCAGAA	
Exon 6	mi5F	ACTGGCAGCCTCCCATCTCCC	204 bp
	me6R	GTCAACTGTCTCTAAGACGCA	
Exon 7	mi6F	TGTAGTGAGGTAGGGAGCGAC	205 bp
	me7R	CTGGGGAAGAAACAGGCTAA	
Exon 8	mi7F	CTGCCTTGTGCTGGTCAATT	244 bp
	me8R	AGGAGAGAGCAAGAGGTGACT	
Exon 9	mi8F	TGAGCTTCACCCCAAAGTCA	168 bp
	me9R	GCAATAATGGGTACAGCTTG	
Exon 10	mi9F	CTTGTCCAGTGCTTCCATCT	151 bp
	me10R	GCTGGAGTGAGCCCTGCTGT	

Tabelle 8: PCR Primer für die Sequenzierung der p53, p19 ARF und Egr1 cDNA

Gen	Primer	Sequenzen in 5'->3' Richtung	Produktgröße
p53 Exon 2-11	mp53e2F	ATGACTGCCATGGAGGAGTC	1,2 kbp
	mp53e11R	TCAGGCCCCACTTTCTTGAC	
p19 ARF Exon 1-2	p19-F1	CTTGGTCACTGTGAGGATTC	568 bp
	P19ex2-R1	TGAGGCCGGATTTAGCTCTGCTC	
Egr1 Exon 1-2 (Teil)	Egr1 F4	GTGTGCCCTCAGTAGCTTC	2,2 kbp
	Egr1 R4	TGAGGTGCTGAAGGAGCTG	

3.2.19 Überprüfung des Allel- Verlustes eines Gens

Die DNA- Sequenz des INK4a/ARF Locus (*Accession No.* AL831719) codiert durch den alternativen *Splicing*- Prozeß für die zwei Tumorsuppressoren P16 und P19 ARF. Der Locus besteht aus drei Exons, Exon 1 β , Exon 2 und Exon 3. Zur Untersuchung des Verlustes des 19 ARF Allels wurden die drei Exons mittels klassischem PCR-Verfahren überprüft.

Genauso wurde das aus zwei Exons bestehende Gen Egr1 (*Accession No.* MN007913) auf Verlust eines Allels überprüft.

Tabelle 9: PCR Primer für die Überprüfung der p19 ARF und Egr1 LOH

Exon	Primer	Sequenzen in 5'->3' Richtung	Produktgröße
Exon 1 β	p19 Ex1-F	GTCACAGTGAGGCCGCGCT	131 bp
	p19Ex1-R	TGGTCCAGGATCCGGTGC	
Exon 2	p19Ex2-F	TTAACAGCGGAGCTTCGTAC	452 bp
	p19Ex2.R	TTTGGACCAACTATGCTCACC	
Exon 3	p19Ex3-F	GGAGACTCCAGATCCCATTAG	965 bp
	p19Ex3-R	ATGGCTGTTGTGACTGACG	

3.2.20 Analyse der RNA

3.2.20.1 Isolierung von Gesamt- RNA aus Gewebekulturzellen

Die Extraktion von RNA aus Gewebekulturzellen erfolgte mittels RNeasy- Mini- Kit (Qiagen).

Die Zellen wurden einen Tag vor der RNA- Extraktion in 60mm oder 100mm Zellkulturschalen ausgesät. Das Medium wurde abgesaut, die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und direkt mit 350µl bzw. 600µl RLT- Lyse- Puffer (mit zusätzlich 1% β-Mercaptoethanol) lysiert. Mit einem Zellschaber wurden die Zelllysate in die QIAshredder™ Säulen gesammelt und 2min bei RT mit 13,000rpm zentrifugiert. Die durch die Säule erhaltene Lösung wurde sofort für die RNA- Isolierung oder für eine spätere Verwendung für mehrere Tage bei -80°C gelagert.

Die zentrifugierte Lösung wurde 1:1 mit 70% Ethanol vermischt, in die RNeasy- RNA- Säulen pipettiert und 15sec bei 10,000rpm zentrifugiert. 350µl RW1 Puffer wurde zur Säule addiert und nochmals wie vormals zentrifugiert. Die auf der Säule gebundene DNA wurde mit 80µl DNase- Lösung (10µl DNase I Stock Lösung und 70µl RDD Puffer von Qiagen RNase-freie DNase Set) 15min bei Raumtemperatur abgebaut. Die Säule wurde nochmals mit 350µl RW1 Puffer gewaschen. Danach wurde sie auf ein neues Reaktionsgefäß gestellt, und 500µl RPE-Puffer (vor Gebrauch mit Ethanol vermischen) addiert und das Ganze dann 15sec bei 10,000rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt, allerdings wurde 2min bei 14,000rpm zentrifugiert. Danach wurde nochmals ein frisches Eppendorf- Tube unter die Säule gestellt, 35µl RNase- freies Wasser hinzupipettiert und 1min bei 14,000rpm zentrifugiert. Dadurch wurde die RNA eluiert.

Die RNA Menge wurde mit einem Spektrophotometer bei 260nm bestimmt (Abschnitt 2.2.12). Die RNA- Qualität wurde dagegen mit der Gel- Elektrophorese überprüft.

3.2.20.2 Reverse Transkription von RNA zu Einzelstrang-cDNA Reverse Transkription mit AMV reverse Transkriptase

Für die reverse Transkription von RNA in einzelsträngige cDNA wurde der Reverse-Transkriptionskit der Firma Promega verwendet. Die AMV Reverse Transkriptase, eine RNA- abhängige DNA- Polymerase des Murinen Leukämie Virus, katalysiert die reverse Transkription der RNA in komplementäre DNA. Als Startsequenz dient ein großer Überschuß an Thymin-Oligomeren aus 16 Nukleotiden, welche an die Poly-

(A)-Sequenz am 3'-Ende eukaryontischer RNA hybridisieren. So wird gewährleistet, dass nur polyadenylierte mRNA- Sequenzen in cDNA umgeschrieben werden. Bei geeigneten Reaktionsbedingungen erfolgt dann unter Verwendung der 4 dNTPs die Synthese des cDNA- Einzelstranges.

Für die reverse Transkription der RNA in cDNA wurden 2µg Gesamt-RNA (Abschnitt 2.2.20) mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 10µl eingestellt und 10min zur Auflösung von Sekundärstrukturen bei 70°C erhitzt. Nach 5 Minuten Abkühlen auf Eis wurden 10µl des reversen Transkriptionsmix zugegeben, vermischt und 30min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde nach Erhitzen auf 95°C für 5 min auf Eis gestellt.

Reaktionsmix:

Totale RNA	2µg
MgCl ₂	5mM
10x reverser Transkriptionspuffer	
{ Tris-Hcl pH 9,0	100mM
{ KCl	500mµ
{ Triton® X-100	1%
dNTP	1mM
Rekombinant Rnasin® Ribonuklease Inhibitor	10U
AMV reverse Transkriptase	15U
Oligo (dT) Primer ₁₅	0.5µg
RNase- freies Wasser	auf 20µl aufgefüllt
rekombinant RNasin® Ribonuklease Inhibitor	10U
M-MuL V reverse Transkriptase	200U
Oligo(dT) ₁₅ Primer	0.5µg
RNase- freies Wasser	auf 20µl aufgefüllt

3.2.21 Quantitative LightCycler® real time PCR

Für die quantitative Analyse wurde anstelle der konventionellen PCR ein Real- Time-PCR- System eingesetzt (Light- Cycler von Roche).

Hierfür verwendet man den Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I. Dieser Fluorophor hat die Eigenschaft, unspezifisch in Doppelstrang- DNA zu interkalieren (Abbildung 15). Dies führt mit fortschreitender PCR- Reaktion zu einem Anstieg des Fluoreszenzsignals. Bei Verwendung von SYBR-Green I fehlt allerdings die Spezifität hinsichtlich des zu untersuchenden Templates, da auch Primer- Dimere oder Nebenprodukte, die sich während der Reaktion bilden, einen Fluoreszenzanstieg verursachen. Dieser ist zunächst nicht von dem des spezifischen Produkts zu unterscheiden. Eine Differenzierung zwischen spezifischem Produkt und Primer-Dimeren oder Nebenprodukten kann erst nach Abschluss der PCR- Reaktion mittels einer Schmelzpunktkurvenanalyse erfolgen. Bei dieser werden die PCR- Produkte kontinuierlich über einen bestimmten Temperaturbereich aufgeheizt, bis sie ihrem Schmelzpunkt entsprechend nur noch als Einzelstrang vorliegen. Die damit verbundene Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet. Kleinere Fragmente wie z.B. Primer- Dimere weisen einen niedrigeren Schmelzpunkt auf als die spezifischen PCR- Produkte.

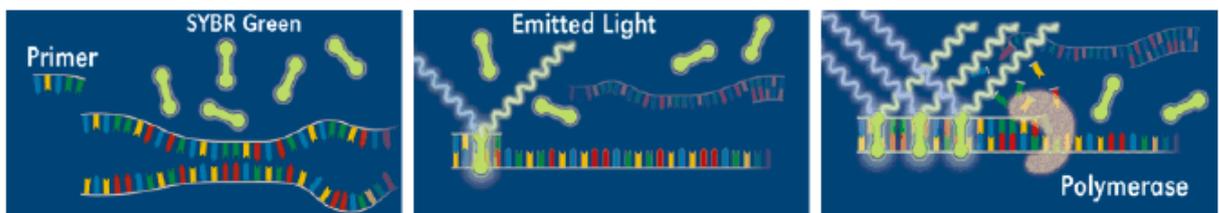


Abbildung 15: Entstehung eines Fluoreszenzsignals.

Der Fluoreszenzfarbstoff SYBRGreen I bindet an doppelsträngige DNA. Bei diesem Vorgang wird Licht emittiert, welches zur Quantifizierung des PCR-Produktes kontinuierlich durch eine Photozelle detektiert werden kann (Quelle.<http://www.biochemroche.com/lightcycler/>).

Der Reaktionsansatz benötigt das LightCycler® DNA- Master- SYBRGreen I®, das ein Gemisch von PCR- Bestandteilen wie dNTPs, Taq-Polymerase und das SYBRGreen I® enthält. Dazu wurden Aqua bidest. und Primer hinzugegeben. Ein

zweites ReaktionsKit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG der Firma Invitrogen wurde auch verwendet. Es besteht aus einem Gemisch von Platinum Taq-Polymerase, dNTPs, Mg₂Cl₂, KCl, Tris-HCl (pH 8,4) und SYBR® Green I. Dazu wurden Aqua bidest., BSA und Primer gegeben.

Die Auswertung der Light Cycler-Daten erfolgte mittels einer Standard Kurve mit spezifischen Primern für das Haushaltsgen Cyklophilin A; diese bestand aus fünf Verdünnungstufen einer Verdünnungsreihe von jeweils 1/10 bis 1/10⁵. Die Schmelztemperatur der entstandenen PCR-Produkte wurde mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse ausgewertet. Dieser liegt eine Bewertung der Fluoreszenzintensität in Bezug zur Temperatur zugrunde. Mit steigender Temperatur sinkt die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffes aufgrund abnehmender Doppelstrang-DNA (Abbildung 16).

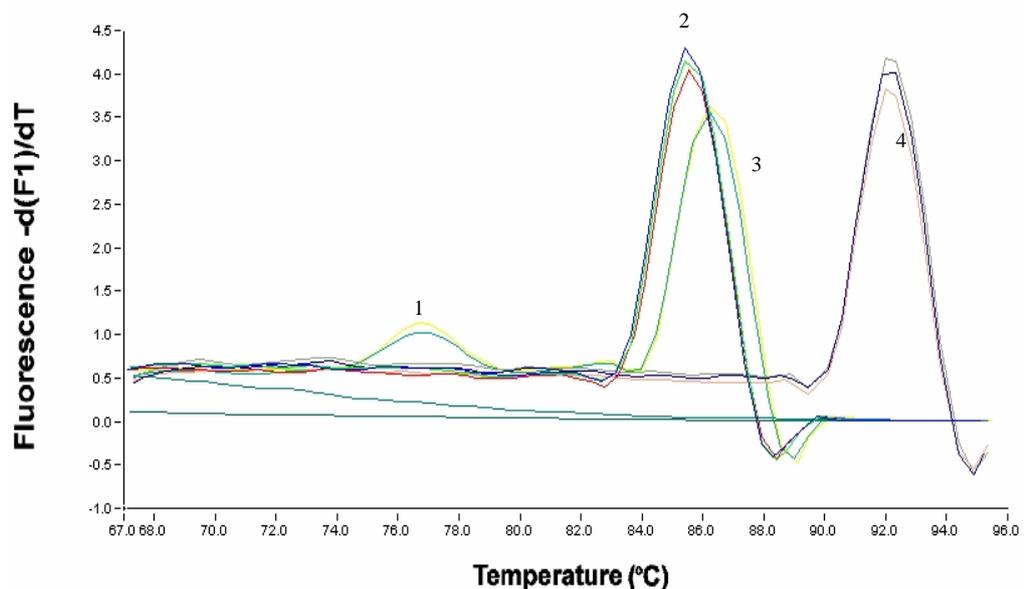


Abbildung 16: Entstehung einer Schmelzkurve in der LightCycler® real time PCR.

Die dargestellten, bei verschiedenen Temperaturen entstandenen Schmelzkurven sind jeweils von Perp (2), p53 (3) und p21 WAF (3). Der kleine Hügel (1) zeigt hier den Primer-Dimer.

Zwei Kits wurden für das Light- Cycler verwendet, das Erste: LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I der Firma Roche und der Zweite Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG von Invitrogen.

LightCycler® real time PCR-Reaktion:

Die Reaktionsmischung der LightCycler® real- time PCR:

Fast DNA Master SYBR Green I Mix (Roche)	2 µl
--	------

Die gemischten a und 1b Reagenzien des Kits sollen nicht länger als 7 Tagen verwendet werden!

MgCL ₂	3 mM
-------------------	------

Primer vorwärts	0,5 µM
-----------------	--------

Primer rückwärts	0,5 µM
------------------	--------

Aqua bidest.	auf 8µl aufgefüllt
--------------	--------------------

cDNA 1/10 verdünnt	2 µl
--------------------	------

LightCycler® real time PCR- Reaktion:

Die Reaktionsmischung der LightCycler® real time PCR:

Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG 5 µl

20x BSA	0,5 µl
---------	--------

Primer vorwärts	10 µM
-----------------	-------

Primer rückwärts	10 µM
------------------	-------

Aqua bidest.	auf 8µl aufgefüllt
--------------	--------------------

cDNA 1/10 verdünnt	2 µl
--------------------	------

Nachdem die RNA extrahiert, sowie die cDNA daraus hergestellt war (Abschnitt 2.2.20.2), wurde diese 1/10 mit Wasser verdünnt.

Die 8µl der Reaktionsmischung der LightCycler® real time PCR wurden in die LightCycler® Kapillaren pipettiert.

Die 2µl cDNA der verdünnten Proben wurden in jeweils eine Kapillare dazugegeben. Diese wurden dicht verschlossen und kurz bei 3,000rpm zentrifugiert. Das Proben-Karussell wurde dann in den Light- Cycler Apparat gestellt und gestartet.

Die PCR-Reaktion erfolgte mit den folgenden Programmen:

I. Denaturierung	95°C	10min	
Quantifizierung			
Denaturierung	95°C	5min	} x 45 Zyklen
Annealing	60°C	5sec	
Elongation	72°C	10sec	

Die Schmelzkurve wurde anhand des folgenden Temperaturschemas erstellt:

Temperatur 1	95°C	0sec
Temperatur 2	65°C	15sec
Temperatur 3	98°C	0sec

Die PCR- Reaktion endete mit einer Abkühlungstemperatur von:

Temperatur	40°C	30sec
------------	------	-------

II. Denaturierung	50°C	2min
	95°C	2min

Quantifizierung			
Denaturierung	95°C	15sec	} x 45 Zyklen
Annealing	55°C	10sec	
Elongation	72°C	10sec	

Die Schmelzkurve wurde anhand des folgenden Temperaturschemas erstellt:

Temperatur 1	95°C	0sec
Temperatur 2	65°C	15sec
Temperatur 3	98°C	0sec
Temperatur 4	40°C	0sec

Die verwendeten Primer für die Quantitative LightCycler® PCR sind in der Tabelle 10 angegeben.

Tabelle 10: Primer für die LightCycler® real time PCR

Primer	Sequenzen in 5'->3' Richtung	Gen	Produktgröße
mp53 -F1 mp53-R1	CACGTGCTCACCCCTGGCTAA CAGGATATCTTCTGGAGGAA	p53	260 bp
mp21-F mp21-R	CGGTCCCGTGGACAGTGAGC AAATCTGTCAGGCTGGTCTGCC	p21/WAF	372 bp
mperp-2-F mperp-2-R	GTTCTTCGCCCTGTGTGGAC CAGCAGGGTTATCGTGAAGC	PERP	150 bp
mBax-F1 mBax-R1	TTTGCTACAGGGTTTCATC TCCATATTGCTGTCCAGTTC	BAX	150 bp
mNoxa-F mNoxa-R	TGAGCTGTGATAACGTGAAAC CAATCCCAAACGACTGCC	Noxa	199 bp
megr1-F megr1-R	GAGTGATGAACGCAAGAGG AGGAGAGGAGTAGGAAGTGG	Egr1	
p19ARF-F1 p19ARF-R2	CTTGGTCACTGTGAGGATTC CGGGAGAAGGTAGTGGGGTC	p19ARF	265 bp
Cyclo F-3 Cyclo R-3	TGCTGGACCAAACACAAAC CCATTCTGGACCCAAAAC	Cyclophilin A	144 bp
G3F G3R	ACACCAGTAGACTCCACGACA TCATTGACCTCAACTACATGG	Gapdh	193 bp

3.2.22 Arbeiten mit Tieren

Tierhaltung und Tierzucht

Die Tierhaltung und Tierzucht erfolgte im zentralen Tierlabor des DKFZ unter Aufsicht der Mitarbeiter des zentralen Tierlabors (ZTL). Dabei wurden die Tiere in einem künstlichen Tag- und Nachtrhythmus bei konstanter Temperatur von etwa 21°C und relativer Luftfeuchtigkeit von 50–60 % gehalten. Alle Mäuse erhielten Altromin Standardtrockenfutter und Wasser *ad libitum*. Die Männchen wurden nach der Verpaarung einzeln gehalten. Schwangerschaften wurden anhand der Plaquebildung überprüft. Jungtiere wurden 4 Wochen nach der Geburt von der Mutter getrennt. Die exakte Identifizierung der einzelnen Tiere gewährleisteten Ohrmarken. Für die Genotypisierung (Isolierung der genomischen DNA) wurde den Mäusen ca. 0,5cm des Schwanzendes abgeschnitten.

4. ERGEBNISSE

4.1 SPONTANE IMMORTALISIERUNG DER PRIMÄREN, EMBRYONALEN MAUS UND *HUPKI* ARGININ FIBROBLASTEN (MEFs UND HUFs R/R)

Drei verschiedene, voneinander unabhängige *in vitro* Experimente wurden durchgeführt, in denen zwei primäre, embryonale Fibroblastenpopulationen mit unterschiedlichen p53 Genen verwendet wurden. Bis zur Überwindung der Seneszenz sowie der kritischen Phase und bis zum Eintritt der Immortalisierung wurden die gleichen Zellkulturbedingungen verwendet. Es zeigten sich dabei unterschiedliche Immortalisierungsraten.

Die verwendeten primären embryonalen Fibroblasten stammten von 13,5 Tage alten Maus Embryonen unterschiedlicher p53 Genotypen: Maus p53 wildtyp (129/Ola oder 129/sv) und humane p53 Arginin *knock in* (*Hupki* Arginin) Maus (129/Ola) (Luo *et al.*, 2001a).

Die Maus- p53- wildtyp Populationen wurden als „MEFs“ und die mit der *Hupki* p53 Arginin Variante als „Arginin HUFs“ oder „HUFs R/R“ bezeichnet.

Die Zellzahl der Ausgangszellpopulationen stellt die einzige Variation innerhalb der drei voneinander unabhängigen Experimente dar (Tabelle 11a und b).

Bei jedem Experiment wurden die HUFs R/R und MEFs in Passage 2 (p2) in 6-Lochplatten verteilt. In der ersten Woche mussten die Zellen im Abstand von 2 bis 3 Tagen trypsiniert und 1:3 verdünnt werden; nachdem aber die Fibroblasten in die Seneszenz eintraten, wurde das frische Medium mit zusätzlich 10% Serum so lange regelmäßig dazu gegeben, bis Zelllinien durch eine spontane Immortalisierung entstanden. Die MEFs und die HUFs R/R zeigten ein unterschiedliches Verhalten Ergebnisse in der Immortalisierungsrate (Abbildung 17).

90% der HUFs R/R und nur 10% der MEF Zellpopulationen wurden immortalisiert. Dagegen aber starben nur 10% der HUFs R/R- aber 90% der MEFs.

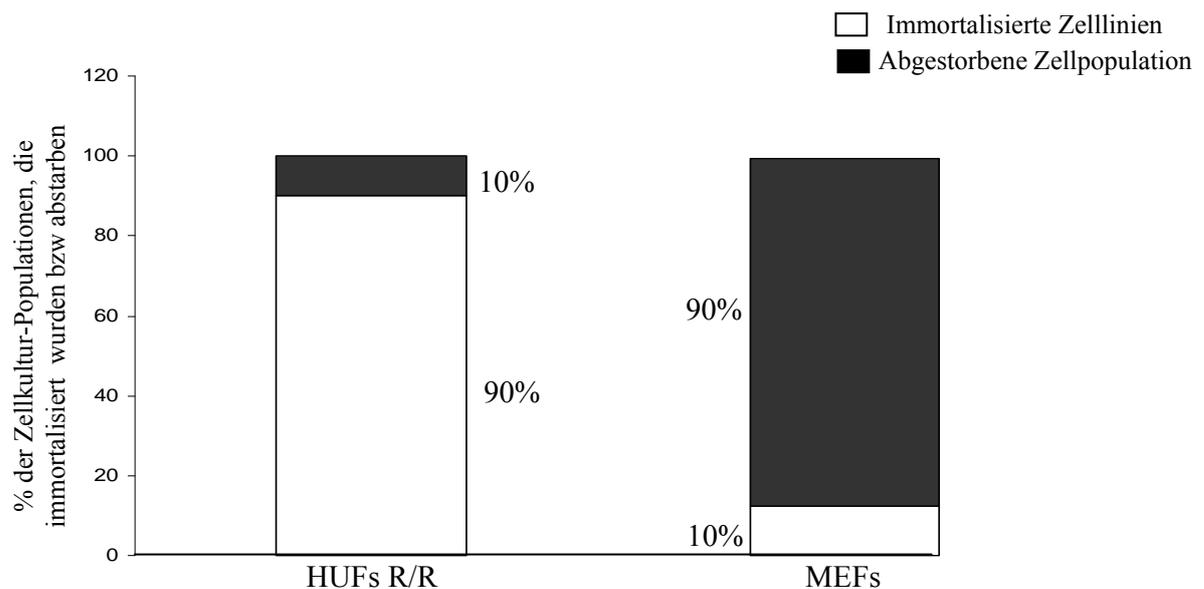


Abbildung 17: Der Unterschied zwischen primären, embryonalen Arginin HUFs und MEFs bei der spontanen *in vitro* Immortalisierung.

Murine embryonale primäre Arginin Fibroblasten (HUFs R/R) und MEFs wurden *in vitro* im Medium mit 10% Serum Zusatz gezüchtet. Wie das Diagramm zeigt, wurden 90% der HUFs R/R und nur 10% der MEFs immortalisiert (weiße Balken); Dagegen starben nur 10% der HUFs R/R- und 90% der MEF Zellpopulationen (schwarze Balken). Die erste Tabelle (11 a) zeigt alle Experimente mit gezüchteten primären HUFs R/R mit dem *Hupki* Arginin p53: 120 mit 109 immortalisierten Zellpopulationen und nur 11 toten. Die zweite Tabelle (11 b) zeigt alle MEFs Zellkulturexperimente mit dem wildtyp Maus p53: Von 121 primären Zellpopulationen entwickelten sich 12 Populationen zu Zelllinien, die 109 restlichen Zellpopulationen starben. (*): Dieses Experiment wurde von K.Muehlbauer (C040) durchgeführt.

Tabelle 11a: Zellkultur Experimente mit den p53 *Hupki* Arginin Zellpopulationen

Experiment	Zahl primärer Populationen	Dauer der Kultur	Immortalisierte Populationen	Abgestorbene Populationen	Genotyp der Zellpopulationen
I ($4 \cdot 10^4$ /Well)	38	12-16 Wochen	34	4	P53 <i>Hupki</i> Arginin
II ($4 \cdot 10^4$ /Well)	34	12 Wochen	30	4	P53 <i>Hupki</i> Arginin
III ($1 \cdot 10^5$ /Well)	48	14 Wochen	45	3	P53 <i>Hupki</i> Arginin
I+II+III	120		109	11	P53 <i>Hupki</i> Arginin

Tabelle 11b: Zellkultur Experimente mit den Maus p53 Zellpopulationen

Experiment	Zahl primärer Populationen	Dauer der Kultur	Immortalisierte Populationen	Abgestorbene Populationen	Genotyp der Zellpopulationen
I ($4 \cdot 10^4$ /Well)	45	12-20 Wochen	4	41	Maus p53
II ($4 \cdot 10^4$ /Well)	47	16-20 Wochen	4	43	Maus p53
III ($1 \cdot 10^5$ /Well)	29	18-21 Wochen	4	25	Maus p53
I+II+III	121		12	109	Maus p53

4.2 *IN VITRO* IMMORTALISIERUNGSMECHANISMEN DER MEFs

Die spontane Immortalisierung *in vitro* weist wie die *in vivo* Transformierung normaler Gewebe zu Tumoren (Abbildung 7 im Kapitel 1.4.1 der Einleitung) molekularbiologische Veränderungen auf. Diese geben der Zelle die neue spezifische Identität einer Zelllinie.

