

Analyse p53-induzierter Signalwege in Lymphozyten

vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte

Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Stefan Heinrichs

geboren am 27.01.1970

in Bonn

2001

Referenten: Prof. Dr. W. Müller (Medizinische Hochschule Hannover)
Prof. Dr. W. Deppert (Heinrich Pette Institut Hamburg)

Tag der Prüfung: 14.02.2001

„Es scheint paradox, dass wissenschaftliche Forschung –die menschliche Betätigung, die am meisten in Frage stellt und am skeptischsten ist- von persönlichem Vertrauen abhängen soll. Doch Tatsache ist: Ohne Vertrauen kann das Unternehmen Forschung nicht funktionieren.“

Arnold S. Relman
Herausgeber des New England Journal of Medicine, 1983

Inhalt

<i>Zusammenfassung / Abstract</i>	1 / 2
<i>I. Einleitung</i>	3
I.1 Zellteilung und Zelltod	3
I.2 Genomische Stabilität und p53	8
I.3 Struktur und Funktion des p53 Proteins	9
I.4 Aktivierung von p53	10
I.5 Induktion eines Wachstumsarrests durch p53	12
I.6 Apoptoseinduktion durch p53	12
I.7 Problemstellung	15
<i>II. Ergebnisse</i>	17
II.1 Apoptose in Lymphozyten nach γ -Bestrahlung	17
- Die Apoptose in Lymphozyten nach γ -Bestrahlung ist p53-abhängig	17
- Mitogene Stimulation führt zur Hemmung der Apoptose	19
- Die Stimulations-bedingte Unterdrückung der Apoptose umfasst T- und B-Lymphozyten	21
II.2 Proliferationsanalyse	24
- Mitogen stimulierte Lymphozyten zeigen nach Bestrahlung einen G ₁ -Arrest in Abhängigkeit von p53	24
II.3 Induktion von p53 und p53 Zielgenen	25
- Nach γ -Bestrahlung wird p53 in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten induziert	25
- Die Transaktivierung von p53 Zielgenen erfolgt nicht differentiell, wird jedoch durch die Stimulation moduliert	27
II.4 p21 als Zielgen des G ₁ -Arrests	31
- p21 wird in stimulierten Zellen präferentiell exprimiert	31
- Die Hemmung der Apoptose ist nicht abhängig von p21	32
- Der G ₁ -Arrest ist abhängig von p21	33
II.5 Aktivierung anti-apoptotisch wirkender Signalwege	35
- Das mitochondriale Membranpotential sinkt nur bei Induktion der Apoptose	35
- Die Apoptoseinhibition korreliert mit der Induktion von Bcl-x _L	37
- Die Apoptoseinhibition ist abhängig von der Aktivierung der Protein Kinase C	38
<i>III. Diskussion</i>	40
III.1 p53 als Apoptosesignalgeber	40
- Ziel der pro-apoptotischen p53 Signale: Mitochondrien	40
- Induktion von pro-apoptotischen p53 Zielgenen	40
III.2 Zelluläre Antwort auf aktiviertes p53: Wachstumsarrest oder Apoptose	41
- Aktivierung von p53	42

- p53-abhängige Transaktivierung	42
- Funktion von p21	43
- Modulation durch Wachstumsfaktoren, Cytokine und mitogene Stimulation	44
- Mechanismus der Apoptoseinhibition	45
<i>IV. Material und Methoden</i>	50
IV.1 Material	50
IV.1.1 Biologisches Material	50
IV.1.2 Molekularbiologisches Material	50
IV.1.3 Geräte & Software	52
IV.1.4 Medien, Puffer und Lösungen	53
IV.2 Methoden	56
IV.2.1 Präparation und Kultivierung muriner Milzzellen	56
IV.2.2 Arbeiten mit Bakterienzellen	57
IV.2.3 Präparation, Analyse und Klonierung von DNA	58
IV.2.4 PCR und verwandte Methoden	60
IV.2.5 RNA Präparation	61
IV.2.6 RNase Protection Assay (RPA)	62
IV.2.7 Proteinbiochemische Methoden	64
IV.2.8 DNA-Fragmentierungsanalyse	65
IV.2.9 Durchflußzytometrie	65
<i>V. Literatur</i>	68
<i>Anhang</i>	80

Zusammenfassung

Die Aktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 nach einer genotoxischen Schädigung führt zur Induktion zweier unterschiedlicher Signalwege: Einerseits kann ein Wachstumsarrest induziert werden, der die Reparatur der geschädigten DNA ermöglicht, andererseits kann die geschädigte Zelle durch Apoptose eliminiert werden. Obwohl das Verständnis der p53 Signaltransduktion in den letzten Jahren enorm zugenommen hat, ist nur unzulänglich bekannt, wie die zelluläre Antwort auf die Aktivierung von p53 gesteuert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde diese Frage anhand von Milzzellen untersucht, die aus normalen BALB/c Mäusen (wt, p53^{+/+}) bzw. aus p53 knockout BALB/c Mäusen (p53^{-/-}) stammten. Die γ -Bestrahlung von ruhenden wt Milzzellen führte zur Induktion von Apoptose. Wenn die Zellen vor der Bestrahlung mit Concanavalin A oder mit PMA plus Ionomycin stimuliert wurden, kam es jedoch zur Induktion eines Wachstumsarrest. Durch die parallele Analyse von wt und p53^(-/-) Zellen konnte nachgewiesen werden, dass beide Antworten abhängig von p53 waren, da p53^(-/-) Zellen weder Apoptose noch Wachstumsarrest zeigten. Unstimulierte und stimulierte Milzzellen bildeten damit ein Modellsystem, in dem die beiden unterschiedlichen p53-abhängigen Reaktionen auf Bestrahlung analysiert wurden.

Die Bestrahlung führte unabhängig von der Stimulation zur Aktivierung von p53 als Transkriptionsfaktor. Sowohl in unstimulierten bestrahlten, als auch in stimulierten bestrahlten Zellen transaktivierte p53 Zielgene, deren Genprodukte zur Induktion des Wachstumsarrest führen oder einen pro-apoptotischen Effekt haben. Eine differentielle Transaktivierung durch p53 konnte daher als Ursache einer unterschiedlichen zellulären Reaktion auf die Bestrahlung ausgeschlossen werden.

Die Induktion von p21, einem Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), war in Relation zu den übrigen, analysierten Genen vergleichsweise hoch. Die p53-abhängige Transaktivierung von p21 wurde durch Stimulation multiplikativ verstärkt und führte in stimulierten, bestrahlten Zellen zu hohen p21 Protein-Spiegeln. p21 kann einerseits über die Inhibition von CDKs einen Wachstumsarrest induzieren, andererseits hat p21 anti-apoptotische Wirkung. Mit Hilfe von p21^(-/-) Zellen wurde untersucht ob, die p21 Expression in stimulierten, bestrahlten Zellen eine potentielle Determinante der zellulären Antwort auf die p53-Aktivierung darstellt. p21^(-/-) Zellen zeigten ebenso wie p53^(-/-) Zellen nach Stimulation und Bestrahlung keinen Wachstumsarrest mehr. p21 ist demnach tatsächlich für den p53-abhängigen Wachstumsarrest verantwortlich. Allerdings waren p21^(-/-) Zellen, wie wt Zellen, nach Stimulation und Bestrahlung vollständig apoptose-inhibiert und p21 fungiert daher nicht als essentieller Mediator der Apoptoseinhibition. Deshalb wurde die Expression anderer anti-apoptotischer Faktoren analysiert, die in der Lage sind, die p53-abhängige Apoptose zu inhibieren.

Ausgangspunkt war die Beobachtung, dass p53 Apoptose in unstimulierten Lymphozyten über eine Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials induziert, und dass die Veränderung nach Stimulation unterbunden wurde. Tatsächlich korrelierte die Expression von, einem der wichtigsten anti-apoptotisch wirkenden Proteine der Bcl-2 Familie, mit der Apoptoseinhibition in stimulierten, bestrahlten Zellen. Da Bcl-x_L alleine durch die Stimulation der Zellen induziert wurde, wurde die funktionelle Verknüpfung der Stimulation mit der Bcl-x_L Expression untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Inhibition der Protein Kinase C (PKC) die Apoptoseinhibition in stimulierten, bestrahlten Zellen aufheben kann, d.h. Inhibitor-behandelte stimulierte Zellen reagierten auf Bestrahlung in gleichem Ausmaß mit Apoptose wie unstimulierte, bestrahlte Zellen. Die Induktion von Bcl-x_L war demnach das Ergebnis der PKC Aktivierung nach Stimulation. Dies legt nahe, dass Bcl-x_L über NF κ B, einem Effektor der PKC, aktiviert wird.

Die erhobenen Daten machen deutlich, dass zumindest in dem hier untersuchten System das Umschalten der p53 Antwort von Apoptose auf Wachstumsarrest nicht über p53 Effektorsignalwege gesteuert wird, sondern über p53-unabhängige Signale. Diese Erkenntnis könnte weitreichende Konsequenzen für das Verständnis der Apoptose-Resistenz von Tumoren, die wt p53 exprimieren, haben.

Schlagwörter: p53, Zellzyklus, Apoptose

Abstract

Activation of the tumor suppressor p53 after genotoxic insults may result in two completely different responses: cell cycle arrest, allowing time for repair of damaged DNA, or elimination of the damaged cell by apoptosis. Although much knowledge has accumulated about the signal transduction by p53 within the past decade, very little is known about what determines a cell's fate in response to p53 activation.

This work approached the question of the choice of p53 responsive pathways by the analysis of freshly prepared mouse splenocytes from wildtyp (wt) and p53 knockout (p53^{-/-}) mice. γ -irradiation of splenocytes induced apoptosis, when resting (G0) cells are irradiated, but growth arrest in G1 when the cells had been stimulated with Concanavalin A (ConA) or PMA plus Ionomycin prior to irradiation. Comparison of cells obtained from wt and p53^{-/-} demonstrated that both responses were p53-dependent, as irradiated resting splenocytes derived from p53^{-/-} did not go into apoptosis, and stimulated splenocytes from such mice did not growth arrest after γ -irradiation. The system of resting and stimulated splenocytes thus provided a suitable model system to analyze the cellular parameters influencing the p53-dependent cellular response to γ -irradiation.

Independently from stimulation γ -irradiation results in activation of p53 as transcription factor. In resting, irradiated and in stimulated, irradiated cells p53 transactivated target genes, that lead to apoptosis and growth arrest. Therefore a differential transactivation by p53 as a reason for the different cellular behavior could be excluded.

Nevertheless, the induction of p21, an inhibitor of cyclin dependent kinases (CDKs), was high in comparison to the genes analyzed. The p53-dependent transactivation of p21 was strengthened multiplicatively by stimulation and gave raise to high p21 levels in stimulated and irradiated cells. Beside the induction of growth arrest by inhibition of CDKs, p21 has anti-apoptotic activity. By use of p21^{-/-} cells it was analyzed whether the high p21 induction is a determinant of cellular response. Irradiated and stimulated p21^{-/-} cells -like p53^{-/-} cells-showed no growth arrest. Therefore p21 accounted for the observed p53-induced growth arrest. However, p21^{-/-} cells showed an apoptosis inhibition like wt cells upon irradiation and stimulation. Out of this p21 was not an essential mediator of apoptosis inhibition. As a consequence other factors that might confer a block of apoptosis were analyzed.

Starting point was the observation that p53 induces apoptosis by the break down of the mitochondrial membrane potential, which was blocked by stimulation. Actually, there was a strong correlation between the stimulation of the cells and the induction of Bcl-xL which is one of the most important anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family. The functional connection between stimulation, induction of Bcl-xL and apoptosis inhibition was shown by the use of an inhibitor of protein kinase C (PKC). Inhibitor-treated, stimulated and irradiated cells did undergo apoptosis like resting, irradiated cells. The induction of Bcl-xL was mediated by PKC activation which suggests that Bcl-xL is activated by NF κ B, an effector of PKC.

These data show, that a least in this system the choice of the cellular response is not p53 dependent but rather influence by p53-independent signals. This finding might have important implications for the apoptotic resistance of tumor cells that express wt p53.

key words: p53, cell cycle, apoptosis

I. Einleitung

Die Integrität des Gesamtorganismus wird durch Zellteilung, Differenzierung und Wachstum einerseits und Zelltod andererseits erzeugt und aufrecht erhalten. Zellzyklus und Apoptose sind somit wichtige Determinanten eines Gleichgewichts. Diese beiden grundlegenden Prozesse müssen flexibel auf äußere Einflüsse reagieren. So hat beispielsweise die genotoxische Schädigung einer Zelle einen regulativen Eingriff zur Folge: Die Zellteilung kann unterbunden werden und eine Schadensreparatur erfolgen. Alternativ kann die geschädigte Zelle eliminiert werden. An der Induktion beider Prozesse ist der Tumorsuppressor p53 beteiligt.

I.1 Zellteilung und Zelltod

Zellzyklus

Der Zellzyklus besteht aus einer Phase der DNA-Replikation (Synthese- oder S-Phase) und einer Phase der Zellteilung (Mitose- oder M-Phase), die durch die G₁- und G₂-Phasen (*gap*-Phasen) getrennt sind. Nach einer Zellteilung können Zellen in eine neue G₁-Phase eintreten oder in einem bestimmten Differenzierungszustand in eine als G₀-Phase bezeichnete Ruhephase übergehen, in der sie entweder irreversibel verbleiben, oder die sie durch bestimmte Signale wieder verlassen. Die Progression einer Zelle durch den Zellzyklus wird durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) reguliert. Die katalytische Einheit der CDKs ist nur dann aktiv, wenn sie mit regulatorischen Untereinheiten, den sog. Cyclinen, assoziiert ist. Die zyklische Expression der Cycline und die Bildung definierter Cyclin-CDK-Komplexe zu bestimmten Zeitpunkten ermöglicht eine Koordination des Ablaufs. Darüber hinaus wird die Aktivität der Cyclin-CDK-Komplexe durch Phosphorylierung, Sequestrierung und durch inhibitorische Proteine reguliert (Morgan, 1997).

Apoptose: Morphologie, Physiologie und Pathophysiologie

Neben der Proliferation muss auch die Elimination von Zellen geordnet ablaufen und einer strikten Kontrolle unterliegen. Dieser Prozess des programmierten Zelltods wird als Apoptose bezeichnet (Kerr *et al.*, 1972). Die Apoptose ist durch charakteristische morphologische und biochemische Veränderungen gekennzeichnet.

Die Zelle verliert zunächst an Volumen, und die Plasmamembran zeigt Ausstülpungen (*blebbing*). Dann setzt eine Kondensation und Fragmentierung des Chromatins ein. Das Chromatin sammelt sich am Rand der Kernmembran und der Kern kollabiert. Nachdem aus den Kernresten kleine sphärische Partikel entstanden sind, löst sich die Zelle unter Bildung apoptotischer Vesikel auf. Diese Vesikel können von Makrophagen und benachbarten Zellen phagozytiert werden. Die Nekrose, der Zelltod durch Gewebeschädigung, ist von der Apoptose abzugrenzen. Nekrotische Zellen schwellen an, platzen auf, der Zellinhalt wird freigesetzt und es kommt zur Induktion einer Entzündungsantwort.

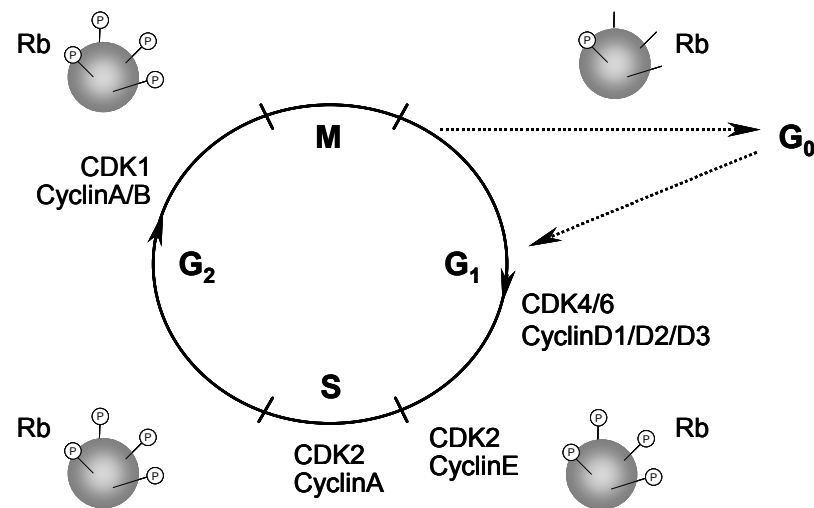


Abbildung 1: Aktivitäten der CDK-Cyclin Komplexe und Phosphorylierungszustand von Rb im Verlauf des Zellzyklus Der Zellzyklus besteht aus der S-Phase (Synthese-Phase), der M-Phase (Mitose-Phase) und der dazwischen-liegenden G₁ u. G₂-Phase (*gap*-Phasen). Nach der Zellteilung (M-Phase) kann eine Zelle in eine G₀-Phase übertreten, in der sie transient oder irreversibel verbleibt (ruhende Zellen). Proliferierende Zellen treten nach der M-Phase in die G₁-Phase ein, in deren Verlauf Cycline des D-Typs als erste nachweisbar sind. Die D-Typ Cycline binden hauptsächlich an die CDKs 4 und 6. Die Aktivität dieser Komplexe ist auf die G₁-Phase beschränkt. In der späten G₁-Phase und in der frühen S-Phase tritt Cyclin E im Komplex mit CDK2 auf. Im weiteren Verlauf der S-Phase wird Cyclin E degradiert und CDK2 assoziiert mit Cyclin A. In der G₂ Phase und der M-Phase ist CDK1 die dominierende Kinase. Die Aktivität des Komplexes aus CDK1 und Cyclin B, des sog. *mitosis promoting factor* ist für den Eintritt in die S-Phase verantwortlich. Die Degradation von Cyclin B erfolgt am Ende der Mitose. Der Funktions- und Phosphorylierungsstatus von Rb korreliert eng mit dem Zellzyklus. Rb wird in der späten G₁-Phase durch D- und E-Typ Cyclin-abhängige Kinasen phosphoryliert. Dadurch wird die Hemmung der Induktion E2F-abhängiger Genen aufgehoben. Der Phosphorylierungszustand von Rb bleibt dann bis zur Mitose erhalten.

Während die Nekrose pathologischen Charakter hat, stellt die Apoptose den physiologischen Prozess der Zellelimination dar. In der Entwicklung ist Apoptose an der Formgebung des Körpers beteiligt, beispielsweise an der Ausbildung von Fingern und Zehen. Nervensystem und Immunsystem entstehen nach der Überproduktion von Zellen, die bei fehlenden synaptischen Kontakten bzw. bei der Bildung von Autoantigen-Spezifitäten absterben. Im Zuge der Immunantwort spielt Apoptose einerseits eine Rolle beim Abtöten pathogen-infizierter Zellen, andererseits bei der Elimination von aktivierten Lymphozyten nach Ablauf der Immunreaktion. Folglich ist die strikte Kontrolle der Apoptose außerordentlich wichtig. Eine Dysregulation ist Teil der Pathogenese vieler Erkrankungen. Eine verminderte oder verstärkte Apoptose ist an der Entstehung von Entwicklungsdefekten, Autoimmunkrankheiten, neurodegenerativen Erkrankungen und Krebs beteiligt.

Caspasen

Die biochemische Analyse der Apoptose zeigte, dass viele der beobachteten morphologischen Veränderungen von Proteasen verursacht werden. Tatsächlich ist die Aktivierung von Proteasen das zentrale Ereignis im molekularen Ablauf der Apoptose. Die identifizierten Proteasen sind homolog zueinander und Teil einer Proteinfamilie, deren Mitglieder als Caspasen bezeichnet werden (Alnemri *et al.*, 1996). Bisher wurden mehr als 12

Caspasen identifiziert; für etwa 2/3 wurde eine Rolle in der Apoptose gezeigt (Earnshaw *et al.*, 1999). Caspasen besitzen im aktiven Zentrum einen Cysteinrest und schneiden Substrate in der linearen Sequenz hinter einem Aspartatrest. Die Substratspezifität wird durch die vier N-terminal zur Schnittstelle gelegenen Aminosäurereste bestimmt (Thornberry *et al.*, 1997).

Mehr als 100 Caspasesubstrate wurden in den letzten Jahren identifiziert; nur für wenige konnte eine direkte Funktion in der Apoptose nachgewiesen werden. Das prominenteste Beispiel ist die Caspase-abhängige Aktivierung der von Wyllie (1980) zuerst beschriebenen und heute als CAD bezeichneten Endonuklease (*caspase-activated deoxyribonuclease*). In nicht-apoptotischen Zellen liegt CAD in einem Komplex mit dem Inhibitor ICAD vor. Die proteolytischen Inaktivierung von ICAD führt zur Freisetzung von CAD. CAD schneidet die genomische DNA zwischen den Nukleosomen und erzeugt somit Fragmente von 180 bp Länge oder einem Vielfachen davon. Die gelelektrophoretische Analyse der DNA apoptotischer Zellen zeigt daher eine Leiter-ähnliches Bild (*DNA-laddering*). Die Chromatinfragmentierung ist folglich über das Substrat ICAD an die Caspaseaktivitäten gekoppelt. Neben einer solchen Inaktivierung von Inhibitoren der Apoptose können Caspasen auch direkt zelluläre Strukturen wie etwa die Kernlamina angreifen oder wichtige Enzyme durch gezielte Proteolyse in ihrer Aktivität deregulieren.

Wie die meisten Proteasen werden Caspasen als Proenzyme synthetisiert und proteolytisch aktiviert. Insgesamt erfolgt die Aktivierung von Caspasen in einer sich selbst verstärkenden proteolytischen Kaskade ausgehend von sog. Initiatorcaspasen. Caspasen, die die sichtbaren Veränderungen in der Zelle bewirken, werden als Effektorcaspasen bezeichnet. Die am besten charakterisierten Initiatorcaspasen sind Caspase-8 und Caspase-9. Sie stehen im Zentrum zweier verschiedener Apoptose-Signalwege, die auf der Ebene der Effektorcaspasen konvergieren.

Der *death receptor* Signalweg

Viele Zellen besitzen Oberflächenrezeptoren (*death receptors*), über die sie extrazelluläre Apoptosesignale erhalten können (Ashkenazi & Dixit, 1998). Diese Rezeptoren gehören zur Superfamilie der Tumor Nekrose Faktor (TNF) Rezeptoren, die sich durch eine bestimmte Cystein-reiche extrazelluläre Domäne auszeichnen (Smith *et al.*, 1994). Außerdem besitzen die Apoptose-Rezeptoren eine homologe cytoplasmatische Aminosäuresequenz, die sog. *death domain* (Tartaglia *et al.*, 1993; Nagata, 1997). Einer der am besten charakterisierten Rezeptoren ist CD95, der auch als Fas (Yonehara *et al.*, 1989) oder Apo-1 (Trauth *et al.*, 1989) bezeichnet wird. Physiologisch spielt die Fas-Aktivierung u.a. eine Rolle bei der Eliminierung aktivierter T-Lymphozyten am Ende einer Immunantwort. Die Bindung des Fas-Liganden FasL führt zur Clusterbildung der Rezeptoren und damit ihrer intrazellulären Domänen. Dadurch kann das Adaptormolekül FADD, das ebenfalls eine *death domain* besitzt, rekrutiert werden. Über eine weitere Domäne, die *death effector domain* (DED), kann FADD Procaspase-8 binden. In dem sich bildenden Komplex, der als DISC (*death inducing signaling complex*) bezeichnet wird (Kischkel *et al.*, 1995), kommt es zur Oligomerisierung von Procaspase-8. Procaspase-8 besitzt eine schwache intrinsische Proteaseaktivität. Die hohen lokalen Konzentrationen ermöglichen eine Aktivierung durch Auto- oder Transprozessierung (Muzio *et al.*, 1998). An die Caspase-8-Aktivierung scheinen sich abhängig vom Zelltyp zwei unterschiedliche Signaltransduktionswege anzuschließen (Scaffidi *et al.*, 1998). In sog. Typ-1 Zellen ist die DISC-induzierte Caspase-8-Aktivierung ausreichend um Caspase-3 zu aktivieren. Eine Inhibition der Apoptose durch Bcl-2 (siehe unten) ist in

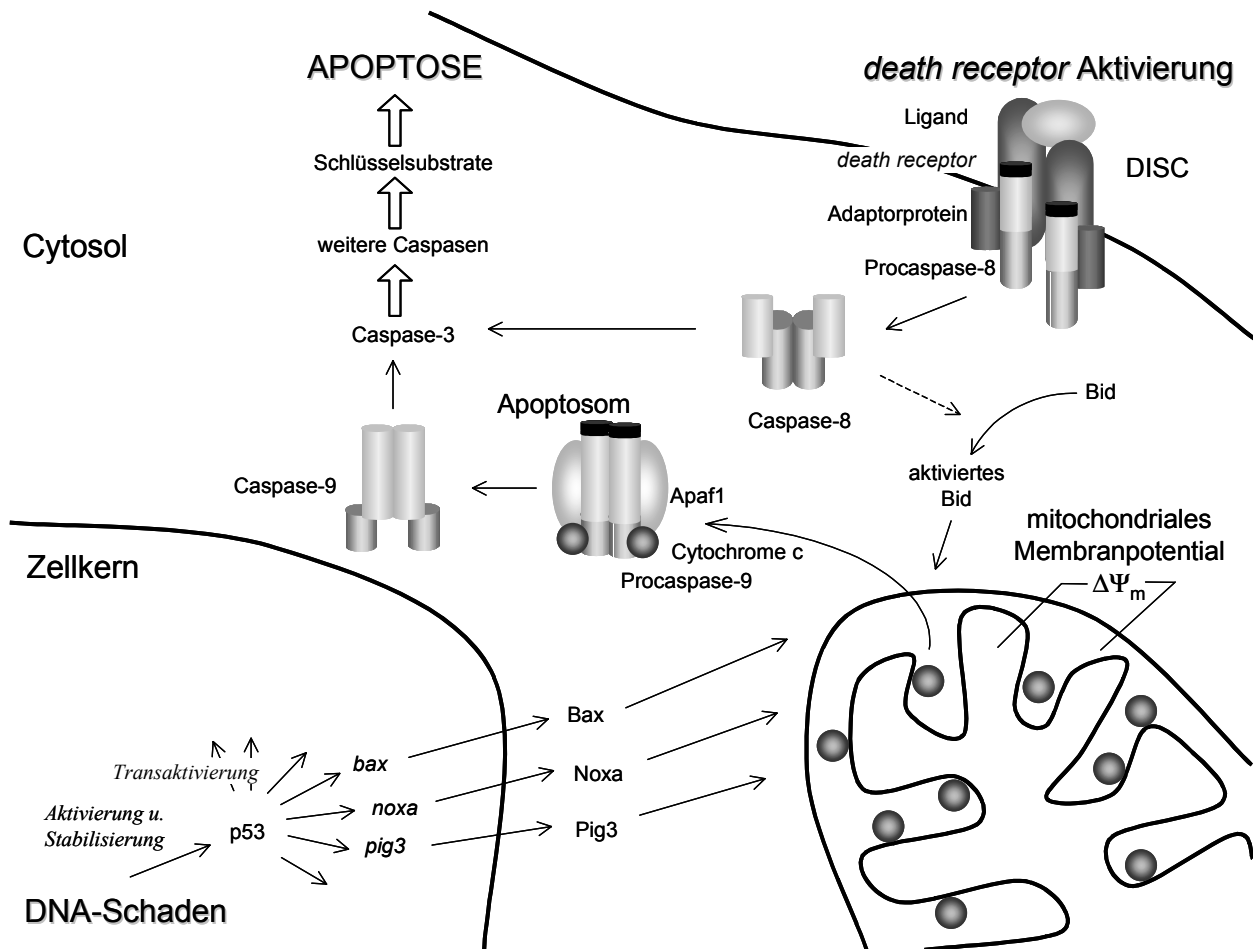


Abbildung 2: mitochondrialer und death receptor Signalweg der Apoptoseinduktion Zwei unabhängige Signalwege führen über die Aktivierung von Caspase-3 und weiteren Effektorcaspasen zur Induktion der Apoptose. Der *death receptor* Signalweg wird durch die Bindungen eines Liganden (z.B. FasL) an einen Rezeptor (z.B. Fas) aktiviert. Der so induzierte Signalkomplex (DISC, *death inducing signaling complex*) enthält u.a. ein Adaptorprotein (z.B. FADD) und aktiviert Caspase-8. Der mitochondriale Signalweg wird beispielsweise durch einen genotoxischen Schaden induziert. Die Aktivierung von p53 führt zur Expression proapoptischer Faktoren (z.B. Bax, Noxa und Pig3), die die Dysregulation der mitochondrialen Integrität induzieren, die sich in der Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials und der Freisetzung von Cytochrom c zeigt. Cytosolisches Cytochrom c ist neben Apaf-1 ein essentieller Faktor des Signalkomplexes (Apoptosom), der die Aktivierung von Caspase-9 induziert. Caspase-8 und Caspase-9 starten als Initiatorcaspasen die proteolytische Aktivierung der Effektorcaspasen, wie beispielsweise Caspase-3. In einigen Zellen ist vermutlich die Aktivierung von Caspase-8 nicht ausreichend um direkt weitere Procaspasen zu spalten. Über die proteolytische Aktivierung von Bid kann dann der mitochondriale Signalweg induziert werden.

diesen Zellen nicht möglich (Scaffidi *et al.*, 1999). Typ-2 Zellen zeigen demgegenüber nur eine schwache DISC-Bildung. Eine Signalamplifikation erfolgt über die Spaltung des cytosolischen Proteins Bid durch Caspase-8. Verkürztes Bid ist in der Lage, die Aktivierung der Caspasekaskade über den mitochondrialen Signalweg zu initiieren (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998).