Die bekannten genetischen Modifizierungen betreffen die „Genom-Wächter“ und Zellzyklus Kontrolleure, nämlich Tumorsuppressorgene wie p53 und p19.

Es ist bekannt, dass bei fast 50% aller Tumore des Menschen der p53 Tumorsuppressor mindestens eine Mutation aufweist. Auch in den durchgeführten *in vitro* Studien zur Immortalisierung der Zellen, zeigte sich p53 als *Target* der Mutationen (Liu *et al.*, 2004 und 2005).

Andere Tumorsuppressoren verlieren ihre Funktion nicht durch Punktmutationen im Codierungsbereich der DNA wie p53, sondern durch die komplette Abwesenheit des Proteins wegen des teilweisen Verlustes des Gens oder des kompletten Chromosoms, auf dem das entsprechende Gen lokalisiert ist (Abbildung 18 und Tabellen 12 a, b und c). In diesem Fall ist p19 ein gutes Beispiel für den Funktionsverlust hauptsächlich durch eine Deletion im DNA-Kodierungsbereich, denn die p19 cDNA Sequenzierung der immortalisierten MEF Zelllinien (N=9) weist keine einzige Mutation auf.

4 immortalisierte Zelllinien in Tabelle 12 c zeigen weder p53 Mutationen noch p19/ARF Deletionen und sind auf eine noch unbekannt Weise immortalisiert. Diese sind als Unbekannt im Kuchendiagramm bezeichnet und betragen 36% der gesamten immortalisierten Zellen.

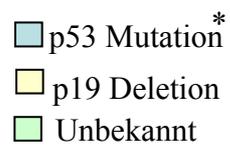
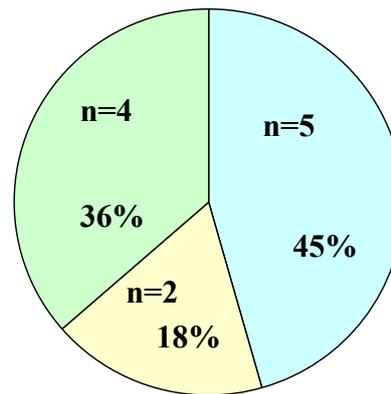


Abbildung 18: Immortalisierungsmechanismen der MEFs.

p53 Mutationen betragen 45% (n=5) (Tabelle 12 a), p19/ARF Deletionen etwa 18% (n=2) (Tabelle 12 b) in 11 untersuchten, immortalisierten MEF Zelllinien. Dagegen zeigen 36% (n=4) der immortalisierten Zellpopulationen keine der im Kreis-Diagramm genannten molekularen Veränderungen (p53 Mutation, p19/ARF Deletion) (Tabelle 12 c) und wurden deshalb als unbekannt bezeichnet. *: Bei einer p53 mutanten Zelllinie (wt1) war die cDNA des Egr1 Faktors (*early growth response factor 1*) nicht nachweisbar (siehe Abbildung 22).

Tabelle 12 a: MEF Zelllinie mit p53 Mutation.

Zelllinie	Mutation (5'→3')	Stelle	Aminosäure Substitution
Wt1 Experiment I	C>G	Ex7 c.245	Arg>Gly
Wt19 Experiment I	C>G	Ex5 c.132	Cys>Trp
Wt24D Experiment I	C>G	Ex5 c.132	Cys>Trp
Wt25 Experiment II	G>C	Ex5 c.135	Ala>Pro
Wt42 Experiment II	Ex7-Ex11	Deletion	

Tabelle 12 b: MEF Zelllinie mit p19 Deletion.

Zelllinie	P19 Status
Wt14 Experiment I	Deletiert
Wt24K Experiment III	Deletiert

Tabelle 12 c: MEF Zelllinie mit wildtyp p53.

Zelllinie	P53 Status	P19 Status	Egr1 Status
Wt7 Experiment I	wildtyp	wildtyp	wildtyp
Wt10 Experiment I	wildtyp	wildtyp	wildtyp
Wt26 Experiment III	wildtyp	wildtyp	wildtyp
Wt29 Experiment III	wildtyp	wildtyp	wildtyp

4.3 SCREENING DER GENETISCHEN VERÄNDERUNGEN IN SPONTAN IMMORTALISIERTEN MEF ZELLINIEN

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, scheint die Anzahl der Zellteilungen aller humaner sowie muriner Fibroblasten (MEFs) begrenzt. Entsprechend verhielten sich die MEFs und die HUFs R/R mit einer Wachstumsbegrenzung, begleitet von der Erscheinung der Seneszenz. Dieses Phänomen ist noch nicht ganz verstanden, es ist aber von *in vivo* sowie *in vitro* Studien bekannt, dass unterschiedliche, komplexe genetische Modifizierungen die Zellen dazu bringen, der Zellteilungsbegrenzung zu entkommen.

Viele Zellteilungsregulatoren wie z.B. das mutierte p53- oder p19- Protein könnten daran beteiligt sein.

4.3.1 P53 Mutationen in spontan immortalisierten MEF Zelllinien

Fünf immortalisierte Zellpopulationen (wt1, wt 19, wt 24D wt25 und wt42) weisen Punktmutationen auf der DNA-Ebene (wt1, wt 19, wt 24D und wt25) oder eine komplette Deletion des DNA-Bereiches von Exon7 bis Exon 11 auf. Diese sind in der Tabelle a zusammengefasst.

Die identifizierten Punktmutationen (Abbildung 19) sind Missense Mutationen vom Typ C zu G oder G zu C Transversion: Zwei homozygote Mutationen zeigten sich in jeweils Exon 7 im Codon 245 CGC > GGC in der wt 1 Zelllinie mit Arginin zu

Glycin Aminosäureaustausch, und Exon 5 im Codon 132 $\text{TGC} > \text{TGG}$ in den wt 19 und wt 24D Zellpopulationen mit Austausch des Cystein gegen Tryptophan.

Eine dritte heterozygote Mutation zeigte die Zelllinie wt 25 im Exon 5 im Codon 135 $\text{GCG} > \text{CCG}$ und damit Alanin zu Prolin Aminosäureaustausch, auf.

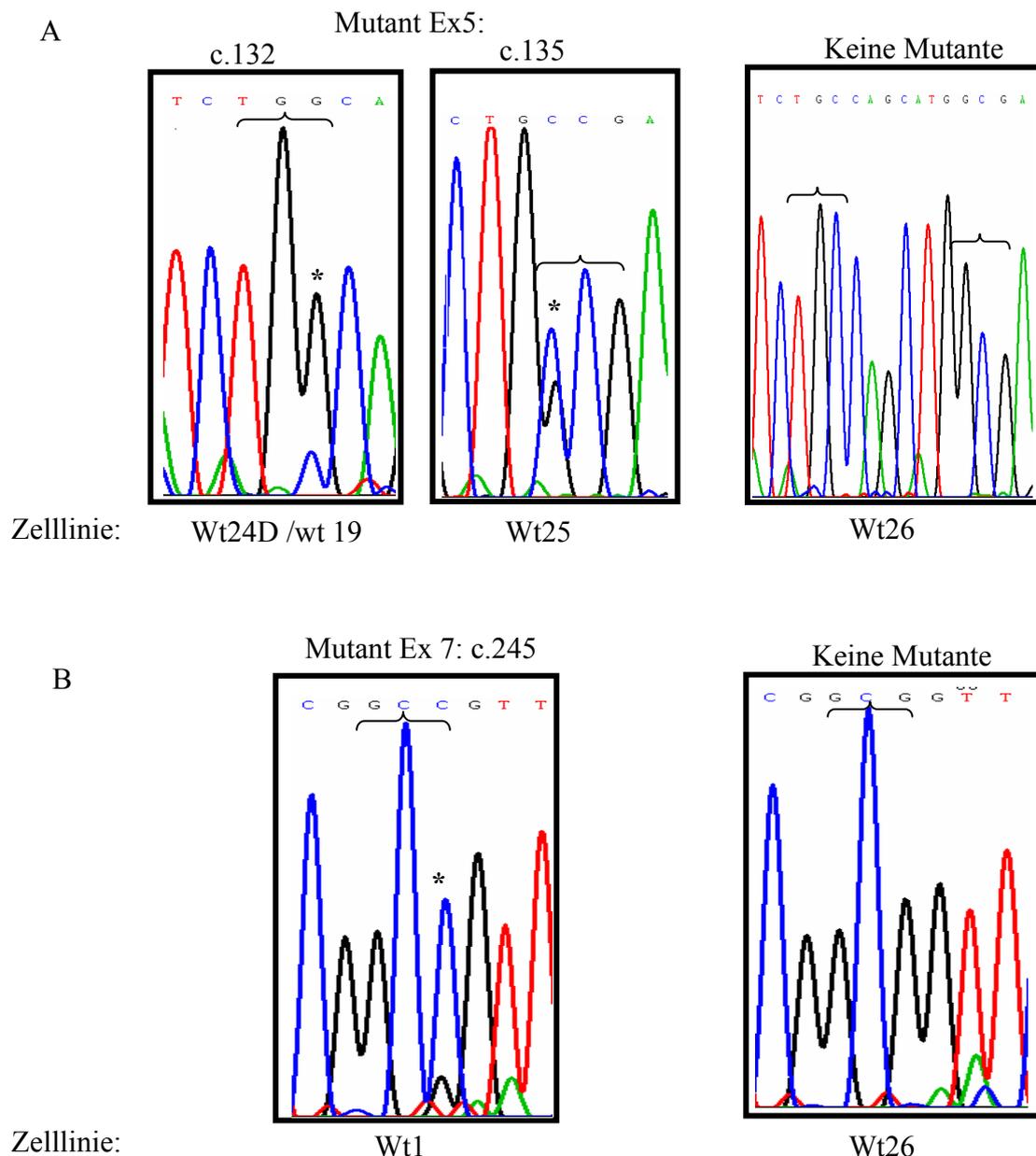


Abbildung 19: Untersuchung der p53 Mutationen in spontan immortalisierten MEFs.

Homozygote oder heterozygote Mutationen wurden mit der Sanger Sequenzierungsmethode, die auf fluoreszenzmarkierten Dideoxynukleotiden basiert, in den Zelllinien wt 24D bzw wt19 sowie in wt 25 (Elektrophogram A in der Richtung

5'→3') und wt 1 (Elektrophogram B in der Richtung 3'→5') identifiziert, dabei sind die nicht mutierten MEF Zelllinien wt 26 als Kontrolle (keine Mutante) mitgezeigt. Die Sternchen markieren die Basen, an denen die genetischen Veränderungen stattgefunden haben.

4.3.2 P53 DNA-Sequenz Homologie zwischen Maus und Mensch

Die Struktur des p53 Gens hat während der Evolution unterschiedlicher Spezies wie dem Menschen, der Maus oder der Ratte kaum Veränderungen erfahren.

Das menschliche p53 Gen ist etwa 20 kb lang und ist somit größer als das der Maus, welches 12 kb umfasst (Soussi *et al.*, 1990). In Abbildung 20 ist der mutierte Bereich der Zelllinien wt 1, wt 19, wt 24D und wt25 gezeigt: In den Codons 132 und 135 des Exon 5 sind die Maus und humane bzw *Hupki* p53 Sequenzen ähnlich aber haben unterschiedliche Codon-Nummern. TGC für Cystein im Codon 132 und GCG für Alanin im Codon 135 aber entsprechen jeweils Codon 135 mit TGC und 138 mit GCC Codons in humanen p53 DNA Sequenzen. Im Exon 7 in der wt 1 MEF Zelllinie ist die Mutation im Codon 245 (CGC) und entspricht Codon 248 (CGG) in den humanen Sequenzen, mit dem Unterschied in der dritten Base des Triplets CGC bei Maus und CGG beim Menschen. Die Reihenfolge der Aminosäuren des p53 Proteins ist in diesem Fall bei beiden Spezies (Maus und Mensch) nicht verändert, da die beiden Codons CGC bei Maus und CGG beim Menschen für die selbe Aminosäure (Arginin) codieren.

4.3.3 Untersuchung des P19 /ARF/Ink4a Lokus Verlustes in MEF Zelllinien

Der Ink4a/ARF Lokus befindet sich auf Chromosom 4 (42.7) der Maus, der Lokus kodiert zwei Proteine: P16^{INK4a} und P19^{ARF} (P14^{ARF} bei Menschen) (Collins and Sedivy; 2003).

P16 wird vom α - Transkript kodiert und besteht aus drei Exons: $\alpha 1$, 2 und 3. P19/ARF wird vom β - Transkript kodiert, auch dieses enthält drei Exons: 1 β , 2 und 3 (Haber ; 1997).

P16 und P19 Proteine werden in unterschiedlichen Leserastern gelesen (Collins and Sedivy; 2003). (Abbildung 21 Siehe Skizze).

Das P19 Protein wird von Exon 1 β und Exon 2 kodiert. Zwei MEF Zelllinien (wt14 und wt 24K) weisen p19/ARF Deletionen in allen Exons auf. Die genomische DNA der Zellen wurde mittels PCR untersucht (Abbildung 21).

In den wt 14 und wt 24K Zellpopulationen erscheint eine leichte Amplifizierung des zweiten Exons, vermutlich handelt es sich um eine Subpopulation, die noch keinen Exon 2 Verlust aufweist oder eine PCR Kontamination.

Punktmutationen im p19 cDNA- Kodierungsbereich der immortalisierten MEF Zelllinien wurden nicht festgestellt.

4.3.4 Untersuchung der Egr1, p53 und p19/ARF cDNA aus MEF Zelllinien

Mit dem klassischen RT-PCR Verfahren wurde die aus immortalisierten Zellpopulationen extrahierte RNA zu cDNA kopiert und jeweils mittels Egr1, p53 und p19/ARF spezifischen Primer (Abbildung 22 siehe Skizze) amplifiziert. In der wt1- Zelllinie, die eine Punktmutation im p53 enthielt, wurde Egr1 nicht feststellbar. P53 scheint ab Exon 7 in der wt42- Zelllinie deletiert und damit nicht transkribierbar (keine cDNA) (Abbildung 23). Ebenso ergeben wt14 und wt24K keine p19 cDNA (Abbildung 23), da die Exons (1 β , 2 und 3) nicht nachzuweisen sind. (Abbildung 22).

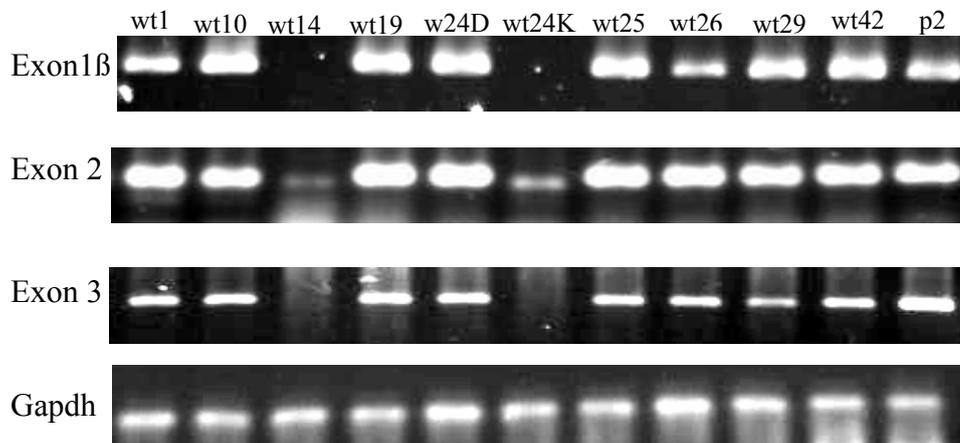
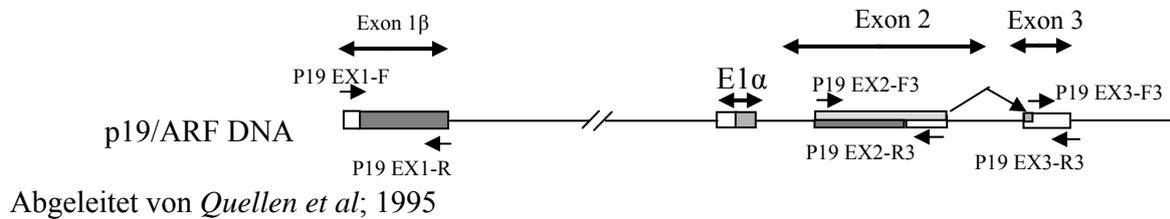


Abbildung 21: Verlust des p19/ARF/Ink4a Locus in immortalisierten MEF Zelllinien.

Mit Hilfe p19 spezifischer Primer für jedes Exon: Exon1 (231bp), Exon 2 (452bp) und Exon 3 (965bp) wurde die p19 DNA Deletion untersucht. Ein GAPDH DNA Abschnitt (190bp) wurde für die Überprüfung der PCR Qualität parallel amplifiziert. Die oben gezeichnete Skizze zeigt die Bindungsstellen der p19/ARF Primer. (Die DNA Spuren im Exon 2 der Proben wt 14 und wt 24K sind keine Amplifizierung des Exons 2 sondern vermutlich eine Amplifizierung von Subpopulationen in den wt 14 und wt 24K Zelllinien oder eine PCR Kontamination.

4.3.5 P53 Expressionsstatus und P19 Überexpression in immortalisierten MEFs mit mutiertem p53.

P19 inhibiert die P53 Inaktivierung, indem es an die Ubiquitin Ligase mdm2 bindet und damit das p53 Protein vor Abbau schützt (Pomerantz et al., 1998; Weber et al., 1999).

In normalen Zellen und Geweben ist die P19/ARF- Protein Konzentration sehr niedrig (Zindy et al., 2003). Dagegen wird P19 bei nicht normal proliferierenden Signalen hoch exprimiert, deshalb die nicht kontinuierliche *in vitro* Zellkultur von primären, embryonalen Maus Fibroblasten erfolgt (Kamijo et al., 1997).

In immortalisierten MEFs mit p53 Missense Mutationen (wt 1, wt 24D und wt 25) oder mit p53 Deletion (wt 42) scheint p19/ARF überexprimiert. Die mRNA Menge ist viel höher als bei primären embryonalen MEFs (p2) sowie MEF Zelllinien mit p53 wildtyp (wt 10, wt26 und wt 29). Wt 14 und wt 24K weisen keine p19 mRNA wegen der p19 DNA Deletion auf (Abbildung 23 A).

Die Proteinbestimmung (Western Blot) ergab, dass p19 in den wt 1, wt 24D, wt 25 und wt 42 Zelllinien mit mutiertem p53 in größeren Mengen (Abbildung 23 B), verglichen mit den wt10, wt26 und wt29 Zelllinien mit wildtyp p53 exprimiert wird. Kein P19 Protein scheint nachweisbar in wt 14 und wt24K wegen der bereits beschriebenen, mittels PCR nachgewiesenen, p19/ARF DNA Deletion (Abbildung 23 B).

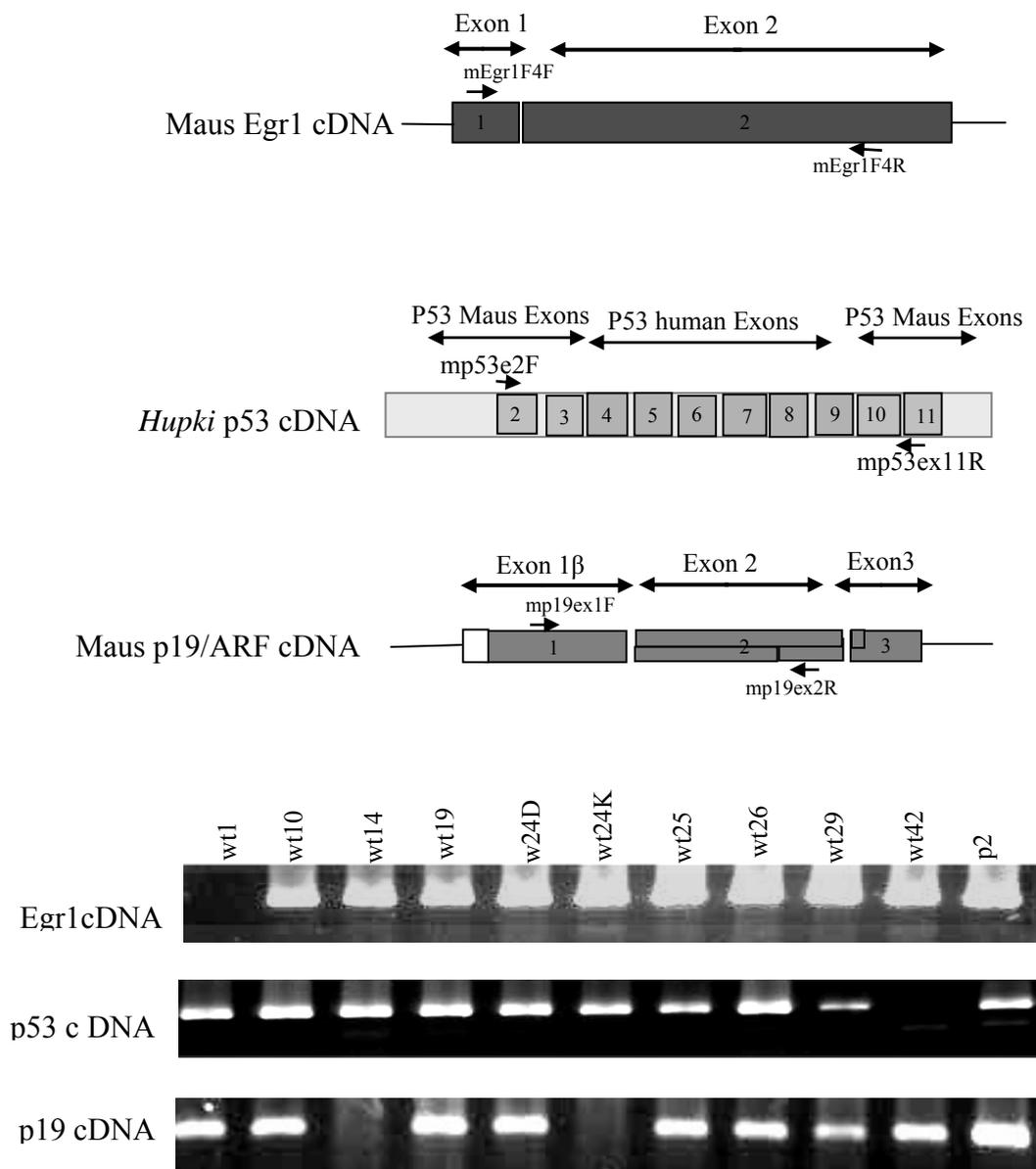
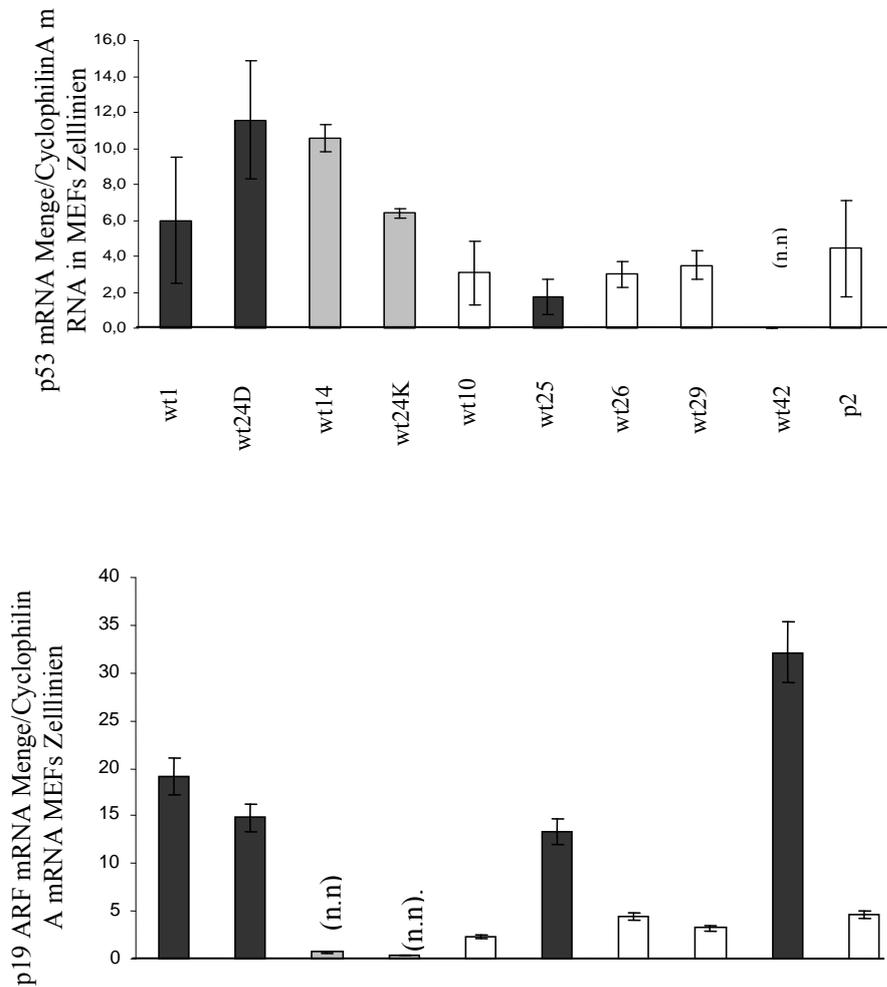


Abbildung 22: cDNA Amplifizierung der Egr1, p53 und p19/ARF Tumorrepressoren in MEF Zelllinien.