Der mitochondriale Signalweg

Die Aktivierung von Caspase-9 erfolgt über interne Signale. Das kritische Ereignis dieses Signalweges ist die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Cytosolisches

Cytochrom c assoziiert mit Apaf-1, einem zentralen Adaptorprotein (Zou *et al.*, 1997). Durch die Bindung von Cytochrom c kann Apaf-1 mit Procaspase-9 über eine CARD-CARD Wechselwirkung (*caspase activation and recruitment domain*) assoziieren. In diesem Komplex, kommt es zur Spaltung von Procaspase-9 und damit zur Aktivierung dieser Initiatorcaspase. Während Apaf-1 zusammen mit Cytochrom c zunächst nur als transient benötigter Faktor für die Aktivierung von Procaspase-9 beschrieben wurde (Li *et al.*, 1997; Zou *et al.*, 1997), geht man inzwischen davon aus, dass Apaf-1 eine essentielle Untereinheit des Caspase-9 Holoenzym ist. Dieser Holoenzymkomplex enthält möglicherweise noch weitere Proteine und wird auch als Apoptosom bezeichnet (Cain *et al.*, 1999; Cain *et al.*, 2000; Beere *et al.*, 2000).

Die Bcl-2 Familie

Mitglieder der Bcl-2 Familie sind wichtige Regulatorproteine der Apoptose, die sich strukturell und funktionell in 3 Gruppen einordnen lassen (Adams & Cory, 1998; Gross *et al.*, 1999). Die erste Gruppe umfasst Proteine mit anti-apoptotischer Wirkung, die eine potentielle C-terminale Membranverankerungsdomäne und vier konservierte Bcl-2 Homologie Domänen (BH1-BH4) besitzen. Die wichtigsten Vertreter sind Bcl-2 und Bcl-x_L. Der Gruppe 2 gehören pro-apoptotische Proteine wie beispielsweise Bax oder Bak an. Sie besitzen die gleiche Domänenstruktur wie Mitglieder der Gruppe 1, allerdings fehlt die N-terminale BH4-Domäne. Proteine, die nur die BH3-Domäne und zum Teil weitere Domänen besitzen, haben pro-apoptotische Wirkung und werden in Gruppe 3 zusammengefasst.

Der exakte Mechanismus der Wirkung Proteine der Bcl-2 Familie ist nicht befriedigend geklärt. In erster Annäherung scheint das Verhältnis von pro- und anti-apoptotischen Familienmitgliedern die Sensitivität der Zelle gegenüber Apoptosesignalen zu bestimmen. So führt die Überexpression pro-apoptotischer Proteine zur Auslösung der Apoptose und erhöhte Spiegel anti-apoptotischer Proteine schützen die Zelle vor potenten Apoptoseinduktoren. Die Tatsache, dass diese Proteine Homo- und Heteromere bilden können, zeigt einen möglichen Mechanismus der Signalintegration auf. In Mutationsanalysen konnte beispielsweise für die Interaktion von dem pro-apoptotischen Protein Bad mit Bcl-2 oder Bcl-x_L die funktionelle Relevanz dieser Wechselwirkung gezeigt werden (Ottillie *et al.*, 1997; Zha *et al.*, 1997). Neben der Oligomerisierung kann die Aktivität der Proteine durch die subzelluläre Translokation (Hsu *et al.*, 1997; Wolter *et al.*, 1997; Gross *et al.*, 1998), Phosphorylierung (Zha *et al.*, 1996), oder proteolytische Aktivierung (Li *et al.*, 1998; Luo *et al.*, 1998) moduliert werden.

Mitochondrien als Integrationsort vieler apoptischer Signale

Mitochondrien, die lange nur als Energiezentren der Zelle betrachtet wurden, stehen seit einigen Jahren im Mittelpunkt der Apoptoseforschung (Green & Reed, 1998). Viele Signale konvergieren auf der Ebene der Mitochondrien und verschieben das Gleichgewicht in Richtung Apoptose oder Überleben. Im Einklang damit scheinen Mitochondrien auch der wichtigste Ort der Apoptosemodulation durch Bcl-2 Familien Proteine zu sein. Die Deregulation der mitochondrialen Membranintegrität ist Ziel vieler Apoptosesignalwege. Die induzierten Veränderungen betreffen die innere und äußere Membran und führen zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) und/oder der Freisetzung von Proteinen, insbesondere Cytochrom c, aus dem Intermembranraum ins Cytosol. Der genaue Mechanismus der Signalumsetzung ist noch Gegenstand intensiver Forschung.

Ein Modell geht von einer Beteiligung des Spannungs-abhängigen Anionenkanals (VDAC, *voltage dependent anion channel*), dem quantitativ wichtigsten Protein der äußeren Membran aus. Die Beobachtung, dass Mitglieder der Bcl-2 Familie Ionenkanäle in artifiziellen Membranen bilden (Schendel *et al.*, 1997; Minn *et al.*, 1997; Antonsson *et al.*, 1997) und die Tatsache, dass Bax und Bak Cytochrom c aus isolierten Mitochondrien freisetzen (Jurgensmeier *et al.*, 1998) führte zu der Hypothese, dass Bax und Bak an der Bildung eines größeren Kanals beteiligt sind. Bax und Bak im Zusammenspiel mit VDAC sind tatsächlich in der Lage Cytochrom c freizusetzen, und dieser Prozess wird durch Bcl-x_L inhibiert (Shimizu *et al.*, 1999).

I.2 Genomische Stabilität und p53

DNA-Schäden

Für die Entwicklung und den Erhalt eines Organismus ist es entscheidend, dass bei der Verdoppelung und Weitergabe der genetischen Information keine Veränderungen stattfinden.

Die strukturelle Basis der genetischen Information, die DNA, ist jedoch einer Vielzahl schädigender endogener und exogener Noxen ausgesetzt, die zu Veränderungen (Mutationen) der DNA führen können. Ausgangspunkt endogen-bedingter Mutationen sind beispielsweise spontan auftretende Depurinierungen (2000-10000 pro Säugetierzelle und Tag) oder oxidative Schäden durch Hydroxylradikale, die aus Zwischenprodukten der Atmungskette entstehen. Zu den exogenen Einflüssen gehört die Entstehung von DNA-Schäden durch alkylierende Verbindungen (chemische Mutagenese), UV-Strahlung und ionisierende Strahlung (z.B. Höhenstrahlung).

Zellen höherer Organismen haben deshalb Strategien zur Aufrechterhaltung ihrer genomischen Integrität entwickelt. Nach der Erkennung eines Schadens, kann die Zelle den Zellzyklus unterbrechen und die DNA-Reparatur einleiten. Alternativ kann Apoptose induziert werden.

Tumorgenese

Wird ein genomischer Schaden nicht erkannt, repariert oder die Zelle durch Apoptose eliminiert, kommt es während der DNA-Replikation zur Fixierung der Schäden in Form von Mutationen. Mutationen können Ausgangspunkt einer Tumorzellentwicklung sein. Die Entstehung einer Tumorzelle ist ein mehrschrittiger Evolutionsprozess, in dem aus initialen Wachstumsvorteilen weitere proliferations-stimulierende Veränderungen resultieren, die schließlich zu ungehemmtem Wachstum und invasivem Verhalten führen (Hanahan & Weinberg, 2000). Grundlage dieser Mikroevolution ist die Akkumulation von Mutationen in Kontrollgenen der Proliferation und des Zelltods. Klassisch werden diese Gene in Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene eingeteilt. Die Mutation eines Proto-Onkogens zu einem aktiven Onkogen ist ein dominanter Prozess, der mit einer deregulierten Aktivität oder Veränderung eines Genprodukts einhergeht (*gain-of-function*) und eine Zelltransformation auslösen kann. Die Mutation eines Tumorsuppressorgens steht demgegenüber mit der Inaktivierung oder dem Verlust eines Genprodukts (*loss-of-function*) in Zusammenhang und ist rezessiv.

p53

Eines der wichtigsten Tumorsuppressorgene höherer Zellen ist p53. P53 wurde 1979 aus Immunpräzipitaten des großen T-Antigens von SV40 transformierten Zellen isoliert (Kress *et al.*, 1979; Lane & Crawford, 1979; Linzer & Levine, 1979). Frühe Untersuchungen legten nahe, dass p53 ein klassisches Proto-Onkogen ist (Crawford *et al.*, 1981; Eliyahu *et al.*, 1984; Wolf *et al.*, 1984). In den folgenden Jahren stellte sich jedoch heraus, dass die ersten Studien mit mutiertem p53 gemacht wurden. Wildtyp p53 ist dagegen in der Lage, die Transformation von Zellen durch Onkogene zu unterdrücken. Seiner Wildtyp-Eigenschaften entsprechend wird p53 daher klassisch als Tumorsuppressor bezeichnet. Dennoch scheinen Mutationen im p53 Gen nicht ausschließlich eine Inaktivierung von p53 zu bewirken. So konnte ausgehend von den ursprünglichen Versuchen gezeigt werden, dass Mäuse, die mutiertes p53 exprimieren, eine schnellere Onkogenese gegenüber Mäusen, die kein p53 exprimieren, besitzen (Harvey *et al.*, 1995). Daher müssen mutiertem p53 auch onkogene Eigenschaften zugeschrieben werden.

Die zentrale Bedeutung von Wildtyp p53 als Tumorsuppressor zeigt sich eindeutig in der Untersuchung humaner Tumore. In über 50% aller humanen Tumore ist p53 mutiert (Hollstein *et al.*, 1991). Den größten Anteil am Mutationsspektrum haben Punktmutationen, die die spezifische Interaktion von p53 mit DNA verändern. Der hohe Selektionsdruck der Onkogenese deutet auf die Relevanz dieser Wechselwirkung als Basis der Tumorsuppressorfunktion von p53 hin. Neben weiteren Aktivitäten ist seine Funktion als Transkriptionsfaktor die wichtigste biochemische Aktivität.

I.3 Struktur und Funktion des p53 Proteins

Das humane p53 Protein besteht aus 393 Aminosäuren (murines p53: 390 Aminosäuren) und hat eine Molmasse von 43,5 kDa. Das aberrante Laufverhalten in der SDS-PAGE bei 53 kDa wurde bei der Namengebung zugrunde gelegt. Das p53 Protein kann strukturell und funktionell in drei Regionen unterteilt werden.

Aminoterminaler Region

Die Aminosäuren 1-42 bilden eine Transaktivierungsdomäne, die mit basalen Transkriptionsfaktoren interagiert (Lu & Levine, 1995; Thut *et al.*, 1995). Das Adenovirusprotein E1B 55kDa, Mdm2 und das Hepatitisvirusprotein HBV-X binden den aminoterminalen Bereich von p53 und inhibieren die Transaktivierungsfunktion (Yew & Berk, 1992; Oliner *et al.*, 1993; Momand *et al.*, 1992). Im N-terminalen Teil des Proteins befindet sich außerdem eine Prolin-reiche Region (Aminosäuren 63-97), die sich durch fünf Wiederholungen des Motivs PXXP auszeichnet (Walker & Levine, 1996). Die große Ähnlichkeit dieser Sequenz zu dem SH3 Bindungsmotiv anderer Proteine legt eine Interaktion mit Elementen von Signaltransduktionswegen nahe. Bislang wurden eine Funktionen in der Apoptoseinduktion (Sakamuro *et al.*, 1997), in der Wachstumsregulation (Walker & Levine, 1996) und in der Transrepression (Venot *et al.*, 1998) diskutiert.

Zentrale Region

Die sequenzspezifische DNA Bindungsdomäne ist zwischen den Aminosäuren 102-292 lokalisiert und wird aufgrund ihrer relativen Proteaseresistenz auch als Kerndomäne (*core domain*) bezeichnet. Die Domäne faltet sich in zwei antiparallele β -Faltblätter, die als Gerüst für zwei große *loops* und ein *loop-sheet-helix* Motif dienen. Diese Strukturen bilden die DNA-Kontaktfläche von p53 (Cho *et al.*, 1994). Für die sequenzspezifische DNA Bindung wurde ein Konsensusmotiv vorgeschlagen, das aus zwei Wiederholungen eines in sich invertierten Dekanucleotids besteht (El-Deiry *et al.*, 1992). Diese Anordnung der DNA-Elemente ist ein Hinweis auf die Beteiligung der DNA-Konformation an der Interaktion mit p53 (Kim *et al.*, 1997). Neben der sequenzspezifischen DNA-Bindung konnte der Kerndomäne eine 3'-5' Exonukleaseaktivität zugeordnet werden (Mummenbrauer *et al.*, 1996). Die Bedeutung dieser Domäne für die p53 Funktion wird in der Mutationsanalyse deutlich. Über 90% aller Missensmutation mit *hot spots* bei Aminosäure 175, 245, 248, 249, 273 und 282 (zusammen 40%) liegen in diesem Bereich (Hollstein *et al.*, 1994; Cho *et al.*, 1994).

Carboxyterminale Region

Der C-terminale Bereich (Aminosäurereste 300-393) ist multifunktionell. Die Aminosäurereste 324-355 bilden eine Oligomerisierungsdomäne. Das p53 Protein liegt in Lösung als Tetramer vor, das strukturell aus zwei Dimeren aufgebaut ist (Kraiss *et al.*, 1988; Clore *et al.*, 1994). Die Tetramerisierung scheint für eine effiziente Transaktivierung *in vivo* notwendig zu sein (Pietenpol *et al.*, 1994). Die Tetramerisierungsdomäne ist mit der sequenzspezifischen DNA-Bindungsdomäne über eine flexible *linker* Region aus 37 Aminosäureresten (287-323) verbunden (Jeffrey *et al.*, 1995). In der C-terminalen Region liegen außerdem 3 Kernlokalisierungssignale (NLS1: 312-318, NLS2: 365-370, NLS3: 375-380), von denen NLS1 das bedeutendste ist (Shaulsky *et al.*, 1990; Shaulsky *et al.*, 1991).

Der äußerste C-Terminus (Aminosäurereste 363-393) zeichnet sich durch einen hohen Anteil basischer Aminosäurereste aus. Diesem Bereich wurden regulatorische Funktionen für die sequenzspezifische DNA-Bindung zugeschrieben (Hupp & Lane, 1994). Die beobachtete unspezifische Nukleinsäurebindung und die Katalyse der Reassoziations einzelsträngiger DNA und RNA (*reannealing*-Aktivität) sind strukturell ebenfalls in diesem Bereich lokalisiert (Oberosler *et al.*, 1993).

I.4 Aktivierung von p53

Afferente Signalwege

p53 kann durch zwei Arten von Signalen aktiviert werden: metabolischer und genotoxischer Stress oder die Gegenwart von aktivierten Onkogenen. Das wichtigste Stress-Signal ist eine DNA-Schädigung (Maltzman & Czyzyk, 1984; Kastan *et al.*, 1991). Daneben wird p53 u.a. durch Schäden am mitotischen Spindelapparat (Cross *et al.*, 1995), Ribonukleotiddepletion (Linke *et al.*, 1996), Sauerstoffmangel (Graeber *et al.*, 1994), Hitzeschock (Ohnishi *et al.*, 1996) oder Stickoxidexposition (Forrester *et al.*, 1996) aktiviert. Wie die Erkennung der einzelnen Stresssignale erfolgt ist unklar. Die aus der Umsetzung dieser Signale resultierende Aktivierung von p53 ist dagegen besser charakterisiert.

Metabolische Stabilisierung

Die Aktivierung von p53 geht einher mit einer Erhöhung des p53 Proteinspiegels. Dabei spielt die transkriptionale Induktion des *p53* Gens dabei keine Rolle. Neben der möglichen Beteiligung einer translationalen Regulation (Fu *et al.*, 1996; Mosner *et al.*, 1995; Fontoura *et al.*, 1997) erfolgt die Regulation post-translational, über eine Erhöhung der Halbwertszeit des p53 Proteins (Maltzman & Czyzyk, 1984; Kastan *et al.*, 1991).

Der Mechanismus der p53 Stabilisierung involviert Mdm2. In ungeschädigten Zellen komplexiert Mdm2 die N-terminalen Transaktivierungsdomäne von p53 und unterdrückt dadurch die p53-abhängige Transkription (Momand *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1996a; Haupt *et al.*, 1996). Darüber hinaus leitet Mdm2 die proteolytische Degradation von p53 ein (Haupt *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997). Der Abbau von p53 erfolgt über den Ubiquitin-Proteasom-Signalweg (Maki *et al.*, 1996), möglicherweise unter einer direkten Beteiligung von Mdm2, da Mdm2 *in vitro* als p53-spezifische E3 Ubiquitin Ligase fungieren kann (Honda *et al.*, 1997; Honda & Yasuda, 1999). Nach einem Stress-Signal wird die Interaktion von Mdm2 und p53 durch Phosphorylierung beider Bindungspartner unterbunden. Dadurch ist p53 in der Lage, Zielgene zu transaktivieren denen auch *mdm2* gehört (Wu *et al.*, 1993; Perry *et al.*, 1993). Daraus resultiert ein negativer Rückkopplungseffekt, durch den ein übermäßiger Anstieg des p53 Proteinspiegels verhindert wird.

kovalente Modifikationen

Die Aktivierung von p53 umfasst auch die Modulation der Phosphorylierung und Acetylierung des Proteins. Phosphorylierungsstellen befinden sich hauptsächlich in der N-terminalen und der C-terminalen Region (Meek, 1999). Die Phosphorylierung im N-terminalen Bereich verstärkt die Transaktivierung und schwächt die Bindung zu Mdm2. Außerdem entsteht eine stärkere Interaktion mit dem Transkriptions-Coaktivator p300, der p53 auch acetylieren kann (Lambert *et al.*, 1998). Daneben wird p53 auch durch PCAF acetyliert (Sakaguchi *et al.*, 1998). Ebenso wie die Phosphorylierung in der C-terminalen Region, führt die Acetylierung zu einer Verstärkung der sequenzspezifischen DNA-Bindung.

ARF Signalweg

Neben der stress-induzierten Aktivierung von p53 kann die deregulierte Expression von Onkogenen wie *c-myc*, *E1A*, *ras* oder β -*catenin* eine p53 Antwort induzieren (Hermeking & Eick, 1994; Serrano *et al.*, 1997; Debbas & White, 1993; Damalas *et al.*, 1999). Die Mechanismus dieser Aktivierung war bis zur Entdeckung von ARF, einem Produkt des *INK4A* Tumorsuppressorgens, unklar. In neueren Arbeiten konnte dann gezeigt werden, dass eine deregulierte Aktivität von Onkoproteinen zu einer Induktion von ARF führt (Zindy *et al.*, 1998; de Stanchina *et al.*, 1998; Palmero *et al.*, 1998). ARF bindet an Mdm2, verhindert die Ubiquitinierung und Degradation von p53 und ermöglicht dadurch die p53 Aktivierung (Bates *et al.*, 1998; Stott *et al.*, 1998; Pomerantz *et al.*, 1998).

Funktionen von aktiviertem p53

Die beiden wichtigsten effizienten Signalwege über die aktiviertes p53 seine Tumorsuppressorfunktion ausübt sind die Induktion von Apoptose oder Wachstumsarrest. Der Wachstumsarrest kann sowohl am G₁- als auch am G₂/M- Checkpunkt des Zellzyklus erfolgen. Beide Signalwege sind eng mit der Funktion von p53 als Transkriptionsfaktor verknüpft und sollen in den folgenden Abschnitten detailliert dargestellt werden.

Neben der transkriptionalen Kontrolle von Wachstumsarrest und Apoptose ist p53 mit einer Reihe anderer zellulärer Prozesse funktionell verknüpft. P53 kann DNA-Reparatur, Rekombination und Replikation möglicherweise über Protein-Protein Interaktionen und über die 3'-5' Exonukleaseaktivität entscheidend beeinflussen (Albrechtsen *et al.*, 1999). Vermutlich ist dazu nicht in jedem Fall eine Stress-bedingte Induktion notwendig, d.h. auch nicht-aktiviertes p53 erfüllt in der Zelle Aufgaben, die zur Aufrechterhaltung der genomischen Integrität beitragen (*dual role model*).

I.5 Induktion eines Wachstumsarrests durch p53

G₁-Arrest

Der p53-induzierte G₁-Arrest ist abhängig von der Transaktivierung des p21^{waf1}-Gens (El-Deiry *et al.*, 1993; Waldman *et al.*, 1995; Deng *et al.*, 1995; Brugarolas *et al.*, 1995). P21^{waf1} ist ein starker Inhibitor von CDK-Aktivitäten (Harper *et al.*, 1993; Dulic *et al.*, 1994; Xiong *et al.*, 1993).

Die Aktivität von Cyclin D-CDK4/6 und Cyclin E-CDK2 führt in der G₁-Phase zur sequentiellen Phosphorylierung des Retinoblastomproteins RB. Dadurch werden die von hypophosphoryliertem RB gebundenen und sequestrierten Proteine der E2F Familie freigesetzt und können Gene transaktivieren, deren Produkte die S-Phase einleiten. Die Inhibition von Cyclin D-CDK4/6 und Cyclin E-CDK2 durch p21^{waf1} hält die für die G₁-Phase des Zellzyklus charakteristische Hypophosphorylierung des Retinoblastomproteins RB aufrecht und vermittelt somit einen G₁-Arrest.

G₂-Arrest

Für die Induktion eines G₂-Arrests durch p53 scheinen mehrere Mechanismen verantwortlich zu sein. Im Vordergrund steht vermutlich die Transaktivierung von 14-3-3σ (Hermeking *et al.*, 1997). 14-3-3σ komplexiert Cyclin B-CDK1 und sequestriert diesen Komplex im Cytoplasma. Dadurch wird die Aktivierung von Cyclin B-CDK1 unterbunden und die Zelle geht nicht in die Mitose. Die Phosphatase Cdc25C, die den Cyclin B-CDK1 Komplex aktiviert, wird gleichzeitig über einen anderen Signalweg inaktiviert (Chan *et al.*, 1999; Peng *et al.*, 1997). Damit ist die Entstehung eines G₂-Arrests vollständig erklärbar, dennoch scheint eine zusätzliche Beteiligung von p21^{waf1} möglich (Bunz *et al.*, 1998; Medema *et al.*, 1998; Niculescu *et al.*, 1998; Dulic *et al.*, 1998). Die beobachtete Repression der Transkription von Cyclin B durch p53 könnte ebenfalls zur Induktion eines G₂-Arrests beitragen (Innocente *et al.*, 1999). Daneben wird auch die Transaktivierung von Gadd45, dessen Genprodukt Cyclin B-CDK1 hemmt, diskutiert (Zhan *et al.*, 1999).