Extrahierte RNA aus MEF Zelllinien wurde mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben und als Template für die PCR zum Nachweis der Anwesenheit oder der Abwesenheit von mRNA Expression einer der drei untersuchten Tumorrepressoren: Egr1, p53 und p19/ARF, verwendet. Die PCR wurde mit den Primern Egr1F4/R4 (2,3Kb) für Egr1, mp53 ex2F/mp53 ex11R (1,2Kb) für p53 und mp19ex1F/mp19 ex2R (600Kb) für p19/ARF durchgeführt. p2: cDNA der primären, in Passage 2 Maus p53 embryonalen Fibroblasten. Die oberen Skizzen zeigen die Bindungsstellen der verschiedenen Primer an unterschiedliche cDNAs.

A



B

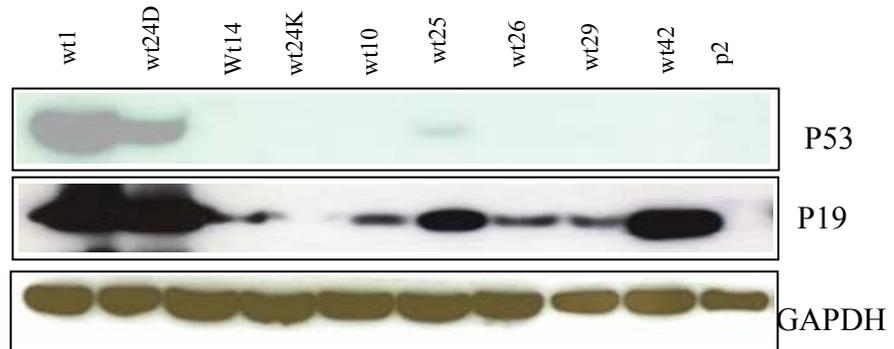


Abbildung 23: Exprimierte p53 und p19/ARF mRNA und Protein Mengen in immortalisierten MEF Zelllinien unter *in vitro* Kulturbedingungen.

(A): Die p53 bzw. p19 mRNA Expression wurde in 9 immortalisierten Zelllinien, die

entweder mutiertes p53 (schwarzen Balken) oder durch Deletion verlorenes p19 (graue Balken) haben, analysiert, dabei wurden auch primäre Zellen in Passage 2 mit analysiert (p2). Die mRNA wurde quantitativ mittels RT-PCR gemessen und mit Cyclophilin A als Haushaltgen verglichen. Drei unabhängige Experimente wurden durchgeführt und die Standardabweichung berechnet. (n.n): nicht nachweisbar). (B): Western Blot Analyse der P53, P19 und Gapdh Proteine (CM5, 1:1000), AB-1, 1:1000) und (6C5, 1:4000) sind die verwendeten Antikörper bzw. ihre Verdünnungen zum Nachweis von jeweils P53, P19 bzw Gapdh. Die Western Blot Analyse wurde mit wt1, wt 24D und wt 42 zweimal durchgeführt.

4.3.6 Egr1 Expression in den immortalisierten MEF Zelllinien.

Egr1 scheint für die Seneszenz durch Aktivierung des p53-MDM2-p19^{ARF} Mechanismus erforderlich. Es repräsentiert ein *upstream gate-keeper* der p53 Aktivität in der Zellzyklus Progression (Krones-Herzig *et al.*, 2003).

In immortalisierten MEF Zelllinien wurde die Egr1- mRNA- Menge mit RT-PCR quantitativ untersucht. Diese scheint etwas höher zu sein als in den primären, embryonalen MEFs (p2), unabhängig vom p53- Status (mutiert oder nicht mutiert), außer in wt1, in denen die mRNA (Abbildung 22) nicht detektierbar zu sein scheint, und in der wt42 Zelllinie mit p53- Deletion.

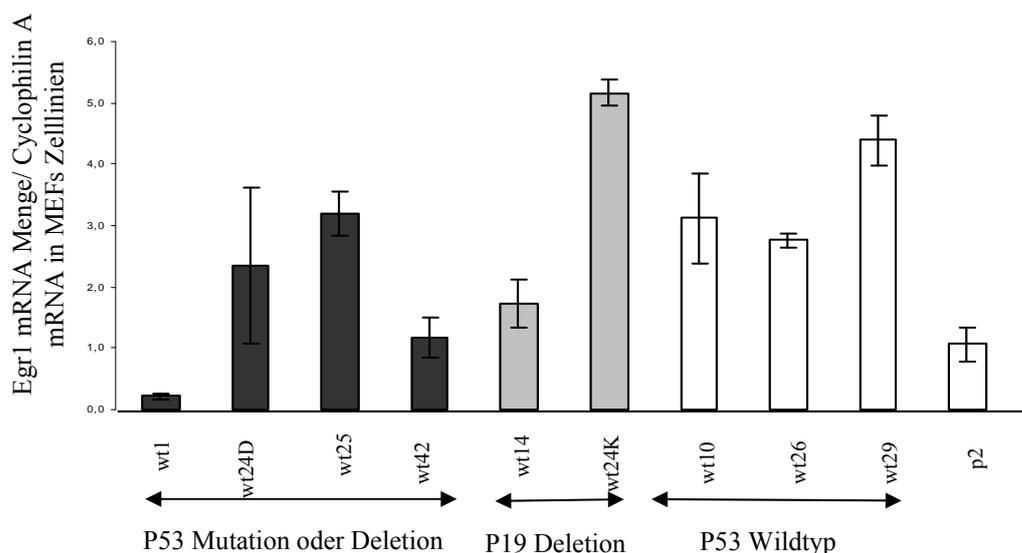


Abbildung 24: Exprimierte Egr1- mRNA- Mengen in immortalisierten MEF Zelllinien.

Die Egr1- mRNA- Expression wurde in vier Zelllinien mit p53 Punktmutationen wt1

wt 24D und wt 25 oder p53 Deletion (wt 42) (Schwarze Balken), in zwei Zelllinien mit p19 Deletion (wt14 und wt 24K) (graue Balken) und in drei Zelllinien mit jeweils unveränderten (nicht mutierten) p53 und p19 untersucht. (p2) entspricht den analysierten primären Fibroblasten in Passage 2. Die mRNA wurden in drei unterschiedlichen Experimenten quantitativ mittels RT-PCR gemessen und mit Cyclophilin A als Haushaltsgen verglichen und mit den berechneten Standardabweichungen dargestellt.

4.4 VERGLEICH VON PRIMÄREN, EMBRYONALEN MAUS FIBROBLASTEN MIT EMBRYONALEN *HUPKI* ARGININ FIBROBLASTEN UNTER GLEICHEN *IN VITRO* ZELLKULTURBEDINGUNGEN

Zwei primäre, embryonale Fibroblasten MEF- und HUF R/R- Populationen von Passage 1 bis Passage 4 wurden gezüchtet, danach jeweils $1,2 \cdot 10^4$ Zellen/Well in 24 Wellplatte gesät, täglich innerhalb einer Zeitspanne von 7 Tagen trysinisiert und nach Färbung mit Trypanblau unter dem Lichtmikroskop gezählt.

Trypanblau dringt in die Zellwand toter Zellen ein, und lässt sie unter dem Mikroskop blau erscheinen. Somit sind sie deutlich von intakten Zellen zu unterscheiden. Die gesamte Zellmenge (Tote und Lebende) wurden gezählt, um Wachstumskurven zu erstellen (linke Abbildung 25A). Es ist zusätzlich eine zweite Wachstumskurve nur mit lebenden Zellen separat in der rechten Abbildung (25A) dargestellt. Unter gleichen Zellkulturbedingungen (10% Serum) zeigten die MEFs eine langsamere Zellproliferation langsamer als die HUFs R/R in Passage 4, dies ist in der rechten Wachstumskurve der lebenden Zellen deutlich zu sehen.

In den Diagrammen sind jeweils die lebenden (Abbildung 25B) und die blau gefärbten, toten Zellen (Abbildung 25C) dargestellt: Ab Tag 4 scheinen die MEFs nicht mehr zu wachsen, denn es wurde in den restlichen Tagen 5, 6 und 7 keine nennenswerten Veränderungen mehr festgestellt (Abbildung 25B).

Deutlich mehr tote MEFs als HUFs R/R weist das Diagramm C der Abbildung 25 innerhalb der 7 Tage auf.

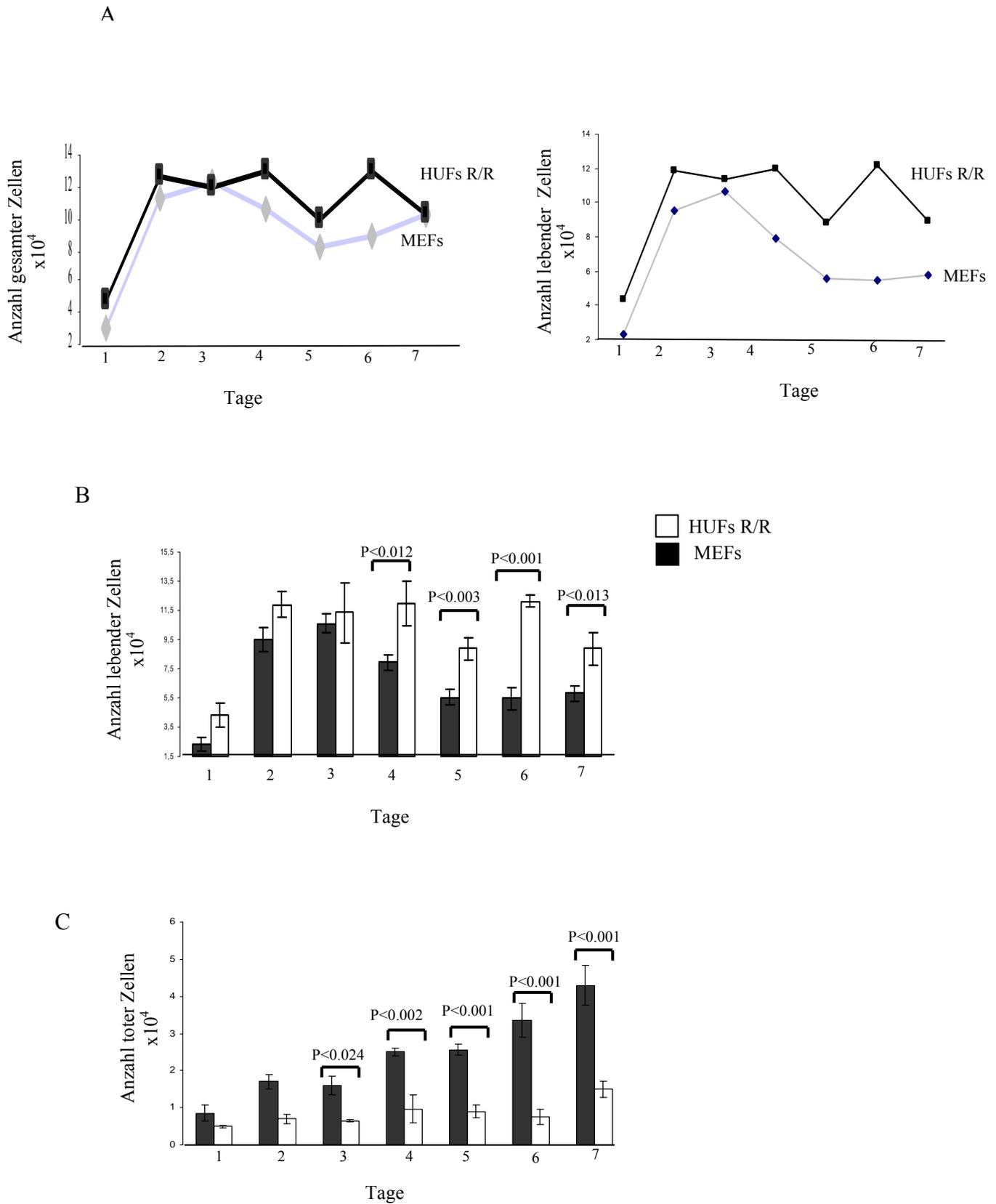


Abbildung 25: Wachstumskurve der von primären, embryonalen Fibroblasten *Hupki* p53 Arginin und Maus p53.

Primäre embryonale *Hupki* Arginin (HUFs R/R) (weisse Balken bzw schwarze Kurve) und Maus (MEFs) Fibroblasten (schwarze Balken bzw graue Kurve) wurden in Passage 4 in 24 Loch Platten gesät und innerhalb einer Zeitspanne von 7 Tagen täglich trypsiniert, mit Trypanblau gefärbt und mittels einer Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. (A): Die Wachstumskurven der gesamten (links) oder lebenden Zellen (Rechts). (B): Die Anzahl lebender Zellen und (C): Die Anzahl toter Zellen. Das Experiment wurde als Dreifach-Bestimmung durchgeführt, dabei wurden die Mittelwerte ebenso wie die Standardabweichungen berechnet. 1 bis 7 sind die Tage, an denen die Zellen gezählt wurden. Signifikante Differenzen wurden an bestimmten Tagen (Tag 4, 5, 6 und 7 in Abbildung B) und Tag 3, 4, 5, 6 und 7 in Abbildung C) erhalten (*t-Test*).

4.4.1 Die Morphologie der HUFs R/R und MEFs ist in der *in vitro* Zellkultur gut erhalten

Da 90% der MEF Populationen starben (Abbildung 17), scheinen diese seltener als die HUFs R/R die Seneszenz zu überwinden und sich als neue immortalisierte Zelllinien zu etablieren. Aber sowohl die primären MEFs als auch die HUFs R/R treten in die Seneszenz ein, indem sie aufhören, sich zu teilen. Die seneszenten MEF und HUF Zellen sind morphologisch unter dem Lichtmikroskop unterscheidbar, diese zeigen deutliche Unterschiede zu den primären sowie den immortalisierten Zellen (Abbildung 26).

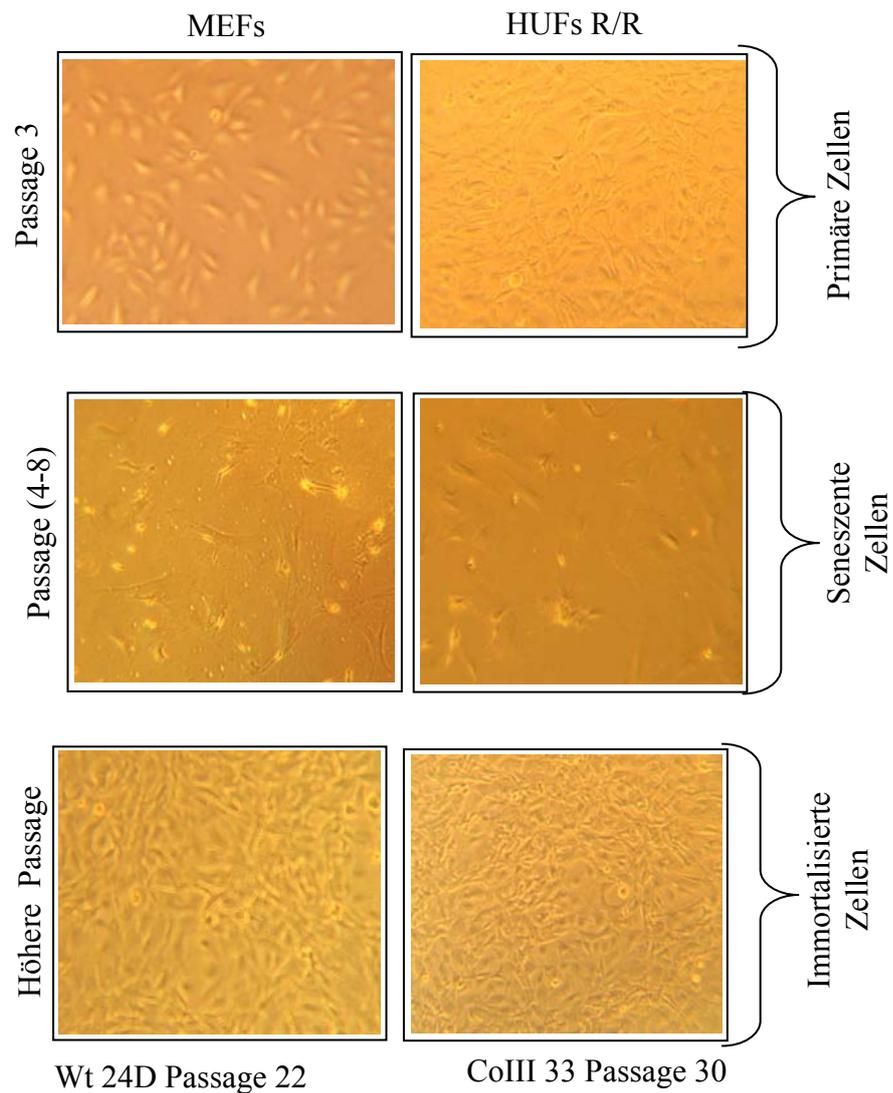


Abbildung 26: Morphologie der primären seneszenten und immortalisierten MEFs und HUFs R/R.

Primäre HUFs R/R und MEFs wurden *in vitro* gezüchtet und morphologisch in jedem Zustand der Entwicklung (primär, seneszent und immortalisiert) untersucht. Die Bilder der primären Fibroblasten wurden in der Passage 3, der seneszenten Zellen zwischen Passage 4 und 8 aufgenommen. Für die immortalisierten Zellen sind die Zelllinien wt 24D in der Passage 22 für die MEFs und CoIII 33 in der Passage 30 für die HUFs R/R gezeigt.

4.5 SIND DIESE UNTERSCHIEDLICHEN BEOBACHTUNGEN IN DER IMMORTALISIERUNG DER MEFs UND HUFs R/R MOLEKULARBIOLOGISCH BEDINGT?

Da die *in vitro* Immortalisierung der MEFs anders als die der HUFs R/R Populationen verläuft und jede Zellteilung von komplizierten endogenen Mechanismen reguliert werden kann, wurde die Genexpression von Egr1, p53, p21, Bax und Noxa primärer MEFs und HUFs R/R in Passage 2 quantitativ mittels RT-PCR vor und nach Induktion der Apoptose untersucht.

Dazu wurde zuerst die mRNA-Menge von Zellen ohne Behandlung bestimmt (Abbildung 27A). Dann wurden die MEFs bzw. HUFs Gammastrahlung (20Gy) ausgesetzt, nach 4 Stunden geerntet, die mRNA extrahiert, daraus cDNA hergestellt und zum Schluss quantitativ ihre Expression mit Egr1, p53, p21, Bax und Noxa spezifischen Primern mittels Light Cycler RT-PCR bestimmt (Abbildung 27 B).

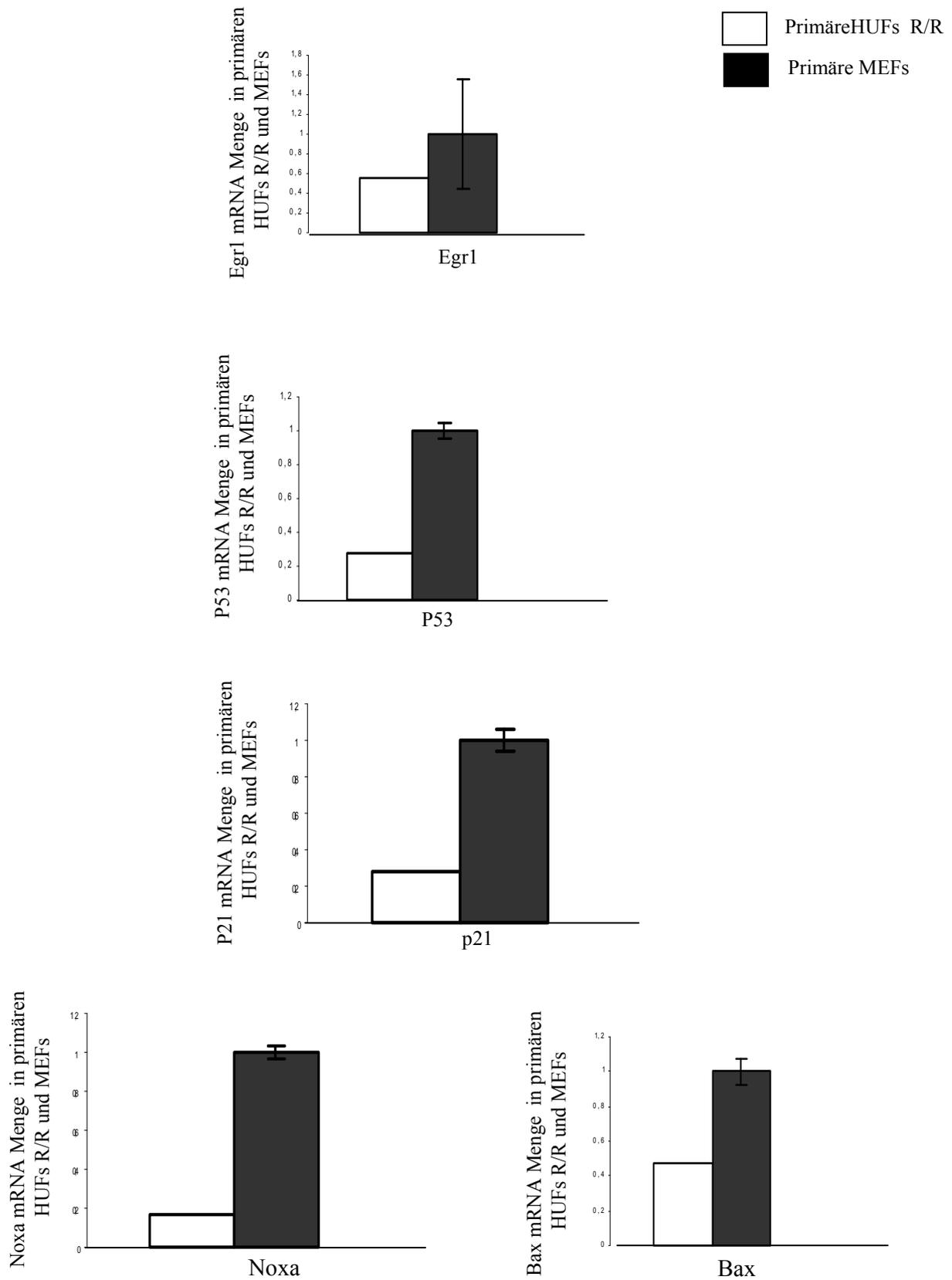
Die Untersuchung der Egr1, p53, p21, Bax und Noxa- mRNA Expression zeigt, dass in den primären, nicht bestrahlten MEFs eine deutlich höhere mRNA Menge gebildet wird, als in den primären nicht bestrahlten HUFs R/R (Abbildung 27A).

Die HUFs R/R sowie die MEFs zeigen leichte p21 und Bax mRNA Induktionen nach 20Gy Gammastrahlung mit der Ausnahme, dass die Noxa Expression in den MEFs niedriger als in den HUFs R/R zu sein scheint (Abbildung 27B).

Die p53- mRNA Menge ist nach der Bestrahlung sowohl in den HUFs R/R als in den MEFs stark erhöht zu sein.

Die Messung der Egr1 mRNA Induktion nach Gamma Bestrahlung zeigt sich auch in den beiden Zellpopulationen (HUFs R/R und MEFs) (Abbildung 27 B).

A



B

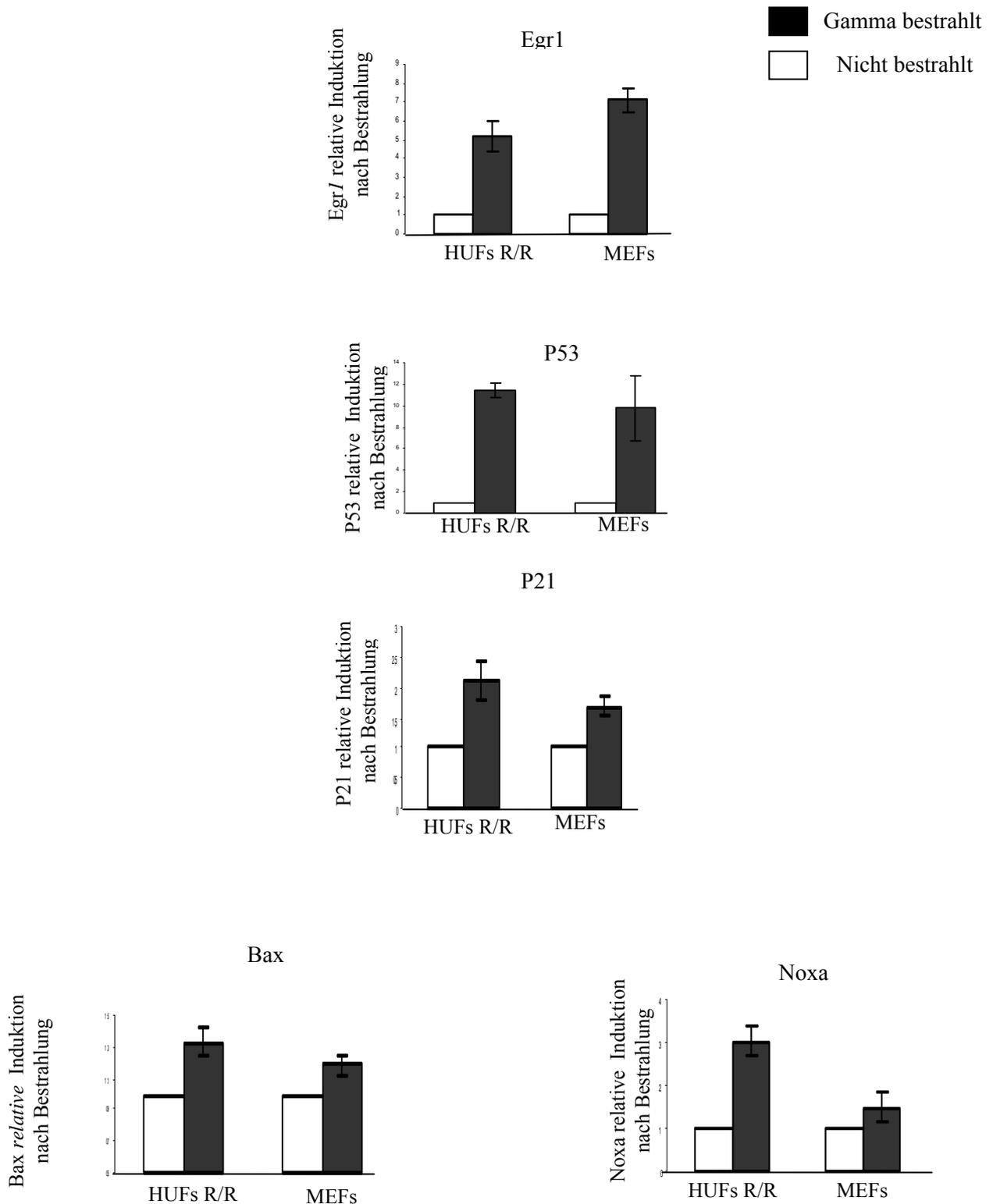


Abbildung 27: Egr1, p53, p21, Bax und Noxa mRNA Mengen in primären HUFs R/R und MEFs vor und nach Gamma-Bestrahlung.