I.6 Apoptoseinduktion durch p53

Der erste Hinweis darauf, dass p53 in der Lage ist, Apoptose zu induzieren, ergab sich aus Experimenten mit einer Mutante, die temperatur-abhängig in Wildtyp- bzw. Mutanten-

Konformation vorliegt (ts p53). Nach Transfektion von ts p53 in eine murine Leukämie-Zelllinie, zeigten die Zellen bei permissiver Temperatur Apoptose, nicht jedoch bei restriktiver Temperatur (Yonish-Rouach *et al.*, 1991). Daran anschließende Studien wiesen nach, dass die Transfektion von p53 in Tumorzelllinien Apoptose auslöst (Shaw *et al.*, 1992; Yonish-Rouach *et al.*, 1993). Die Apoptoseinduktion nach einem DNA-Schaden durch p53 wurde intensiv an Zellen und Geweben von p53 knockout Mäusen untersucht. Insbesondere für Thymozyten (Lowe *et al.*, 1993; Clarke *et al.*, 1993), andere Zellen des hämatopoetischen Systems (Lotem & Sachs, 1993), Kreatinozyten (Ziegler *et al.*, 1994) und Zellen des Interstitiums (Clarke *et al.*, 1994) konnte eine starke p53-abhängige Apoptose nach Bestrahlung gezeigt werden. Aktivierte Onkogene wie *myc* (Hermeking & Eick, 1994), *E2F-1* (Wu & Levine, 1994) oder *E1A* (Debbas & White, 1993) können ebenfalls Signal einer p53-abhängigen Apoptose sein.

Ein mit fast allen Studien zu vereinbarendes Ergebnis ist, dass die Signaltransduktion von aktiviertem p53 zur allgemeinen Apoptosemaschinerie über die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien und die Aktivierung von Caspase-9 verläuft (Kuida *et al.*, 1998; Hakem *et al.*, 1998; Schuler *et al.*, 2000). Der molekulare Ablauf der p53-induzierten mitochondrialen Dysregulation ist jedoch noch nicht eindeutig aufgeklärt.

Transaktivierungs-abhängige und Transaktivierungs-unabhängige Apoptose

Während der p53-vermittelte Wachstumsarrest von der Transaktivierungsfunktion von p53 abhängt, zeigen viele Studien, dass die Transaktivierung für die Apoptoseinduktion durch p53 nicht immer notwendig ist. Die ersten Hinweise dafür ergaben sich aus Untersuchungen, die zeigten, dass die p53-vermittelte Apoptose in Gegenwart von Inhibitoren der Transkription oder Translation stattfindet (Caelles *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994; Gao & Tsuchida, 1999). Die Analyse einer Transaktivierungs-defizienten p53 Mutante (humanes p53 Gln22Ser23, murines p53 Gln25Ser26) brachte widersprüchliche Ergebnisse. Während zwei Studien zeigten, dass diese Mutante noch Apoptose auslösen konnte (Haupt *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996b), konnte aus anderen Arbeiten mit der gleichen Mutante der Schluss gezogen werden, dass die transkriptionale Aktivität von p53 zur Apoptoseinduktion notwendig ist (Sabbatini *et al.*, 1995; Attardi *et al.*, 1996). Dieser Analyseansatz fand seine Vervollständigung in der Generation eines knockin Mausmodells (Jimenez *et al.*, 2000; Chao *et al.*, 2000) und konnte das Ergebnis einer Transaktivierungs-Abhängigkeit eindrucksvoll *in vivo* bestätigen.

Dennoch scheint zumindest eine Beteiligung von Transaktivierungs-unabhängigen Prozessen möglich zu sein. So konnte kürzlich beobachtet werden, dass ein kleiner Teil von aktiviertem p53 eine mitochondriale Lokalisation zeigt. Diese Lokalisation konnte nur nachgewiesen werden, wenn die Zellen eine p53-induzierten Apoptose zeigten, nicht jedoch bei der Induktion eines Zellzyklusarrests durch p53 oder einer p53-unabhängigen Apoptose. (Marchenko *et al.*, 2000). Die Ergebnisse einer anderen Studie legen nahe, dass die direkte Interaktion von p53 mit den TFIIH DNA-Helikasen XPB und XPD für die Apoptoseinduktion notwendig ist (Wang *et al.*, 1996).

p53 Zielgene mit pro-apoptotischer Funktion

Eine Modellvorstellung wie sie für die Transaktivierung und Funktion von Genen bei der Induktion des Wachstumsarrest etabliert wurde, konnte für die Transaktivierungs-abhängigen Apoptose nicht aufgestellt werden. Die Liste der p53-induzierten Gene, die Funktionen in der Apoptose haben, wächst ständig. Allerdings konnte bisher kein Genprodukt identifiziert

werden, das alleine in der Lage ist, die p53-vermittelten Apoptose zu induzieren. Die Apoptose-relevanten Zielgene lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Zu der ersten Gruppe gehören Genprodukte, die als Oberflächenrezeptoren Apoptose induzieren können. Die zweite Gruppe kodiert Proteine, die auf der Ebene der Mitochondrien in die Signaltransduktion eingreifen.

fas konnte, zur ersten Gruppe gehörend, als Zielgen von p53 identifiziert werden (Owen-Schaub *et al.*, 1995). Die funktionelle Beteiligung des Fas-Signalwegs an der p53-vermittelten Apoptose ist jedoch unklar. Durch den Vergleich von Heptomazelllinien, die wt bzw. mt p53 enthalten, konnte gezeigt werden, dass eine durch einen DNA-Schaden induzierte Apoptose über p53 und den Fas-Weg vermittelt wird (Muller *et al.*, 1997). Dagegen lies sich jedoch keine Abhängigkeit der p53-vermittelten Apoptose und dem Fas-Signalweg in anderen Zellen zeigen (O'Connor *et al.*, 2000; Fuchs *et al.*, 1997). Ein anderer zur TNF-Superfamilie gehörender Rezeptor, *Killer/DR5*, scheint ebenfalls Zielgen von p53 zu sein (Wu *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 1999). In den Kontext der *death receptor* Signalwege gehört ebenfalls das neu entdeckte Gen *pidd*, das ein Zielgen von p53 ist und für ein Adaptorprotein mit Homologie zu FADD kodiert (Lin *et al.*, 2000b). Ein weiteres p53-induziertes Protein ist IGF-BP3 (*insulin-like growth factor binding protein 3*), das Apoptose durch die Blockierung des IGF-1-abhängigen Überlebens-Signalwegs induziert (Buckbinder *et al.*, 1995). Die gleichzeitige transkriptionale Repression des zugehörigen Rezeptors *IGF-1 R* durch p53 ermöglicht eine effiziente Blockierung dieses Signalwegs (Prisco *et al.*, 1997).

Während die Beteiligung der Rezeptor-abhängigen Prozesse nur in bestimmten Systemen eine Rolle spielt, steht die Deregulation des Mitochondriums im Zentrum der p53-abhängigen Signaltransduktion. P53 transaktiviert Gene, die direkt die mitochondriale Integrität beeinflussen. Darüber hinaus können auch Rezeptor-abhängige Signalwege über die Spaltung von Bid mit dem Mitochondrium gekoppelt sein.

Das prominenteste von p53 transaktivierte Gen mit einer direkten mitochondrialen Funktion ist *Bax* (Miyashita & Reed, 1995; Zhan *et al.*, 1994). Als pro-apoptotisches Protein der Bcl-2 Familie ist Bax in der Lage, die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien zu induzieren (Jurgensmeier *et al.*, 1998; Rosse *et al.*, 1998). In der p53-vermittelten Apoptose scheint Bax eine Funktion in Gehirn-Tumoren (Yin *et al.*, 1997) und Fibroblasten (McCurrach *et al.*, 1997), nicht jedoch in Thymozyten (Knudson *et al.*, 1995) zu haben. Mit der Bax-induzierten Apoptose scheint ein weiteres Zielgen von p53 in Zusammenhang zustehen. *peg3/pw1* wird von p53 transaktiviert (Relaix *et al.*, 2000) und induziert die Translokation von Bax zu den Mitochondrien (Deng & Wu, 2000). Ein weiteres pro-apoptotisches Protein der Bcl-2 Familie, Noxa genannt, wurde kürzlich in einem Screening auf p53-induzierte Gene entdeckt. Es konnte gezeigt werden, dass *noxa* von p53 transaktiviert wird und dass Noxa tatsächlich Apoptose auslöst (Oda *et al.*, 2000a). Zusätzlich zu der Transaktivierung von pro-apoptotischen Genen der Bcl-2 Familie könnte auch die Transrepression von Genen mit anti-apoptotischer Wirkung durch p53 eine Rolle spielen. Ein potentielles Zielgen ist *bcl-2* (Miyashita *et al.*, 1994).

Neben der Modulation der mitochondrialen Integrität durch Proteine der Bcl-2 Familie, wurde die ROS-Induktion als möglicher p53-abhängiger Signalweg beschrieben (Johnson *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1999). Tatsächlich konnten in einem Screening Gene (*pig1-pig13*) identifiziert werden, die durch p53 transaktiviert werden und von denen einige potentiell ROS erzeugen können (Polyak *et al.*, 1997). Insbesondere für *pig3* zeigte sich eine starke p53-

abhängige Induktion und die Hemmung dieser Induktion korrelierte mit einer verminderten ROS Produktion (Venot *et al.*, 1998). Die Überexpression von Pig3 alleine führt jedoch nicht zur Induktion von Apoptose (Polyak *et al.*, 1997).

Insgesamt zeigt sich, dass die durch p53-induzierten Genprodukte das mitochondriale Gleichgewicht in Richtung Apoptose verschieben können. In sensitiven Zellen führt dies zur Apoptoseinduktion. Demgegenüber sind Zellen, die anti-apoptotische Faktoren exprimieren, vor einer Apoptoseinduktion geschützt. So wird die p53-abhängige Apoptose durch Überexpression von Bcl-2 inhibiert (Chiou *et al.*, 1994).

E2F-1 und p53

Die Induktion von Zielgenen und die mitochondriale Signalintegration stellt nur einen Ausschnitt der Komplexität der Apoptoseinduktion durch p53 dar. Durch die Verknüpfung von Signalwegen (*pathway crosstalk*) können synergistischer Effekte entstehen. Dazu zählt die mögliche Kooperation von E2F-1 und p53 (Wu & Levine, 1994). Ektopisch exprimiertes E2F-1 führt zur Induktion einer p53-abhängigen Apoptose in Zellen, die unter gleichen Bedingungen einen p53-abhängigen Wachstumsarrest zeigen. Demgegenüber ist die E2F-1-abhängige Apoptose in Keratinozyten in *p53* knockout Mäusen reduziert (Pierce *et al.*, 1998). Ferner zeigen Mäuse mit dereguliertem RB Signalweg eine Tumorentwicklung, die mit massiven Apoptosen einhergeht. Sowohl durch Ausschalten von p53 als auch von E2F-1 werden diese Apoptosen stark vermindert (Pan *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass in die Analyse der p53-Apoptose stets das gesamte zelluläre System einbezogen werden muss.

I.7 Problemstellung

Die Aktivierung des Tumorsuppressors p53 nach einem DNA-Schaden führt zur Induktion eines Wachstumsarrests und der damit gekoppelten der DNA-Reparatur oder zur Induktion von Apoptose. Durch beide Mechanismen wird sichergestellt, dass ein DNA-Schaden nicht in Form einer Mutation fixiert wird und potentielle eine Zelltransformation einleitet.

Die Auswahl des Signalweges wird durch viele Parameter beeinflusst. Der Zelltyp spielt dabei eine entscheidende Rolle. So beantworten Zellen des hämatopoetischen Systems einen DNA-Schaden häufig mit einer massiven Apoptose, während Fibroblasten einen Zellzyklusarrest einleiten. Der Unterschied in der Reaktion auf das gleiche Signal könnte im Zusammenhang mit der funktionellen Ausrichtung der entsprechenden Zellen stehen. So ist die Apoptose von Lymphozyten ein wichtiger Bestandteil der Dynamik des Immunsystems und damit für Lymphozyten ein physiologisch wesentlich bedeutsamerer Vorgang als für Fibroblasten. Schon die Entstehung des T- und B-Zellrepertoires durch positive und negative Selektion basiert auf der Apoptose potentiell autoreaktiver Zellen. Im adulten Organismus werden überzählige Zellen nach der klonalen Expansion Antigen-reaktiver Lymphozyten und dem Ablauf einer Immunantwort durch Apoptose eliminiert. Daher ist es nicht verwunderlich, dass aus der Aktivierung von p53 in diesen Zellen die Apoptoseinduktion resultiert und kein Arrest/Reparatur Signalweg initiiert wird.

Tatsächlich gilt die durch γ -Bestrahlung induzierte Apoptose in Thymozyten als eines der wichtigsten Referenzsysteme für die p53-induzierte Apoptose (Lowe *et al.*, 1993). p53 knockout Thymozyten sind resistent gegenüber γ -Bestrahlung, während andere Signalwege der Apoptoseinduktion in diesen Zellen jedoch intakt sind (Clarke *et al.*, 1993). Der p53-abhängige Weg verläuft über die Aktivierung der Initiatorcaspase Caspase-9 (Kuida *et al.*, 1998; Hakem *et al.*, 1998). Wie die Signalübertragung erfolgt ist weitgehend unklar. Zumindest scheint in diesem System die p53-induzierte Apoptose Transaktivierungsabhängig zu sein. Knockin Mäuse mit einer Doppelmutation in der Transaktivierungsdomäne zeigen im Thymozyten-Bestrahlungsexperiment den gleichen Phänotyp wie p53 knockout Mäuse (Jimenez *et al.*, 2000; Chao *et al.*, 2000). Da die Induktion eines Wachstumsarrests ebenfalls weitgehend von der Transaktivierung abhängig ist, könnte die Wahl des p53-Signalweges auf einer systemspezifischen Transaktivierung beruhen. Eine differentielle Transaktivierung kann verschiedene Ursachen haben. Beispielsweise kann aktiviertes p53 in unterschiedlicher Weise modifiziert werden und mit verschiedenen Cofaktoren interagieren. Eine Spezifität kann auch durch die DNA-Struktur des Promotors bedingt sein (Kim *et al.*, 1997). Diese Faktoren lassen sich unter dem Begriff „zellulärer Kontext“ zusammenfassen. Daher wäre für eine Untersuchung der p53-abhängigen Transaktivierung ein Analyseansatz interessant, in dem sich dieser Kontext dramatisch ändert.

Ein Zellsystem mit geeigneten Voraussetzung sind Milzzellen. Eine Milzzellsuspension besteht aus etwa 80% T- und B-Lymphozyten, die sich in der G₀-Phase des Zellzyklus befinden. Die polyklonale Stimulation dieser Zellen induziert einen Eintritt in den Zellzyklus und ist damit ein starker proliferativer Stimulus. Gleichzeitig ist der Übergang von ruhenden Lymphozyten zu T- und B-Lymphoblasten ein Differenzierungsschritt. Als Zellen des hämatopoetischen Systems stehen Milzzellen in enger Beziehung zu Thymozyten, die ein klassisches System für die p53-abhängige Apoptose darstellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher die Signalwege nach DNA-Schädigung in Milzzellen näher zu charakterisieren. Dazu sollte zunächst gezeigt werden, dass γ -Bestrahlung in Milzzellen tatsächlich Apoptose induziert. Die Analyse einer p53 Abhängigkeit sollte mit Hilfe von p53 knockout Mäusen erfolgen. Im Mittelpunkt der Arbeit sollte die Frage stehen, in wie weit eine mitogene Stimulation die p53-abhängigen Transaktivierung und die zelluläre Antwort -Apoptoseinduktion- beeinflusst.

II. Ergebnisse

II.1 Apoptose in Lymphozyten nach γ -Bestrahlung

Die Apoptose in Lymphozyten nach γ -Bestrahlung ist p53-abhängig

Viele Zellen des hämatopoetischen Systems reagieren auf die Behandlung mit DNA-schädigenden Agenzien mit der Induktion von Apoptose. Insbesondere das Auftreten von Doppelstrangbrüchen nach γ -Bestrahlung ist ein starker Induktor, und die kurz danach auftretende Apoptose ist abhängig von p53. Die Analyse der Reaktion muriner Milzzellen auf γ -Bestrahlung war Ausgangspunkt dieser Arbeit.

Die Zellen wurden jeweils frisch präpariert. Nach dem Abtrennen von Gewebebestandteilen und der Lyse der Erythrozyten wurden die Zellen in Medium resuspendiert und kultiviert. Die gewonnene Zellsuspension bestand zu ca. 80% aus T- und B-Lymphozyten (siehe unten), so dass diese Zellen im folgenden vereinfachend als Lymphozyten bezeichnet werden.

γ -Bestrahlung mit 8 Gy induzierte in den Lymphozyten Apoptose. Die qualitative Erfassung der Apoptose erfolgte über die gelelektrophoretische Analyse der DNA-Fragmentierung (*DNA-laddering*). Der Verlust der Integrität der genomischen DNA und das Auftreten der Fragmente war 8 h nach Bestrahlung deutlich sichtbar (Abb.3 A1). Nach 30 h war die genomische DNA fast vollständig degradiert. Im Unterschied dazu zeigten unbehandelte Zellen nach 30 h nur eine schwache Fragmentierung und eine deutliche Bande an der Position intakter genomischer DNA (Abb.3 A1).

Die quantitative Erfassung apoptotischer Zellen erfolgte über eine durchflußzytometrische Analyse. Durch den Verlust kleiner DNA-Fragmente nach der Zellfixierung werden apoptotische Zellen in einer Analyse des DNA-Gehalts als Population mit einem geringeren DNA-Gehalt als G_0/G_1 -Zellen erfasst. Da der DNA-Verlust heterogen ist, ergibt sich eine Streuung über einen größeren Kanalbereich (breiter sub- G_1 -Peak). Die Induktion der Apoptose nach Bestrahlung war deutlich über die Zunahme dieses sub- G_1 -Peaks messbar (Abb.3 vgl. A2 u. A3). Die Analyse des Anteils apoptotischer Zellen im Zeitverlauf (Abb.4) ergab, dass auch ohne Behandlung ein Anstieg von ca. 3% zu Beginn auf ca. 35% nach 30 h zu verzeichnen war. Es handelte sich dabei um eine Spontanapoptose, die eine Reaktion der primären Zellen auf die Präparation und die Kultivierungsbedingungen ist. Sie wurde jedoch deutlich von der bestrahlungs-induzierten Apoptose überlagert. Nach 30 h wiesen ca. 90% der bestrahlten Zellen eine DNA-Fragmentierung auf. Der Vergleich der Spontanapoptose mit der bestrahlungs-induzierten Apoptose im Zeitverlauf zeigte, dass die Zunahme des Anteils apoptotischer Zellen (Steigung der Kurve) zwischen 6 h - 10 h nach Bestrahlung am größten war (Abb.4). Der Zeitpunkt 10 h wurde daher auch als Referenzzeitpunkt für weitere durchflußzytometrische Analysen der Zellen gewählt.

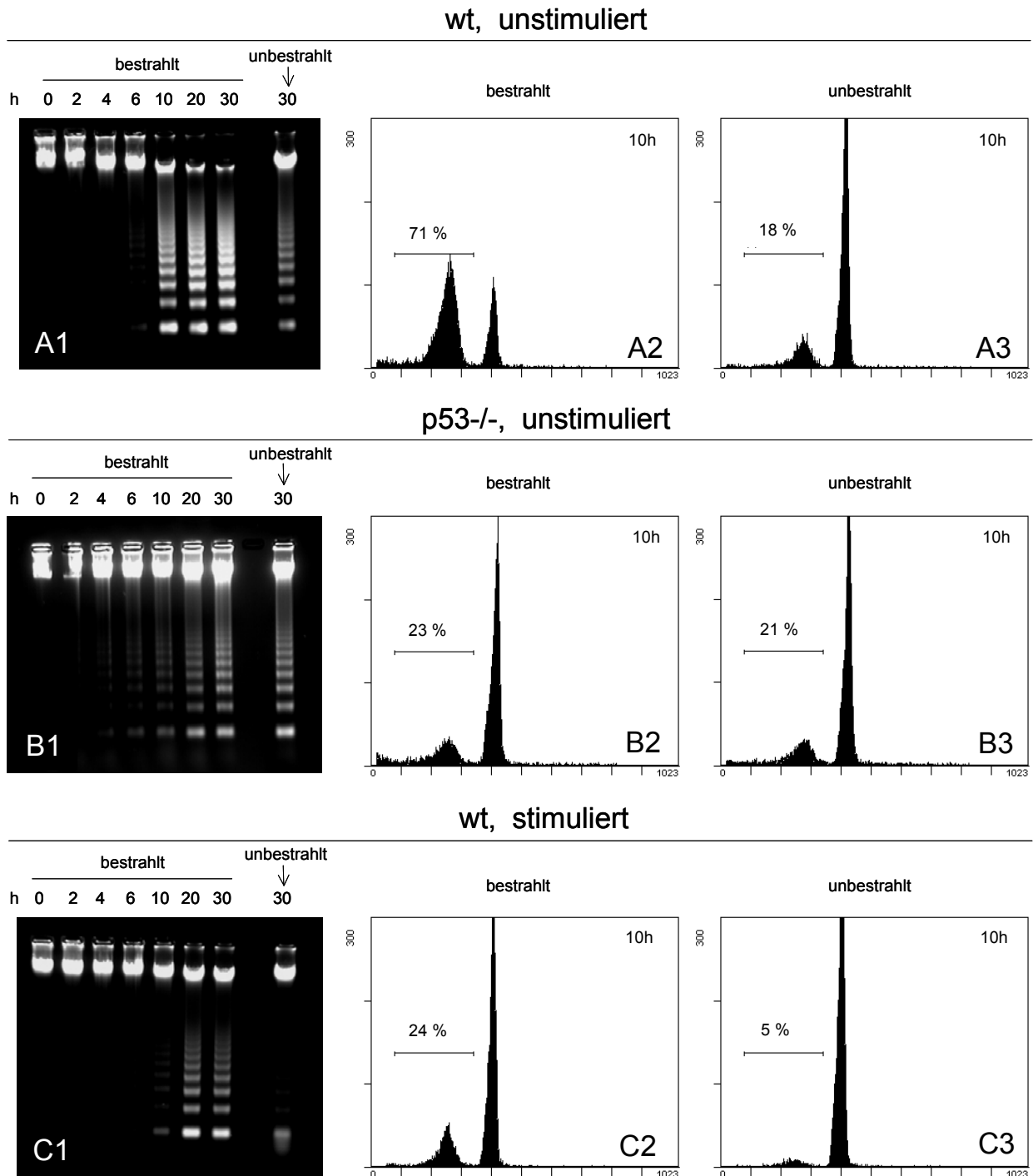


Abbildung 3: Analyse der Apoptose in unstimulierten wt Zellen (A), unstimulierten p53^{-/-} Zellen (B) und in stimulierten wt Zellen (C) Milzzellen wurden ohne und mit ConA kultiviert. 30 min nach Zugabe des Mitogens wurden die Zellen mit 8 Gy bestrahlt oder verblieben unbehandelt. Die Kultivierung nach Bestrahlung erfolgte für die angegebene Zeit. **A1-C1:** Je 2,5 µg genomische DNA aus Zelllysaten wurde in einem Agarosegel (1%) elektrophoretisch aufgetrennt, und die DNA wurde durch EtBr-Färbung und UV-Illumination sichtbar gemacht. **A2-C2 u A3-C3:** Die Zellen wurden fixiert, mit PI gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Pro Ansatz wurden 13.000 Ereignisse gezählt und unter Ausschluß von Zellrümern und Dubletten über einen 605/35 Bandpassfilter (FL3) detektiert. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde über den markierten Kanalbereich bestimmt.

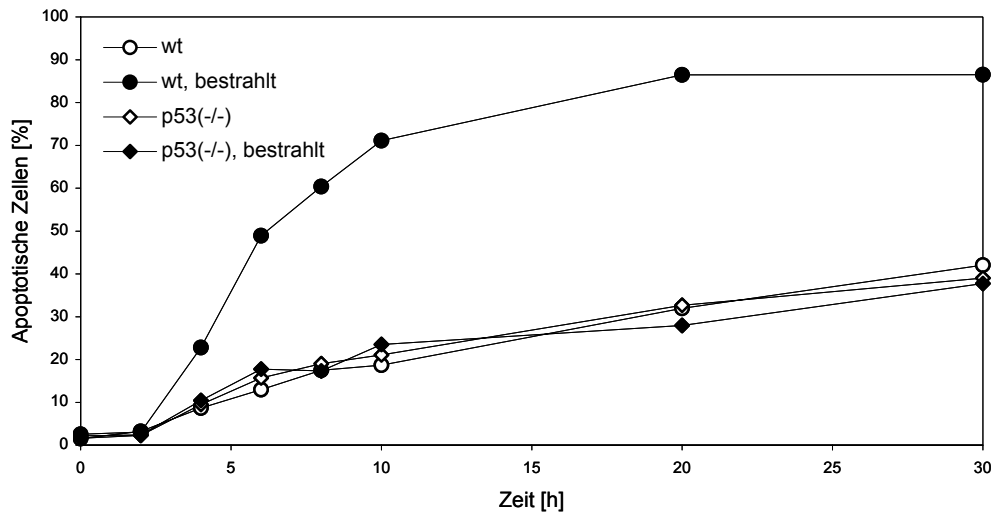


Abbildung 4: Durchflußzytometrische Analyse der Apoptoseinduktion: Vergleich von wt Zellen und p53^(-/-) Zellen Milzzellen wurden mit 8 Gy bestrahlt oder verblieben unbehandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung wurden die Zellen fixiert, mit PI gefärbt und durchflußzytometrisch -wie in Abb.3 gezeigt- analysiert. Die ermittelten Anteile apoptotischer Zellen wurden gegen die Zeit aufgetragen.

Insgesamt stimmte die durchflußzytometrische Quantifizierung der apoptotischer Zellen gut mit der Erfassung über die gelelektrophoretische Analyse überein.

Die Abhängigkeit dieser bestrahlungs-induzierten Apoptose von p53 wurde mit Hilfe von p53-defizienten Lymphozyten gezeigt. Während der Anteil apoptotischer Zellen 10 h nach Bestrahlung in wt Zellen von 18% auf 71% anstieg (Abb.3 vgl. A2 u. A3), reagierten p53^(-/-) Zellen nicht mit Apoptoseinduktion (Abb.3 vgl. B2 u. B3). Im Zeitverlauf konnte ebenfalls keine durch Bestrahlung erhöhte Apoptoserate dieser Zellen gemessen werden (Abb.3A1 u. Abb.4). Der Vergleich von p53^(-/-) Zellen und wt Zellen zeigte außerdem, dass die Spontanapoptose unabhängig von p53 ist. Dieses Ergebnis deutet an, dass in bestrahlten Zellen parallel zwei voneinander unabhängige Apoptosereaktionen ablaufen, die p53 unabhängige Spontanapoptose und die p53-abhängige bestrahlungs-induzierte Apoptose. p53 ist demnach ein eigenständiger Signalgeber und verstärkt nicht einfach die in diesen Zellen ablaufende Spontanapoptose.

Insgesamt belegen die Daten, dass die bestrahlungs-induzierte Apoptose auch in diesem Zellsystem eindeutig von p53 abhängig ist. Die Analyse des Zeitverlaufs zeigt darüber hinaus, dass es sich um einen schnellen Prozess handelte, da nach 10 h etwa 3/4 der Zellen eine DNA-Fragmentierung aufwiesen.

Mitogene Stimulation führt zur Hemmung der Apoptose

Neben der Quantifizierung der Population apoptotischer Zellen zeigten die Histogramme der analysierten Lymphozyten die erwartete Zellzyklusverteilung: Über 98% der Zellen hatten zu Beginn der Kultivierung einen 2n DNA-Gehalt und befanden sich in der G₀-Phase

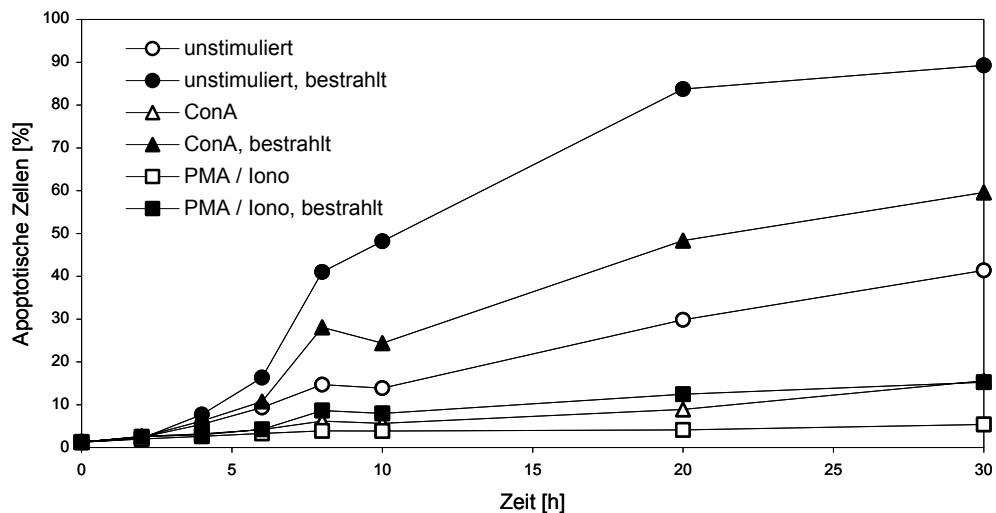


Abbildung 5: Durchflußzytometrische Analyse der Apoptoseinduktion: Vergleich von unstimulierten wt Zellen und stimulierten wt Zellen Milzzellen wurden ohne und mit ConA bzw. PMA/Ionomycin kultiviert. 30 min nach Zugabe des Mitogens wurden die Zellen mit 8 Gy bestrahlt oder verblieben unbehandelt. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung fixiert, mit PI gefärbt und durchflußzytometrisch -wie in Abb.3 gezeigt- analysiert. Die ermittelten Anteile apoptotischer Zellen wurden gegen die Zeit aufgetragen.

des Zellzyklus (Abb.3 A3 u. B3). Physiologisch stellt diese Phase einen Differenzierungszustand dar, in dem die Zellen verbleiben bis ein Stimulationssignal auftritt. *In vivo* erfolgt diese Stimulierung durch eine antigen-abhängige Aktivierung des Immunsystems. T-Lymphozyten werden dabei durch eine spezifische Interaktion zwischen präsentem Antigen und dem T-Zellrezeptor-Komplex klonal aktiviert. Dieses Signal induziert eine Differenzierung zu T-Lymphoblasten und ist zugleich ein extrem starker proliferativer Stimulus. Dieser Signalweg, der *in vivo* nur bei einer erfolgreichen Antigen-Rezeptor-Interaktion induziert wird und daher nur wenige T-Zellen umfasst, lässt sich *in vitro* durch das Lektin Concanavalin A simulieren. ConA bindet an bestimmte Zuckerstrukturen der glykosylierten T-Zellrezeptoren. Über die dadurch induzierte Quervernetzung der Rezeptoren werden T-Zellen ebenfalls aktiviert. Im Unterschied zur physiologischen Situation ist dieser Stimulus polyklonal. Während durch ConA primär nur T-Zellen aktiviert werden, ist eine direkte Aktivierung der T- und B-Lymphozyten *in vitro* durch eine kombinierte Behandlung mit dem Phorbol-ester PMA und dem Calcium-Ionophor Ionomycin möglich. Die Wirkung beruht auf der Aktivierung von Protein Kinase C, einer Kinase, die in der Signaltransduktion nach der Rezeptoraktivierung eine zentrale Stellung einnimmt.

Die Aktivierung von Lymphozyten ist ein komplexer Prozess, der die Zellen innerhalb von wenigen Stunden aus der G₀-Phase in die G₁-Phase überführt. Die Auswirkungen eines derartigen Stimulus auf die p53-induzierte Apoptose wurden analysiert, indem die Zellen 30 min vor der Bestrahlung mit ConA bzw. PMA/Ionomycin versetzt wurden. Dabei zeigte sich eine deutliche Verminderung der p53-induzierten Apoptose. In Gegenwart von ConA wurde die genomische DNA auch nach Bestrahlung nur marginal fragmentiert (Abb.3C1). Der Anteil apoptotischer Zellen 10 h nach Bestrahlung sank auf 24% (Abb.3 vgl. A2 u. C2;

Abb.5). Der Effekt war bei Stimulation mit PMA/Ionomycin noch stärker (Abb.5). Der Kurvenverlauf über die Zeit (Abb.5, ausgefüllte Symbole) bildet diesen Effekt ebenfalls deutlich ab. Die Kurve für ConA-stimulierte, bestrahlte Zellen verlief deutlich unterhalb derjenigen für bestrahlte Zellen. In PMA/Ionomycin behandelten, bestrahlten Zellen stieg die Population apoptotischer Zellen über den gesamten Zeitraum kaum an.

Darüber hinaus zeigte der Vergleich unbestrahlter, unstimulierter und stimulierter Zellen, dass die Spontanapoptose ebenfalls durch Stimulation reduziert wurde (Abb.3 vgl. A3 u. C3; Abb.5, offene Symbole). Der Wirkung von ConA und PMA/Ionomycin hinsichtlich der Verminderung der Spontanapoptose war etwa gleich stark.

Die Stimulations-bedingte Unterdrückung der Apoptose umfasst T- und B-Lymphozyten

Bei dem hier verwendeten Zellsystem handelt es sich um eine Zellsuspension, die zwar organotypisch ist (Milz), jedoch aus unterschiedlichen Zelltypen besteht. Den Hauptanteil der Milzzellen machen T- und B-Lymphozyten aus, die unterschiedlich auf die Stimulation reagieren (siehe unten). Daher wurde die Untersuchung der Apoptose um die experimentelle Differenzierung nach diesen beiden Zelltypen erweitert.

Die durchflußzytometrische Detektion bestimmter Zelltypen in heterogenen Suspensionen erfolgt durch Fluorophor-gekoppelte Antikörper, die an Zelltyp-spezifische Zelloberflächenproteine binden (Immunophänotypisierung). Ziel des Analyseansatzes war die methodische Kopplung der Erfassung apoptotischer Zellen mit einer Immunophänotypisierung. Die in den vorhergehenden Versuchen verwendete Bestimmung des DNA-Gehalts erforderte eine Zellfixierung, die nicht mit der Markierung von Oberflächenantigenen kompatibel ist. Daher wurde für die Apoptosedetektion ein modifiziertes TUNEL-Protokoll etabliert.

Die Detektion der B-Zellen erfolgte durch Markierung von CD45R/B220, T-Zellen wurden über CD3, dem zentralen Protein des T-Zellrezeptor-Komplex, erfasst. Durch gleichzeitige TUNEL-Markierung ergab sich eine Zweiparameter-Darstellung (Dotplot), bei der apoptotische Zellen in x-Richtung aus dem unteren linken Quadranten (*lower left*, LL) in den oberen linken Quadranten (*upper left*, UL) verschoben werden; B- bzw. T-Zellen werden entlang der Abszisse in den unteren rechten Quadranten (*lower right*, LR) verschoben (Abb.6).

Die Validität des Protokolls konnte zunächst durch die Bestimmung der CD45R/B220 und CD3 positiven Gesamtpopulationen verifiziert werden (Abb.6 A-D, UL+UR). Der Anteil an B-Zellen lag in jeder Messung konstant bei ca. 50%, für T-Zellen ergab sich ein Wert von ca. 30%. Die ermittelten Werte stimmen mit den Literaturwerten überein. Die Erfassung apoptotischer Zellen zeigte ebenfalls eine Konformität, sowohl hinsichtlich der erwarteten Werte, als auch beim Vergleich von T- und B-Zellmarkierung: Eine Spontanapoptose (Abb.6 A, UR+LR) konnte für 16% bzw. 14% der Zellen ermittelt werden. Nach Bestrahlung lag der Anteil der apoptotischen bei 82% bzw. 77% (Abb.6 B, UR+LR). Die Stimulation durch ConA führte zu einer deutlichen Reduktion der Werte (28% bzw. 29%), die im Fall einer

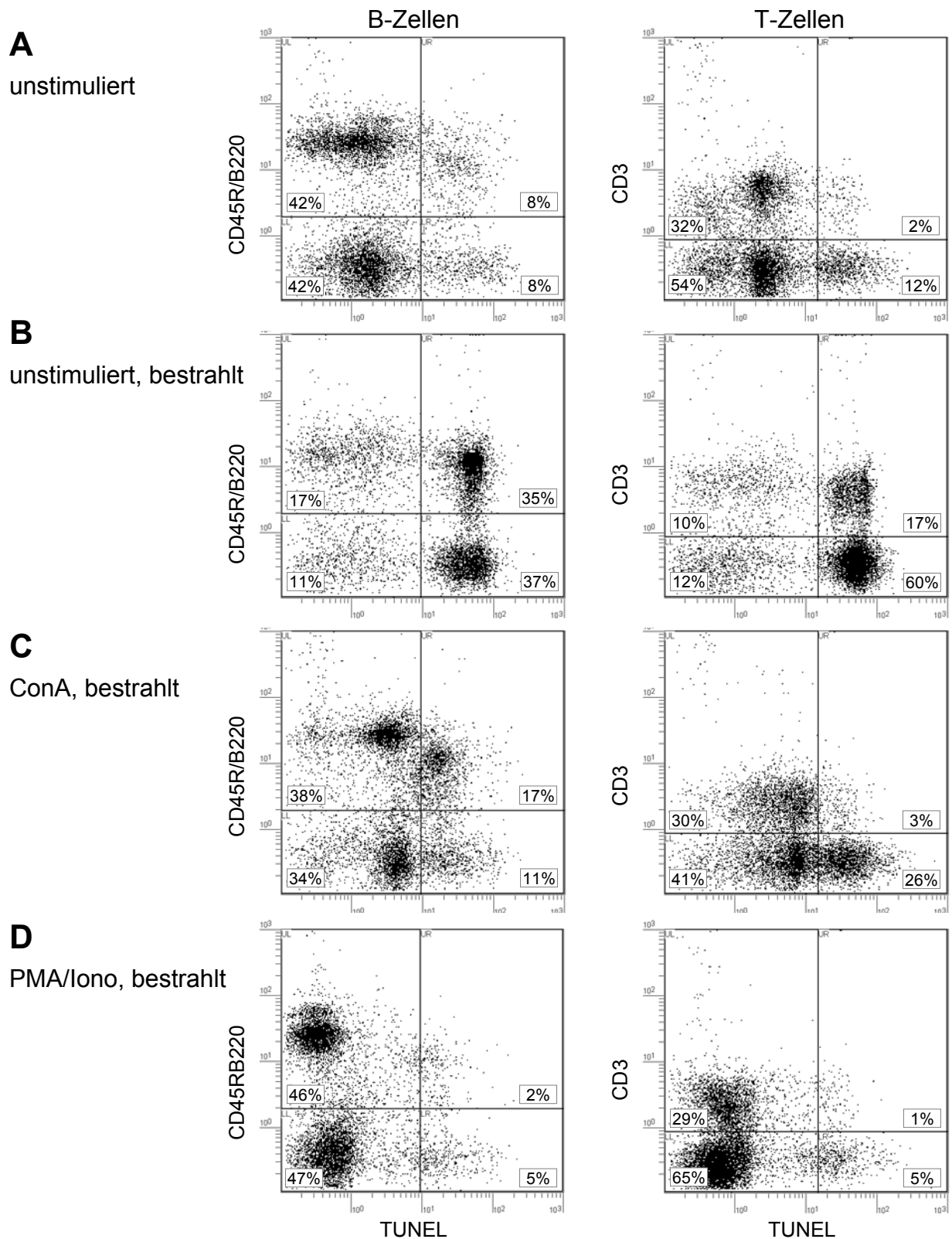


Abbildung 6: Durchflußzytometrische Analyse der Apoptoseinduktion in T- und B-Zellen Milzzellen wurden ohne (A, B) und mit ConA (C) bzw. PMA/Ionomycin (D) kultiviert. 30 min nach Zugabe des Mitogens wurden die Zellen mit 8 Gy bestrahlt (B, C, D) oder verblieben unbehandelt (A). 10 h nach Bestrahlung erfolgte die immunophänotypische Markierung durch PE-gekoppelte anti-CD45R/B220 Antikörper bzw. anti-CD3 Antikörper. Nach kovalenter Fixierung der Antikörper wurden die Zellen zusätzlich über die TUNEL-Methode unter Verwendung eines Fluorescein-gekoppelten Antikörpers markiert. Pro Ansatz wurden 10.000 Ereignisse gezählt und unter Ausschluß von Zelltrümmern über einen 505/25 Bandpassfilter (FL1, Abszisse) und einen 560/90 Bandpassfilter (FL2, Ordinate) detektiert.

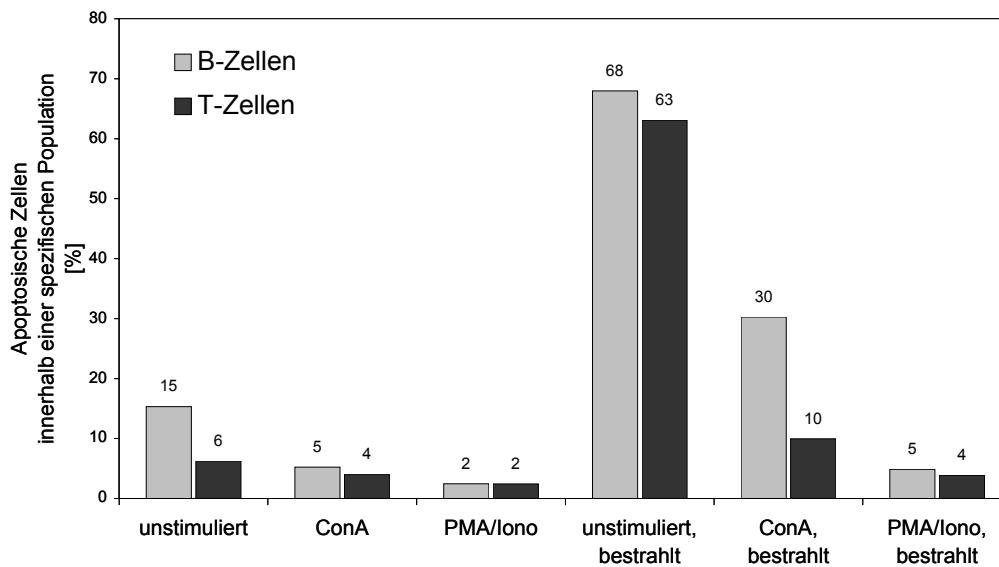


Abbildung 7: Auswertung der durchflußzytometrische Analyse der Apoptoseinduktion in T- und B-Zellen
Die in Abb.6 gezeigten Daten wurden durch Normierung auf positive Zellen des jeweiligen Zelltyps reevaluiert ($UR/[UL+UR]$).

Stimulation durch PMA/Ionomycin mit 7% bzw. 6% noch stärker ausgeprägt war (Abb.6 C u. D, UR+LR). Der mit der TUNEL-Messung ermittelte, im Vergleich zur DNA-Gehaltsbestimmung höhere Anteil apoptotischer Zellen 10 h nach Bestrahlung, basiert auf einer höheren Sensitivität dieser Methode. Insgesamt konnten die zuvor erhobenen Daten bestätigt werden.

Zur Auswertung der B- bzw. T-Zell-spezifischen Reaktionen wurden die Anteile apoptotischer B- bzw. T-Zellen auf die Gesamtzellzahl des entsprechenden Zelltyps bezogen (Abb.7). Zunächst wurde dadurch ein Unterschied zwischen T- und B-Zellen hinsichtlich der Spontanapoptose sichtbar. Der Anteil apoptotischer B-Zellen (15%) lag über dem entsprechenden Anteil bei T-Zellen (6%). B-Zellen sind folglich bei der Kultivierung ohne spezifische Faktoren labiler als T-Zellen. Die Reaktion von B- und T-Zellen auf die Bestrahlung und die stimulations-bedingte Unterdrückung der Apoptose durch PMA/Ionomycin war dagegen gleich: 10 h nach Bestrahlung waren jeweils 2/3 der Zellen apoptotisch, die PMA/Ionomycin-Stimulation resultierte in einer Reduktion auf wenige Prozent.

Ein wichtiger Unterschied wurde bei der Reaktion auf ConA-Stimulation sichtbar. Nur etwa die Hälfte der B-Zellen können über diesen Stimulus vor der Apoptoseinduktion geschützt werden, bei T-Zellen ergibt sich eine Verminderung auf ein Sechstel. Im Unterschied zur Stimulation mit PMA/Ionomycin, die Zelltyp-unabhängig eine direkte Aktivierung der Protein Kinase C bewirkt, ist ConA primär ein T-Zellmitogen. Dennoch können B-Zellen entweder direkt partiell aktiviert werden oder indirekt über aktivierte T-Zellen stimuliert werden (Hawrylowicz & Klaus, 1984; Dosch *et al.*, 1980). Innerhalb der kurzen Zeitspanne zwischen Stimulation und Bestrahlung scheint jedoch nur in einem Teil der B-Zellen die vollständige Aktivierung der benötigten Signalwege stattzufinden. Die

eingeschränkte Reaktion von B-Zellen auf ConA, ist daher die Hauptursache des schlechteren Potentials von ConA gegenüber PMA/Ionomycin eine Apoptoseinhibition zu induzieren. Zusammenfassend zeigte sich, dass sowohl die bestrahlungs-induzierte Apoptose als auch die stimulations-induzierte Apoptoseinhibition nicht nur in einem Zelltyp abläuft, sondern sowohl B- als auch T-Lymphozyten umfasst, mit den für ConA gezeigten Einschränkungen.

II.2 Proliferationsanalyse

Mitogen stimulierte Lymphozyten zeigen nach Bestrahlung einen G₁-Arrest in Abhängigkeit von p53

In den vorangegangenen Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass γ -Bestrahlung in Lymphozyten Apoptose auslöste. Diese Apoptose war abhängig von p53 und konnte durch mitogene Stimulation inhibiert werden. Nach einer genotoxischen Schädigung sollte jedoch auch in stimulierten Zellen eine p53-abhängige Reaktion erfolgen. Möglicherweise wird in stimulierten, bestrahlten Zellen daher der alternative Signalweg eines Wachstumsarrests induziert. Nach Stimulation treten die Zellen in den Zellzyklus und beginnen nach dem Durchlaufen der G₁-Phase mit der DNA-Replikation. Ein G₁-Arrest würde diesen Eintritt in die S-Phase unterbinden und die Reparatur des Schadens ermöglichen. Daher wurde überprüft, ob stimulierte Zellen als Reaktion auf die Bestrahlung einen Zellzyklusarrest zeigen.

Da sich die Lymphozyten in der G₀-Phase befinden, ist der stimulations-induzierte Eintritt in den Zellzyklus und dessen weiterer Verlauf weitgehend synchron. Der Eintritt in die S-Phase, d.h. der Beginn der DNA-Replikation wurde durch eine [³H]-Thymidin Markierung

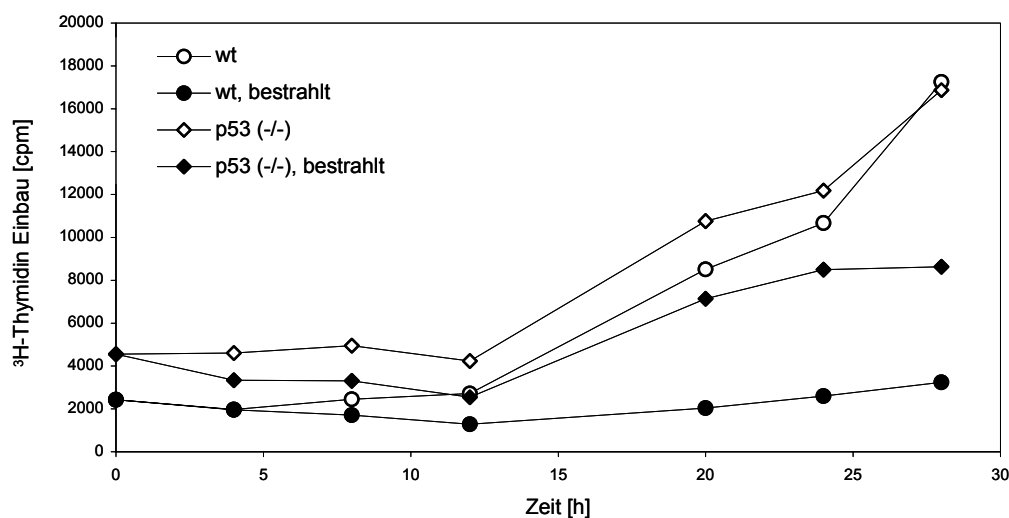


Abbildung 8: Proliferationsanalyse nach mitogener Stimulation: Vergleich von wt und p53^(-/-) Zellen 7,2×10⁵ Milzzellen wurden mit ConA versetzt und 30 min nach Zugabe des Mitogens mit 8 Gy bestrahlt oder verblieben unbehandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung wurden die Zellen mit 0,37 MBq [³H]-Thymidin versetzt und nach 60 min Inkubation lysiert. Mit Hilfe eines Zellharvesters wurde die in die DNA inkorporierte Aktivität auf Szintillationsfilter überführt. Die Ergebnisse der Szintillationsmessung wurden gegen die Zeit aufgetragen.

der Zellen gemessen (Abb.8). Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation wurde der in die DNA eingebaute Anteil der Radioaktivität bestimmt. Der Beginn der S-Phase wurde nach ca. 20h detektierbar. Die Analyse der unbestrahlten wt und p53^(-/-) Zellen ergab weitgehend den gleichen Kurvenverlauf. Die [³H]-Inkorporation der p53^(-/-) Zellen war jedoch insgesamt erhöht. Dieser basale, d.h. nicht stimulations-bedingte Anteil an S-Phase Zellen ist vermutlich auf Zellen zurückzuführen, die aufgrund der p53 Defizienz eine Zellzyklusdysregulation aufweisen. Da diese nicht durch Apoptose oder Wachstumsarrest aufgefangen wird, können derartige Zellen potentiell zu Lymphomen evolvieren. Tatsächlich sind Lymphome die häufigste Tumorart, die in p53 knockout Mäusen im Alter von 4-6 Monaten gefunden wird (Donehower, 1992).

Bestrahlte wt Zellen zeigten im Gegensatz zu unbestrahlten Zellen, keinen Anstieg der [³H]-Thymidin Inkorporation nach 20 h. Die Zellen traten nicht in die S-Phase und waren folglich in der G₁-Phase arretiert. Dieser G₁-Arrest war p53-abhängig. Hingegen zeigten bestrahlte p53^(-/-) Zellen nach 20 h eine [³H]-Thymidin Inkorporation in der gleichen Größenordnung wie unbestrahlte Zellen. Der Eintritt in die S-Phase war in diesen Zellen nicht durch einen G₁-Arrest inhibiert. Nach 28 h war die Einbaurate der p53^(-/-) Zellen nur noch halb so groß wie die unbestrahlter Zellen. Ursache dafür ist der Abbruch der DNA-Synthese an den zahlreichen Doppelstrangbrüchen, die durch die Bestrahlung mit 8 Gy induziert wurden.

Damit konnte belegt werden, dass die mitogene Stimulation der Lymphozyten nicht nur die Inhibition der p53-abhängigen Apoptose induzierte, sondern auch eine Induktion des p53-abhängigen Wachstumsarrests bewirkte.

II.3 Induktion von p53 und p53 Zielgenen

Nach γ -Bestrahlung wird p53 in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten induziert

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich die zelluläre Reaktion auf eine γ -Bestrahlung durch mitogene Stimulation dramatisch ändert, wurden die zugrunde liegenden Vorgänge auf molekularer Ebene näher charakterisiert. Da sowohl die Apoptoseinduktion als auch die Induktion des Wachstumsarrests eine strikte Abhängigkeit von p53 zeigten, war der Ausgangspunkt der molekularen Analyse die Untersuchung der p53 Aktivierung. Das wichtigste Kennzeichen der p53 Aktivierung ist die Erhöhung des p53 Proteinspiegels. Als zelluläre Reaktion auf genotoxischen Stress steigt die p53 Halbwertszeit von 20-30 min auf ein Vielfaches davon an (Maltzman & Czyzyk, 1984; Rogel *et al.*, 1985). In Lymphozyten spielt zusätzlich die translationale Regulation der p53 Expression eine Rolle (Mosner *et al.*, 1995).