(A): Transkription von Egr1, p53, p21, Bax und Noxa in homozygoten primären embryonalen *Hupki* Arginin HUFs R/R) (weisse Balken) und Wildtyp p53 (MEFs)

(schwarzen Balken) Fibroblasten. (B): mRNA Induktion von Egr1, p53, p21, Bax und Noxa in HUFs R/R und MEFs nach Gamma-Bestrahlung (20Gy/4 Stunden). Die extrahierten mRNAs der primären Zellen in Passage 2 wurden quantitativ mit der Real time PCR in 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils einer Messung, die mit dem Haushaltsgen Cyclophilin A verglichen wurden, bestimmt. Die Standardabweichungen wurden berechnet. Zuerst wurden alle Proben mit den Cyclophilin A spezifischen Primern analysiert, dabei wurden 4-5 Verdünnungen einer Probe für die Standardkurve mitgemessen. In Abbildung B wurden die unbehandelten Zellen (weiße Balken) zur Berechnung der relativen Induktion als 1 definiert.

4.6 ANALYSE DER APOPTOSE DER HUFs R/R UND MEFs

Die Zellteilung normaler Zellen ist Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* begrenzt.

Die zwei untersuchten, verschiedenen MEFs und HUFs R/R Zellpopulationen zeigen unterschiedliche Absterberaten während des Immortalisierungsprozesses. 90% der MEFs aber nur 10% der HUFs R/R Zellpopulationen starben (Abbildung 28).

Das Sterben dieser Zellen wurde nach der Induktion der Apoptose durch Gammastrahlung mit der Durchflußzytometrie analysiert.

Primäre MEFs und HUFs R/R in Passage 2 wurden 20Gy Gammastrahlung ausgesetzt und nach vier Stunden geerntet, mit dem Apo Annexin V Kit markiert und mittels eines FACS Gerätes analysiert.

Die Apoptose wird sowohl in MEFs als in HUFs R/R nach der Gammabestrahlung ausgelöst, aber die nicht bestrahlten Zellen weisen signifikant unterschiedliche Absterberaten (Apoptose) auf (Abbildung 28).

Die zytometrische Analyse zeigt mehr Annexin- markierte MEFs (apoptotische Zellen) (Abbildung 29 B) als markierte HUFs R/R (Abbildung 29 C) vor und nach der Gammabestrahlung.

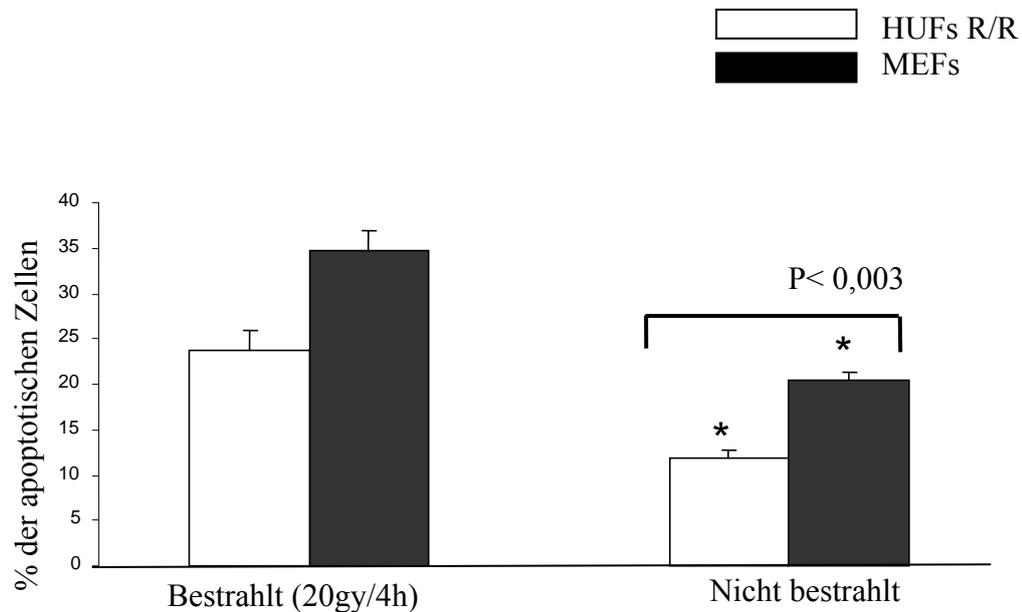


Abbildung 28: Durchflußzytometrie- Analyse der Apoptose in HUFs R/R und MEFs mittels Apo-Annexin V. Kit nach γ -Bestrahlung.

Primäre HUFs R/R und MEFs in Passage 2 wurden Gammastrahlung (20Gy) ausgesetzt und nach 4 Stunden geerntet, mit AnnexinV/PI behandelt (markiert) und mittels Durchflußzytometrie analysiert. Das Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander wiederholt, daraus wurden die Standardabweichungen berechnet. Eine signifikante Differenz wurde zwischen nicht bestrahlten HUFs R/R und MEFs festgestellt (t -Test: $p < 0,001$).

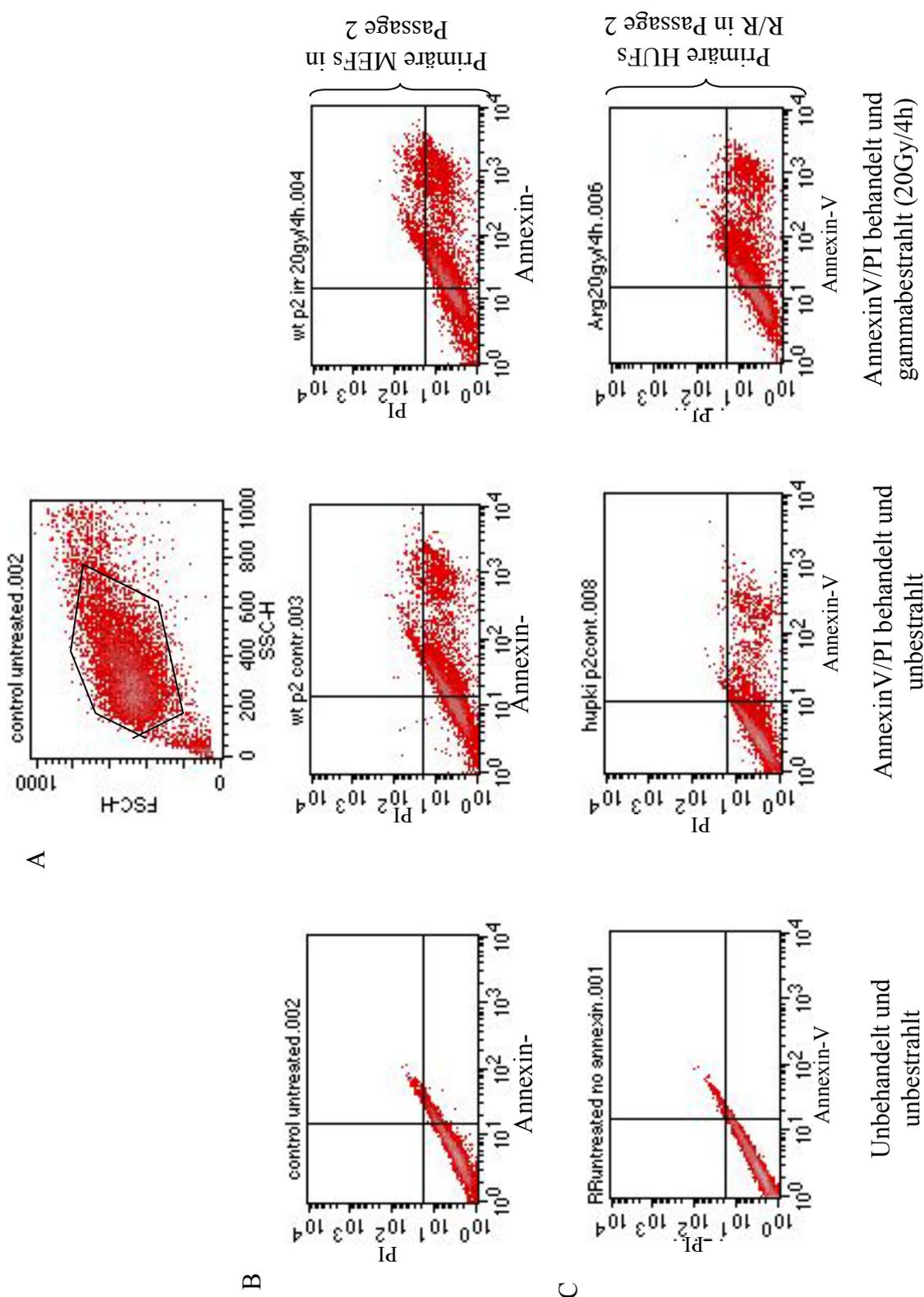


Abbildung 29: Fluoreszenz primärer MEFs und HUFs R/R mittels Annexin V/PI in der durchflußzytometrischen Analyse.

Primäre MEFs und HUFs R/R in Passage 2 wurden gammabestrahlt (20Gy/4h) (für die Apoptose Induktion), mit Annexin V/PI markiert und mittels FACS durchflußzytometrisch analysiert. Als Kontrolle wurden Zellen die weder bestrahlt noch mit Annexin V/PI behandelt waren, verwendet, um die Autofluoreszenz der Zellen mit zu berücksichtigen. Ebenso wurden die Fibroblasten ohne Bestrahlung analysiert, um das Verhalten der MEFs sowie HUFs R/R miteinander zu vergleichen (B und C). Bild (A) zeigt die Fibroblasten Population der folgenden zwei Bildreihen (B und C).

4.7 CHARAKTERISIERUNG DER ZWEITEN HERGESTELLTEN P53 *KNOCK IN* MAUS: *HUPKI* P53 PROLIN MAUS.

Wie bereits im Kapitel „Methoden“ beschrieben, wurde die *Hupki* p53 Prolin Maus mit der *Gene Targeting* Strategie hergestellt. Ein *Gene Targeting* Vektor mit humanen p53 DNA Sequenzen (Exon 4 – Exon 9) wurde in die Stammzellen (ES E14.1) elektroporiert. Mit Hilfe der PGK-Neo Kasette im Vektor konnten die Neo-resistenten ES Klone selektioniert werden. Die DNA der Neo-resistenten Zellen wurde mit den spezifischen Primern (Skizze der Abbildung 30) mittels PCR nach homologen rekombinanten ES Klonen durchsucht (Abbildung 30).

Das Experiment wurde dreimal wiederholt aber es gelang nicht, positive homologe rekombinante ES Klone zu erhalten (Tabelle 13 der Abbildung 30).

Die *Hupki* p53 Prolin Maus wurde mit Hilfe der Firma RCC GmbH in Berlin hergestellt.

Die Genotypisierung der Mäuse wurde durch ein PCR Verfahren bestätigt (siehe Skizze in der Abbildung 30).

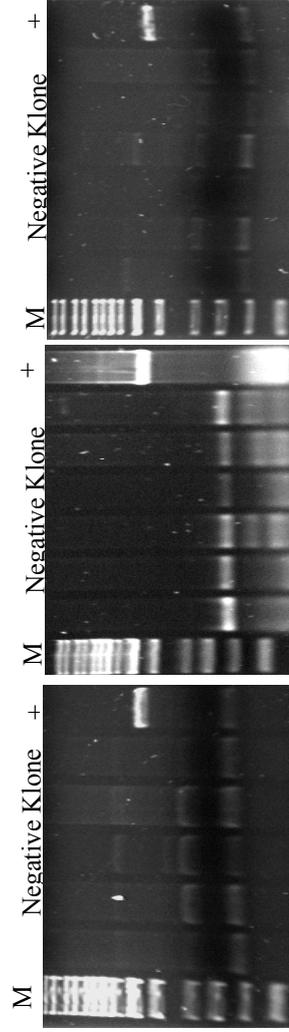
Der wichtigste Punkt bei der Charakterisierung der Maus ist der Nachweis eines funktionellen Maus p53 Gens mit der humanen DNA-Bindungsdomäne. Zuerst wurde die RNA von mehreren Organen (Leber, Niere und Milz) extrahiert, cDNA daraus hergestellt und vollständig sequenziert. Die *Hupki* p53 Prolin Variante wird in allen untersuchten Geweben sowie im wildtyp p53 der Maus exprimiert (Abbildung 31).

Die cDNA des *Hupki* p53 Prolin Proteins der *Hupki* Prolin/wt heterozygoten Mäuse zeigt sich genauso amplifizierbar wie die der *Hupki* p53 Arginin Variante von der schon früher hergestellten ersten *Hupki* p53 Arginin Maus (Luo *et al.*, 2001a) als auch des P53 Wildtyp Proteins von der Wildtyp Maus. Sie wurde als Template für die Amplifizierung des internalen p53 Fragments zwischen Exon 4 und Exon 10 (836 bp) in allen drei Mäusen (*Hupki* Prolin, *Hupki* Arginin und wildtyp) verwendet. Dann wurden die PCR Produkte mit dem Restriktionsenzym *Ava I* verdaut. Weder das

Hupki Arginin noch Prolin p53 PCR Produkt ist verdaubar, Ava I besitzt nur in den p53 Maus Sequenzen eine Schnittstelle und schneidet das p53 cDNA Fragment (Exon 4- Exon 10) in drei andere, kleinere Fragmente (433, 343 und 60 bp) (Abbildung 32).

	Experiment I	Experiment II	Experiment III
Stammzellen (E.S: E14.1)	7X 10 ⁷ Zellen	5X10 ⁷ Zellen	4X 10 ⁷ Zellen
Targeting Vektor	40µg	35µg	40µg
Gepickte ES Klone	336	960	480
Neo-resistente ES Klone	0 (286->getestet)	0 (850->getestet)	0 (445->getestet)

Tabelle 13



PCR-Screening der Neo resistenten Klone

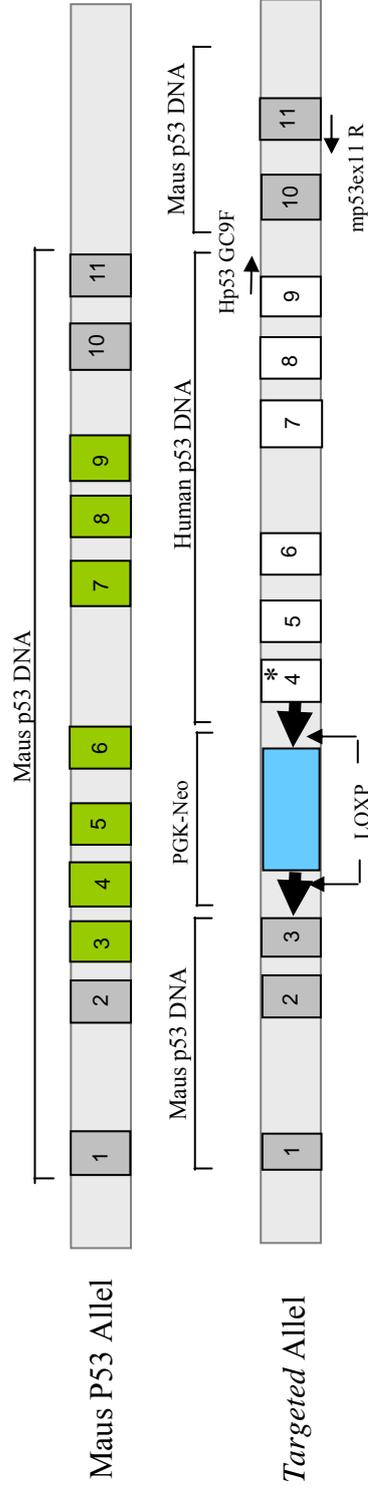


Abbildung 30: Erste in vitro Arbeitsschritte mit Maus Stammzellen für die Herstellung der p53 Knock in Maus.

Drei wiederholte Experimente der *in vitro* Prozedur für die Herstellung der *Hupki* Prolin *knock in* Maus wurden durchgeführt. Die ES Zellen (E. 14.1) wurden in Kultur genommen (2-mal passagiert), dann mit dem *Targeting* Vektor (siehe Skizze) elektroporiert. Die erhaltenen Neo-resistenten ES Klone wurden mittels PCR auf die ordnungsgemäße Integration des Vektors im Maus p53 Locus des Chromosoms überprüft. Keine positiven Klone wurden dabei identifiziert. Die verwendeten Primer für die PCR waren: hp53GC9F (human p53 Exon 9F) und mp53 ex 11R (Maus p53 Exon 11R) (siehe Skizze).

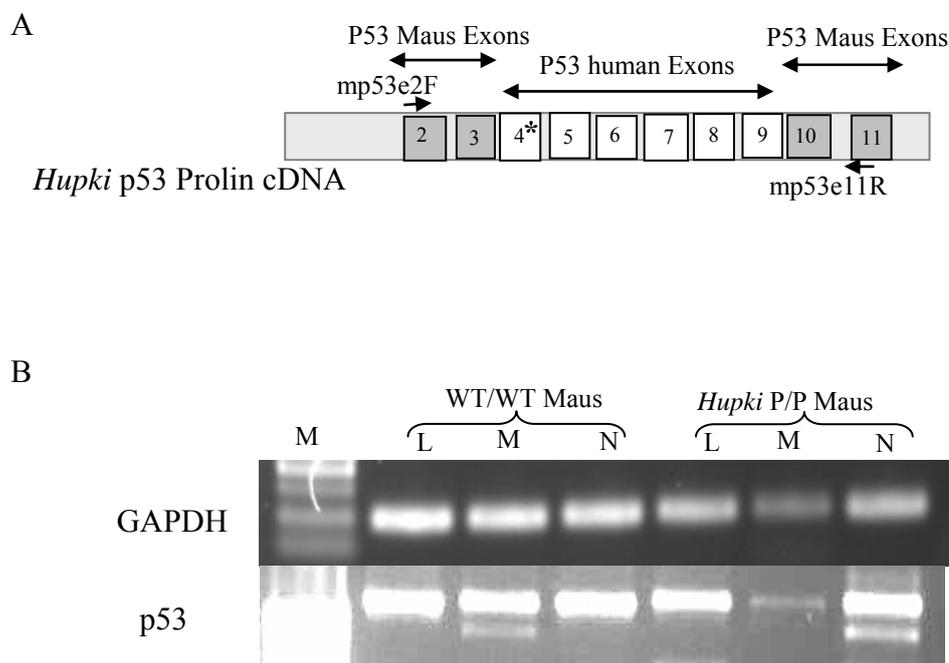
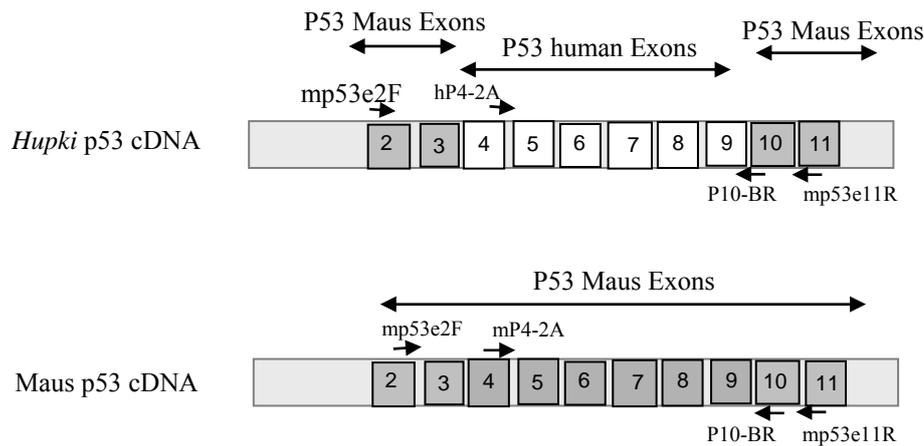
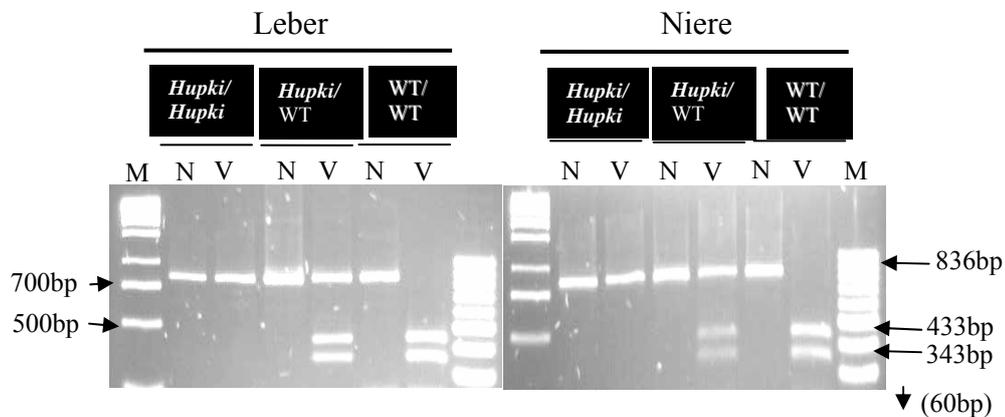
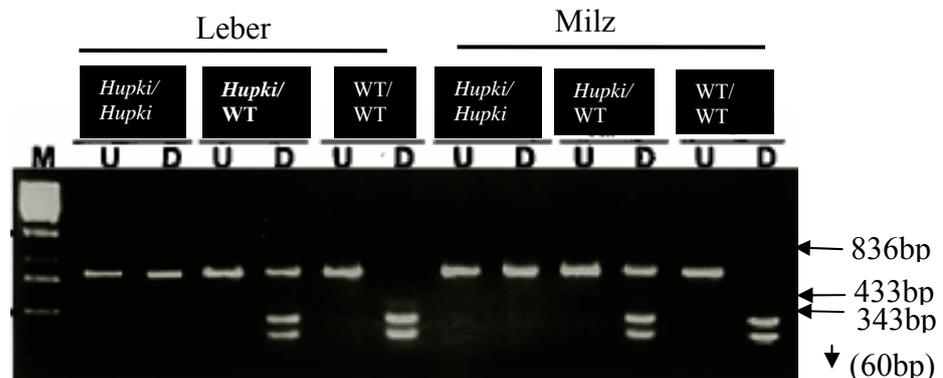


Abbildung 31: P53 Transkription in den verschiedenen Organen der p53 Prolin *Knock in* und wildtyp Maus.

RNA wurde von den oben genannten Organen (Milz, Niere und Leber), die wiederum aus der hergestellten transgenen *Hupki* Prolin Maus entfernt wurden, isoliert, zu cDNA umgeschrieben und mit den p53- sowie Gapdh- spezifische PCR analysiert. Die Primer mp53e3F und mp53e11R (1,2Kb) (siehe Skizze A) sind für die p53- cDNA-Amplifizierung und die G3F/R Primer (200 bp) sind für die Gapdh PCR zuständig (B). L: Leber, M: Milz, N: Niere. M: 100bp Marker. *: ist für das Codon 72 (Prolin) des humanen p53 Exon 4 Sequenze.

A

B: *Hupki* ProlinC: *Hupki* ArgininModifiziert von Luo et al; 2001. *Oncogene***Abbildung 32: *Ava I* P53 Prolin knock in und wildtyp cDNA Verdau.**

Mit Hilfe der Primer mp53e2F and mp53 e11R wurde die cDNA der Milz, Niere und Leber von den verschiedenen Genotypen der homozygoten *Hupki* Prolin Maus und der Wildtyp (WT/WT) Maus amplifiziert. Die PCR Produkte der cDNA von der Milz und der Leber wurden als Template für eine zweite PCR (836bp) mit den Primer: P4-2A (h me4F) und P10-BR (m e10R) verwendet, dann mit dem Restriktionsenzym *Ava I* in 433, 343 und 60 bp Fragmenten verdaut. Die *Hupki* Prolin cDNA Produkte enthalten keine *Ava I* Restriktionsschnittstelle, die WT/WT sind vollständig verdaut, die heterozygoten

Hupki Prolin/WT(nur im Bild B) sind zu 50% verdaut und gleicht dem Ergebnis des Bildes C (*Luo et al., 2001a*), in dem der *Ava I* Verdau der ersten *Hupki* p53 Arginin *knock in* Maus. NV=U: nicht verdaut, V=D: verdaut, M: 1Kb Marker. Die Skizze in A zeigt die Bindungsstellen der verwendeten Primer. P4-2A Primer ist sowohl *Hupki* (Human) als auch Maus spezifisch.