Das Ausmaß der p53 Aktivierung kann die Induktion der efferenten Signalwege beeinflussen. Generell scheint zu gelten, dass die Apoptoseinduktion durch höhere

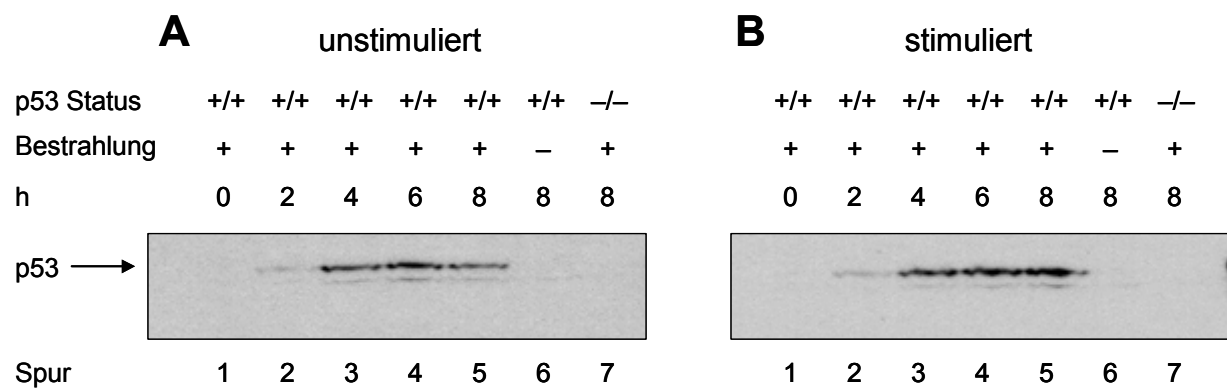


Abbildung 9: p53 Proteinspiegel nach Bestrahlung Milzzellen wurden ohne (A) und mit ConA (B) kultiviert. 30 min nach Zugabe des Mitogens wurden die Zellen mit 8 Gy bestrahlt oder verblieben unbehandelt und wurden für die angegebene Zeit kultiviert. Je 100 µg Gesamtprotein aus SDS-Zelllysaten wurden durch eine SDS-PAGE (11,5%) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. p53 wurde mit dem polyklonalen Kaninchen-Antiserum detektiert.

p53 Spiegel begünstigt wird (Chen *et al.*, 1996b). Um eine ursächliche Beteiligung einer potentiell unterschiedlichen p53 Aktivierung an der zellulären Reaktion auszuschließen, sollte festgestellt werden, ob die p53 Proteinspiegel unter beiden Bedingungen gleichermaßen ansteigen.

Die p53 Proteinspiegel von unstimulierten und stimulierten Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung durch Western-Blot Analysen untersucht (Abb.9). Die γ -Bestrahlung der Zellen induzierte einen Anstieg von p53. Ausgehend von nicht-detektierbaren Mengen zeigte die Analyse von Zelllysaten, die 4 h nach Bestrahlung gewonnen wurden, eine deutliche p53 Bande (Spur 3). Diese prägnante Erhöhung war sowohl bei unstimulierten als auch bei stimulierten Zellen messbar und erfolgte mit der gleichen Kinetik. Insgesamt ergab sich somit kein durch die Stimulation bedingter Unterschied. Lediglich 8 h nach Bestrahlung schienen die p53 Spiegel in unstimulierten Zellen zu sinken. Vermutlich war dieser Abfall jedoch eine Konsequenz der hohen Apoptoserate in unstimulierten, bestrahlten Zellen zu diesem Zeitpunkt (Abb.3). Durch Kontrollen (Abb.9, Spuren 6 u. 7) konnte einerseits belegt werden, dass die Bestrahlung, und nicht beispielsweise der durch die Kultivierung der primären Zellen ausgelöste Stress, die Erhöhung des p53 Spiegels bewirkte. Andererseits konnte die Spezifität des Antiserums durch die Verwendung von Zelllysaten aus p53^(-/-) Zellen demonstriert werden. Die zusätzliche Analyse der p53 mRNA-Spiegel ergab, dass weder Bestrahlung noch Stimulation eine Veränderung in der Menge der p53 Transkripte bewirkte (Daten nicht gezeigt). Dies steht im Einklang mit der für p53 gezeigten post-transkriptionalen Regulation (Kastan *et al.*, 1991).

Die folglich auf der translationalen Induktion und der metabolischen Stabilisierung des Proteins beruhende Aktivierung von p53 erfolgte damit gleichermaßen unter Bedingungen, die zur Induktion des Wachstumsarrests (Bestrahlung und Stimulation) als auch unter Bedingungen, die zur Apoptoseinduktion (Bestrahlung) führen.

Die Transaktivierung von p53 Zielgenen erfolgt nicht differentiell, wird jedoch durch die Stimulation moduliert

Die unterschiedliche zelluläre Antwort auf die Aktivierung von p53 kann vielfältige Ursachen haben. Viele der in diesem Zusammenhang diskutierten Determinanten (Sionov & Haupt, 1999) wie die Variation von Zellsystem zu Zellsystem, die Art und Stärke des Stress-Signals oder die Höhe des p53 Proteinspiegels sind in dem hier verwendeten Ansatz Systemimmanent auszuschließen bzw. experimentell nicht zu stützen (siehe oben). Da p53 durch die Bestrahlung in unstimulierten und stimulierten Zellen gleichermaßen aktiviert wird, könnte die unterschiedliche Induktion p53-efferenter Signalwege die zelluläre Reaktion entscheidend beeinflussen. Auf molekularer Ebene könnte dies durch eine differentielle Transaktivierung von Apoptose- und Wachstumsarrest-spezifischen Genen erfolgen. Obwohl die Notwendigkeit der Transaktivierung von Genen durch p53 zur Apoptoseinduktion nicht in jedem System nachgewiesen werden konnte, ist zumindest für die Apoptoseauslösung in bestrahlten Thymozyten eine intakte Transaktivierungsdomäne erforderlich (Jimenez *et al.*, 2000; Chao *et al.*, 2000). Darüber hinaus ist unbestritten, dass für die Induktion des Wachstumsarrests die Transaktivierung spezifischer Gene durch p53 essentiell ist.

Daher wurde die p53-abhängige Transaktivierung von 5 p53 Zielgenen analysiert, deren Produkte wichtige Funktionen in p53-abhängigen Signalwegen haben: Mdm2 als einen essentiellen Regulator der p53-Aktivität, Fas als Rezeptor für die Steuerung eines *death receptor* Signalwegs, Bax und Noxa als pro-apoptische Proteine der Bcl-2 Familie und mitochondrial wirkende Apoptoseinduktoren, sowie p21 als wichtigsten CDK-Inhibitor zur Induktion des G₁-Arrests. Die Spiegel der entsprechenden Transkripte 5 h nach Bestrahlung wurden über einen RNase Protection Assay bestimmt und durch eine Phosphorimager-Analyse quantifiziert (Abb.10). Die zur Herstellung der antisense RNA-Sonden erforderlichen Konstrukte wurden über RT-PCRs bzw. über Umklonierungen aus anderen Plasmiden hergestellt. Ausgangsmaterial für die gezeigte Analyse war Gesamt-RNA (Abb.10F).

Die erhaltenen Daten wurden in zwei unterschiedlichen Darstellungen ausgewertet. Um die generellen Effekte von Stimulation und Bestrahlung zu analysieren, wurden alle aus der Phosphor-Imager Analyse gewonnenen Werte für die mRNA-Spiegel auf unbestrahlte, unstimulierte Zellen bezogen (Abb.10, Spur 1). Zur Veranschaulichung der p53-spezifischen Transaktivierung wurde getrennt auf unstimulierte und stimulierte Zellen normiert (Abb.11).

Zunächst zeigte sich, dass die Expression aller analysierten Gene durch Stimulation erhöht wurde (Abb.10, vgl. Spuren 1 u. 2). Da die Stimulation die Differenzierung zu Lymphblasten induziert, die mit einer erheblichen Zunahme der Zellgröße (Abnahme des Kern/Cytoplasma Verhältnisses) einhergeht, könnte die Erhöhung der mRNA-Spiegel eine funktionelle Kompensation dieses Wachstums darstellen. Dies legte die Größenordnung der Faktoren (etwa 2- bis 3-fach) nahe und ist auch für Gene zu erwarten, die keine Funktion in p53 Signalwegen haben. Dennoch gibt es Unterschiede, die mit der Funktion des entsprechenden Proteins zusammenhängen könnten. So wurde im Fall von Mdm2, das in sehr engem funktionellen Zusammenhang zu p53 steht, nur ein minimaler Anstieg der mRNA durch die Stimulation induziert (Faktor 1,5). Dagegen konnte für p21 der höchste Wert (Faktor 3,7) ermittelt werden. Diese stärkere Induktion könnte in Verbindung zu der Funktion von p21 als Assemblierungsfaktor von CDK-Cyclin Komplexen stehen (Zhang *et al.*, 1994;

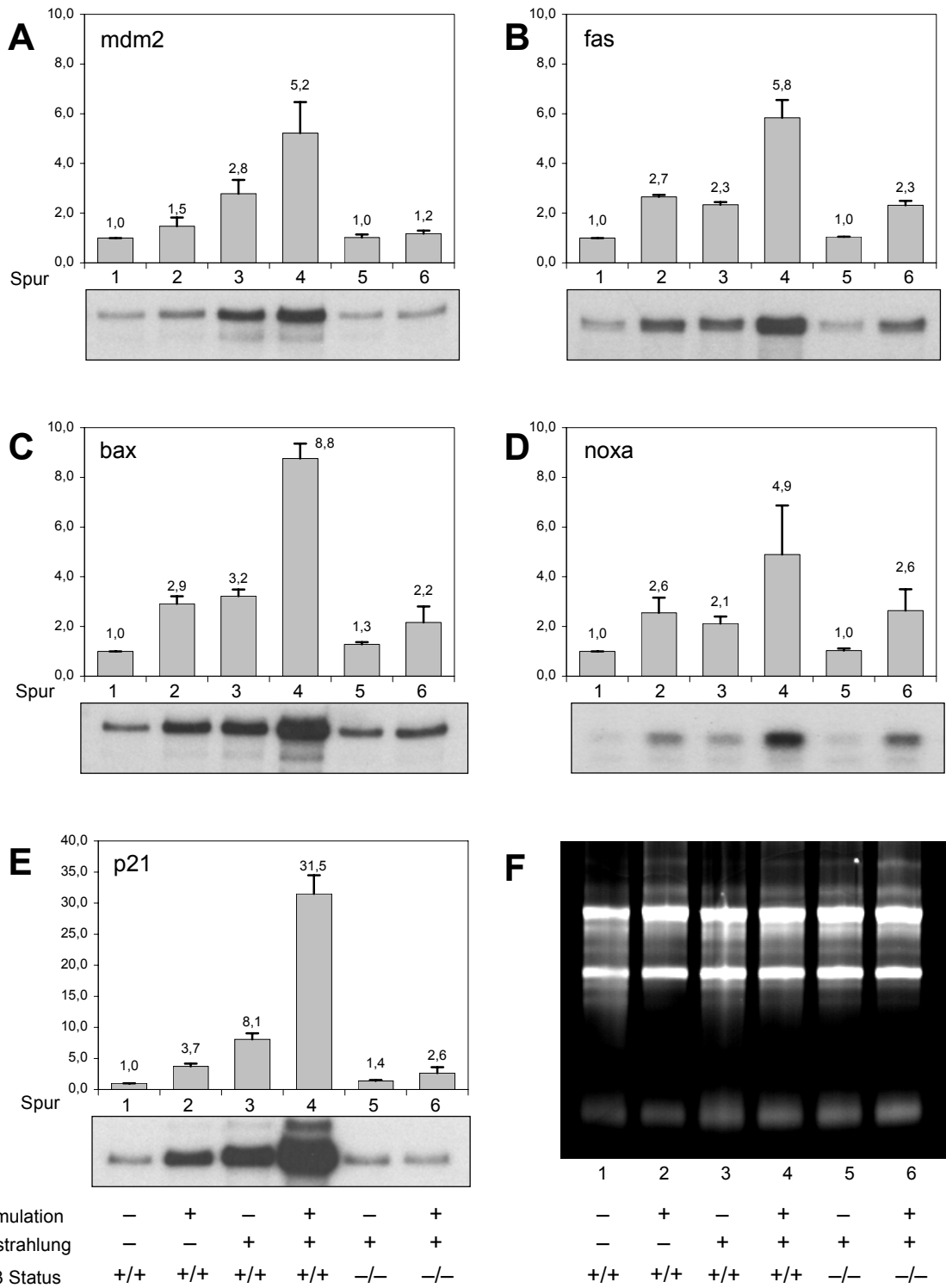


Abbildung 10: Analyse der mRNA-Spiegel von p53 Zielgenen (RNase Protection Assay) Milzzellen wurden ohne und mit ConA kultiviert. 30 min nach Zugabe des Mitogens wurden die Zellen mit 8 Gy bestrahlt oder verblieben unbehandelt. 5 h nach Bestrahlung erfolgte die Zellyse und Präparation der Gesamt-RNA (F). Je 8 µg RNA wurden mit einer [³²P] markierten Sonde, die gegen einen Abschnitt der mRNA des entsprechenden Gens gerichtet war, hybridisiert. Nach dem Verdau überschüssiger Sonde wurde der Reaktionsansatz über ein denaturierendes PAA Gel aufgetrennt und der geschützte Anteil durch eine Phosphorimager Analyse quantifiziert. Die erhaltenen Werte (Spur 1-6) wurden jeweils auf den Wert für unstimulierte und unbestrahlte Zellen normiert (Spur 1). Die Analyse umfaßte die mRNA-Spiegel von mdm2, fas, bax, noxa und p21 (A-E).

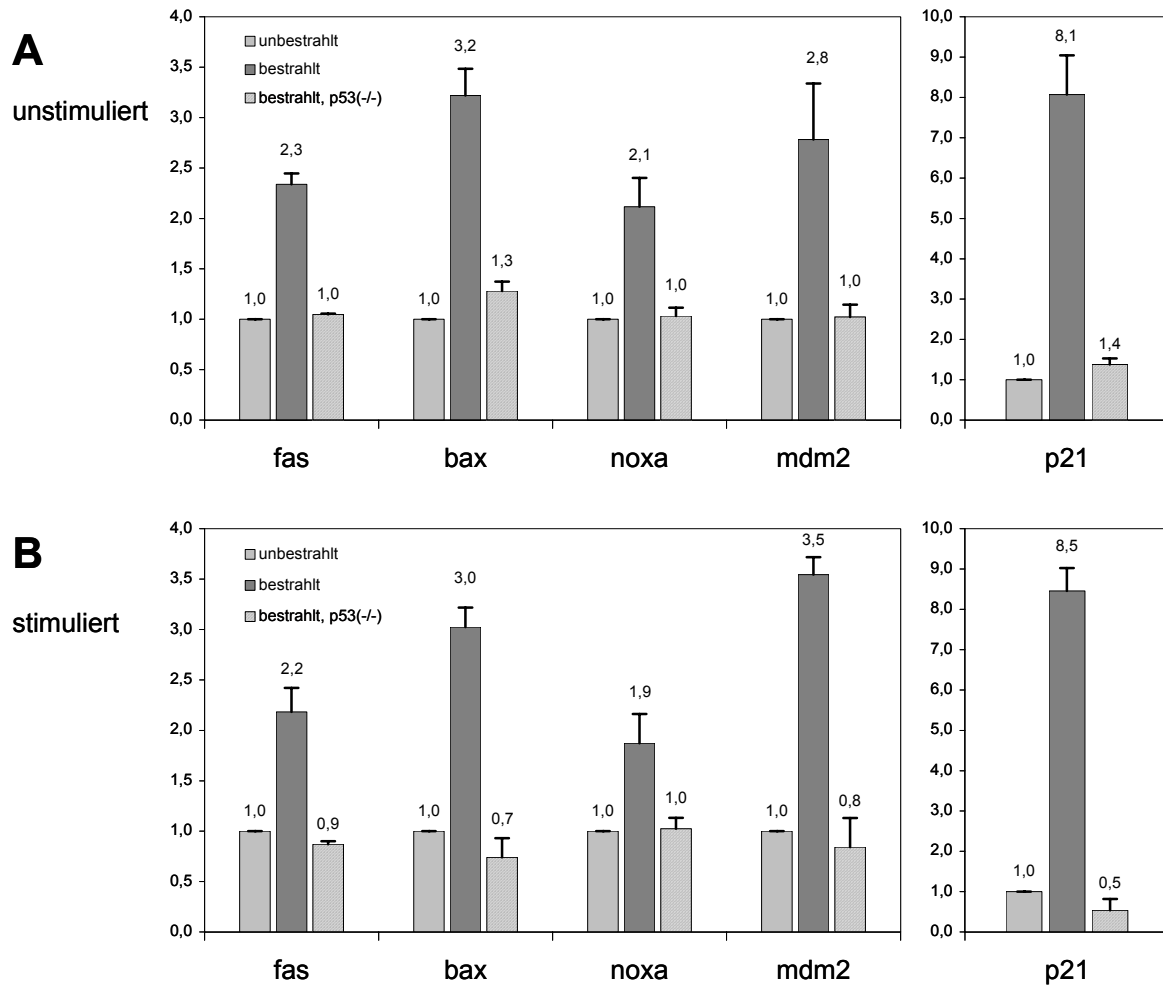


Abbildung 11: Vergleich der p53-abhängigen Transaktivierung in unstimulierten und stimulierten Zellen. Die Daten aus Abb.10 wurden mit einer anderen Normierung reevaluiert. Die Werte aller unstimulierten Ansätze (unbestrahlt, bestrahlt u. bestrahlt p53^(-/-)) wurden auf den Wert für unstimulierte, unbestrahlte Zellen bezogen (**A**, Spuren 1, 3, 5 in Abb.10). Die Werte aller stimulierten Ansätze (unbestrahlt, bestrahlt u. bestrahlt p53^(-/-)) wurden auf den Wert für stimulierte, unbestrahlte Zellen bezogen (**B**, Spuren 2, 4, u. 6 in Abb.10).

Harper *et al.*, 1995). Geringe Konzentrationen erhöhen die CDK-Cyclin Aktivität, höhere Konzentrationen führen zu einer starken Inhibition.

Die Bestrahlung führte ebenfalls zur Induktion der analysierten Gene (Abb.10, vgl. Spuren 1 u. 3). Hinsichtlich des Ausmaßes dieser Erhöhung der mRNA-Spiegel gab es jedoch deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Genen. Die Induktion von *fas* und *noxa* lag bei Faktor 2; für *bax* und *mdm2* ergab sich eine 3-fache Erhöhung. Die prägnanteste Erhöhung konnte für *p21* mit Faktor 8 gemessen werden (Abb.10E, beachte andere Ordinatenkalierung).

Wie aus dem Vergleich der Werte von nur stimulierten und nur bestrahlten Zellen (Abb.10, Spuren 2 u. 3) mit den Werten für stimulierte und bestrahlte Zellen (Abb.10, Spur 4) ersichtlich wird, wirkten sich Bestrahlung und Stimulation multiplikativ aus. Um ausschließlich die Wirkung der Bestrahlung zu dokumentieren, wurde der stimulationsbedingte Anteil der Induktion durch entsprechende Normierung ausgeschlossen (Abb.11).

Zunächst wird damit ersichtlich, dass in unstimulierten Zellen (Abb.11A) die Bestrahlung eine p53-abhängige Transaktivierung induzierte. p53 konnte somit in G₀-Zellen die Transkription der pro-apoptotischen Gene *fas*, *bax* und *noxa* aktivieren. Diese transkriptionale Aktivierung korrelierte damit mit der Apoptoseinduktion (Abb.3). Während die Funktion von Fas in der p53-abhängigen Apoptose umstritten ist, so konnte zumindest die Induktion von *fas* nach Bestrahlung nachgewiesen werden. Die Induktion von *bax* und *noxa*, deren Genprodukte mitochondrial wirkende pro-apoptotische Proteine der Bcl-2 Familie sind, steht demgegenüber auch in einem funktionellen Zusammenhang mit der p53-abhängigen Apoptose. Sowohl Bax als auch Noxa sind bei Überexpression eigenständig in Lage eine mitochondriale Dysregulation zu bewirken und dadurch Apoptose auszulösen. Allerdings ist die physiologische Induktion von Bax alleine nicht ausreichend um die p53-induzierte Apoptose zu vermitteln (Knudson *et al.*, 1995).

Daher ist auch für Lymphozyten anzunehmen, dass p53 noch weitere Apoptoseeffektorgene transaktiviert, und dass die kumulative Wirkung dieser Apoptoseeffektoren zur Auslösung der Apoptose führt. Darüber hinaus kann der eindeutige Nachweis der Transaktivierung von Apoptoseeffektorgenen durch p53 als Indiz für eine Transkriptionsabhängigkeit der Apoptoseinduktion in Lymphozyten gewertet werden.

In stimulierten, bestrahlten Zellen ergab sich überraschenderweise jedoch das gleiche Bild für die p53-spezifische Transaktivierung (Abb.11B). Die Transaktivierungsfaktoren für die Gene *fas*, *bax*, und *noxa* lagen in der gleichen Größenordnung wie in unstimulierten, bestrahlten Zellen. Die Expression dieser pro-apoptotischen Effektoren war folglich in Zellen, die keine Apoptose mehr zeigten, nicht blockiert. Die Hemmung der Apoptoseinduktion in stimulierten, bestrahlten Zellen kann daher nicht auf einer Hemmung der p53-abhängigen Transaktivierung dieser Gene beruhen.

In der Induktion von *mdm2* zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Ansätzen (Abb.11 vgl. A u. B). Die Induktion des *mdm2* Gens ist von Bedeutung, da Mdm2 als negativer Regulator der p53-Aktivität fungiert und anti-apoptotisch auf die p53-abhängige Apoptose wirken kann (Haupt *et al.*, 1996). Die Transaktivierungsfunktion von p53 wird durch die Interaktion mit Mdm2 inhibiert (Momand *et al.*, 1992), und Mdm2 induziert die proteolytische Degradation von p53 (Haupt *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997). Gleichzeitig aktiviert p53 jedoch die Expression von *mdm2*, so dass ein negativer Rückkopplungsmechanismus entsteht (Wu *et al.*, 1993). Durch die Umsetzung der p53 Aktivierung in eine Erhöhung des Mdm2 Proteinspiegels ergibt sich ein Zeitfenster, in dem p53 aktiv ist. Dieses Zeitfenster kann durch die Verzögerung der *mdm2* Induktion oder durch die Inhibition der Mdm2 Aktivität verlängert werden (Wu & Levine, 1997). Ein unterschiedlicher Mdm2 Spiegel kann somit die p53-Aktivität modulieren und dadurch die zelluläre Antwort beeinflussen (Thomas & White, 1998).

Die Analyse von *p21* war vor dem Hintergrund der zuvor erhaltenen Ergebnisse von besonderem Interesse. Einerseits ist p21 ist der zentrale Mediator des p53-vermittelten G₁-Arrests (El-Deiry *et al.*, 1993) und fungiert als Regulator von CDK Aktivitäten (Harper *et al.*, 1993). Andererseits gibt es zahlreiche Belege für eine anti-apoptotische Wirkung von p21 (siehe Diskussion). Demnach wäre eine erhöhte Expression in stimulierten Zellen nach Bestrahlung zu erwarten. Die Bestrahlung führte auch hier unabhängig von der Stimulation zur Induktion von *p21*. Dennoch scheint die *p21* Transaktivierung komplexer zu sein. Neben dem vergleichsweise starken Ausmaß der Transaktivierung, scheint p53 auch einen Anteil an

der stimulations-bedingten Induktion zu haben. Nach Bestrahlung und Stimulation verringerte sich die Transaktivierung in $p53^{(-/-)}$ Zellen auf 0,5 (Abb.11B), während in bestrahlten, unstimulierten Zellen der entsprechende Wert bei 1,4 lag (Abb.11A).

Insgesamt konnte keine differentielle p53-abhängige Transaktivierung festgestellt werden. Folglich konnte die These, dass p53 unter bestimmten Bedingungen eine bestimmte Gruppe von Genen induziert, und unter anderen Bedingungen eine andere, zumindest in diesem System nicht bestätigt werden. Demnach erfolgt kein Umschalten von der Apoptoseinduktion auf die Induktion eines Wachstumsarrests durch eine selektive p53 Transkription; vielmehr agiert p53 auf molekularer Ebene unter beiden Bedingungen gleichartig.

II.4 p21 als Zielgen des G₁-Arrests

p21 wird in stimulierten Zellen präferentiell exprimiert

Die durch die Stimulation induzierten Effekte, Apoptosehemmung und Wachstumsarrest, konnten nicht über eine differentielle p53 Aktivierung erklärt werden. Als möglicher weiterer Mechanismus muss daher die stimulations-induzierte Expression eines anti-apoptotischen Proteins in Betracht gezogen werden, das die Wirkung der induzierten pro-apoptotischen Gene antagonisiert. Dies ist insbesondere zu fordern, da die Expression aller p53-induzierten Gene durch die Stimulation noch multiplikativ verstärkt wird. Interessanterweise wirkte sich dieser multiplikative Effekt in besonderem Maße auf die *p21* Induktion aus. *p21* wurde im Vergleich zu den übrigen untersuchten Genen durch Stimulation alleine (Abb.10E Spur 2) und durch Bestrahlung alleine (Abb.10E Spur 3) am stärksten induziert. Beide Effekte zusammen erhöhten den mRNA-Spiegel um den Faktor 32 (Abb.10E Spur 4). Damit lagen die mRNA-Spiegel von *p21* sehr deutlich über denen der übrigen analysierten Gene. Diese überdurchschnittlich starke Erhöhung innerhalb von 5 h nach Bestrahlung legte eine funktionelle Bedeutung nahe. Die *p21* Expression wurde daher auf Proteinebene untersucht. Insbesondere wurde dadurch auch die zu erwartende Modulation der Expressionsrate durch die Translation erfasst.

Die *p21* Proteinspiegel von unstimulierten und stimulierten Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung durch Western-Blot Analysen untersucht (Abb.12). In unstimulierten Zellen konnten 4-8 h nach Bestrahlung nur geringe Menge an *p21* detektiert werden. In unbestrahlten Zellen, in $p53$ -defizienten Zellen und direkt nach der Bestrahlung lagen die *p21* Proteinspiegel unterhalb der Sensitivität des Western-Blots. Demgegenüber zeigten stimulierte Zellen eine drastische Erhöhung 4, 6 und 8 h nach Bestrahlung. Diese Induktion korrelierte im Zeitverlauf mit der p53 Aktivierung (Abb.9) und war strikt von p53 abhängig (Abb.12B, Spur 7). Die Stimulation alleine (Abb.12B, Spur 6) führte zu einer minimalen Erhöhung der *p21* Proteinspiegel. Der Proteinspiegel in Zellen, die nur bestrahlt wurden (Abb.12A, Spur 5) oder nur stimuliert wurden (Abb.12B, Spur 6) war etwa gleich groß. Da sich die entsprechenden mRNA-Spiegel (Abb.10E, Spur 2 u. 3) jedoch

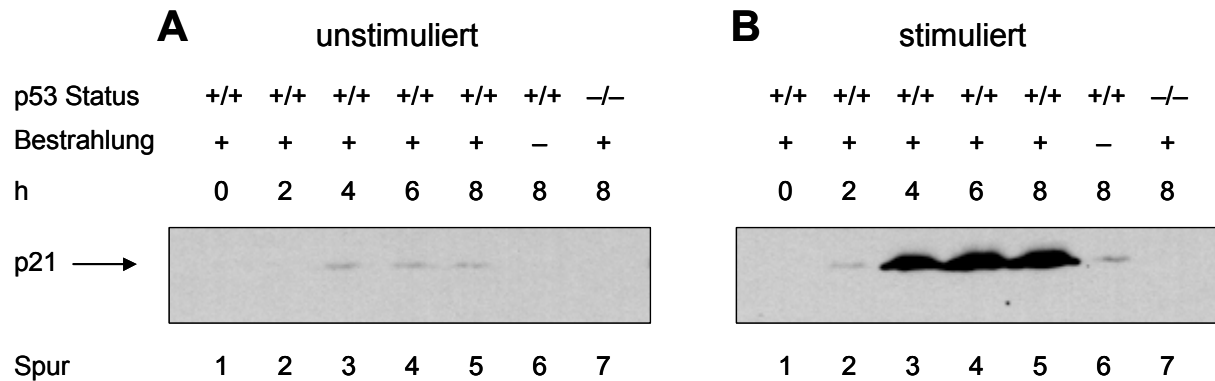


Abbildung 12: p21 Proteinspiegel nach Bestrahlung Milzzellen wurden ohne (A) und mit ConA (B) kultiviert. 30 min nach Zugabe des Mitogens wurden die Zellen mit 8 Gy bestrahlt oder verblieben unbehandelt und wurden für die angegebene Zeit kultiviert. Je 100 µg Gesamtprotein aus SDS-Zelllysaten wurden durch eine SDS-PAGE (15%) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. p21 wurde mit dem monoklonalen Antikörper SX118 detektiert.

um den Faktor 2 unterschieden, ist davon auszugehen, dass durch die Stimulation eine Erhöhung der allgemeinen Translationsrate um diesen Faktor erfolgte.

Die multiplikative Wirkung von Bestrahlung und Stimulation scheint tatsächlich den mRNA-Spiegel weit genug anzuheben, um eine drastische Erhöhung des p21 Proteinspiegels zu induzieren, da einer dieser Induktoren alleine dazu nicht in der Lage war. (Abb.12A, Spur 5; Abb.12B, Spur 6). Das Ausmaß des daraus resultierenden Unterschieds auf Proteinebene beruht damit primär auf den unterschiedlichen mRNA-Spiegeln, die Divergenz wird jedoch erheblich durch die Translation verstärkt.

Ein im Ausmaß wesentlich geringere, aber dennoch gleichgerichtete Tendenz ist auch für die Expression der untersuchten der pro-apoptotischen Gene zu erwarten. Eine genaue Analyse der entsprechenden Proteinspiegel war jedoch nicht möglich, da diese unterhalb der Detektionsgrenze der Western-Blot Analyse lagen (Daten nicht gezeigt).

Die unterschiedliche p21 Expression spiegelt damit auf molekularer Ebene die beobachtete zelluläre Reaktion wider. In Zellen, die bestrahlt wurden und Apoptose induzierten, konnten nur geringe Mengen an p21 detektiert werden. In stimulierten, bestrahlten Zellen, die einen G₁-Arrest zeigten, konnten dagegen sehr hohe p21 Spiegel gemessen werden. In diesen Zellen laufen zwei Prozesse ab, G₁-Arrest und Apoptoseinhibition. Die hohen Proteinspiegel legen demnach eine Beteiligung von p21 an beiden Prozessen nahe.

Die Hemmung der Apoptose ist nicht abhängig von p21

Neben seiner Funktion in der Zellzyklusregulation kann p21 Prozesse wie Apoptose und Differenzierung beeinflussen. Im allgemeinen wirkt die Expression von p21 der Apoptoseinduktion entgegen. So konnte nachgewiesen werden, dass p21 in Melanomzellen die p53-vermittelte Apoptose inhibieren kann (Gorospe *et al.*, 1997). In colorektalen

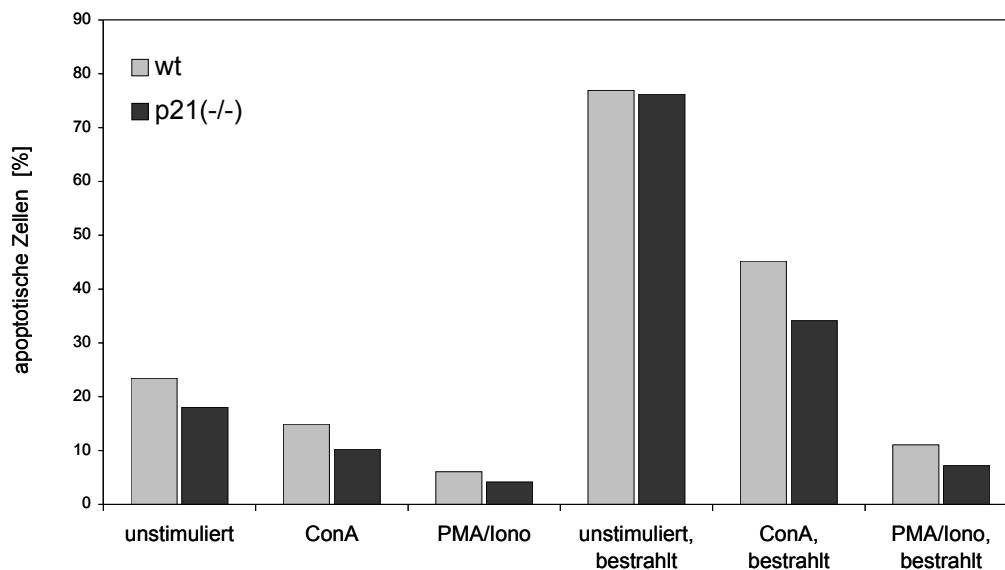


Abbildung 13: Analyse der Apoptoseinduktion: Vergleich von wt und p21^(-/-) Zellen Milzzellen wurden ohne und mit ConA bzw. PMA/Ionomycin kultiviert. 30 min nach Zugabe des Mitogens wurden die Zellen mit 8 Gy bestrahlt oder verblieben unbehandelt. Die Zellen wurden 10 h nach Bestrahlung fixiert, mit PI gefärbt und durchflußzytometrisch -wie in Abb.3 gezeigt- analysiert. Dargestellt sind die so ermittelten Anteile apoptotischer wt und p21^(-/-) Zellen unter den verschiedenen Bedingungen.

Tumorzelllinien führte die Inaktivierung von p21 zu einem Ausfall des Wachstumsarrests und zu Apoptose. In der gleichen Studie wurden jedoch auch Hinweise dafür gefunden, dass der Apoptosesignalweg dominant über der Induktion des Wachstumsarrests sein kann. Daher muss postuliert werden, dass p21 zwar vor Apoptose schützen kann, dass es aber Faktoren gibt, die diesen Schutz überwinden können (Polyak *et al.*, 1996). Ob in stimulierten, bestrahlten Lymphozyten die hohe p21 Expression ursächlich mit der Apoptoseinhibition verknüpft ist, wurde an p21-defizienten Zellen untersucht.

Die Zellen wurden 30 min vor Bestrahlung mit ConA bzw. PMA/Ionomycin versetzt, und 10 h nach Bestrahlung wurde der Anteil apoptotischer Zellen durchflußzytometrisch ermittelt. Die Analyse zeigte, dass p21^(-/-) Zellen ebenso wie wt Zellen nach Bestrahlung Apoptose induzierten (Abb.13). Dies war zu erwarten, da p21 nicht zur Apoptoseinduktion notwendig ist (Deng *et al.*, 1995; Attardi *et al.*, 1996). Allerdings führte die Stimulation in p21^(-/-) Zellen ebenfalls zu einer Hemmung der Apoptose. Demnach war die hohe p21 Expression in diesem System auch nicht zur Apoptoseinhibition notwendig. Es ist folglich anzunehmen, dass andere Faktoren diese Inhibition verursachen.

Der G₁-Arrest ist abhängig von p21

Die Bestrahlung von stimulierten Zellen führte neben der Apoptoseinhibition zur Induktion eines Wachstumsarrests (Abb.8). Durch den Vergleich von wt und p53^(-/-) Zellen wurde die

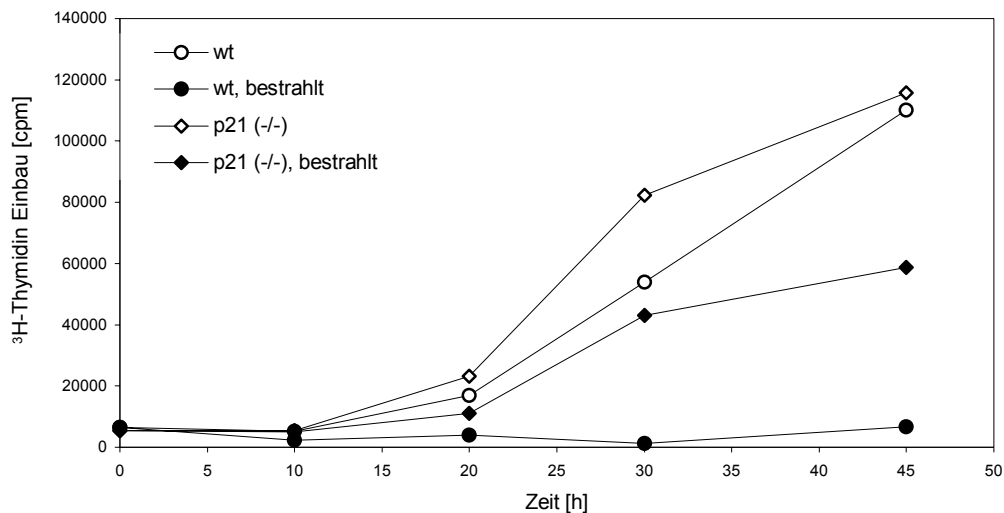


Abbildung 14: Proliferationsanalyse nach mitogener Stimulation: Vergleich von wt und p21^(-/-) Zellen
 $7,2 \times 10^5$ Milzzellen wurden mit ConA versetzt und 30 min nach Zugabe des Mitogens mit 8 Gy bestrahlt oder verblieben unbehandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung wurden die Zellen mit 0,37 MBq [³H]-Thymidin versetzt und nach 60 min Inkubation lysiert. Mit Hilfe eines Zellharvesters wurde die in die DNA inkorporierte Aktivität auf Szintillationsfilter überführt. Die Ergebnisse der Szintillationsmessung wurden gegen die Zeit aufgetragen.

Abhängigkeit von p53 deutlich. Da p21 der zentrale Mediator des p53-vermittelten G₁-Arrests ist, und in bestrahlten, stimulierten Zellen hohe p21 Proteinspiegel nachgewiesen werden konnten, wurde die Abhängigkeit dieses Wachstumsarrests von p21 analysiert. Dazu wurde in wt und p21-defizienten Zellen der Eintritt in die S-Phase durch eine [³H]-Thymidin Markierung untersucht (Abb.14).

Die Stimulation führte in unbestrahlten Zellen zum Eintritt in den Zellzyklus, was sich durch den Beginn der S-Phase nach ca. 20 h manifestierte. Wt Zellen zeigten dabei eine etwas langsamere Kinetik als p21^(-/-) Zellen. Während die Bestrahlung in den stimulierten wt Zellen den Eintritt in die S-Phase inhibierte, zeigten die p21^(-/-) Zellen keinen Arrest. In diesen Zellen konnte der Beginn der S-Phase ebenfalls nach 20 h detektiert werden. Die [³H]-Thymidin Inkorporation zu späteren Zeitpunkt lag jedoch bedingt durch die DNA-Schädigung unter dem Wert unbestrahlter Zellen.

Somit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass p21 in bestrahlten, stimulierten Zellen notwendig zur Vermittlung des p53-abhängigen G₁-Arrests ist und die präferentielle p21 Expression damit gut korreliert.

II.5 Aktivierung anti-apoptotisch wirkender Signalwege

Das mitochondriale Membranpotential sinkt nur bei Induktion der Apoptose

Die vorangegangenen Experimente machten wahrscheinlich, dass die Entscheidung zwischen Wachstumsarrest und Apoptose nicht auf einer differentiellen Transaktivierung von p53 Zielgenen beruht. Diese Interpretation wird besonders dadurch gestützt, dass auch pro-apoptotische Gene in stimulierten, bestrahlten Zellen induziert wurden, ohne dass eine Apoptose sichtbar wurde. Andererseits war die gleichzeitig auftretende starke Induktion von p21 zumindest nicht hinreichend, um die Inhibition der Apoptose in diesen Zellen zu erklären. Folglich war als alternativer Mechanismus zu postulieren, dass die Wirkung p53-induzierter Apoptosesignale in stimulierten, bestrahlten Lymphozyten durch einen stimulations-induzierten Inhibitor antagonisiert wird.

Ein kritisches Ereignis in der Signaltransduktion von p53 zur Auslösung der Apoptose ist die Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ und die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Intermembranraum (Schuler *et al.*, 2000). Mitochondrien sind Integrationsort vieler pro- und anti-apoptotischer Signale und das mitochondriale Membranpotential $\Delta\Psi_m$ ist ein zentrales Stellglied dieser Signale (Kroemer *et al.*, 1997). Die Induktion pro-apoptotischer Proteine durch p53 in stimulierten, bestrahlten Zellen könnte daher durch die Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials abfangen werden.

Zur Bestimmung von $\Delta\Psi_m$ wurden die Zellen mit dem Farbstoff JC-1 gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. JC-1 akkumuliert potential-abhängig in den Mitochondrien. Höhere Konzentrationen führen zur Bildung sog. J-Aggregate, die sich durch eine rote Fluoreszenz auszeichnen. Eine Verringerung von $\Delta\Psi_m$ führt über die Konzentrationsabnahme von JC-1 zu einer Abnahme der Rot-Fluoreszenz und einer Verstärkung der Grün-Fluoreszenz. Bei der Messung werden folglich zwei Zellpopulationen erfasst. Die Population mit erniedrigter Rot-Fluoreszenz und erhöhter Grün-Fluoreszenz umfasste die Zellen mit verringertem mitochondrialen Membranpotential und wurde über einen Dotplot quantifiziert (Abb.15A).

Wie der Vergleich zwischen wt und p53^(-/-) Zellen (Abb.15B) zeigt, stieg der Anteil der wt Zellen mit einem erniedrigten $\Delta\Psi_m$ nach Bestrahlung kontinuierlich an. Bei unbestrahlten Zellen und bei p53^(-/-) Zellen war dieser Anstieg nicht messbar. Die Induktion der Apoptose nach Bestrahlung involviert folglich eine p53-abhängige Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials und verläuft damit in den Lymphozyten wie erwartet über den mitochondrialen Signalweg. Die Stimulation der Zellen bewirkte eine deutliche Verringerung des Anteils der Zellen mit erniedrigtem $\Delta\Psi_m$ (Abb.15C). Dies galt insbesondere für bestrahlte, aber auch für unbestrahlte Zellen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Stimulation zu einer generellen Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials führt. Diese Stabilisierung korreliert einerseits mit der Verringerung der Spontanapoptose, andererseits mit der Inhibition der bestrahlungs-induzierten Apoptose. Aufgrund dieses Befunds ist davon auszugehen, dass die Inhibition der p53-induzierten Apoptose tatsächlich auf der Aktivierung eines Faktors beruht, der zu einer mitochondrialen Stabilisierung führt.

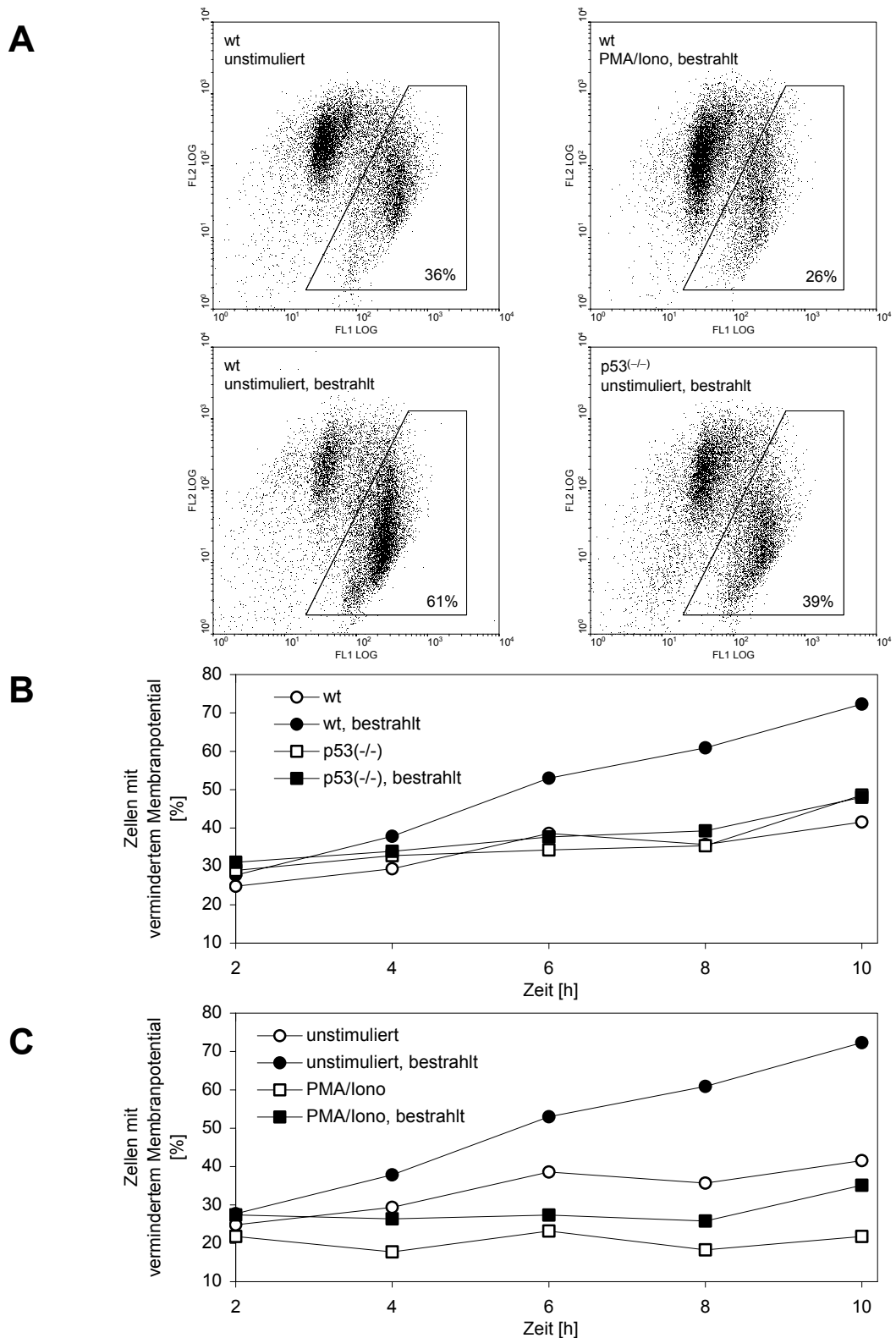


Abbildung 15: Durchflußzytometrische Analyse des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ Milzzellen wurden ohne und mit PMA/Ionomycin kultiviert. 30 min nach Zugabe des Mitogens wurden die Zellen mit 8 Gy bestrahlt oder verblieben unbehandelt. Zu den angegebenen Zeiten nach Bestrahlung wurden die Zellen mit JC-1 gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Pro Ansatz wurden 10.000 Ereignisse gezählt und unter Ausschluß von Zelltrümmern über einen 505/25 nm Bandpassfilter (FL1) und einen 560/90 nm Bandpassfilter (FL2) detektiert. Zellen mit verminderter Rot- und erhöhter Grünfluoreszenz wurden über die gekennzeichnete Region in einem Dotplot erfaßt (A). Die erhaltenen Anteile an Zellen mit vermindertem Membranpotential wurden gegen die Zeit aufgetragen. Zur besseren Übersicht wurden die Daten in zwei Diagrammen dargestellt: Vergleich von wt und p53^(-/-) Zellen (B), Vergleich von unstimulierten und stimulierten Zellen (C)

Die Apoptoseinhibition korreliert mit der Induktion von Bcl-x_L

Die Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie sind die wichtigsten Regulatoren des mitochondrialen Membranpotentials. Die ektopische Expression von anti-apoptotischen Mitgliedern dieser Familie kann die mitochondriale Induktion der Apoptose effizient inhibieren. Die durch p53-induzierte Apoptose wird daher ebenfalls effektiv gehemmt (Chiou *et al.*, 1994). Die beobachtete Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials könnte folglich auf der endogenen Hochregulation anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2 Familie basieren.

Die Wirkung der Stimulation auf die Expression der beiden wichtigsten Vertreter Bcl-2 und Bcl-x_L wurde über eine Western-Blot Analyse untersucht (Abb.16).

Der bcl-x Locus kodiert für zwei Bcl-2-verwandte Apoptoseregulatorproteine, die durch alternatives *splicing* entstehen (Boise *et al.*, 1993). Während die längere Form (Bcl-x_L) einen anti-apoptotischen Effekt hat, wirkt die kürzere (Bcl-x_S) pro-apoptotisch. Mit dem verwendeten Antikörper konnte nur die für Bcl-x_L typische Doppelbande detektiert werden (Krajewski *et al.*, 1994). Im Zeitverlauf nach Stimulation sowohl durch ConA als auch durch PMA/Ionomycin zeigte sich eine deutliche Induktion (Abb.16A u. B). Die Proteinspiegel stiegen kontinuierlich während der ersten Stunden nach Stimulation an (Spur 1-5) und erreichten zu späteren Zeitpunkten noch höhere Werte (Spur 8). Der Anstieg innerhalb der ersten 8 h wurde durch die Bestrahlung nicht unterdrückt (Spur 7) und war nur abhängig von der Stimulation (Spur 6). Im Gegensatz dazu ergab die Analyse von Bcl-2 keine Änderung der Expression durch die Stimulation.

Die Stimulation der Lymphozyten führte demnach tatsächlich zur Induktion eines anti-apoptotischen Faktors. Da nur die Expression von Bcl-x_L und nicht der Expression von Bcl-2 anstieg, ist zu vermuten, dass diese Erhöhung nicht die allgemein erhöhte

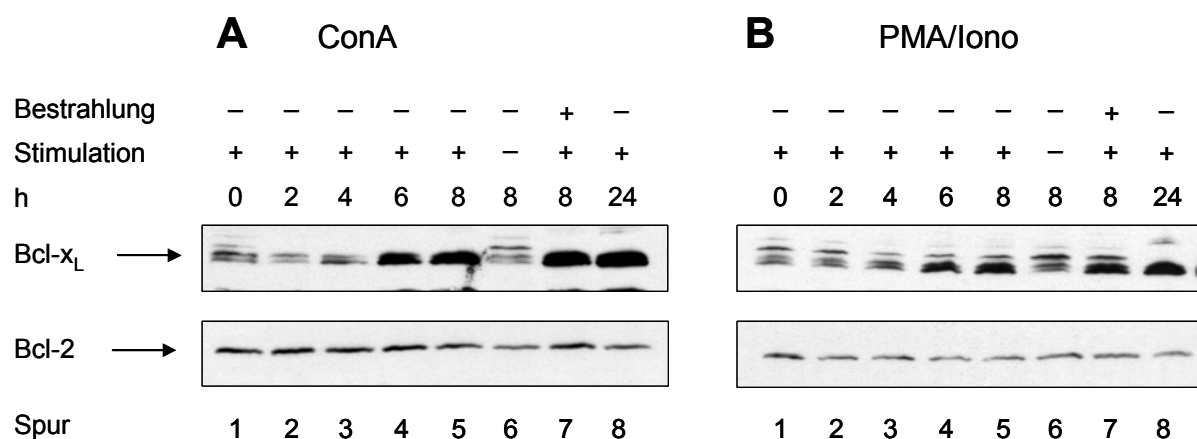


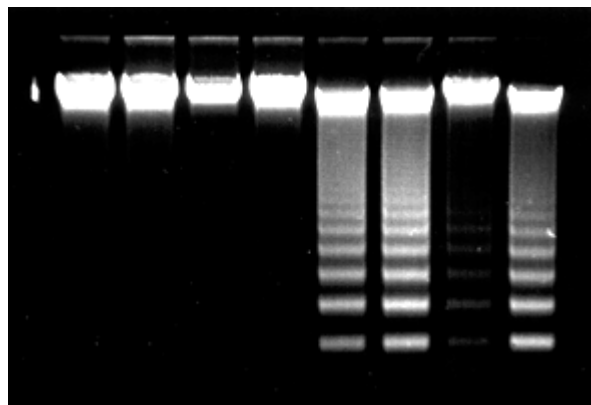
Abbildung 16: Bcl-2 und Bcl-x_L Proteinspiegel nach Stimulation Milzzellen wurden mit ConA (A) und mit PMA/Ionomycin (B) kultiviert. 30 min nach Zugabe des Mitogens wurden die Zellen mit 8 Gy bestrahlt oder verblieben unbehandelt und wurden für die angegebene Zeit kultiviert. Je 100 µg Gesamtprotein aus SDS-Zelllysaten wurden durch eine SDS-PAGE (12%) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Bcl-x_L wurde mit dem polyklonalen Kaninchen-Antiserum detektiert, die Detektion von Bcl-2 erfolgte mit dem Klon 7 Antikörper.