4.7.1 ***In vitro* Untersuchung der *Hupki* p53 Arginin und Prolin primären embryonalen Fibroblasten (HUFs R/R und HUFs P/P).**

Die publizierten Studien der *in vitro* Zelllinien beschreiben Unterschiede der zwei polymorphen p53 Varianten in der Transaktivierung proapoptotischer Gene wie *perp* (*P53 apoptosis effector related to PMP22*). Die p53 Arginin Variante bindet besser an den *Perp* Promoter als die Prolin Variante, genauso ist ihre Affinität zu MDM2 stärker und damit auch ihr Transport außerhalb des Kerns zu den Mitochondrien gehört. Weitere Unterschiede wurden über die Wechselwirkung mit anderen Proteinen wie das Papilloma Virus E6 Onkoprotein berichtet (Storey *et al.*, 1998; Marin *et al.*, 2000; Bergamaschi *et al.*, 2003; Dumont, 2003).

Die primären, embryonalen *Hupki* p53 Arginin und Prolin Fibroblasten (HUFsR/R und HUFs P/P) stammten jeweils aus den gleichen Weibchen (vergleichbare genetische Hintergründe). Diese wurden bis zur Passage 2 gezüchtet, 20Gy Gammastrahlung ausgesetzt, vier Stunden nach der Bestrahlung geerntet und dann daraus die RNA isoliert.

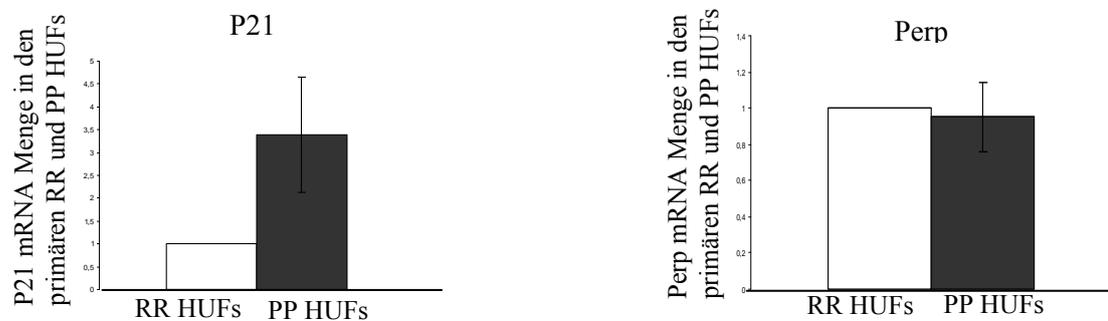
Aus der mRNA wurde dann cDNA hergestellt, welche für die Quantifizierung der Genexpression von p21 und *perp* verwendet wurde.

HUFs P/P weisen in dieser Untersuchung weder p21 noch *perp* Induktion auf, allerdings scheint die p21 mRNA Menge in den nicht bestrahlten HUFs P/P höher zu sein, als in den HUFs R/R (Abbildung 33A und B).

Die basale *Perp* mRNA Menge ist in beiden HUFs (R/R und P/P) gleich. (Abbildung 33 A).

P21 und *perp* Induktion ist in den HUFs R/R nach Gammastrahlung detektierbar (Abbildung 33 B).

A



B

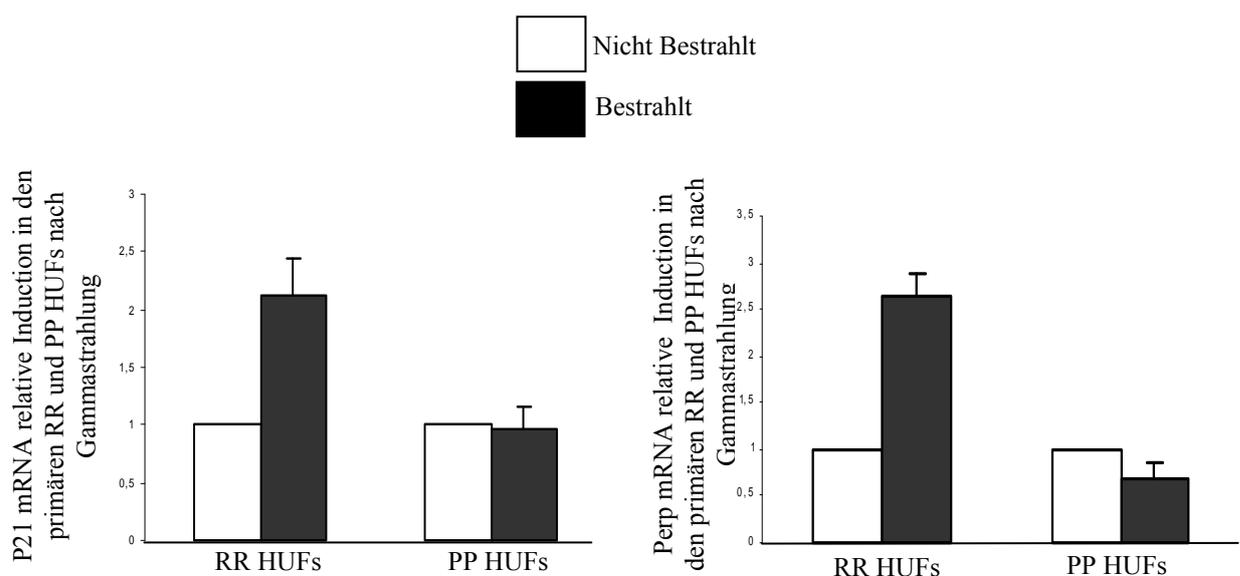


Abbildung 33: Transkriptionsniveau der p53 abhängigen Gene, P21/WAF und Perp mRNA in primären, embryonalen *Hupki* Arginin (HUFs R/R) und Prolin (HUFs P/P) Fibroblasten vor und nach Gamma-Bestrahlung.

A: Basales Transkriptionsniveau der p21/WAF und der perp mRNA der HUFs P/P (schwarze Balken) und HUFs R/R (weissse Balken) unter *in vitro* Zellkulturbedingungen. B: P21/Waf sowie perp mRNA Induktion in den HUFs R/R und P/P nach Gamma-Bestrahlung (20gy/4 Stunden). Die extrahierten mRNAs wurden von den primären Zellen in Passage 2 extrahiert, quantitativ mit real time PCR in 3 unabhängigen Experimenten

gemessen und mit dem Haushaltsgen Cyclophilin A verglichen. Eine Standardabweichung wurde mitberechnet. Die verwendeten primären Fibroblasten stammten jeweils aus den gleichen *Hupki* Arginin/ Prolin heterozygoten Mäusen (gleiche genetische Hintergründe).

4.7.2 **Screening der p53 Mutationen in *Hupki* Arginin / Prolin heterozygoten Zelllinien nach der Benzoapyren Behandlung primärer, embryonaler *Hupki* Arginin / Prolin heterozygoter Fibroblasten**

13,5 Tage alte primäre, embryonale *Hupki* Arginin/Prolin heterozygote Fibroblasten (HUFs R/P) wurden *in vitro* mit 5µM Benzoapyren (B(a)P) für 48 Stunden behandelt und in Kultur gezüchtet, bis immortalisierte Zelllinien entstanden.

Diese wurden auf p53 Mutationen untersucht, da diese ein Immortalisierungsmechanismus sein könnten.

B(a)P gehört zu den polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK). Diese entstehen hauptsächlich durch unvollständige Verbrennung organischen Materials wie Holz, Kohle und Mineralöl. Es findet sich auch im Tabakrauch und spielt eine Rolle, neben anderen Karzinogenen, in der Entstehung von Lungentumoren bei Rauchern.

Reaktive B(a)P-Metabolite können die DNA schädigen, indem die sie DNA-Addukte und DNA-Strangbrüche verursachen können und damit zur Tumorentstehung führen. (BGFA-Info 3/2000).

47 primäre B(a)P behandelte HUFs R/P Zellpopulationen ergaben 20 Zelllinien, BaP RP genannt. Das P53 Gen der immortalisierten B(a)P RP Klone wurde von Exon 4 bis Exon 9 sequenziert

Von den 20 B(a)P R/P Zelllinien weisen 6 p53 Mutationen auf (Tabelle 14).

Die identifizierten p53 Mutationen sind in den "Elektropherogrammen" der Abbildung 34 geschildert:

C>G Transversionen im Codon 141 im Exon 4 mit der Aminosäure- Substitution Cystein zu Tryptophan in BaP RP 8 sowie BaP RP43, C>T Transition in Codon 127 im Exon 5 und G>C Transversion im Codon 282 im Exon 8 mit jeweils Serin zu Phenylalanin (Codon 127) und Tryptophan zu Prolin (Codon 282) Aminosäure- Veränderungen in BaP RP 25. Die Codons 135 und 151 im Exon 5 in BaP RP 32 waren von C>G bzw. G>C

Transversionen betroffen und verursachten damit den Aminosäureaustausch von jeweils Cystein zu Tryptophan bzw Glycin zu Prolin auf der p53 Protein Ebene. Der BaP RP 38 Zellklon zeigte eine G>C Transversion im Codon 238 im Exon 7 und einen Cytosin-Basen Verlust des Codons 36 CCG im Exon 4. Die C (Cytosin) Basen Deletion verursacht eine Leseraster Verschiebung bis zur Entstehung des Stop Codons TGA im Codon 43/44 im Exon 4 (Abbildung 34).

Diese Punktmutationen waren vom Allel Verlust (LOH: *Loss of heterozygosity*) gefolgt. In BaP RP 8, 32 und 43 Zelllinien ist das Arginin Allel verloren gegangen. In BaP RP 19- Zelllinie scheint auch das Arginin Allel verschwunden zu sein, diese Zellen weisen keine Mutation im DNA Bereich von Exon 4 bis Exon 9 auf (Abbildung 34). Neben der Sequenzierung kann der p53 Polymorphismus am Codon 72 im Exon 4 (Argin Prolin) mit einem Verdau durch ein *BstUI* Restriktionsenzym nachgewiesen werden. Nur die Arginin- Allel- DNA in Codon 72 (GGCG)) enthält die Restriktionsschnittstelle des *Bst UI* Enzyms und wird daher geschnitten (Abbildung 35). Auf diese Weise konnte die LOH in den BaP RP 8, 19, 32 und 43 Klonen nachgewiesen werden (Abbildung 36).

Tabelle 14: Mutationen in heterozygoten Arginin/ProlinHUFs Zelllinien, die nach der Benzo(a)pyren Behandlung primärer HUFs etabliert wurden

BaP Zellklone	Mutation 5'→3'	Stelle	Mutationstyp	Aminosäure Substitution	Zellliniegenotyp, Codon72	Homozygote oder heterozygote Mutation(en)
BaP 8	TGC→TGG	Codon 141 Ex 5	Transversion	Cys>Trp	Prolin	Homozygot
BaP 19					(Fast) Arginin	
BaP 25	TCC→TTC CGG→CCG	Codon 127 Ex 5 Codon 282 Ex 8	Transition Transversion	Set>Phe Trp>Pro	Arginin/Prolin	Heterozygot Heterozygot
BaP 32	TGC→TGG GGG→CGG	Codon 135 Ex 5 Codon 151 Ex 5	Transversion Transversion	Cys>Trp Gly>Arg	Prolin	Heterozygot Heterozygot
BaP 38	TGT→TCT C Verlust in CCG	Codon 238 Ex 7 Codon 36 Ex 4	Transversion <i>Frameshift</i>	Cys>Ser Stop Codon TGA in Codon 43/44	Arginin/Prolin Arginin/Prolin	Heterozygot Heterozygot
BaP 43	TGC→TGG	Codon 141 Ex 5	Transversion	Cys>Trp	Prolin	Homozygot

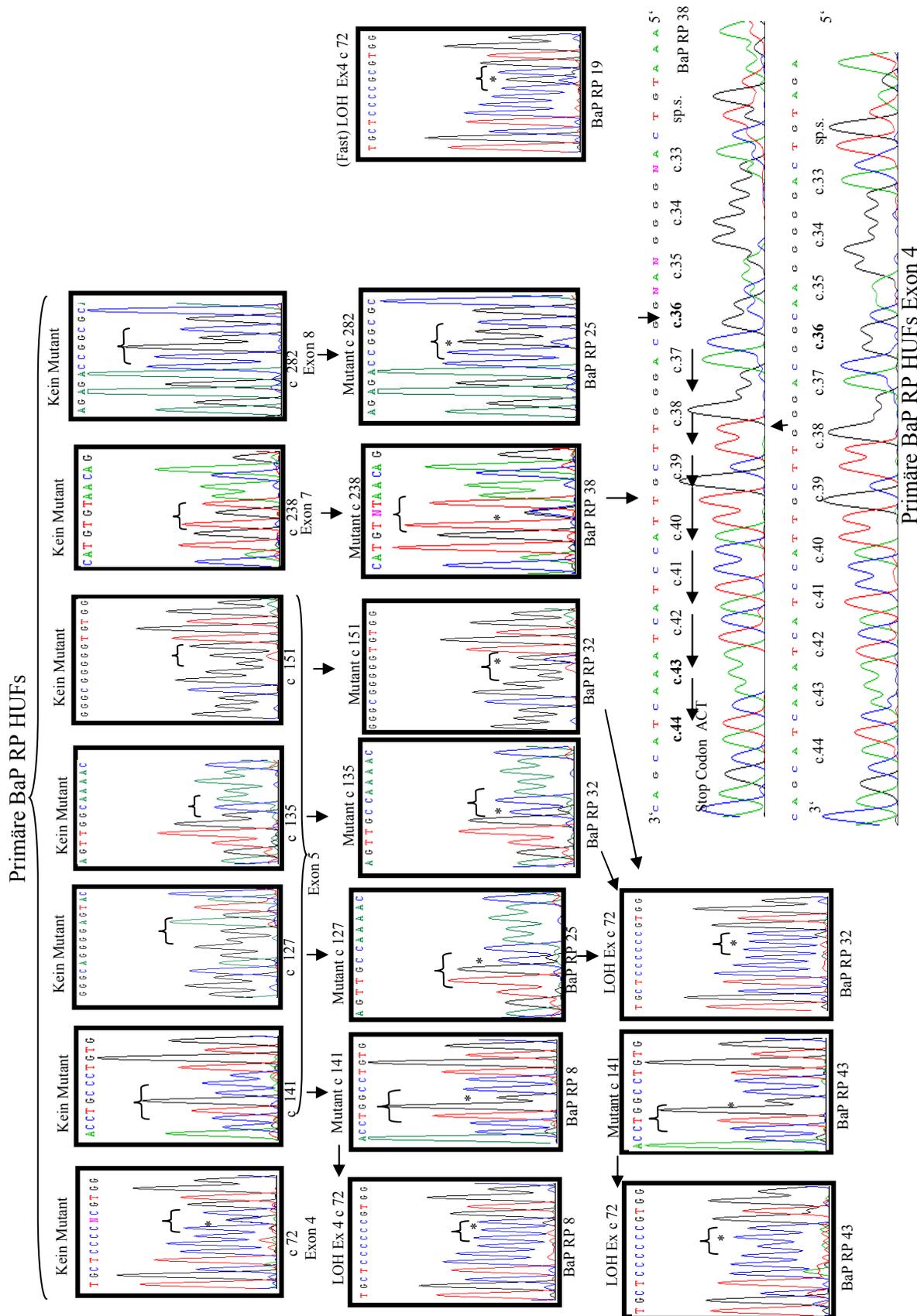


Abbildung 34: Untersuchung der p53 Mutationen in den von den B(a)P behandelten primären Argini/Prolin Fibroblasten abgeleiteten *Hupki* heterozygoten Arginin/Prolin HUF Klonen (BaP RP).

Die Sequenzierung wurde mit der Sanger Sequenzierungsmethode durchgeführt. Mutationen wurden in den Zelllinien BaP RP 8, 25, 32, 38 und 43 detektiert, ein Verlust des Arginin Allels wurde in BaP RP 8, 25, 32 und 43 festgestellt. In der BaP RP 38 Zelllinie wurde noch eine Cytosin Deletion im Codon 36 im Exon 4 beobachtet mit einer Leserasterverschiebung, gefolgt vom einem Stop-Codon. In BaP RP 19 ist der Verlust des Prolin Allels schon zu erkennen, vermutlich geht das Allel in den nächsten Kulturen verloren. Die Sequenzierungen wurden in der Richtung 5'→3'außer im Fall der Leseraster Verschiebung in BaP RP 38 durchgeführt. Als Kontrolle wurde die DNA primärer BaP RP HUFs (keine Mutante) sequenziert.

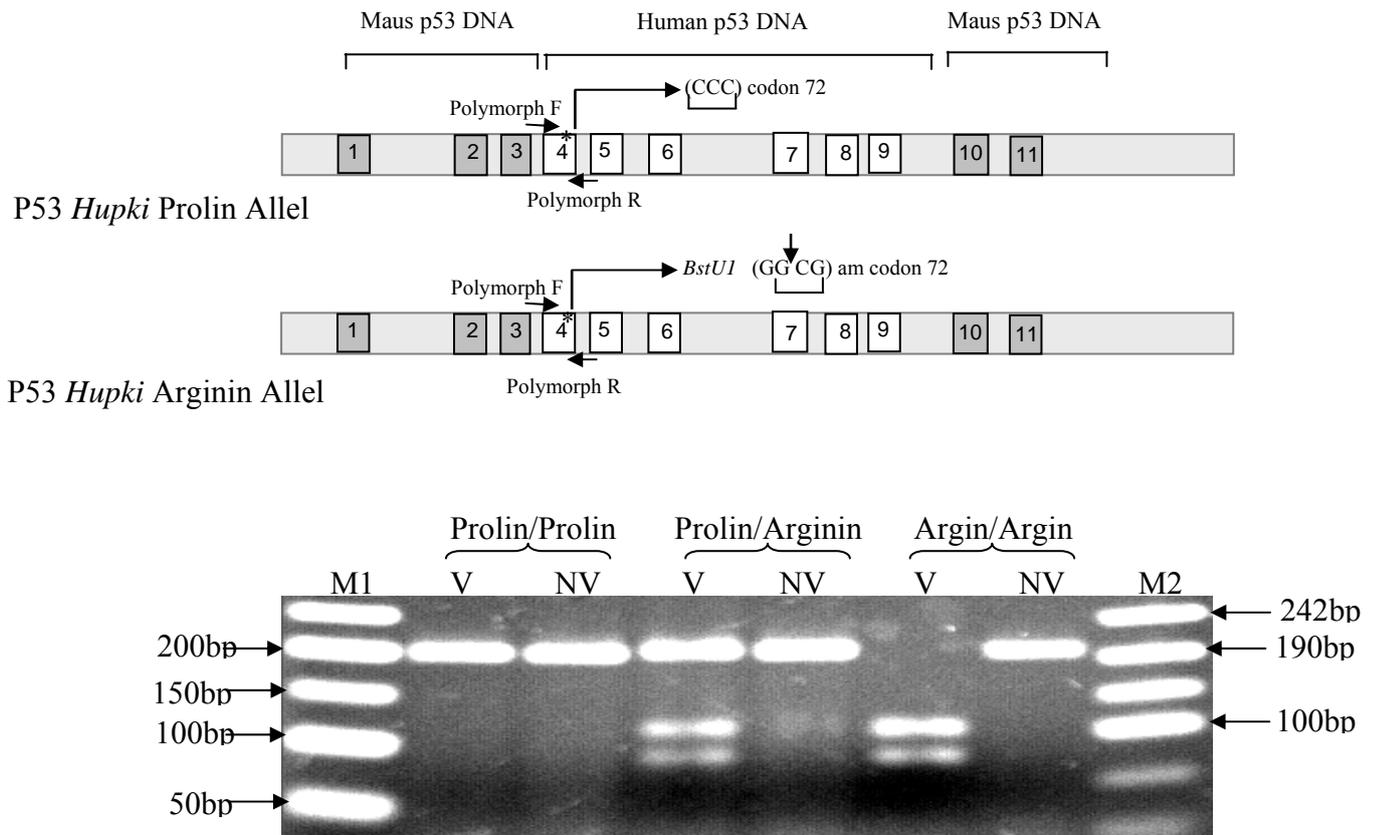


Abbildung 35: *BstUI* Verdauung der extrahierten DNA von homozygoten Arginin und Prolin und heterozygoten Arginin/Prolin Fibroblasten.

Für die Amplifizierung von einem ca. 200bp DNA Bereich (obere Bande auf dem Bild) des *Hupki* Exons 4 mit Hilfe von Polymorph F/R- Primern wurde die DNA von homozygoten und heterozygoten *Hupki* Arginin und Prolin Fibroblasten verwendet. Die *Hupki* Arginin und Prolin Allele sind außer an der Stelle des Codons 72 in Exon 4 identisch. Deshalb lässt sich das Arginin und nicht das Prolin Allel mit dem Restriktionsenzym *BstUI* in jeweils 113 und 88 bp DNA Fragmente verdauen, denn die *BstUI* Restriktionsschnittstelle GGCG (siehe Skizze) befindet sich am Codon 72 und damit ist sie nur für das Arginin Allel spezifisch. Die Arginin Homozygoten sind 100%, die Arginin/Prolin Heterozygoten zu 50% und die Prolin Homozygoten sind nicht verdaubar. V: verdaut, NV: nicht verdaut, M1: 50bp und M2: PucMix 8. (*) zeigt die Stellen des Codons 72 in Exon 4 und gleichzeitig die Schnittstellen des *BstUI* Restriktionsenzym.

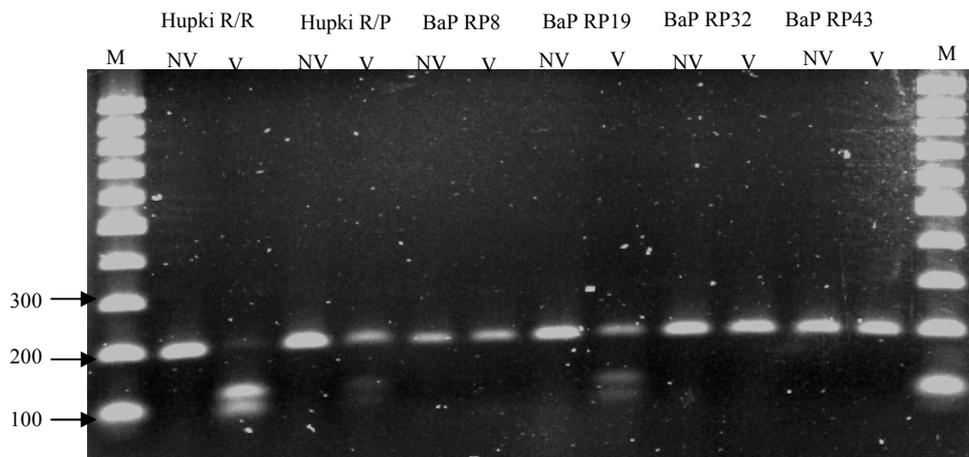


Abbildung 36: *Bst UI* Verdau zum Nachweis des Verlustes des Arginin Allels in den auf p53 Mutationen untersuchten BaP RP Zellklonen

Die primären heterozygoten Arginin/Prolin Fibroblasten (HUFs R/P) wurden mit 5 μ M B(a)P behandelt. Die entstandenen BaP RP Zelllinien wurden auf p53 Mutationen untersucht (Tabelle 14). Manche Zellklone weisen p53 Mutationen mit dem Verlust des Arginin Allels (LOH) (BaP 8, 32 und 43) auf. Die Sequenzen ergaben keinen Polymorphismus im Codon 72, sondern nur das Codon CCC für Prolin (siehe „*Elektrophogram*“ für das Mutationspektrum). Der Verdau bestätigt den Arginin Verlust, denn das Prolin Allel ist nicht verdaubar mit *BstUI* und damit sind keine Doppelbanden auf dem Bild zu sehen. BaP 19 scheint noch BaP RP zu sein, aber das „*Elektrophogram*“ (Abbildung 34) zeigt fast eine LOH des Prolin Allels, dh diese Zellen werden in den nächsten Passagen vermutlich das Prolin Allel verlieren. Der *Hupki* DNA Bereich (Exon 4) wurde mit den spezifischen Primern amplifiziert (siehe Skizze der Abbildung 35) dann mit *BstUI* verdaut. Als Kontrolle wurden *Hupki* R/R (Arginin: 100% verdaubar), R/P: zu 50% verdaubar) und P/P (Prolin: 100% unverdaubar) DNA verwendet. V: verdaut, NV: nicht verdaut, M: 100bp Marker.