Stoffwechselaktivität stimulierter Zellen widerspiegelt, sondern eine funktionelle Bedeutung hat. Da die ektopische Expression von anti-apoptotisch wirkenden Proteinen der Bcl-2 Familie die p53-abhängige Apoptose inhibieren kann, ist zu vermuten, dass eine erhöhte endogene Expression dazu ebenfalls in der Lage ist.

Die Apoptoseinhibition ist abhängig von der Aktivierung der Protein Kinase C

Mit Bcl-x_L konnte ein anti-apoptotischer Effektor der Stimulation identifiziert werden. Um den Signaltransduktionsweg näher zu charakterisieren, der zur Hochregulation von Bcl-x_L führt, wurde versucht potentielle Induktoren durch spezifische Inhibition zu blockieren und damit den anti-apoptotischen Effekt der Stimulation aufzuheben. Ein Faktor, der in anderen Systemen anti-apoptotische Signale vermitteln kann, ist NFκB (Barkett & Gilmore, 1999; Foo & Nolan, 1999). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass NFκB in der Lage ist *bcl-x* zu transaktivieren. Da in primären, ruhenden Lymphozyten keine Möglichkeit besteht einen dominant negativ wirkenden Inhibitor von NFκB ektopisch zu exprimieren, wurde versucht die mögliche NFκB Aktivität über niedermolekulare Inhibitoren zu hemmen (Epinat & Gilmore, 1999). Allerdings zeigte sich, dass die getesteten Substanzen MG-132, ALLN, Parthenolid (Hegner *et al.*, 1999) und Sulfasalazin (Wahl *et al.*, 1998) zu hohe toxische Effekte hatten und daher nicht verwendet werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Bestrahlung	-	-	-	-	+	+	+	+
ConA Stimulation	-	-	+	+	-	-	+	+
GF109203X	-	+	-	+	-	+	-	+



Spur 1 2 3 4 5 6 7 8

Abbildung 17: Analyse der Apoptoseinduktion: Wirkung der PKC-Inhibition durch GF109203X
Milzzellen wurden ohne und mit ConA kultiviert. GF109203X (2μM) wurde 45 min vor Zusatz des Mitogens in das Kulturmedium gegeben. 30 min nach Zugabe des Mitogens wurden die Zellen mit 8 Gy bestrahlt oder verblieben unbehandelt. Nach Bestrahlung wurden die Zellen für 10h kultiviert. Je 2,5 μg genomische DNA aus Zelllysaten wurde in einem Agarosegel (1%) elektrophoretisch aufgetrennt, und die DNA wurde durch EtBr-Färbung und UV-Illumination sichtbar gemacht.

Um dennoch Hinweise auf die zugrunde liegende Signaltransduktion zu erhalten, wurden Inhibitoren getestet, die an einem vorgeschalteten Punkt in den Signalweg eingreifen. Die mitogene Stimulation mit ConA führt über die Quervernetzung des T-Zellrezeptor-Komplexes zur Aktivierung von T-Zellen, die eine Vielzahl von Signalwegen umfasst. Die Heterogenität des Zellsystems erhöht Komplexität der Signaltransduktion durch sekundäre Effekte. Da die Aktivierung der Protein Kinase C ein Rezeptor-proximales Ereignis ist und die Stimulation durch PMA/Ionomycin diese Aktivierung direkt induziert, wurde die Rolle von PKC im Hinblick auf die Apoptoseinhibition analysiert.

Dazu wurden die Zellen vor der Stimulation mit ConA mit dem PKC-Inhibitor GF109203X versetzt. Die Apoptoseinduktion wurde 10 h nach Bestrahlung über die DNA-Fragmentierung bestimmt (Abb.17). Die Kontroll-Behandlung unbestrahlter Zellen zeigte, dass GF109203X weder in stimulierten noch in unstimulierten Zellen selbst Apoptose auslöst (Spur 1-4). Außerdem inhibierte GF109203X auch nicht die Induktion der Apoptose nach Bestrahlung von unstimulierten Zellen (Spur 5 u. 6). Dagegen war GF109203X in der Lage die durch ConA-induzierte Apoptosehemmung aufzuheben (Spur 7 u. 8). Damit konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Aktivität von PKC in ConA-stimulierten Zellen auch für die induzierte Apoptoseinhibition notwendig ist.

Daher basiert die Inhibition der p53-induzierten Apoptose nach Stimulation sowohl in ConA als auch in PMA/Ionomycin stimulierten Zellen auf der Aktivierung von PKC. Diese Aktivierung führt vermutlich über die Aktivierung von NF κ B zur Induktion anti-apoptotisch wirkender Faktoren, wie Bcl-x_L, die auf der Ebene der Mitochondrien in den p53 Signalweg eingreifen.

III. Diskussion

III.1 p53 als Apoptosesignalgeber

Ziel der pro-apoptischen p53 Signale: Mitochondrien

Die Aktivierung des zellulären Selbstmordprogramms ist einer der Schlüsselmechanismen über den p53 seine Tumorsuppressorfunktion vermittelt. Insbesondere in Zellen des hämatopoetischen Systems konnte eine vollständige Abhängigkeit der Apoptoseinduktion nach einem genotoxischen Schaden von p53 gezeigt werden. Die bestrahlungs-induzierte Apoptose von Thymozyten gilt daher auch als Referenzsystem für eine p53-abhängige Apoptose. Trotzdem sind die Signalwege, über die p53 das Apoptoseprogramm der Zelle startet, nicht vollständig aufgeklärt. Neuere Arbeiten konnten jedoch durch die Analyse der Thymozyten-Apoptose in knockout Mäusen belegen, dass p53 über die Aktivierung von Apaf-1 und Caspase-9 Apoptose induziert (Yoshida *et al.*, 1998; Kuida *et al.*, 1998; Hakem *et al.*, 1998). Die dazu notwendige Freisetzung von Cytochrom c ins Cytosol (Schuler *et al.*, 2000) ist die Konsequenz der p53-induzierten Deregulation der mitochondrialen Integrität.

Die Apoptoseinduktion über den mitochondrialen Signalweg konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Die analysierten Lymphozyten reagierten auf Bestrahlung mit der Induktion einer p53-abhängigen Apoptose, die mit dem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials einherging. Es kann daher als gesichert gelten, dass die von p53 ausgehenden Apoptose-Signale auf der Ebene der Mitochondrien das Apoptoseprogramm der Zelle aktivieren.

Induktion von pro-apoptischen p53 Zielgenen

Da p53 als Transkriptionsfaktor fungiert und diese Funktion essentiell für die Induktion des Wachstumsarrests ist, liegt die Annahme nahe, dass p53 auch Apoptose durch die Transaktivierung pro-apoptischer Gene auslöst.

Als p53-induzierte mitochondrial wirkende Apoptoseeffektoren wurde die *bax* und *noxa* Expression analysiert. Beide Gene wurden p53-abhängig transaktiviert; die mRNA-Spiegel erhöhten sich etwa um den Faktor 3. Damit konnte zumindest gezeigt werden, dass p53 in Zellen, die das Apoptoseprogramm starten, als Transaktivator pro-apoptischer Gene fungieren kann. Dennoch kann aufgrund der hier erhaltenen Ergebnisse eine Beteiligung von Transrepression oder nicht-transkriptionalen Mechanismen an der Apoptoseinduktion durch p53 in diesem System nicht ausgeschlossen werden.

Sowohl Bax als auch Noxa sind bei Überexpression alleine in der Lage Apoptose auszulösen. Da aber die p53-abhängige Apoptose in Thymozyten von *bax* knockout Mäusen nicht blockiert ist (Knudson *et al.*, 1995), ist zumindest die Induktion von Bax nicht

notwendig. Dennoch scheint Bax einen wesentlichen Beitrag zur Apoptoseinduktion zu leisten (McCurrach *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 1997). Neben *bax* und *noxa* induziert p53 noch weitere Gene, die die mitochondriale Integrität beeinflussen, jedoch nicht zur Bcl-2 Familie gehören. Die Produkte dieser Gene katalysieren Reaktionen, die zur Entstehung von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) führen. Die ROS Induktion ist möglicherweise essentiell für die p53-abhängige Apoptose und ursächlich an der Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials beteiligt (Johnson *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1999). Dennoch konnte Pig3, ein Chinon-Oxidoreduktase Homolog und prominentester Vertreter dieser Faktoren, alleine keine Apoptose auslösen (Polyak *et al.*, 1997).

Es ist daher anzunehmen, dass die moderate Induktion mehrerer Apoptoseeffektoren über einen kumulativen Effekt das mitochondriale Gleichgewicht in Richtung Apoptose verschiebt. In Zellen, die eine erhöhte Sensitivität gegenüber der Apoptoseinduktion haben, wie dies in Zellen des hämatopoetischen Systems der Fall zu sein scheint, könnte somit die Schwelle zum Starten des Apoptoseprogramms überschritten werden.

Neben der Transaktivierung von Apoptoseeffektoren, die direkt an den Mitochondrien wirken, kann p53 auch Gene der *death receptor* Signalwege induzieren. Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Die Induktion von *fas* lag in der gleichen Größenordnung wie die von *bax* und *noxa*. Dennoch ist fraglich, ob *death receptor* Signalwege eine essentielle Funktion in der direkten Apoptoseauslösung nach DNA-Schäden haben. Mäuse, die *fas*-defizient sind (*lpr* Mäuse) oder die ein FADD Mutante mit dominant negativer Wirkung exprimieren, zeigen keine Veränderung in der Induktion der Apoptose nach Bestrahlung (Newton & Strasser, 2000). Es ist daher anzunehmen, dass p53 durch die Induktion von Faktoren, die in *death receptor* Signalwege involviert sind, lediglich die Sensitivität der Zelle gegenüber einer Apoptoseinduktion durch FasL oder andere Liganden erhöht. Über diesen Mechanismus könnte die Zelle einen endogenen Schaden nach außen signalisieren und damit eine Apoptoseinduktion von außen ermöglichen. Ein funktionelle Bedeutung könnte ein solcher Mechanismus haben, wenn der Caspase-9-abhängige, mitochondriale Signalweg blockiert wäre oder das Schadenssignal nicht stark genug wäre, um eine mitochondriale Deregulation zu induzieren. Die Rezeptor-induzierte Apoptose könnte dann über den Caspase-8 Signalweg ablaufen.

III.2 Zelluläre Antwort auf aktiviertes p53: Wachstumsarrest oder Apoptose

Eine der wichtigsten Fragen der p53 Biologie war auch Gegenstand dieser Arbeit: Was bestimmt die zelluläre Reaktion auf die Aktivierung von p53? In vielen Studien konnten einige Aspekte analysiert werden (Sionov & Haupt, 1999). In der Regel basierten die Ergebnisse jedoch auf der Analyse von Zelllinien, in denen anstelle von endogenem, aktivierbaren p53 eine ektopische Expression erfolgte. Zudem zeichnen sich Zelllinien durch die Deregulation von Wachstumsarrest- und Apoptosesignalwegen aus. In dieser Arbeit wurden daher primäre Zellen verwendet. Es zeigt sich, dass die mitogene Stimulation von ruhenden Lymphozyten einen Einfluss auf die p53-induzierten Signalwege hatte.

Lymphozyten, in denen Bestrahlung eine p53-abhängige Apoptose auslöste, zeigten nach Stimulation keine Apoptoseinduktion mehr. Statt dessen führte die Bestrahlung zur Induktion eines p53-abhängigen Wachstumsarrests. Die diesem Mechanismus zugrunde liegende Signaltransduktion wurde ausgehend von der p53 Aktivierung untersucht.

Aktivierung von p53

Das charakteristische Kennzeichen einer p53 Aktivierung ist die Erhöhung der p53 Proteinspiegel, die nach Bestrahlung in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten nachgewiesen werden konnten. Dieses Ergebnis war insbesondere für die Reaktion unstimulierter Lymphozyten von Bedeutung, da die p53 Aktivierung post-transkriptional reguliert wird (Kastan *et al.*, 1991). Unstimulierte Lymphozyten befinden sich in der G₀-Phase des Zellzyklus und haben daher eine stark erniedrigte Stoffwechselaktivität gegenüber proliferierenden Zellen. Dennoch hatte die Bestrahlung die translationale Induktion und die Stabilisierung des entstehenden Proteins zur Folge. Hinsichtlich der Aktivierung konnten daher keine Unterschiede zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen gefunden werden. In einer weitergehenden Analyse könnte das Phosphorylierungs- und Acetylierungsmuster unter beiden Bedingungen verglichen werden. Dazu müssten nach einer Immunpräzipitation von p53 die verschiedenen modifizierten p53 Spezies über eine zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert werden. Da die Phosphorylierung von p53 jedoch insbesondere von dem induzierenden Signal abhängt, ist es fraglich ob in dem hier untersuchten System relevante Unterschiede gefunden werden können. Dennoch ist eine differentielle Phosphorylierung nicht auszuschließen, wie die Korrelation der Induktion eines neu entdeckten pro-apoptotischen p53 Effektorgens mit einer spezifischen Phosphorylierung zeigt (Oda *et al.*, 2000b).

p53-abhängige Transaktivierung

Die selektive Transaktivierung von pro-apoptotischen Genen oder Genen, die mit der Induktion des Wachstumsarrests gekoppelt sind, stellt einen Mechanismus dar, über den die zelluläre Reaktion entscheidend beeinflusst werden könnte.

In einigen Studien wurde diese Hypothese durch die Beobachtung unterstützt, dass bestimmte p53 Mutanten in der Lage waren, physiologische Promotoren zu transaktivieren, jedoch nicht mehr Apoptose induzieren konnten. So konnte gezeigt werden, dass die Mutante 175P noch p21 transaktivieren und Wachstumsarrest auslösen konnte. Eine Apoptoseinduktion war jedoch nicht mehr detektierbar und korrelierte mit dem Verlust, *bax* und *IGF-BP3* zu transaktivieren (Rowan *et al.*, 1996; Ludwig *et al.*, 1996; Ryan & Vousden, 1998). Eine ähnliche Promotorselektivität konnte für die temperatursensitive Mutante 143A demonstriert werden (Friedlander *et al.*, 1996). Auch wenn die Ergebnisse für bestimmte Mutanten nicht konsistent waren (Ryan & Vousden, 1998), größtenteils auf transienten Transfektionen basierten und die „Apoptoseinduktion“ auf niedrigem Niveau stattfand,

deuten die Daten dennoch auf die Existenz von verschiedenen p53-transaktivierbaren Promotortypen hin.

Möglicherweise gibt es tatsächlich unterschiedliche Klassen von p53 Zielpromotoren, die durch ihre DNA-Konformation definiert werden. So konnte nachgewiesen werden, dass p53 Responsive Elemente durchaus nicht nur in B-Konformation vorliegen können, und p53 an diese sog. *non-B* DNA Strukturen bindet (Kim *et al.*, 1999). Eine funktionelle Verknüpfung mit der selektiven Induktion endogener Promotoren nach *in vivo* Induktion konnte bisher allerdings noch nicht gezeigt werden.

Das Konzept einer selektiven Transaktivierung lag auch einem kürzlich durchgeführten Screening zugrunde (Attardi *et al.*, 2000). Das Besondere der Strategie war die Ausrichtung auf die Identifizierung von Zielgenen, die selektiv durch p53 in E1A-transformierten, apoptotischen MEFs und nicht in wachstums-arretierten wt MEFs induziert wurden. Tatsächlich war die p53-abhängige Induktion des identifizierten Gens *PERP* präferentiell in apoptotischen Zellen detektierbar. Interessanterweise zeigte sich für *bax*, *mdm2* und *p21* keine Korrelation der Expressionsrate mit der zellulären Reaktion. Da dies konsistent mit den in dieser Arbeit gefundenen Resultaten ist, wäre eine Analyse der *PERP* Expression auch in Lymphozyten unter den verschiedenen Bedingungen interessant. Allerdings ist es fraglich, ob tatsächlich eine differentielle Transaktivierung von *PERP* stattfindet, da die besondere genetische Ausstattung der MEFs die Regulation der p53-induzierten Antwort verursachte. Währenddessen verursachte ein exogenes Signal in den Lymphozyten eine Apoptoseinhibition und hat daher eher Ähnlichkeiten mit einer Cytokinbehandlung (siehe unten).

Tatsächlich scheint die Regulation der zellulären Reaktion auf einer der Transaktivierung nachgeschalteten Ebene stattzufinden. Für die in dieser Arbeit analysierten Gene ergab sich nämlich kein Unterschied in der bestrahlungs-induzierten p53-abhängigen Transaktivierung in unstimulierten und stimulierten Lymphozyten (Abb.11). Eine stimulations-induzierte Promotorselektivität konnte somit als Ursache für die unterschiedliche zelluläre Reaktion weitgehend ausgeschlossen werden. Das Ergebnis, dass pro-apoptische Gene auch in stimulierten, bestrahlten Zellen induziert werden, bestätigte die Beobachtung, dass potentielle p53 Apoptoseeffektorgene häufig unabhängig von der zellulären Reaktion induziert werden und spricht für eine Regulation, die die Aktivierung des Wachstumsarrests und die Inhibition der Apoptose in stimulierten, bestrahlten Zellen involviert.

Funktion von p21

Vor diesem Hintergrund war insbesondere die Analyse von p21 aufgrund seiner vielfältigen Funktion von Bedeutung. p21 wurde als Vermittler des p53-abhängigen Wachstumsarrests und als Inhibitor von CDK/Cyclin Aktivitäten entdeckt (El-Deiry *et al.*, 1993; Harper *et al.*, 1993). Neben der Bindung an CDKs kann p21 die Zellzykluskontrolle zusätzlich über andere Protein-Protein Interaktionen ausüben. Durch Interaktion mit PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), einer Untereinheit von DNA Polymerase δ , kann die DNA-Replikation direkt inhibiert werden, ohne Reparaturprozesse zu beeinflussen (Waga *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 1995). Ferner wurde eine direkte Bindung an E2F

Transkriptionsfaktoren beschrieben, die zur Hemmung der für die S-Phase notwendigen E2F Aktivität führt (Delavaine & La Thangue, 1999). Eine weitere Funktion von p21 ist jedoch die Apoptosekontrolle. p21 kann als protektiver Faktor fungieren (Bissonnette & Hunting, 1998; Wang & Walsh, 1996; Gorospe *et al.*, 1996; Gorospe *et al.*, 1997) und scheint an drei verschiedenen Stellen die Apoptose zu antagonisieren. Die Aktivierung von CDKs ist in einigen Systemen mit der Apoptose funktionell verknüpft (Levkau *et al.*, 1998; Harvey *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998). p21 könnte wie in der Zellzykluskontrolle durch die Inhibition von CDK Aktivitäten die Apoptose blockieren, da die Expression einer dominant-negativen CDK ebenfalls die Apoptose inhibiert (Levkau *et al.*, 1998). Mutiertes p21, das die CDK-inhibitorische Aktivität nicht mehr hat, kann ebenfalls keine Apoptoseinhibition vermitteln (Lu *et al.*, 1998). Ein weiterer möglicher Mechanismus ist die direkte Apoptoseinhibition durch Bindung an Caspase-3 (Suzuki *et al.*, 1998; Suzuki *et al.*, 1999). Ferner gibt es Evidenzen, dass p21 Stress-aktivierte Kinasen ebenfalls durch Komplexierung inhibiert (Shim *et al.*, 1996; Asada *et al.*, 1999).

Die p21 Funktionen, Apoptoseinhibition und Wachstumsarrest, wurden auch in Lymphozyten nach Bestrahlung analysiert. Dabei zeigte sich zunächst, dass *p21* unabhängig von der Stimulation durch p53 transaktiviert wurde. Obwohl die mRNA-Spiegel im Vergleich zu anderen untersuchten Zielgenen verhältnismäßig stark anstiegen, konnte in unstimulierten, bestrahlten Zellen nur wenig p21 Protein detektiert werden. In diesen Zellen führte die Bestrahlung zur Apoptose, für deren Induktion p21 nicht notwendig war (Abb.13) (Deng *et al.*, 1995). In stimulierten, bestrahlten Zellen wurden die mRNA-Spiegel durch die Stimulation nochmals um den Faktor 4 erhöht. Die hohen mRNA-Spiegel und eine erhöhte allgemeine Translationsrate führten zu sehr hohen p21 Proteinspiegeln. Diese hohe Expression korrelierte mit der Induktion des G₁-Arrests. Tatsächlich war p21 notwendig für die Induktion des Wachstumsarrests, jedoch nicht essentiell für die Apoptoseinhibition. Die Ergebnisse legen damit nahe, dass p21 nicht in der Lage ist, die p53-induzierte Apoptose in Zellen, die auf Bestrahlung präferentiell mit der Apoptoseinduktion antworten, zu antagonisieren. Dies scheint insbesondere dann der Fall zu sein, wenn es sich um endogenes p21 handelt, das zeitgleich mit pro-apoptotischen Effektorgenen induziert wird. Um einem starken Apoptosestimulus entgegen wirken zu können, müssen vermutlich potentere Apoptoseinhibitoren wie etwa Bcl-2-homologe Proteine aktiviert werden. Die in dieser Arbeit gezeigte Hochregulation von Bcl-x_L ist eine Evidenz dafür. Eine auxiliäre anti-apoptotische Wirkung von p21 sollte aufgrund der hohen p21 Proteinspiegel nicht ausgeschlossen werden. Dieser zusätzliche p21-abhängige protektive Effekt könnte nur nachgewiesen werden, wenn die Induktion von anti-apoptotischen Proteinen experimentell von den übrigen Effekten der Stimulation entkoppelt werden könnte. Dies war jedoch in dem hier verwendeten Zellsystem nicht möglich.

Modulation durch Wachstumsfaktoren, Cytokine und mitogene Stimulation

Die in dieser Arbeit an primären Zellen gezeigte Inhibition der Apoptose und die Aktivierung des Wachstumsarrests beruhte auf der mitogenen Stimulation der Zellen. Damit konnte durch ein exogenes Signal die zelluläre Antwort auf eine p53 Aktivierung

entscheidend beeinflusst werden. Auch andere exogene Faktoren können eine Wirkung auf p53-induzierte Signalwege haben, der möglicherweise ein ähnlicher Mechanismus unterliegt.

Insbesondere Cytokine sind in der Lage, die p53-abhängige Apoptose zu inhibieren. So konnte in der murinen Leukämiezelllinie M1 nach stabiler Transfektion einer temperatur-sensitiven p53 Mutante (tsp53) bei permissiver Temperatur Apoptose ausgelöst werden, die durch IL-6 inhibiert wurde (Yonish-Rouach *et al.*, 1991). In der ebenfalls mit tsp53 transfizierten murinen Leukämiezelllinie DP-16 führte die Aktivierung der Kit Tyrosinrezeptorkinase durch den Liganden Steel ebenfalls zur Hemmung der p53-induzierten Apoptose. Die Inkubation mit Steel hatte jedoch keinen Einfluss auf die Transaktivierung von *p21*, *mdm2* und *bax* nach dem Temperaturshift (Abrahamson *et al.*, 1995). Vielmehr konnte die Entstehung von ROS blockiert werden, die charakteristischerweise in diesen Zellen mit der Apoptoseinduktion einherging (Lee, 1998). In einer weiteren Arbeit konnte wiederum in einer mit tsp53 transfizierten Leukämiezelllinie nachgewiesen werden, dass neben Steel auch IL-3 und Epo in der Lage waren, die p53-abhängige Apoptose zu blockieren, jedoch nicht den gleichzeitig induzierten Wachstumsarrest (Lin & Benchimol, 1995). Die Ergebnisse, die mit tsp53 erhalten wurden, konnten in Zellen mit endogenem p53 bestätigt werden. In der IL-3-abhängigen murinen Leukämiezelllinie Ba/F3 konnte gezeigt werden, dass IL-3 auch zu einem Schutz vor Bestrahlung führte (Collins *et al.*, 1992). Nach Entzug von IL-3 induzierte Bestrahlung eine schnelle p53-abhängige Apoptose, während die in Gegenwart von IL-3 beobachtete Apoptoseinhibition mit einem p53-abhängigen Wachstumsarrest einherging (Canman *et al.*, 1995). Interessanterweise führte die ektopische, konstitutive Expression von p21 in diesen Zellen nur zu einer marginalen Apoptoseinhibition. Wachstumsarrest und Apoptoseinhibition wurden folglich in diesen Zellen ebenfalls weitgehend unabhängig voneinander bewirkt (Canman & Kastan, 1998).

Damit weisen diese Resultate eine gemeinsame Grundstruktur auf, aus der sich eine Modellvorstellung der Beeinflussung der zellulären Reaktion auf aktiviertes bzw. überexprimiertes p53 durch exogene Faktoren ableiten lässt. In Zellsystemen, in denen die Induktion der Apoptose das vorherrschende Ergebnis einer p53 Aktivierung ist, führt die Hemmung der Apoptose durch exogene Faktoren zu einem p53-abhängigen Wachstumsarrest. Die Transaktivierung von p21 und zumindest einiger Apoptoseinduktoren durch p53 erfolgt nicht differentiell. Statt dessen ist anzunehmen, dass die Aktivität pro-apoptotischer Effektoren blockiert wird. Damit ergeben sich augenfällige Übereinstimmungen zwischen der in dieser Arbeit gezeigten Wirkung der mitogenen Stimulation und der Wirkung von Wachstumsfaktoren und Cytokinen.

Mechanismus der Apoptoseinhibition

In neueren Arbeiten wurden die Mechanismen näher analysiert, die der Cytokin-induzierten Apoptoseinhibition zugrunde liegen. Mit Hilfe von Rezeptormutanten konnte belegt werden, dass im Epo Signaltransduktionsweg die Aktivierung der Kinase Jak2 ausreichend war, um die bestrahlungs-induzierte Apoptose zu unterdrücken. Da die Aktivierung des Jak Kinase Signalwegs zur Induktion von Bcl-2 und Bcl-x_L führte und die Expression beider Proteine in den gleichen Zellen ebenfalls die Apoptose blockieren konnte, war zu vermuten, dass die Apoptoseinhibition dadurch vermittelt wird (Quelle *et al.*, 1998).