4.8 DIE KREUZUNG DER *HUPKI* P53 ARGININ MAUS MIT DER P53 *KNOCKOUT* MAUS ERGIBT HETEROZYGOTE P53 *HUPKI*/NULL MÄUSE

Die *Hupki* p53 Arginin Mäuse vom 129/Sv Stamm wurden mit den C57BL/6 *black knock out* Mäusen von Tyler Jacks (Jacks *et al.*, 1994) gekreuzt (siehe Skizze A der Abbildung 37). Die Nachkommenschaft wurde als *Hupki*/Null bezeichnet, sie sind p53 hemizygot, denn sie besitzen nur ein funktionelles p53 Allel: Das *Hupki* Allel. Die *Knock out* Mäuse von Tyler Jacks sind mit der homologen Rekombinations- Strategie hergestellt, indem das Maus p53 Allel zwischen dem Exon 2 und dem Intron 6 durch das Neomycin Gen unterbrochen wurde (Jacks *et al.*, 1994) (siehe Skizze A der Abbildung 38).

10 *Hupki*/Null Mäuse standen während ihrer gesamten Lebensdauer unter ständiger Beobachtung (Tabelle14).

Die Genotypisierung der Mäuse wurden mit den *Hupki* p53 sowie *Knock out* p53 spezifischen Primern durchgeführt (Abbildung 37).

Insgesamt starben 6 hemizygoten Mäuse an Krebs, was einer Sterberate von 60 % entspricht (Abbildung 38).

4 Tiere starben an unbekanntem Todesursachen.

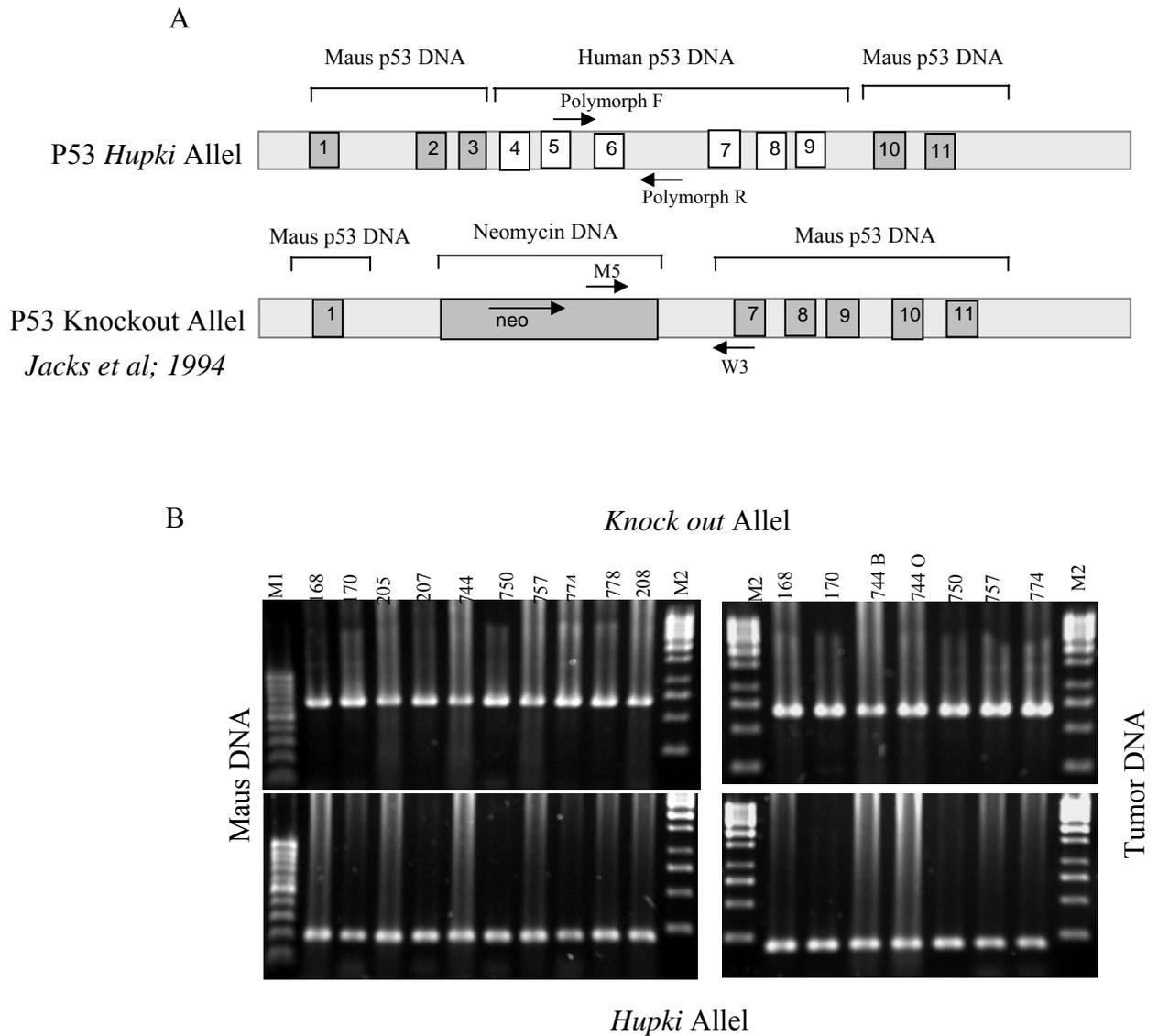


Abbildung 37: Die Genotypisierung der *Hupki*/null Mäuse und deren Tumore

Mittels der spezifischen Primer (siehe Skizze A) wurden die PCR Reaktion für die Feststellung des unfunktionellen p53 *knock out* Allels (Bild B (Oben): 600bp) und des funktionellen *Hupki* p53 Arginin Allels (Bild B (Unten): 200bp) in den Mäusen (links) und den Tumoren (rechts), durchgeführt. M1= 100bp Marker und M2=1KbMarker

Tabelle 15: Die beobachteten *Hupki*/null Mäuse.

Maus Marker	Geboren am:	Gestorben am:	Todesalter in Tagen	Maus Genotyp	Tumor Bildung	Tumor Zytologie	Todesursache
757	09.12.2002	21.03.2004	466	<i>Hupki</i> /Null	Ja	Haut Plattenepithelkarzinom	Tumor
744	12.12.2002	23.11.2004	712	<i>Hupki</i> /Null	Ja	2x Lymphom	Tumor
168	14.12.2002	21.03.2004	463	<i>Hupki</i> /Null	Ja	Haut Plattenepithelkarzinom	Tumor
170	14.12.2002	22.10.2004	678	<i>Hupki</i> /Null	Ja	Haut Plattenepithelkarzinom	Tumor
750	15.04.2004	15.08.2005	487	<i>Hupki</i> /Null	Ja	Haut Plattenepithelkarzinom	Tumor
774	15.04.2004	15.08.2005	487	<i>Hupki</i> /Null	Ja	Haut Plattenepithelkarzinom	Tumor
205	15.05.2003	22.01.2004	252	<i>Hupki</i> /Null	Nein		Unbekannt
207	15.05.2003	22.01.2004	252	<i>Hupki</i> /Null	Nein		Unbekannt
778	15.04.2004	02.10.2005	535	<i>Hupki</i> /Null	Nein		Unbekannt
802	16.02.2004	17.10.2005	609	<i>Hupki</i> /Null	Nein		Unbekannt

Jacks *in vivo* Studien zeigten, dass 70% der p53 hemizygoten Wt/KO (Wildtyp/*Knock out*) Mäuse im Alter von etwa 9 Monaten Tumore aufwiesen und daran starben.

Das als Voruntersuchung gedachte Experiment zeigte, dass die *Hupki*/Null Tiere auch die Tumorgenese aufweisen, dies trat aber scheinbar später auf, als bei den p53 hemizygoten Wt/KO Mäusen (Abbildung 38). 6 Mäuse lebten ca. 14 bis 22 Monate lang (siehe Tabelle 15).

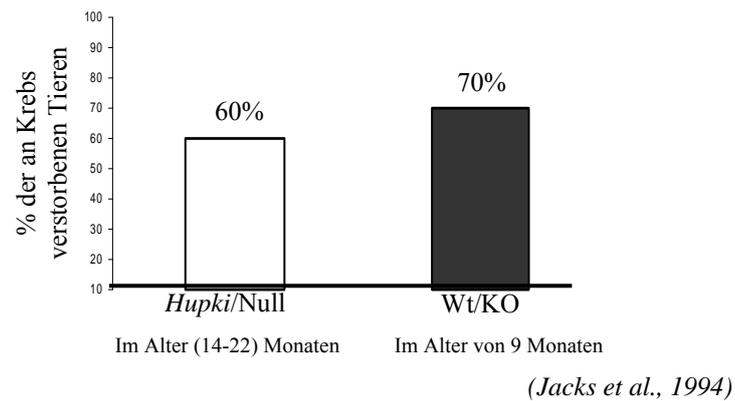


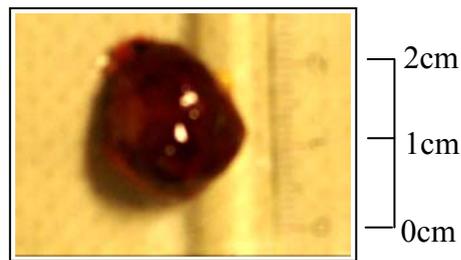
Abbildung 38: Die Tumorgenese der *Hupki/Null* Mäuse.

6 Hupki/Null Mäuse starben an Krebs im Alter von 14 bis 22 Monaten, diese Beobachtung scheint sich von den p53 Wildtyp/knock out (Wt/KO) heterozygoten Tieren von Jacks *et al* zu unterscheiden. 70% der Wt/KO starben an Tumoren im Alter von 9 Monaten (Jacks et al., 1994) (Folgeexperimente unter normierten Bedingungen sollten diese vorläufigen Daten bestätigen).

Jeder Tumor wurde histologisch untersucht: Jeder Tumor war etwa 2 cm groß (Abbildung 39 A und B).

Zwei Lymphome wurden hinter dem Ohr und am hinteren Bein der Maus 744 und 5 Plattenepithelkarzinome der Haut in 5 Tieren mit den Nummern 168, 170, 750, 757 und 774 (Tabelle 15) festgestellt.

A



B

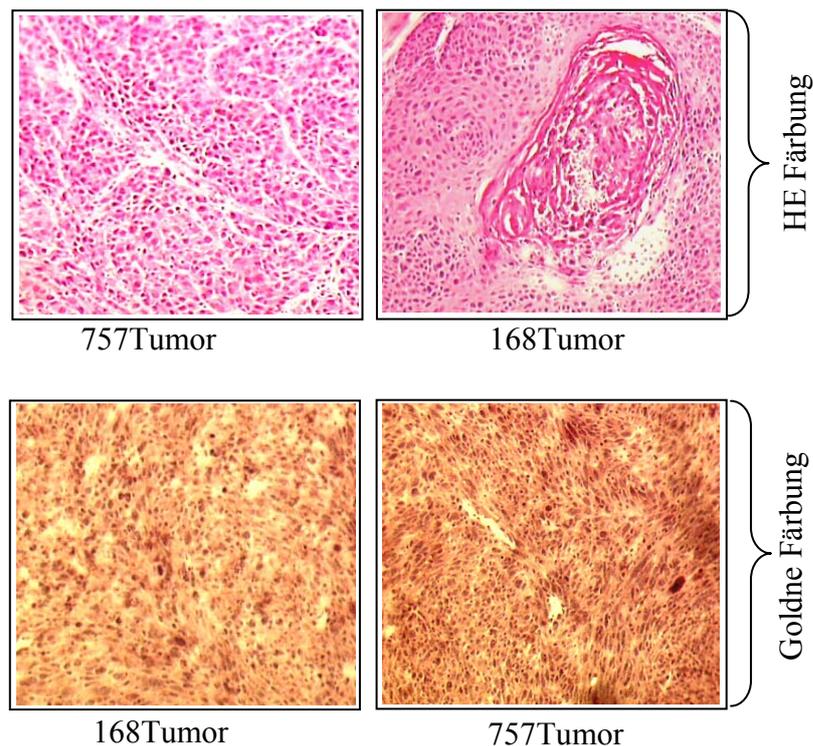


Abbildung 39: Histologische Untersuchungen isolierter Plattenepithelkarzinome von *Hupki*/Null Mäusen.

Die entstandenen Tumore in den *Hupki*/null Mäusen wurden isoliert, gemessen und für die histologischen Untersuchungen in Formalin gelagert. Die Tumorgöße betrug 15 bis 20 mm (Bild A). Für die Klassifikation der Tumore wurden klassische histologische Untersuchungen wie z.B. Hämtoxilin-Eosine (HE) und Goldne Färbungen in der Abteilung „Zelluläre und molekulare Pathologie“ (D010 DKFZ) durchgeführt. Die folgenden Bilder (B) zeigen die mikroskopischen Aufnahmen der präparierten Tumorschnitte. Die Nummern 757 und 168 sind die Ohrenmarker der erkrankten *Hupki*/null Mäuse, von denen Tumore entfernt wurden.

5. DISKUSSION

5.1 SPONTANE *IN VITRO* IMMORTALISIERUNG DER PRIMÄREN, EMBRYONALEN HUFs R/R UND MEFs MIT CHARAKTERISIERUNG DER ETABLIERTEN MEFs ZELLINIEN

Prinzipiell gilt, dass für eine Immortalisierung von humanen wie auch murinen Zellen die Mechanismen die das Replikationslimit begrenzen, inaktiviert werden müssen. Allerdings gibt es zwischen beiden Spezies erhebliche Unterschiede, welcher Weg zur Immortalisierung führt. So treten Mutationen, die eine spontane Immortalisierung ermöglichen, in den MEFs mit einer relativ hohen Häufigkeit auf.

Dies wird in humanen Zellen praktisch nicht beobachtet. Ein weiterer entscheidender Unterschied zwischen den Spezies sind die Telomere. So wird für humane Zellen angenommen, dass die Verkürzung der Telomere während der DNA Replikation entscheidend für das Erreichen des Replikationslimits ist. Die Telomerverkürzung findet auch in murinen Zellen statt. Allerdings befinden sich dort viel längere Telomere als in humanen Zellen.

Primäre, embryonale Maus Fibroblasten sind für die *in vitro* Immortalisierung besser geeignet als humane Fibroblasten, denn die Entwicklung vom primären Zustand zur ausgereiften Zelllinie ist für humane Fibroblasten ungemein komplexer. Allerdings scheinen primäre MEFs recht empfindlich auf die typischen Zellkulturbedingungen wie z.B. eine 20%ige Sauerstoffatmosphäre, zu reagieren (Parrinello *et al.*, 2003).

Vielmehr scheinen die artifiziellen Kulturbedingungen bei murinen Zellen einen sogenannten „Zellkulturschock“ auszulösen, der die Proliferationskapazität einschränkt (Sherr und DePinho, 2000).

In dieser Arbeit ergaben sich große Unterschiede in der Immortalisierungsrate zwischen den primären, embryonalen MEFs und HUFs R/R (Abbildung 17). Im Vergleich zu den HUFs R/R überlebten nur 10% der MEFs den Zellkulturschock mit einem entsprechenden Phenotyp der Seneszenz und traten dann durch progressive Zellproliferation in die Immortalisierung ein.

Wie schon erwähnt, reagieren die MEFs äußerst empfindlich auf die 20%ige Sauerstoffatmosphäre. Die in den Mitochondrien gebildeten freien Sauerstoffradikale (ROS) greifen die DNA an, wenn sie nicht von den zellulären antioxidativen Abwehrmechanismen neutralisiert werden. (Cooke *et al.*, 2003).

In vivo haben ROS Effekte negative Folgen für die Zellen, diese verlieren manchmal die Proliferationskapazität und treten damit in die Seneszenz oder in den programmierten Zelltod ein. Der oxidative Stress kann auch zu Mutationen der DNA führen (Busuttil *et al.*, 2003), deren Konsequenz Tumorbildung, sowie vorzeitige Zellalterung sein kann (Vijg, 2000).

In der spontanen *in vitro* Immortalisierung der primären Maus Fibroblasten spielt also der Sauerstoffgehalt eine entscheidende Rolle für die Häufigkeit von Mutationen.

Werden die Zellen mit 3% O₂ inkubiert, zeigen sich deutlich weniger Mutationen (Busuttil *et al.*, 2003) und damit werden die Zellen von der Seneszenz abgehalten (Parrinello *et al.*, 2003). Experimente haben ergeben, dass die Mutationshäufigkeit in etwa dreimal höher ist, wenn die MEFs in einer 20%igen statt einer 3%igen Sauerstoff Atmosphäre kultiviert werden (Busuttil *et al.*, 2003).

Die p53 Arginin Fibroblasten (HUFs R/R) verhalten sich *in vitro* völlig unterschiedlich gegenüber den MEFs. Da 90% der primären Zellpopulationen die Seneszenz überwunden hatten und sich als Zelllinie etablieren ließen (Abbildung 17), scheint die 20%ige O₂- Atmosphäre wesentlichen Einfluss auf die Zellproliferation zu haben.

Da die HUFs R/R aus den *Hupki* Embryonen bzw. der *Hupki* Maus gewonnen wurden, trägt die DNA einen Teil des humanen p53 Tumorsuppressor Gens (Exon 4-Exon 9), während die MEFs das p53 Wildtyp Gen tragen.

Bekannt ist, dass p53 eine wichtige Rolle in der Regulation der zellulären Proliferation nach DNA-Schädigung spielt. Das Protein kann als Transkriptionsfaktor sowohl an den Einzelstrang als auch an die doppelsträngige DNA binden und mit anderen Proteinen die DNA Reparatur übernehmen (Achanta und Huang, 2004, Zurer *et al.*, 2004). Damit kompensiert p53 den intrazellulären ROS Effekt (May *et al.*, 2005).

Der große Unterschied in den spontanen Immortalisierungsraten zwischen den HUFs R/R und MEFs unter Zellkulturbedingungen wirft die Frage auf, ob die hohe Sterberate von 90% der MEF Zellpopulationen durch irreparable DNA- Schäden aufgrund der 20%igen Sauerstoffatmosphäre ausgelöst wird? Könnte vielleicht p53 in seiner Rolle als Wächter des Genoms trotzdem keine ausreichende DNA- Reparatur bewirken?

Die Überprüfung der Apoptose mittels Annexin V/PI in primären MEFs nach der Produktion von endogenen ROS (20% O₂) und exogenen ROS (20 Gy Gammastrahlung / 4 Stunden) (Abbildung 28 und 29) lässt vermuten, dass die Apoptose in den MEFs der ersten Passagen bei 20% O₂ (endogenen ROS) deutlich häufiger ausgelöst wird als in den HUFs R/R (P<0,003).

Besteht die Möglichkeit, dass *Hupki* p53 den HUFs R/R eine gewisse Resistenz gegenüber oxidativem Stress verleiht?

Verleiht das eingebaute humane p53 Gen den Maus Fibroblasten einen gewissen Schutz gegen die DNA Schäden durch die 20%ige Sauerstoffatmosphäre?

Die Beobachtungen zu den Unterschieden zwischen den beiden Zellpopulationen HUFs R/R und MEFs wurden in der Abbildung 40 zusammengefasst.

Fibroblasten wachsen im Verbund miteinander, sie benötigen eine bestimmte Zelldichte um *in vitro* zu proliferieren. Ist der Zellkontakt untereinander unterbrochen, hat dies ein insuffizientes Zellwachstum zur Folge.

Die oben beschriebene Empfindlichkeit der MEFs gegenüber dem Sauerstoffgehalt bringt die Zellen zum Absterben. Die drastische Abnahme der Zellzahl in der Seneszenz stört den notwendigen Zellverbund der wachsenden MEFs. Die HUFs R/R sind im seneszenten Zustand von der Abnahme der Zellzahl betroffen (Abbildung 25), allerdings nicht so stark wie die MEFs. Ist der abnehmende Verbund des Zellkollektivs die Ursache für die unterschiedlichen Immortalisierungsraten der HUFs R/R und MEFs?

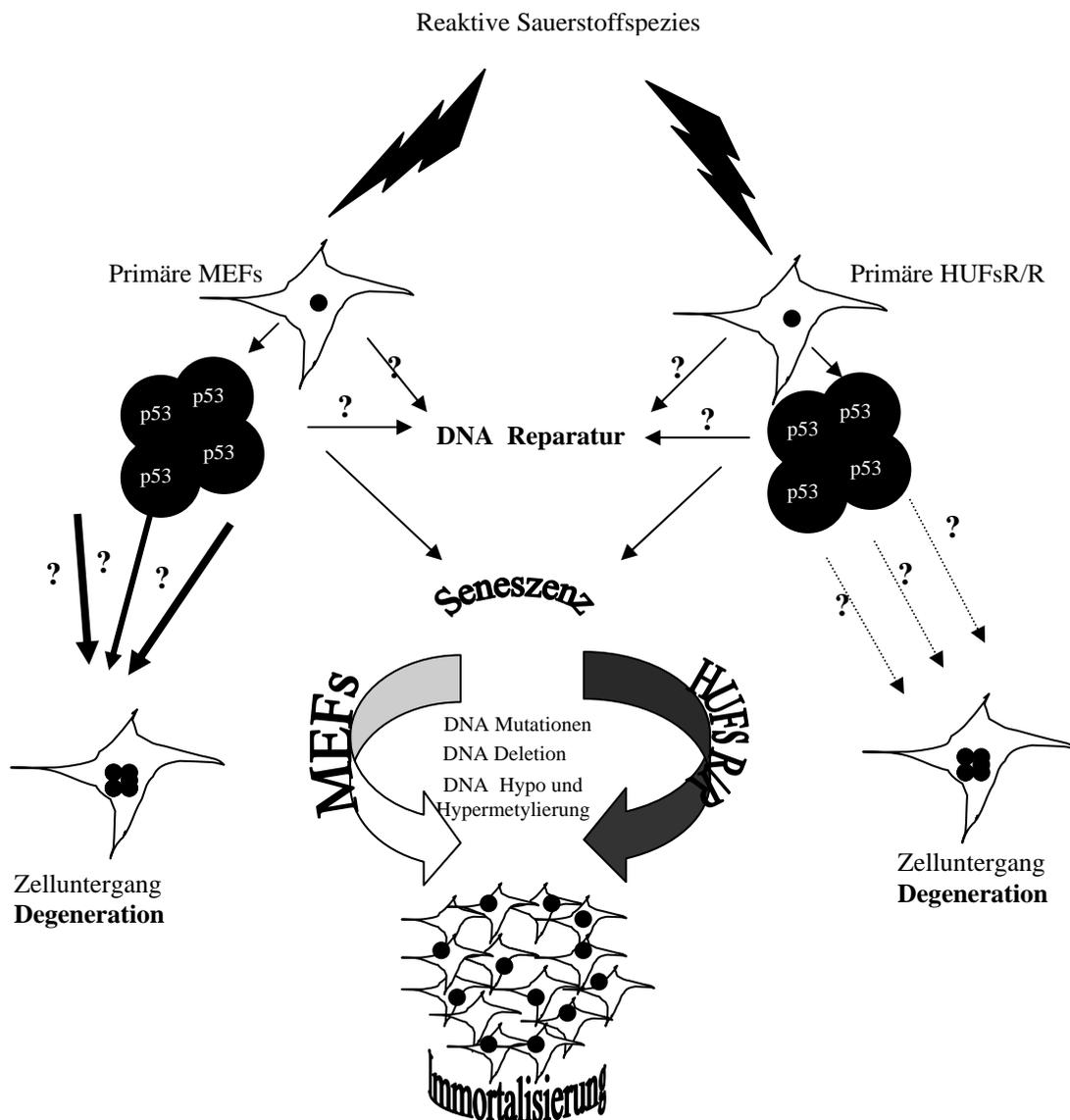


Abbildung 40: Zusammenfassung der *in vitro* ausgeübten Effekte von reaktiven Sauerstoffspezies auf die Entwicklung der primären HUFs R/R und MEFs vom primären Zustand bis zur Immortalisierung.

Unter *in vitro* Bedingungen mit 20%iger O₂- Atmosphäre wird die Zellproliferation der primären, embryonalen Maus Fibroblasten hauptsächlich vom p19/ARF/p53 Mechanismus reguliert (Harvery *et al.*, 1993; Kamijo *et al.*, 1997).

Von den 10 % der spontan immortalisierten MEF Zelllinien (n=11: wt1, wt7, wt10, wt19, wt14, wt24D, wt 24K, wt 25 wt26, wt 29 und wt42) zeigen 64% (n=7) eine Beeinträchtigung des p53/p19ARF Immortalisierungsmechanismus, entweder durch

eine p53 Punktmutation (wt1, wt19, wt24D und wt25) (Abbildung 19).bzw. eine Deletion (wt42) oder einen INK4a- Locus- Verlust (wt14 und wt24K) (Abbildung 21). Alle p53 Punktmutationen sind Transversionen vom Typ G>C oder C>G. Werden die DNA- Dinukleotide CG oder GC nicht von den Reparaturmechanismen der Zelle erkannt? Oder ist der genotoxische ROS Effekt für die C>G bzw. G>C Transversionen spezifisch?

Zwei Zelllinien (wt19 und wt24D) weisen eine p53 Punktmutation im Codon 132 (TGC) Exon 5 auf, diese Stelle scheint charakteristisch für die spontane *in vitro* Immortalisierung der MEFs zu sein. Auch ist von im unseren Labor durchgeführten Untersuchungen bekannt, das die HUFs R/R im Codon 135 (TCG) Exon 5 häufig die gleiche Punktmutation aufweisen.

Das zweite betroffene Codon 245 in wt1 ist eine p53 *hot spot* Mutation in den Maus Hauttumoren nach UV-B Strahlung (Verkler *et al.*, 2005) und entspricht dem humanen Codon 248, das auch oft neben anderen Codons (175, 245, 273 und 282) in verschiedenen humanen Tumoren von Mutationen betroffen sein kann. <http://www-p53.iarc.fr.An>

Ist das p53- Protein unverändert (wildtyp p53), lässt es sich mit der Western- Blot Analyse nicht nachweisen, denn das p53- Protein wird erst nach der Induktion (UV, Gammabestrahlung) exprimiert und wird schnell von MDM2 abgebaut. Dagegen handelt es sich in den wt1- und wt24D- Zelllinien um ein mutiertes p53- Gen, das überexprimiert wird, gefolgt von einer hohen p19- mRNA Transkription, woraus ein Überschuss an p19- Protein resultiert (Abbildung 23).

Falls MDM2 im Laufe der *in vitro* Immortalisierung unverändert geblieben ist, könnte dann vielleicht das überschüssige mutierte p53- Protein die Bindungsfähigkeit an MDM2 verloren haben?

Der durch Mutation verursachte p53- Proteinüberschuss verändert den p19/ARF/MDM2- Mechanismus. Hindert sich vielleicht das P19- Protein durch die erhöhte Menge selbst daran, seine eigentliche Aufgabe als MDM2- Inhibitor wahrzunehmen, oder existieren andere indirekte p53-abhängige Mechanismen, die das System mitkontrollieren?

Das folgende Schema ist eine visuelle Zusammenfassung dieser Frage:

Fibroblasten wachsen unbegrenzt und schnell mit keiner oder geringer p53 Transkription (Baron *et al.*, 2005).

In Abbildung 23 ist die p53- Transkription der Zelllinien mit p53 Mutationen (wt1, wt24D) im Vergleich zu den anderen mit Wildtyp p53 (wt 10, wt 26 und wt 29) und zu den primären MEFs (p2) deutlich erhöht. In den wt42 Zellen mit der p53- Deletion (Exon7-Exon11) ist die Egr1- Transkription niedrig. Bewirkt die Abwesenheit des p53 Proteins ein Ausschalten des Egr1- Faktors (Abbildung 24), da die beiden ein Komplexprotein im Cytoplasma bilden (Baron *et al.*, 2005)? Auf jeden Fall müssen weitere Untersuchungen an beiden Proteinen im Komplex für die Beantwortung dieser Behauptung durchgeführt werden.

Abbildung 24 zeigt, dass scheinbar kein direkter Zusammenhang zwischen der Deletion des p19/ARF- Locus und der Egr1- mRNA- Expression in den beiden Zelllinien wt14 und wt 24K existiert.

36% der immortalisierten MEFs (n=4) weisen weder p53- Mutationen im Bereich von Exon 2 bis Anfang Exon 11 auf, noch p19- DNA- Deletion sowie Mutationen im Kodierungsbereich (cDNA wurde sequenziert) auf. Die Zelllinien (wt7, wt10, wt26 und wt29) setzten sich vielleicht *in vitro* in der schädigenden 20%igen Sauerstoffatmosphäre gegen andere p53- abhängige oder unabhängige Immortalisierungsmechanismen durch.

Der epigenetische Mechanismus spielt auch eine Rolle in der Promoter- Methylierung von Genen und bewirkt dadurch eine Ausschaltung des Gens (*Silencing*). Für p19 und p21 Promotoren ist bekannt, dass sie durch Methylierung inaktiviert werden können. Dadurch sind die Gene nicht mehr zugänglich für die Transkription. Andererseits löst die Hypomethylierung der DNA auch die chromosomale Instabilität und spontane Immortalisierung aus (Dodge *et al.*, 2005).

Es ist notwendig, den oxidativen Stress bei der Isolierung der embryonalen Fibroblasten aus 13,5 alten Embryonen aus dem schwangeren Weibchen zu berücksichtigen. Die Zellen wurden unter *in vitro* Bedingungen unter einer 20%igen O₂ Atmosphäre präpariert, deshalb besteht die Möglichkeit, dass einige Zellen schon nach der Isolierung in den ersten Passagen in die Immortalisierung eintraten, um zu überleben.

Die unterschiedliche Genexpression von Egr1, p53, p21, Noxa und Bax in primären, embryonalen HUFs R/R und MEFs (Abbildung 27) lässt vermuten, dass die hohe Sterberate der MEFs vielleicht von der hohen Expression der p53- abhängigen apoptotischen Gene Bax und Noxa ausgelöst wurde. Sogar p53 scheint höher exprimiert zu sein, obwohl die Untersuchung der *Hupki* p53 Arginin- Transkription in Geweben (in Leber, in der Niere und in der Milz) der *Hupki*- Maus sich nicht verschieden von der Wildtyp Maus zeigte (Luo *et al.*, 2001a).

Die starke Transkription der p21- mRNA kann nicht der Grund für die Empfindlichkeit der MEFs gegenüber den ROS (*reactive oxidative species*) *in vitro* sein, denn p21 verursacht die Seneszenz in humanen Fibroblasten aber nicht in murinen Fibroblasten (Itahana *et al.*, 2004).

5.2 CHARAKTERISIERUNG DER p53 PROLIN KNOCK IN MAUS: *HUPKI* PROLIN MAUS

Trotz der großen p53- DNA Homologie zwischen dem Menschen und Maus ergeben alle Studien, dass Erkenntnisse, die aus Experimenten in der Maus gewonnen wurden, nicht zu 100% auf die Verhaltensweise des humanen p53- Gens übertragbar sind.

Deshalb wurde eine *knock in* Maus mit dem humanen p53- DNA- Fragment von Exon 4 bis Exon 9 hergestellt (Luo *et al.*, 2001a). Die erste *Hupki* Maus ist ein Modell, welches die p53 Arginin Form beeinträchtigt, allerdings ist p53 polymorph im Codon 72 in Exon 4, es codiert für Arginin (CGC) oder Prolin (CCC). Beide Formen weisen unterschiedliche Karzinomsuszeptibilitäten mehrerer Krebsarten auf (Kawajiri *et al.*, 1993; Bosse *et al.*, 2004), deshalb war die Herstellung einer zweiten p53 Prolin *knock in* Maus notwendig, um die vielfältigen Fragen über den p53 Polymorphismus zu klären.

Die *Hupki*- p53- Prolin- Maus wurde mittels der homologen Rekombinationsstrategie hergestellt (Kuhn und Torres, 1997). Das neue *Hupki*- p53- Prolin- Gen wird wie das wildtyp- p53- als auch das *Hupki*- p53- Arginin Gen (Luo *et al.*, 2001a) in mehreren Geweben transkribiert (Abbildung 32), deswegen könnte die *Hupki*- p53- Prolin- Maus neben der *Hupki*- Arginin- Maus viele Fragen über den p53 Polymorphismus klären helfen.

5.3 UNTERSUCHUNG DER P21 UND PERP INDUKTION IN PRIMÄREN, EMBRYONALEN RR UND PP HUFs

P21 ist ein weiteres Zellzykluskontroll- Gen. Es gehört zu der Familie der sogenannten Stress-Antwort-Gene. Weitere bekannte Abkürzungen des Proteins sind WAF1 (*wild-type p53 activated factor*) und CIP1 (*Cdk interacting protein*). Das Genprodukt p21 reagiert dabei als Inhibitor des Zellzyklus. P21 wird durch p53 aktiviert und ist somit ein nachgeschaltetes Zellzykluskontrollgen.

Attardi *et al.* (2000) zeigten, dass das Expressionsprofil von *perp* (*p53 apoptosis Effector related to PMP22*) ähnlich ist wie die Expressionsprofile von p53- Target Genen, wenn diese durch Zugabe von DNA- schädigenden Agentien induziert werden. Ferner wurde gezeigt, dass der Promotor von *Perp* zwei putative p53 Bindungstellen besitzt und funktionell von p53 abhängig ist. *Perp* ist auch in den apoptotischen Maus Fibroblasten wesentlich stärker exprimiert (Ihrie *et al.*, 2003; Reczek *et al.*, 2003).

Die durchgeführten *in vitro* Untersuchungen zur Expression der p21 und *perp* Gene in primären, embryonalen *Hupki* Arginin (RR HUFs) und *Hupki* Prolin (PP HUFs) homozygoten Fibroblasten nach einer (20 Gy) Gammastrahlung weisen unterschiedliche p21 und *perp* Induktion auf.

P21- und *perp*- Induktionen wurden nur in RR HUFs festgestellt (Abbildung 33), allerdings ist die p53- Arginin- Variante effizienter in der Transaktivierung des proapoptotischen *Perp*- Gens. Die höhere Menge an *Perp*- mRNA (Abbildung 33) deutet auf eine stärkere *Perp*- Induktion in den Fibroblasten mit der p53- Arginin- Variante als in den anderen mit der p53- Prolin- Form hin.

P53 spielt eine Rolle in der Aktivierung von p21 als Zellzyklusregulator, dieser zeigt mehr Affinität zu der p53- Prolin- Variante als die Arginin- Form und wird durch die Prolin- Variant stärker transkribiert (Sullivan *et al.*, 2004).

In den PP HUFs wurde eine dreifach höhere Menge an p21- mRNA, verglichen mit den RR HUFs in den ersten Passagen (Passage 2) ohne Bestrahlung, nachgewiesen.

Diese Ergebnisse müssen auf jeden Fall auf der Translationsebene der mRNA zu Proteinen mittels Western- Blot Analysen bestätigt werden.

5.4 UNTERSUCHUNG DER IN VITRO IMMORTALISIERUNG DURCH BENZO(A)PYREN (BAP) BEHANDLUNG VON HETEROZYGOTEN PRIMÄREN HUPKI ARGININ/PROLIN HETEROZYGOTEN FIBROBLASTEN (B(A)P RP).

Die Verteilung der Allele des p53 Polymorphismus ist mit verschiedenen Krebsarten assoziiert (Hogdall *et al.*, 2002). Der Prolin/Prolin- Genotyp scheint einem höheren Krebs-Risiko ausgesetzt zu sein, als der Arginin/Arginin- oder Arginin/Prolin- Genotyp (Van Heemst *et al.*, 2005).

47 primäre- *Hupki*- Arginin/Prolin- heterozygote- HUF Zellpopulationen wurden mit 5µM BaP 48 Stunden behandelt, daraus entstanden 20 (42%) immortalisierte Zelllinien. Dies ist abweichend von den mit 1µM immortalisierten Arginin-homozygoten- HUFs (32 Zelllinien von 32 primären Populationen) (Liu *et al.*, 2005), dazu repräsentieren 30% (6 Zelllinien von 20) p53 Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne (DBD). Die Immortalisierung der Arginin/Arginin HUFs (Liu *et al.*, 2005) wiesen aber 50% p53- Mutationen (16 Zelllinien von 32) auf.

Keine Mutationen wurden in den bekannten p53 *Hotspot* Sequenzen für humane Lungentumoren (im Codon 157 und 158) festgestellt. 5 Punktmutationen sind als G>C bzw. C>G Transversionen und nur eine einzige als C>T Transition.

Die Mutationen sind 100% abweichend von der Guanin zu Thymin Basensubstitution (G->T), die in den Lungentumoren bei Rauchern (Pfeifer and Hainaut, 2003) sowie in den mit BaP immortalisierten Arginin HUFs (Liu *et al.*, 2005) identifiziert wurden.

Wichtig ist zu berücksichtigen, dass der p53- Polymorphismus einerseits keinen Effekt auf das Lungentumor- Risiko hat (Matakidou *et al.* (2003) allerdings andererseits doch eine gewisse Assoziierung aufweist. Zum Beispiel wurde in den Studien von Kawajiri *et al.* (1993) und Weston *et al.* (1994) berichtet, dass der Prolin/Prolin- Genotyp ein höheres Risiko an Lungentumor- Erkrankungen zeigt.

Allerdings ist zu beachten, dass die homozygoten Arginin HUFs im Experiment von Liu *et al.* mit 1µM BaP innerhalb von 4-6 Tage behandelt wurden, dagegen wurden die BaP- RP gegenüber 5µM BaP für 48 Stunden ausgesetzt. Dieser Unterschied könnte auch eine Rolle spielen im Immortalisierungsmechanismus: Die fünffach höhere Menge des Karzinogens (5µM) könnte ein Grund für die geringe Ausbeute an Zelllinien (42% (20 von 47 Zelllinien)) sein. Durch die relativ kurze Inkubationszeit

von 48 Stunden könnte der DNA- Schaden, der durch das Benzo(a)pyren verursacht wurde, Apoptose auslösen, so dass ca. 60% die Immortalisierung nicht erreichten.

Zu diesem Zeitpunkt ist es noch zu früh für eine endgültige, befriedigende Antwort auf die Frage, inwiefern der p53- Polymorphismus auf die *in vitro* Immortalisierung durch Benzo(a)pyren einwirkt.

Aber es konnte beobachtet werden, dass das Prolin- Allel in 50% der Zelllinien (3 von 6 Zelllinien) von Mutationen betroffen war, und dadurch nicht verloren gegangen ist, stattdessen ging das Arginin- Allel verloren (Arginin LOH). (Tabelle 13 und Abbildung 34).

Es ist auf jeden Fall sinnvoll, das Experiment der *in vitro* Immortalisierung der jeweils *Hupki* p53 Arg/Arg und Pro/Pro homozygoten sowie der Pro/Arg heterozygoten HUFs mit den gleichen genetischen Hintergründen (gleiche Eltern) durchzuführen, denn die primären Fibroblasten erleben während der Isolierung aus dem Embryo beim Übergang vom *in vivo*- in den *in vitro*- Zustand einen großen zellulären Stress, der p53- Mutationen auslösen könnte.

5.5 DIE HEMIZYGOTEN P53 *HUPKI*/ KO MÄUSE LEBEN LÄNGER ALS DIE WT/KO MÄUSE

Die hemizygoten *Hupki*/null Mäuse entstanden durch die Kreuzung von 129sv *Hupki* Arginin mit C57BL/6 *black knock out* Tieren von Tyler Jacks (Jacks *et al.*, 1994).

Das als Voruntersuchung gedachte Experiment mit *Hupki*/Null Tieren, das jedoch eine zu geringe Beobachtungseinheit von nur 10 Mäusen einschloss, um statistisch verlässliche Aussagen zu treffen, dass die Tumorbildung scheinbar viel später auftrat als bei den p53 hemizygoten Wt/KO Mäusen (Abbildung 39): 6 Mäuse hatten eine Lebensdauer von ca. 14 bis 22 Monaten (siehe Tabelle 14), ohne dass die Mäuse das funktionelle p53 *Hupki* Allel verloren hatten (Abbildung 37).

Die genetischen Hintergründe üben auch Effekte auf die Tumorentstehung in den p53 *Knock out* Mäusen aus (Donehower *et al.*, 1995)

Diese Beobachtung ist vorsichtig zu betrachten, da es mir nicht möglich war, Einfluß- und Störgrößen in der relativ kurzen Zeit zu ermitteln.

Folgeexperimente unter normierten Bedingungen sollten diese vorläufigen Daten bestätigen.

6. LITERATUR

Achanta,G. and Huang,P. (2004). Role of p53 in sensing oxidative DNA damage in response to reactive oxygen species-generating agents. *Cancer Res.* 64, 6233-6239.

Ahmed,M.M., Chendil,D., Lele,S., Venkatasubbarao,K., Dey,S., Ritter,M., Rowland,R.G., and Mohiuddin,M. (2001). Early growth response-1 gene: potential radiation response gene marker in prostate cancer. *Am. J. Clin. Oncol.* 24, 500-505.

Ahmed,M.M. (2004). Regulation of radiation-induced apoptosis by early growth response-1 gene in solid tumors. *Curr. Cancer Drug Targets.* 4, 43-52.

Ahmed,M.M. (2004). Regulation of radiation-induced apoptosis by early growth response-1 gene in solid tumors. *Curr. Cancer Drug Targets.* 4, 43-52.

Ahuja,H.G., Testa,M.P., and Cline,M.J. (1990). Variation in the protein coding region of the human p53 gene. *Oncogene* 5, 1409-1410.

Allsopp,R.C., Vaziri,H., Patterson,C., Goldstein,S., Younglai,E.V., Futcher,A.B., Greider,C.W., and Harley,C.B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 10114-10118.

Appella,E. and Anderson,C.W. (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur. J. Biochem.* 268, 2764-2772.

Artandi,S.E. and Attardi,L.D. (2005). Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 881-890.

Atadja,P., Wong,H., Garkavtsev,I., Veillette,C., and Riabowol,K. (1995). Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 8348-8352.

Attardi,L.D., Reczek,E.E., Cosmas,C., Demicco,E.G., McCurrach,M.E., Lowe,S.W., and Jacks,T. (2000). PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 Family. *Genes. Dev.*14, 704-718.

Baron,V., Adamson,E.D., Calogero,A., Ragona,G., and Mercola,D. (2006). The transcription factor Egr1 is a direct regulator of multiple tumor suppressors including TGFbeta1, PTEN, p53, and fibronectin. *Cancer Gene Ther.* 13, 115-124.

Beausejour,C.M., Krtolica,A., Galimi,F., Narita,M., Lowe,S.W., Yaswen,P., and Campisi,J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* 22, 4212-4222.

Beckman,G., Birgander,R., Sjalander,A., Saha,N., Holmberg,P.A., Kivela,A., and Beckman,L. (1994). Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum. Hered.* 44, 266-270

Bennett,W.P., Hussain,S.P., Vahakangas,K.H., Khan,M.A., Shields,P.G., and Harris,C.C. (1999). Molecular epidemiology of human cancer risk: gene-environment interactions and p53 mutation spectrum in human lung cancer. *J. Pathol.* 187, 8-18.

- Bergamaschi,D., Gasco,M., Hiller,L., Sullivan,A., Syed,N., Trigiante,G., Yulug,I., Merlano,M., Numico,G., Comino,A., Attard,M., Reelfs,O., Gusterson,B., Bell,A.K., Heath,V., Tavassoli,M., Farrell,P.J., Smith,P., Lu,X., and Crook,T. (2003). p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell* 3, 387-402.
- Berggren,P., Kumar,R., Steineck,G., Ichiba,M., and Hemminki,K. (2001). Ethnic variation in genotype frequencies of a p53 intron 7 polymorphism. *Mutagenesis* 16, 475-478.
- Bernardi,R., Scaglioni,P.P., Bergmann,S., Horn,H.F., Vousden,K.H., and Pandolfi,P.P. (2004). PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nat. Cell Biol.* 6, 665-672.
- Das BGFA -Forschung für den Gesundheitsschutz am Arbeitsplatz. (03/2002). Info Benzo[a]pyren.
- Blasco,M.A., Lee,H.W., Hande,M.P., Samper,E., Lansdorp,P.M., DePinho,R.A., and Greider,C.W. (1997). Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking
- Boehm,J.S., Hession,M.T., Bulmer,S.E., and Hahn,W.C. (2005). Transformation of human and murine fibroblasts without viral oncoproteins. *Mol. Cell Biol.* 25, 6464-6474.
- Boehm,J.S. and Hahn,W.C. (2005). Understanding transformation: progress and gaps. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 13-17.
- Bonafe,M., Salvioli,S., Barbi,C., Trapassi,C., Tocco,F., Storci,G., Invidia,L., Vannini,I., Rossi,M., Marzi,E., Mishto,M., Capri,M., Olivieri,F., Antonicelli,R., Memo,M., Uberti,D., Nacmias,B., Sorbi,S., Monti,D., and Franceschi,C. (2004). The different apoptotic potential of the p53 codon 72 alleles increases with age and modulates in vivo ischaemia-induced cell death. *Cell Death. Differ.* 11, 962-973.
- Bosse,F.,Kanappilly,A., Görögh, Gottschlich,S. (2004). Bedeutung von p53 Polymorphismus Codon 72 bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halz-Bereiches. *Laryngorhinootologie*.83.
- Buller,R.E., Skilling,J.S., Kaliszewski,S., Niemann,T., and Anderson,B. (1995). Absence of significant germ line p53 mutations in ovarian cancer patients. *Gynecol. Oncol.* 58, 368-374
- Busuttill,R.A., Rubio,M., Dolle,M.E., Campisi,J., and Vijg,J. (2003). Oxygen accelerates the accumulation of mutations during the senescence and immortalization of murine cells in culture. *Aging Cell* 2, 287-294.
- Campisi,J. (2000). Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo* 14, 183-188.
- Campisi,J. (2001). Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.* 11, S27-S31.

- Campisi,J., Kim,S.H., Lim,C.S., and Rubio,M. (2001). Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. *Exp. Gerontol.* 36, 1619-1637.
- Campisi,J. (2001). From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture? *Exp. Gerontol.* 36, 607-618.
- Campisi,J., Kim,S.H., Lim,C.S., and Rubio,M. (2001). Cellular senescence, cancer and aging: the telomere connection. *Exp. Gerontol.* 36, 1619-1637.
- Campisi,J. (2001). From cells to organisms: can we learn about aging from cells in culture? *Exp. Gerontol.* 36, 607-618.
- Campisi,J. (2005). Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120, 513-522.
- Carbone,D., Chiba,I., and Mitsudomi,T. (1991). Polymorphism at codon 213 within the p53 gene. *Oncogene* 6, 1691-1692.
- Chang,B.D., Xuan,Y., Broude,E.V., Zhu,H., Schott,B., Fang,J., and Roninson,I.B. (1999). Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene* 18, 4808-4818.
- Chen,D., Li,M., Luo,J., and Gu,W. (2003). Direct interactions between HIF-1 alpha and Mdm2 modulate p53 function. *J. Biol. Chem.* 278, 13595-13598.
- Chen,J.J., Hong,Y., Rustamzadeh,E., Baleja,J.D., and Androphy,E.J. (1998). Identification of an alpha helical motif sufficient for association with papillomavirus E6. *J. Biol. Chem.* 273, 13537-13544.
- Chernov,M.V., Bean,L.J., Lerner,N., and Stark,G.R. (2001). Regulation of ubiquitination and degradation of p53 in unstressed cells through C-terminal phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 276, 31819-31824.
- Chiba,I., Takahashi,T., Nau,M.M., D'Amico,D., Curiel,D.T., Mitsudomi,T., Buchhagen,D.L., Carbone,D., Piantadosi,S., Koga,H. (1990). Mutations in the p53 gene are frequent in primary, resected non-small cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. *Oncogene* 5, 1603-1610.
- Collins,C.J. and Sedivy,J.M. (2003). Involvement of the INK4a/Arf gene locus in senescence. *Aging Cell* 2, 145-150.
- Cooke,M.S., Evans,M.D., Dizdaroglu,M., and Lunec,J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation *FASEB J.* 17, 1195-1214.
- Crook,T., Tidy,J.A., and Vousden,K.H. (1991). Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell* 67, 547-556.
- Cross,S.M., Sanchez,C.A., Morgan,C.A., Schimke,M.K., Ramel,S., Idzerda,R.L., Raskind,W.H., and Reid,B.J. (1995). A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science* 267, 1353-1356.

- Dannenbergh, J.H., van Rossum, A., Schuijff, L., and te, R.H. (2000). Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions. *Genes Dev.* *14*, 3051-3064.
- Das, A., Chendil, D., Dey, S., Mohiuddin, M., Mohiuddin, M., Milbrandt, J., Rangnekar, V.M., and Ahmed, M.M. (2001). Ionizing radiation down-regulates p53 protein in primary Egr-1^{-/-} mouse embryonic fibroblast cells causing enhanced resistance to apoptosis. *J. Biol. Chem.* *276*, 3279-3286.
- Dimri, G.P., Martinez, J.L., Jacobs, J.J., Keblusek, P., Itahana, K., Van Lohuizen, M., Campisi, J., Wazer, D.E., and Band, V. (2002). The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* *62*, 4736-4745.
- Dodge, J.E., Okano, M., Dick, F., Tsujimoto, N., Chen, T., Wang, S., Ueda, Y., Dyson, N., and Li, E. (2005). Inactivation of Dnmt3b in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization. *J. Biol. Chem.* *280*, 17986-17991.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* *356*, 215-221.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Vogel, H., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Park, S.H., Thompson, T., Ford, R.J., and Bradley, A. (1995). Effects of genetic background on tumorigenesis in p53-deficient mice. *Mol. Carcinog.* *14*, 16-22.
- Dumont, P., Leu, J.I., Della, P.A., III, George, D.L., and Murphy, M. (2003). The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat. Genet.* *33*, 357-365.
- El Deiry, W.S. (1998). Regulation of p53 downstream genes. *Semin. Cancer Biol.* *8*, 345-357.
- El Deiry, W.S. (1998). p21/p53, cellular growth control and genomic integrity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *227*, 121-137.
- Fan, R., Wu, M.T., Miller, D., Wain, J.C., Kelsey, K.T., Wiencke, J.K., and Christiani, D.C. (2000). The p53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *9*, 1037-1042.
- Feldmeyer, N., Schmeiser, H.H., Muelbauer, K.R., Belharazem, D., Knyazev, Y., Nedelko, T. and Hollsteim, M. (2006). A Cell Immortalization Assay to Investigate the Mutation Signature of Aristolochic Acid in Human p53 Gene Sequences. *Mutation Res.*, in presse.
- Felix, C.A., Brown, D.L., Mitsudomi, T., Ikagaki, N., Wong, A., Wasserman, R., Womer, R.B., and Biegel, J.A. (1994). Polymorphism at codon 36 of the p53 gene. *Oncogene* *9*, 327-328.

- Felley-Bosco,E., Weston,A., Cawley,H.M., Bennett,W.P., and Harris,C.C. (1993). Functional studies of a germ-line polymorphism at codon 47 within the p53 gene. *Am. J. Hum. Genet.* 53, 752-759.
- Ferraro,B., Bepler,G., Sharma,S., Cantor,A., and Haura,E.B. (2005). EGR1 predicts PTEN and survival in patients with non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 23, 1921-1926.
- Fields,S. and Jang,S.K. (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* 249, 1046-1049.
- Fischer-Maliszewska,L., Kazanowska,B., Kusnierczyk,P., Manczak,M., Niepieklo,W., Pochron-Zeman,B., and Nowakowska,B. (2003). Is p53 intronic variant G13964C associated with predisposition to cancer? *J. Appl. Genet.* 44, 547-552.
- Guo,A., Salomoni,P., Luo,J., Shih,A., Zhong,S., Gu,W., and Pandolfi,P.P. (2000). The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 2, 730-736.
- Fridman,J.S. and Lowe,S.W. (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22, 9030-9040.
- Futreal,P.A., Barrett,J.C., and Wiseman,R.W. (1991). An Alu polymorphism intragenic to the TP53 gene. *Nucleic Acids Res.* 19, 6977.
- Gao,W.M., Mady,H.H., Yu,G.Y., Siegfried,J.M., Luketich,J.D., Melhem,M.F., and Keohavong,P. (2003). Comparison of p53 mutations between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung: unique spectra involving G to A transitions and G to T transversions in both histologic types. *Lung Cancer* 40, 141-150.
- Greider,C.W. (1990). Telomeres, telomerase and senescence. *Bioessays* 12, 363-369.
- Greider,C.W. and Blackburn,E.H. (1996). Telomeres, telomerase and cancer. *Sci. Am.* 274, 92-97.
- Greider,C.W. (1996). Telomere length regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 337-365.
- Groth,A., Weber,J.D., Willumsen,B.M., Sherr,C.J., and Roussel,M.F. (2000). Oncogenic Ras induces p19ARF and growth arrest in mouse embryo fibroblasts lacking p21Cip1 and p27Kip1 without activating cyclin D-dependent kinases. *J. Biol. Chem.* 275, 27473-27480.
- Haber,D.A. (1997). Splicing into senescence: the curious case of p16 and p19ARF. *Cell* 91, 555-558.
- Hahn,W.C., Counter,C.M., Lundberg,A.S., Beijersbergen,R.L., Brooks,M.W., and Weinberg,R.A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 400, 464-468.
- Hainaut,P. and Pfeifer,G.P. (2001). Patterns of p53 G->T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke. *Carcinogenesis* 22, 367-374.

- Harley, C.B., Futcher, A.B., and Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.
- Harley, C.B., Vaziri, H., Counter, C.M., and Allsopp, R.C. (1992). The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp. Gerontol.* 27, 375-382.
- Harris, N., Brill, E., Shohat, O., Prokocimer, M., Wolf, D., Arai, N., and Rotter, V. (1986). Molecular basis for heterogeneity of the human p53 protein. *Mol. Cell Biol.* 6, 4650-4656.
- Harvey, M., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Bradley, A., and Donehower, L.A. (1993). Genetic background alters the spectrum of tumors that develop in p53-deficient mice. *FASEB J.* 7, 938-943.
- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z., and Haupt, Y. (2003). Apoptosis - the p53 network. *J. Cell Sci.* 116, 4077-4085.
- Hayflick, L. (1961). The establishment of a line (WISH) of human amnion cells in continuous cultivation. *Exp. Cell Res.* 23, 14-20.
- Hayflick, L. and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585-621.
- Hellweg, K., Scheunemann, D., Hoffmann, M., Stefan, G. (2005). Zusammenhang zwischen dem HPV-Status und dem Polymorphismus des p53 Tumorsuppressorgens in Codon 72 des Exon 4 bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. HNO-Informationen (Kongressabstracts). DOI: 10.1055/s-2005-869146.
- Hergenhahn, M., Luo, J.L., and Hollstein, M. (2004). p53 designer genes for the modern mouse. *Cell Cycle* 3, 738-741.
- Hogdall, E.V., Hogdall, C.K., Christensen, L., Glud, E., Blaakaer, J., Bock, J.E., Vuust, J., Norgaard-Pedersen, B., and Kjaer, S.K. (2002). Distribution of p53 codon 72 polymorphisms in ovarian tumour patients and their prognostic significance in ovarian cancer patients. *Anticancer Res.* 22, 1859-1864.
- Hornsby, P.J. (2005). Replicative senescence and cancer. *Cancer Treat. Res.* 124, 53-73.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., and 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, 4129-4135.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., and Howley, P.M. (1993). Cloning and expression of the cDNA for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Mol. Cell Biol.* 13, 775-784.
- Hussain, S.P. and Harris, C.C. (1999). p53 mutation spectrum and load: the generation of hypotheses linking the exposure of endogenous or exogenous carcinogens to human cancer. *Mutat. Res.* 428, 23-32.

- Ihrle,R.A., Reczek,E., Horner,J.S., Khachatryan,L., Sage,J., Jacks,T., and Attardi,L.D. (2003). Perp is a mediator of p53-Dependent Apoptosis in Diverse Cell Types. *Curr. Biol.* 13, 1985-1990.
- Itahana,K., Dimri,G.P., Hara,E., Itahana,Y., Zou,Y., Desprez,P.Y., and Campisi,J. (2002). A role for p53 in maintaining and establishing the quiescence growth arrest in human cells. *J. Biol. Chem.* 277, 18206-18214.
- Itahana,K., Zou,Y., Itahana,Y., Martinez,J.L., Beausejour,C., Jacobs,J.J., Van Lohuizen,M., Band,V., Campisi,J., and Dimri,G.P. (2003). Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Mol. Cell Biol.* 23, 389-401.
- Itahana,K., Campisi,J., and Dimri,G.P. (2004). Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology.* 5, 1-10.
- Ito,T., Seyama,T., Hayashi,T., Mizuno,T., Iwamoto,K.S., Tsuyama,N., Dohi,K., Nakamura,N., and Akiyama,M. (1994). HaeIII polymorphism in intron 1 of the human p53 gene. *Hum. Genet.* 93, 222.
- Jacks,T., Remington,L., Williams,B.O., Schmitt,E.M., Halachmi,S., Bronson,R.T., and Weinberg,R.A. (1994). Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr. Biol.* 4, 1-7.
- Jackson,M.W. and Berberich,S.J. (2000). MdmX protects p53 from Mdm2-mediated degradation. *Mol. Cell Biol.* 20, 1001-1007.
- Jacobs,J.J., Kieboom,K., Marino,S., DePinho,R.A., and van,L.M. (1999). The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* 397, 164-168.
- Jones,K.R., Elmore,L.W., Jackson-Cook,C., Demasters,G., Povirk,L.F., Holt,S.E., and Gewirtz,D.A. (2005). P53-Dependent accelerated senescence induced by ionizing radiation in breast tumour cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 81, 445-458.
- Kaesler,M.D. and Iggo,R.D. (2002). Chromatin immunoprecipitation analysis fails to support the latency model for regulation of p53 DNA binding activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 95-100.
- Kamijo,T., Zindy,F., Roussel,M.F., Quelle,D.E., Downing,J.R., Ashmun,R.A., Grosveld,G., and Sherr,C.J. (1997). Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 91, 649-659.
- Kanungo,MS., (1994). *Genes and aging*. Cambridge University press.
- Karlseder,J., Smogorzewska,A., and de Lange,T. (2002). Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* 295, 2446-2449.
- Kato,S., Han,S.Y., Liu,W., Otsuka,K., Shibata,H., Kanamaru,R., and Ishioka,C. (2003). Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 8424-8429.

- Kawajiri,K., Nakachi,K., Imai,K., Watanabe,J., and Hayashi,S. (1993). Germ line polymorphisms of p53 and CYP1A1 genes involved in human lung cancer. *Carcinogenesis* *14*, 1085-1089.
- Klug,S.J., Wilmotte,R., Santos,C., Almonte,M., Herrero,R., Guerrero,I., Caceres,E., Peixoto-Guimaraes,D., Lenoir,G., Hainaut,P., Walboomers,J.M., and Munoz,N. (2001). TP53 polymorphism, HPV infection, and risk of cervical cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *10*, 1009-1012.
- Koushik,A., Platt,R.W., and Franco,E.L. (2004). p53 codon 72 polymorphism and cervical neoplasia: a meta-analysis review. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *13*, 11-22.
- Krimpenfort,P., Quon,K.C., Mooi,W.J., Loonstra,A., and Berns,A. (2001). Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* *413*, 83-86.
- Krishnamurthy,J., Torrice,C., Ramsey,M.R., Kovalev,G.I., Al Regaiey,K., Su,L., and Sharpless,N.E. (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest* *114*, 1299-1307.
- Krones-Herzig,A., Adamson,E., and Mercola,D. (2003). Early growth response 1 protein, an upstream gatekeeper of the p53 tumor suppressor, controls replicative senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 3233-3238.
- Kussie,P.H., Gorina,S., Marechal,V., Elenbaas,B., Moreau,J., Levine,A.J., and Pavletich,N.P. (1996). Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science* *274*, 948-953.
- Lane,D.P. and Crawford,L.V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* *278*, 261-263.
- Lane,D.P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* *358*, 15-16.
- Lazar,V., Hazard,F., Bertin,F., Janin,N., Bellet,D., and Bressac,B. (1993). Simple sequence repeat polymorphism within the p53 gene. *Oncogene* *8*, 1703-1705.
- Li,M., Brooks,C.L., Wu-Baer,F., Chen,D., Baer,R., and Gu,W. (2003). Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* *302*, 1972-1975.
- Li,X. and Coffino,P. (1996). High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J. Virol.* *70*, 4509-4516.
- Li,X., Dumont,P., Della,P.A., Shetler,C., and Murphy,M.E. (2005). The codon 47 polymorphism in p53 is functionally significant. *J. Biol. Chem.* *280*, 24245-24251.
- Linzer,D.I. and Levine,A.J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* *17*, 43-52.

- Liu,Z., Hergenhahn,M., Schmeiser,H.H., Wogan,G.N., Hong,A., and Hollstein,M. (2004). Human tumor p53 mutations are selected for in mouse embryonic fibroblasts harboring a humanized p53 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 2963-2968.
- Liu,Z., Muehlbauer,K.R., Schmeiser,H.H., Hergenhahn,M., Belharazem,D., and Hollstein,M.C. (2005). p53 mutations in benzo(a)pyrene-exposed human p53 knock-in murine fibroblasts correlate with p53 mutations in human lung tumors. *Cancer Res.* *65*, 2583-2587.
- Lieonart,M.E., Kirk,G.D., Villar,S., Lesi,O.A., Dasgupta,A., Goedert,J.J., Mendy,M., Hollstein,M.C., Montesano,R., Groopman,J.D., Hainaut,P., and Friesen,M.D. (2005). Quantitative analysis of plasma TP53 249Ser-mutated DNA by electrospray ionization mass spectrometry. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *14*, 2956-2962.
- Luch,A. (2002). Cell cycle control and cell division: implications for chemically induced carcinogenesis. *Chembiochem.* *3*, 506-516.
- Luo,J., Li,M., Tang,Y., Laszkowska,M., Roeder,R.G., and Gu,W. (2004). Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *101*, 2259-2264.
- Luo,J.L., Tong,W.M., Yoon,J.H., Hergenhahn,M., Koomagi,R., Yang,Q., Galendo,D., Pfeifer,G.P., Wang,Z.Q., and Hollstein,M. (2001). UV-induced DNA damage and mutations in Hupki (human p53 knock-in) mice recapitulate p53 hotspot alterations in sun-exposed human skin. *Cancer Res.* *61*, 8158-8163.
- Lundberg,A.S., Hahn,W.C., Gupta,P., and Weinberg,R.A. (2000). Genes involved in senescence and immortalization. *Curr. Opin. Cell Biol.* *12*, 705-709.
- Maki,C.G. (1999). Oligomerization is required for p53 to be efficiently ubiquitinated by MDM2. *J. Biol. Chem.* *274*, 16531-16535.
- Marin,M.C., Jost,C.A., Brooks,L.A., Irwin,M.S., O'Nions,J., Tidy,J.A., James,N., McGregor,J.M., Harwood,C.A., Yulug,I.G., Vousden,K.H., Allday,M.J., Gusterson,B., Ikawa,S., Hinds,P.W., Crook,T., and Kaelin,W.G., Jr. (2000). A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat. Genet.* *25*, 47-54.
- May,T., Mueller,P.P., Weich,H., Froese,N., Deutsch,U., Wirth,D., Kroger,A., and Hauser,H. (2005). Establishment of murine cell lines by constitutive and conditional immortalization. *J. Biotechnol.* *120*, 99-110.
- Meek,D.W. (2002). p53 Induction: phosphorylation sites cooperate in regulating. *Cancer Biol. Ther.* *1*, 284-286.
- Munger,K., Scheffner,M., Huibregtse,J.M., and Howley,P.M. (1992). Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. *Cancer Surv.* *12*, 197-217.
- Murphy,M., Ahn,J., Walker,K.K., Hoffman,W.H., Evans,R.M., Levine,A.J., and George,D.L. (1999). Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes Dev.* *13*, 2490-2501.

- Murphy, M.E., Leu, J.I., and George, D.L. (2004). p53 moves to mitochondria: a turn on the path to apoptosis. *Cell Cycle* 3, 836-839.
- Noda, A., Ning, Y., Venable, S.F., Pereira-Smith, O.M., and Smith, J.R. (1994). Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp. Cell Res.* 211, 90-98
- Nakamura, S., Roth, J.A., and Mukhopadhyay, T. (2000). Multiple lysine mutations in the C-terminal domain of p53 interfere with MDM2-dependent protein degradation and ubiquitination. *Mol. Cell Biol.* 20, 9391-9398.
- Obata, M., Imamura, E., Yoshida, Y., Goto, J., Kishibe, K., Yasuda, A., and Ogawa, K. (2001). Resistance of primary cultured mouse hepatic tumor cells to cellular senescence despite expression of p16(Ink4a), p19(Arf), p53, and p21(Waf1/Cip1). *Mol. Carcinog.* 32, 9-18.
- Olivier, M., Eeles, R., Hollstein, M., Khan, M.A., Harris, C.C., and Hainaut, P. (2002). The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum. Mutat.* 19, 607-614.
- Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., and Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* 5, 741-747.
- Pfeifer, G.P., Denissenko, M.F., Olivier, M., Tretyakova, N., Hecht, S.S., and Hainaut, P. (2002). Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 21, 7435-7451.
- Pfeifer, G.P. and Hainaut, P. (2003). On the origin of G --> T transversions in lung cancer. *Mutat. Res.* 526, 39-43.
- Pleasant, L.M. and Hansen, M.F. (1994). Identification of a polymorphism in intron 2 of the p53 gene. *Hum. Genet.* 93, 607-608.
- 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., and DePinho, R.A. (1998). The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92, 713-723.
- Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A., and Sherr, C.J. (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83, 993-1000.
- Ramirez, R.D., Herbert, B.S., Vaughan, M.B., Zou, Y., Gandia, K., Morales, C.P., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2003). Bypass of telomere-dependent replicative senescence (M1) upon overexpression of Cdk4 in normal human epithelial cells. *Oncogene* 22, 433-444.
- Rane, S.G., Cosenza, S.C., Mettus, R.V., and Reddy, E.P. (2002). Germ line transmission of the Cdk4(R24C) mutation facilitates tumorigenesis and escape from cellular senescence. *Mol. Cell Biol.* 22, 644-656.

- Rangarajan,A. and Weinberg,R.A. (2003). Opinion: Comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. *Nat. Rev. Cancer* 3, 952-959.
- Reczek,E.E., Flores,E.R., Tsay,A.S., Attardi,I.D., and Jacks,T. (2003). Multiple response elements differential p53 binding control Perp expression during apoptosis. *Mol. Cancer. Res.* 1, 1048-1057.
- Rodin,S.N. and Rodin,A.S. (2004). On the excess of G --> T transversions in the p53 gene in lung cancer cell lines. Reply to Pfeifer and Hainaut. *Mutat. Res.* 545, 141-144.
- Rodriguez,M.S., Desterro,J.M., Lain,S., Lane,D.P., and Hay,R.T. (2000). Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol. Cell Biol.* 20, 8458-8467.
- Sage,J., Mulligan,G.J., Attardi,L.D., Miller,A., Chen,S., Williams,B., Theodorou,E., and Jacks,T. (2000). Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization. *Genes Dev.* 14, 3037-3050.
- Salomoni,P., Bernardi,R., Bergmann,S., Changou,A., Tuttle,S., and Pandolfi,P.P. (2005). The promyelocytic leukemia protein PML regulates c-Jun function in response to DNA damage. *Blood* 105, 3686-3690.
- Scheffner,M., Huibregtse,J.M., Vierstra,R.D., and 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.
- Seger,Y.R., Garcia-Cao,M., Piccinin,S., Cunsolo,C.L., Doglioni,C., Blasco,M.A., Hannon,G.J., and Maestro,R. (2002). Transformation of normal human cells in the absence of telomerase activation. *Cancer Cell* 2, 401-413.
- Serrano,M., Lee,H., Chin,L., Cordon-Cardo,C., Beach,D., and DePinho,R.A. (1996). Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 85, 27-37.
- Serrano,M., Lin,A.W., McCurrach,M.E., Beach,D., and Lowe,S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.
- Sharp,D.A., Kratowicz,S.A., Sank,M.J., and George,D.L. (1999). Stabilization of the MDM2 oncoprotein by interaction with the structurally related MDMX protein. *J. Biol. Chem.* 274, 38189-38196.
- Sharpless,N.E., Bardeesy,N., Lee,K.H., Carrasco,D., Castrillon,D.H., Aguirre,A.J., Wu,E.A., Horner,J.W., and DePinho,R.A. (2001). Loss of p16Ink4a with retention of p19Arf predisposes mice to tumorigenesis. *Nature* 413, 86-91.
- Sharpless,N.E., Ramsey,M.R., Balasubramanian,P., Castrillon,D.H., and DePinho,R.A. (2004). The differential impact of p16(INK4a) or p19(ARF) deficiency on cell growth and tumorigenesis. *Oncogene* 23, 379-385.
- Shay,J.W. and Wright,W.E. (2005). Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* 26, 867-874.

- Shelton,D.N., Chang,E., Whittier,P.S., Choi,D., and Funk,W.D. (1999). Microarray analysis of replicative senescence. *Curr. Biol.* 9, 939-945
- Sherr,C.J. and DePinho,R.A. (2000). Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 102, 407-410.
- Shieh,S.Y., Ikeda,M., Taya,Y., and Prives,C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 91, 325-334.
- Sjalander,A., Birgander,R., Saha,N., Beckman,L., and Beckman,G. (1996). p53 polymorphisms and haplotypes show distinct differences between major ethnic groups. *Hum. Hered.* 46, 41-48.
- Shmueli,A. and Oren,M. (2004). Regulation of p53 by Mdm2: fate is in the numbers. *Mol. Cell* 13, 4-5.
- Soussi,T., Caron,d.F., and May,P. (1990). Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* 5, 945-952.
- Soussi,T. (2000). The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 910, 121-137.
- Soussi,T. and Beroud,C. (2001). Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* 1, 233-240.
- Soussi,T., Kato,S., Levy,P.P., and Ishioka,C. (2005). Reassessment of the TP53 mutation database in human disease by data mining with a library of TP53 missense mutations. *Hum. Mutat.* 25, 6-17.
- Stansel,R.M., Subramanian,D., and Griffith,J.D. (2002). p53 binds telomeric single strand overhangs and t-loop junctions in vitro. *J. Biol. Chem.* 277, 11625-11628.
- Storey,A., Thomas,M., Kalita,A., Harwood,C., Gardiol,D., Mantovani,F., Breuer,J., Leigh,I.M., Matlashewski,G., and Banks,L. (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 393, 229-234.
- Stott,F.J., Bates,S., James,M.C., McConnell,B.B., Starborg,M., Brookes,S., Palmero,I., Ryan,K., Hara,E., Vousden,K.H., and 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, 5001-5014.
- Sullivan,A., Syed,N., Gasco,M., Bergamaschi,D., Trigiante,G., Attard,M., Hiller,L., Farrell,P.J., Smith,P., Lu,X., and Crook,T. (2004). Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene* 23, 3328-3337.
- Taylor,W.R. and Stark,G.R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20, 1803-1815.
- Thomas,M., Kalita,A., Labrecque,S., Pim,D., Banks,L., and Matlashewski,G. (1999). Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol. Cell Biol.* 19, 1092-1100.

- Tommasino,M., Accardi,R., Caldeira,S., Dong,W., Malanchi,I., Smet,A., and Zehbe,I. (2003). The role of TP53 in Cervical carcinogenesis. *Hum. Mutat.* *21*, 307-312.
- Torres,R.M., and Kühn,R. (1997).Laboratory protocols for conditional Gene Targeting. Instiute for Genetics university of Cologne. Oxford University press.
- Van Heemst,D., Mooijaart,S.P., Beekman,M., Schreuder,J., de Craen,A.J., Brandt,B.W., Slagboom,P.E., and Westendorp,R.G. (2005). Variation in the human TP53 gene affects old age survival and cancer mortality. *Exp. Gerontol.* *40*, 11-15.
- Vaziri,H., Schachter,F., Uchida,I., Wei,L., Zhu,X., Effros,R., Cohen,D., and Harley,C.B. (1993). Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am. J. Hum. Genet.* *52*, 661-667.
- Vaziri,H. and Benchimol,S. (1996). From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Exp. Gerontol.* *31*, 295-301.
- Vaziri,H., Dessain,S.K., Ng,E.E., Imai,S.I., Frye,R.A., Pandita,T.K., Guarente,L., and Weinberg,R.A. (2001). hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell* *107*, 149-159.
- Verkler,T.L., Couch,L.H., Howard,P.C., and Parsons,B.L. (2005). Quantifying levels of p53 mutation in mouse skin tumors. *Environ. Mol. Mutagen.* *45*, 427-434.
- Vijg,J. (2000). Somatic mutations and aging: a re-evaluation. *Mutat. Res.* *447*, 117-135.
- Voorhoeve,P.M. and Agami,R. (2003). The tumor-suppressive functions of the human INK4A locus. *Cancer Cell* *4*, 311-319.
- Vos,M., Adams,C.H., Victor,T.C., and van Helden,P.D. (2003). Polymorphisms and mutations found in the regions flanking exons 5 to 8 of the TP53 gene in a population at high risk for esophageal cancer in South Africa. *Cancer Genet. Cytogenet.* *140*, 23-30.
- Weber,J.D., Taylor,L.J., Roussel,M.F., Sherr,C.J., and Bar-Sagi,D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat. Cell Biol.* *1*, 20-26.
- Weinberg,R.A. (1997). The cat and mouse games that genes, viruses, and cells play. *Cell* *88*, 573-575.
- Weisz,L., Zalcenstein,A., Stambolsky,P., Cohen,Y., Goldfinger,N., Oren,M., and Rotter,V. (2004). Transactivation of the EGR1 gene contributes to mutant p53 gain of function. *Cancer Res.* *64*, 8318-8327.
- Weston,A., Perrin,L.S., Forrester,K., Hoover,R.N., Trump,B.F., Harris,C.C., and Caporaso,N.E. (1992). Allelic frequency of a p53 polymorphism in human lung cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* *1*, 481-483.

Weston,A., Ling-Cawley,H.M., Caporaso,N.E., Bowman,E.D., Hoover,R.N., Trump,B.F., and Harris,C. (1994). Determination of the allelic frequencies of an L-myc and p53 polymorphism in human lung cancer. *Carcinogenesis*. 15, 583-587.

Willems,P.M., Meyerink,J.P., van de Locht,L.T., Smetsers,T.F., de Vries,N., and Mensink,E.J. (1992). PCR detection of a BglIII polymorphism in intron I of the human p53 gene (TP53). *Nucleic Acids Res.* 20, 1172.

Wright,W.E., Pereira-Smith,O.M., and Shay,J.W. (1989). Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* 9, 3088-3092.

Wright,W.E. and Shay,J.W. (2000). Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology. *Nat. Med.* 6, 849-851.

Wu,X., Bayle,J.H., Olson,D., and Levine,A.J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* 7, 1126-1132.

Zauberman,A., Flusberg,D., Haupt,Y., Barak,Y., and Oren,M. (1995). A functional p53-responsive intronic promoter is contained within the human mdm2 gene. *Nucleic Acids Res.* 23, 2584-2592.

Zhang,S., Yuan,Z., Liu,H., Zou,H., Xiong,H., and Wu,Y. (2000). Analysis of acyclovir by high performance capillary electrophoresis with on-column amperometric detection. *Electrophoresis* 21, 2995-2998.

Zurer,I., Hofseth,L.J., Cohen,Y., Xu-Welliver,M., Hussain,S.P., Harris,C.C., and Rotter,V. (2004). The role of p53 in base excision repair following genotoxic stress. *Carcinogenesis* 25, 11-19.

7. **PUBLIKATIONSLISTE, D. BELHARAZEM**

Liu,Z., Muehlbauer,K:R., Schmeiser,H:H., Hergenahn,M., **Belharazem,D.** and Hollstein,M. (2005). P53 mutations in Benzo[a]pyrene-exposed Hupki (Human p53 knock-in) murine fibroblasts correlate with p53 mutations in smokers' lung tumors. *Cancer Res*, 65 (7), 2583-2587.

Feldmayer, N., Schmeiser, H.H., Muehlbauer, K.R., **Belharazem, D.**, Knyazev,Y., Nedelko,T. and Hollstein,M. A cell immortalization Assay to investigate the mutation Signature of Aristolochic Acid in Human p53 Gene Sequences (2006) *Mutations Res.*, in press.

Liu,Z., **Belharazem,D.**, Muehlbauer,K.R., Nedelko, T., Knyazev, Y., and Hollstein,M.C. (2006) Mutagenesis of human p53 tumor suppressor gene sequences in embryonic fibroblasts of genetically engineered mice. *Genetic Engineering, Principles and Methods*, Vol. 28, in press.