IL-3 kann möglicherweise durch die Aktivierung des Stat5 Signalwegs (Azam *et al.*, 1995; Mui *et al.*, 1995) ebenfalls die Bcl-x_L Expression induzieren. Stat5 ist ein Transkriptionsfaktor, der den *bcl-x* Promotor direkt transaktivieren kann (Socolovsky *et al.*, 1999). Daneben kann IL-3 in das Gleichgewicht pro- und anti-apoptotischer Proteine der Bcl-2 Familie durch die induzierte Phosphorylierung zweier Serinreste von Bad eingreifen (Zha *et al.*, 1996). Diese Serinreste liegen innerhalb kanonischer Bindungsstellen des Proteins 14-3-3. Da phosphoryliertes Bad nicht mehr mit Bcl-x_L interagieren kann und durch die Komplexbildung mit 14-3-3 im Cytosol sequestriert wird, geht eine Modellvorstellung davon aus, dass die pro-apoptotische Wirkung von Bad dadurch blockiert wird. Die Signaltransduktion verläuft nach Bindung von IL-3 an den IL-3 Rezeptor über die Aktivierung von PI-3 Kinase. Durch die Bildung von Phosphoinositidderivaten als *second messengers* wird die Kinase Akt stimuliert. Die gleichzeitige Phosphorylierung durch die Phosphoinositid-abhängige Kinase 1 (PDK1) führt zur vollständigen Aktivierung von Akt. Akt ist dann in der Lage, Bad zu phosphorylieren und damit zu inaktivieren (Datta *et al.*, 1997). Inwieweit dieser Signalweg zur Inhibition der p53-induzierten Apoptose beiträgt, ist nicht geklärt. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Aktivierung von Akt auch die p53-abhängige Apoptose hemmen kann (Sabbatini & McCormick, 1999).

Ein gemeinsamer Nenner der Hemmung der p53-abhängigen Apoptose durch Wachstumsfaktoren und Cytokine ist scheinbar die Aktivierung von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-x_L und die Inaktivierung von pro-apoptotischen Proteinen wie Bad. Dadurch wird das mitochondriale Gleichgewicht in Richtung Überleben verschoben und die Wirkung pro-apoptotischer Signale abgefangen. Die mitogene Stimulation weist ähnliche Charakteristika auf. In dieser Arbeit konnte eine Korrelation zwischen der Apoptoseinhibition, der Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials und der Erhöhung der Bcl-x_L Expression nachgewiesen werden. Außerdem konnten Evidenzen für den möglichen Mechanismus der Erhöhung der Bcl-x_L Spiegel gefunden werden.

Die Transkription von *bcl-x* kann u.a. direkt durch Stat1, u. Stat5 (Fujio *et al.*, 1997; Socolovsky *et al.*, 1999) induziert werden. Da insbesondere Cytokine die Stat-Signaltransduktion stimulieren, ist zu vermuten, dass eine Erhöhung der Bcl-x_L Expression ursächlich an der beobachteten Blockierung der p53-abhängigen Apoptose durch Cytokine beteiligt ist (Yonish-Rouach *et al.*, 1991; Lin & Benchimol, 1995; Collins *et al.*, 1992). Dagegen ist in der komplexen Signaltransduktion der T-Zellaktivierung und B-Zellaktivierung NF-κB ein zentraler Vermittler von Überlebenssignalen (Tumang *et al.*, 1998; Boothby *et al.*, 1997) und könnte daher an der Apoptoseinhibition durch die mitogene Stimulation beteiligt sein. Tatsächlich konnte kürzlich gezeigt werden, dass NF-κB direkt die Expression von Bcl-x_L aktiviert. Interessanterweise führte die PMA/Ionomycin Stimulation von Jurkat T-Zellen zur *bcl-x* Induktion, die in Zellen, in denen die NF-κB Aktivierung blockiert war, nicht nachweisbar war (Chen *et al.*, 2000). In der gleichen Arbeit konnte in Fibrosarkomzellen die NF-κB-abhängige Erhöhung von Bcl-x_L jedoch nicht von Bcl-2 detektiert werden. Während dieses Bild sich auch in T-Zellen zeigte (Tsukahara *et al.*, 1999), wurde in neuronalen Zellen zusätzlich die Induktion von *bcl-2* gefunden (Tamatani *et al.*, 1999). Damit scheint *bcl-2* nur in bestimmten Zellen als NF-κB Zielgen zu fungieren. Neben Bcl-x_L und möglicherweise Bcl-2 konnte mit Bfl-1/A1 ein weiteres anti-apoptotisch wirkendes Protein der Bcl-2 Familie als NF-κB Zielgen identifiziert werden (Wang *et al.*,

1999; Zong *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999). Möglicherweise spielt die Induktion der Bfl-1/A-1 Expression ebenfalls eine Rolle in der Apoptoseinhibition in stimulierten Lymphozyten.

Vor dem Hintergrund dieser Studien erscheint es wahrscheinlich, dass die NF- κ B-Aktivierung die detektierte Erhöhung der Bcl-x_L Proteinspiegel (Abb.16) bewirkt und somit Mediator der Apoptoseinhibition ist. Da vermutlich zusätzlich auch die Bfl-1 Proteinspiegel ansteigen, würden zwei anti-apoptotisch wirkende Proteine der Bcl-2 Familie die p53-induzierte Apoptose antagonisieren.

Eine direkte Beteiligung von NF- κ B an der Apoptoseinhibition konnte aus methodischen Gründen nicht nachgewiesen werden. Die ektopische Expression eines dominant negativen NF- κ B Inhibitorproteins, das hochspezifisch zur Blockierung der NF- κ B Aktivierung führt, war in ruhenden, primären Lymphozyten nicht möglich, da diese Zellen nicht transfizierbar sind. Andererseits führte die Inkubation der Zellen mit verschiedenen Inhibitoren des NF- κ B Signalwegs jedoch zum Verlust der Vitalität und der Apoptoseinduktion unabhängig von der Bestrahlung.

Allerdings konnte durch die Hemmung der Protein Kinase C die Apoptoseinhibition in bestrahlten, stimulierten Zellen aufgehoben werden (Abb.17). Wenn die beobachtete Hochregulation von Bcl-x_L tatsächlich auf eine Aktivierung von NF- κ B zurückzuführen ist, sollte daher zwischen der PKC Aktivierung und der NF- κ B Aktivierung eine funktionelle Verknüpfung bestehen. Tatsächlich konnten dafür in den letzten Jahren immer mehr Evidenzen gefunden werden, und neuere Arbeiten belegen, dass die Aktivierung von PKC θ in T-Zellen essentiell für die Aktivierung von NF- κ B im Verlauf der T-Zellaktivierung ist (Sun *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2000a; Coudronniere *et al.*, 2000). Die PKC θ Isoform gehört zur Gruppe der neuen Isoformen (nPKCs), die Ca²⁺-unabhängig aktiviert werden können, und wird im hämatopoetischen System selektiv nur in T-Zellen exprimiert. Da die Wirkung des PKC Inhibitors GF109203X jedoch die Apoptoseinhibition in den Milzzellen vollständig aufheben konnte, ist zu vermuten, dass in B-Lymphozyten ein ähnlicher Signalweg durch eine andere PKC Isoform vermittelt wird. In der Tat konnte am Beispiel von PKC α nachgewiesen werden, dass auch konventionelle Isoformen (cPKCs), die zur Aktivierung Ca²⁺ und DAG (*in vivo*) bzw. PMA (*in vitro*) benötigen, NF- κ B aktivieren können (Lallena *et al.*, 1999). Für atypische Isoformen (aPKCs), die nicht durch Ca²⁺ und PMA aktiviert werden können, konnte die PKC-abhängige Aktivierung von NF- κ B im TNF Signalweg gezeigt werden (Lallena *et al.*, 1999; Sanz *et al.*, 1999).

Die Ergebnisse lassen sich zu einem Modell über die Regulation von p53-abhängigen Signalwegen in Lymphozyten zusammenfassen (Abb.18). Nach einem DNA-Schaden wird p53 aktiviert, und die p53 Proteinspiegel steigen deutlich an. Unabhängig von der Stimulation werden p53 Zielgene transaktiviert. In unstimulierten, bestrahlten Lymphozyten führt die kumulative Wirkung pro-apoptotischer Effektoren wie beispielsweise Bax und Noxa zur Induktion der Apoptose über die Deregulation der mitochondrialen Stabilität. Die Stimulation hat zwei Effekte: die Blockierung der Apoptose und die Induktion des Wachstumsarrests. Dadurch dass durch die Stimulation die Transkription und Translation verstärkt werden, werden durch einen multiplikativen Effekt in stimulierten, bestrahlten Zellen hohe p21 Spiegel erreicht, die in der Lage sind, die Zellzyklusprogression durch die Bindung an CDK/Cyclin Komplexe zu inhibieren. Gleichzeitig wird möglicherweise durch eine PKC-vermittelte NF- κ B Aktivierung die Expression von Bcl-x_L und eventuell weiterer anti-

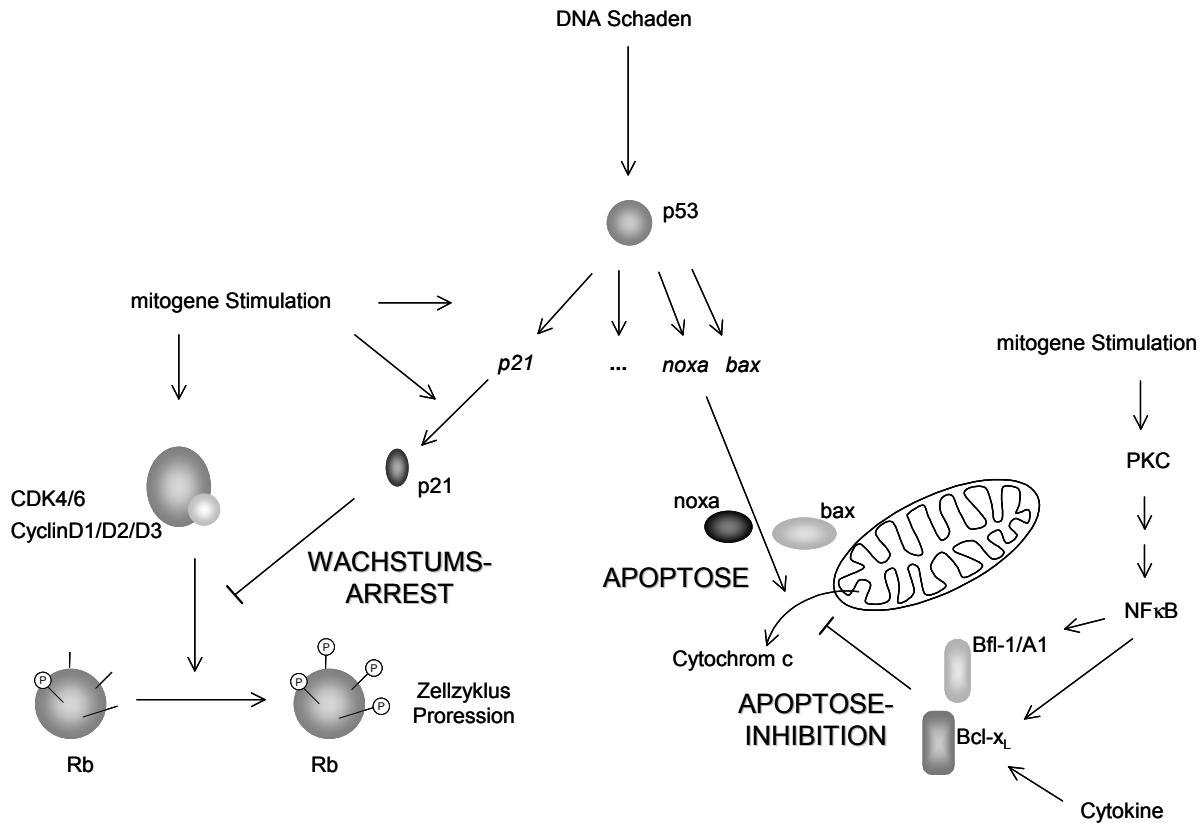


Abbildung 18: Regulation p53-abhängiger Effektorsignalwege in stimulierten und unstimulierten Lymphozyten Nach einem DNA-Schaden kommt es zur Aktivierung von p53. P53 transkribiert Zielgene unabhängig von der mitogenen Stimulation. Die Stimulation hat einen eigenständigen Einfluß auf die Transkription, der sich multiplikativ auswirkt. Zusätzlich erhöht die Stimulation die Translationsrate. Dies führt insbesondere bei p21 zu sehr hohen Proteinspiegeln, und p21 blockiert die Zellzyklusprogression durch die Inhibition von CDK/Cyclin Aktivitäten (Wachstumsarrest). In unstimulierten Zellen führt die Induktion von Bax, Noxa und weiteren pro-apoptotischen Effektoren zur Destabilisierung von Mitochondrien, der Freisetzung von Cytochrom c und damit zur Aktivierung von Caspase-9 (Apoptose). Dieser Signalweg wird in stimulierten Zellen antagonisiert. Die Aktivierung von PKC könnte über die Aktivierung von NFκB zur Induktion anti-apoptotischer Faktoren wie Bcl-x_L und Bfl-1/A1 führen (Apoptoseinhibition). Cytokine können ebenfalls eine anti-apoptotische Wirkung haben, die über Proteine der Bcl-2 Familie vermittelt wird. Dazu gehört beispielsweise die Induktion von Bcl-x_L.

apoptotisch wirkender Proteine wie Bfl-1/A1 induziert. Dadurch wird eine Apoptoseinduktion durch pro-apoptotisch wirkende Proteine effizient gehemmt. Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch anti-apoptotische Wirkung von Cytokinen vermitteln. Vermutlich spielt der Stat-Signaltransduktionsweg dabei eine entscheidende Rolle.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass die Entscheidung zur Aktivierung von Wachstumsarrest oder Apoptose nicht primär auf p53-abhängigen Signalwegen beruhen muss, sondern entscheidend durch andere Faktoren beeinflusst werden kann. Die Expression anti-apoptotischer Effektoren ermöglicht eine Modulation der zellulären Reaktion auf die Aktivierung von p53. Die dazu notwendigen Signale werden auch *in vivo* in bestimmten Differenzierungsschritten aktiviert, wie beispielsweise während der mitogenen Stimulation ruhender Lymphozyten. Diese Erkenntnis könnte auch erklären, warum die vollständige Elimination der wt p53-Aktivität durch Mutation in der Tumorgenese ein spätes Ereignis ist. Die Induktion anti-apoptotischer Effektoren findet deutlich früher statt und ist auch in der

Lage pro-apoptotische Signale, die von wt p53 ausgehen, zu antagonisieren. Dieser Aspekt sollte in der Behandlung von Tumoren, die einen wt p53 Status haben, den man therapeutisch nutzen möchte, berücksichtigt werden.

IV. Material und Methoden

IV.1 Material

IV.1.1 Biologisches Material

- Die Milzzellen folgender Mausstämme wurden verwendet:
wt Zellen: BALB/c
p53-defiziente Zellen: BALB/c p53^(-/-) (Donehower, 1992)
p21-defiziente Zellen: FvB/n p21^(-/-) (Deng *et al.*, 1995)
- Zur Amplifikation von Plasmid-DNA und zur Langzeitlagerung wurden Bakterien des Stammes DH5 α von *E.coli* verwendet.

IV.1.2 Molekularbiologisches Material

Enzyme, Proteine, Lektine

Die aufgelisteten Enzyme wurden jeweils mit dem dazugehörigen Puffer verwendet.

- T7 RNA-Polymerase	Promega, Madison, USA
- Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
- Superscript II	Lifetechnologies, Karlsruhe
- <i>Taq</i> -Polymerase	Qiagen, Hilden
- DNase I, RNase-frei	Promega, Madison, USA
- RNasin	Promega, Madison, USA
- <i>Pwo</i> -Polymerase	Roche, Mannheim
- Concanavalin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Terminale Desoxynukleotidyl Transferase	MBI Fermentas, Vilnius, Litauen
- RNase A (Durchflußzytometrie)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- RNase A (RNase Protection Assay)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- RNase T1	Roche, Mannheim
- Proteinase K	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Antikörper

Folgende Antikörper wurden für Western-Blot Analysen und für die Durchflußzytometrie verwendet. Die monoklonalen Antikörper entstammen der Maus, die hier verwendeten Antiseren wurden aus Känninchen gewonnen. Die eingesetzten Mengen bzw. Verdünnungen sind jeweils angegeben.

- anti-BrdU, Fluorescein-gekoppelt Klon BMC 9318 (Roche, Mannheim)
0,3 µg / 10⁶ Zellen
- anti-CD3e, PE-gekoppelt Klon 145-2C11 (BD Biosciences, Heidelberg)
1 µg / 10⁶ Zellen
- anti-CD45R/B220, PE-gekoppelt Klon RA3-6B2 (BD Biosciences, Heidelberg)
1 µg / 10⁶ Zellen
- anti-bax polyklonal (BD Biosciences, Heidelberg)
Verdünnung: 1:1.000
- anti-bcl-2 Klon 7 (BD Biosciences, Heidelberg)
Verdünnung: 1:500
- anti-p21 Klon SX118 (BD Biosciences, Heidelberg)
Verdünnung: 1:1.000
- anti-p53 polyklonal (Arbeitsgruppe Prof. Deppert, HPI, Hamburg)
Verdünnung: 1:5.000

Zur Detektion der primären Antikörper wurden im Western-Blot folgende sekundäre Antikörper eingesetzt:

- Ziege anti-Maus IgG (H+L), Peroxidase gekoppelt Verd.: 1:5.000 (Biomol, Hamburg)
(für p21 Western-Blot)
- Ziege anti-Maus IgG (H), Peroxidase gekoppelt Verd.: 1:2.500 (Dianova, Hamburg)
(für Bcl-2 Western-Blot)
- Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L), Peroxidase gekp. Verd.: 1:10.000 (Biomol, Hamburg)
(für p53 u. Bax Western-Blot)

Primer und Plasmide

Die für die Klonierungen, Sequenzierungen und die Genotypisierung benötigten Primer sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Plasmide, die zur Synthese radioaktiv markierter antisense RNA kloniert wurden sind im Abschnitt „Klonierungen“ in Tabelle 2 zusammengestellt.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
<i>Primer für Genotypisierungen</i>	
IMR013	CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC
IMR014	AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC
IMR336	ATA GGT CGG CGG TTC AT
IMR337	CCC GAG TAT CTG GAA GAC AG
<i>Primer für cDNA-Synthese (RT-PCR)</i>	
bax-a	GGG GTA CCG GGT CCC GAA GTA GGA GA
bax-s	GCA ATA TGG AGC TGC AGA GGA TG
cip-a	GCT CTA GAT CAG GGT TTT CTC TTG CAG A
cip-s	GGG GTA CCA TGT CCA ATC CTG GTG ATG T
fas-a	TCC CCC GGG TCA CTC CAG ACA TTG TCC
fas-s	CGG GAT CCA TGC TGT GGA TCT GGG CT
noxa-a	AGG TTA CTA AAT TGA AGA GCT TGG
noxa-s	GCA AAA GAG CAG GAT GAG GAG

Tabelle 1: verwendete Primer

Molekulargewichtsstandards

Für die Größenordnung bei der gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen und DNA dienten folgende Molekulargewichtsstandards:

- DNA Standards:

100 Base Pair Ladder	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
KiloBase DNA Marker	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
- Protein Standards:

SDS-7B Prestained Mixture	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LowRange Prestained Marker	Biorad, München

Chemikalien

Die handelsüblichen Chemikalien wurden von den Firmen Roche (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Lifetechnologies (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Darüber hinaus wurden folgende Chemikalien eingesetzt:

- Radiochemikalien:

- $[^3\text{H}]$ -Thymidin	37 MBq/ml	2,8 TBq/mmol	ICN Biomedicals, Eschwege
- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -UTP	370 MBq/ml	110 TBq/mmol	Hartmann Analytic, Braunschweig
- Spezielle Chemikalien:

- PMA	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
- Ionomycin	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
- GF109203X	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden
- BrdUTP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- JC-1	Molecular Probes Europe, Leiden, Niederlande

IV.1.3 Geräte & Software

Neben den zur Grundausstattung gehörenden Geräten wurden Analyse an folgenden Geräten durchgeführt:

Zellharvester	Combi Cell Harvester	Skatron, Noderstedt
Durchflußzytometer	Epics XL-MCL	Beckman-Coulter, Krefeld
Thermocycler	Primus 96 plus	MWG Biotech, Martinsried
Phosphorimager	Fujix Bas 2000	Raytest, Straubenhardt
Szintillationszähler	LS5000TD	Beckman, Unterschleissheim-Lohhof

Zur Erstellung dieser Arbeit und zur Datenanalyse wurde folgende Computer-Software eingesetzt:

Durchflußzytometrie	System II	Beckman-Coulter, Krefeld
Durchflußzytometrie	Expo 32	Beckman-Coulter, Krefeld
Durchflußzytometrie	WinMDI	Joseph Trotter, Scripps Institute, La Jolla, USA
Textverarbeitung, Graphiken, u. Tabellenkalkulation		Office Microsoft
Phosphorimager	Tina 2.09	Raytest, Straubenhardt
Literaturmanagement	Endnote	Niles Software, Berkeley, USA

IV.1.4 Medien, Puffer und Lösungen

3NTP-Mix (5x)

2,5 mM	ATP
2,5 mM	GTP
2,5 mM	CTP

AIO-Mix

1 ml	Phenol (Wasser-gesätt.)
1 ml	Denaturierungspuffer
0,1 ml	Natriumacetat (2 M, pH 4,0)

A/T1 Verdaupuffer

0,1 U/µl	RNase T1
0,5 ng/µl	RNase A
5 mM	EDTA
300 mM	NaCl
10 mM	Tris/HCl pH 7,4

Blockpuffer

5 %	Magermilchpulver
-----	------------------

gelöst in Waschpuffer

BrdU-Färbemix

0,3 µg	anti-BrdU-Antikörper
0,3 %	Triton

verdünnt in PBS-BSA

Chloroform/Isoamylalkohol

24 ml	Chloroform
1 ml	Isoamylalkohol

Denaturierungslösung

4 M	Guanidinthiocyanat
25 mM	Natriumcitrat pH 7,0
0,5 %	N-Lauroylsarcosin (w/v)
0,1 M	2-Mercaptoethanol

2-Mercaptoethanol frisch zusetzen

Detektionslösung

Lösung A

2,5 mM	Luminol
400 mM	Paracumarinsäure
100 mM	Tris/HCl pH 8,5

Lösung B

0,2 %	H ₂ O ₂ (v/v)
100 mM	Tris/HCl pH 8,5

Lösung A und Lösung B unmittelbar vor Gebrauch mischen (je ein Volumenteil)

dNTP-Mix (50x)

10 mM	dATP
10 mM	dGTP
10 mM	dCTP
10 mM	dTTP

Elutionspuffer R

0,5 M	Ammoniumacetat
0,5 %	SDS
2 mM	EDTA

Elutionspuffer EB

10 mM	Tris/HCl pH 8,5
-------	-----------------

EtBr-Färbelösung

10 mg/ml	Ethidiumbromid
----------	----------------

gelöst in H₂O

Formamidladelösung

80 %	Formamid (v/v)
2 mM	EDTA (pH 8,0)
0,1 %	Bromphenolblau (w/v)
0,1 %	Xylencyanol (w/v)

Harnstoffgel

6 %	Acrylamid/Bisacrylamid (19/1)
7 M	Harnstoff
1 x	TBE-Puffer

Polymerisierung durch Zugabe von 1/100 Volumen APS (10% w/v) und 1/1000 Volumen TEMED

Hybridisierungspuffer

80 %	Formamid
40 mM	PIPES (pH 6,4)
0,5 M	NaCl
1 mM	EDTA

Kulturmedium

RPMI mit folgenden Zusätzen

5 %	FCS (v/v)
100 U/ml	Penicillin
100 µg/ml	Streptomycin
50 µM	2-Mercaptoethanol

LB-Medium

10 g	Bacto-Trypton
5 g	Bacto-Yeast-Extrakt
10 g	NaCl

LBA-Medium

0,01 %	Ampicillin (w/v)
--------	------------------

in LB-Medium

LBA-Kulturplatten

1,5 %	Agar (w/v)
-------	------------

in LBA-Medium

Lysepuffer DL

25 mM	Tris/HCl pH 8,0
400 mM	NaCl
0,5 %	SDS
2 mM	EDTA

NP-40 Lysepuffer

50 mM	HEPES
150 mM	NaCl
0,5 %	NP-40

pH-Wert einstellen auf pH 7,4

PI-Färbelösung

20 µg/ml	Propidiumiodid
0,2 mg/ml	RNase A

gelöst in PBS

PBS

140 mM	NaCl
3 mM	KCl
8 mM	Na ₂ PO ₄
1,5 mM	KH ₂ PO ₄

pH-Wert einstellen auf pH 7,4

PBS-BSA

0,5 %	BSA
-------	-----

gelöst in PBS

PBS-BSA-T

0,5 %	BSA
0,1 %	Triton

gelöst in PBS

PCI-Mix

25 ml	Phenol (TRIS-gesätt.)
24 ml	Chloroform
1 ml	Isoamylalkohol

Probenpuffer L (6x)

300 mM	Tris/HCl pH 6,8
10 %	SDS (w/v)
0,6 M	DTT
30 %	Glycerol (v/v)
0,001%	Bromphenolblau (w/v)

Probenpuffer X (6x)

300 mM	Tris/HCl pH 6,8
5 %	SDS (w/v)
0,6 M	DTT
30 %	Glycerol (v/v)
0,001%	Bromphenolblau (w/v)

Probenpuffer A

20 mM	EDTA pH 8,0
50 %	Glycerol (v/v)
0,25%	Bromphenolblau (w/v)
0,25%	Xylen-Cyanol (w/v)

Protease-Inhibitoren

5 µg/ml	Pepstatin A
5 µg/ml	Aprotenin
5 µg/ml	Leupeptin
125 µg/ml	Prefabloc SC

Angaben beziehen sich auf finale Konzentrationen

Puffer S1

50 mM	Tris/HCl pH 8,0
10 mM	EDTA
100 µg/ml	RNase A

Puffer S2

200 mM	NaOH
1 %	SDS (w/v)

Puffer S3

2,8 M	Kaliumacetat pH 5,1
-------	---------------------

Puffer N2

100 mM	Tris
15 %	Ethanol (v/v)
0,9 M	KCl
0,15 %	Triton X-100

pH-Wert mit H₃PO₄ einstellen auf pH 6,3

Puffer N3

100 mM	Tris
15 %	Ethanol (v/v)
1,15 M	KCl

pH-Wert mit H₃PO₄ einstellen auf pH 6,3

Puffer N5

100 mM	Tris
15 %	Ethanol (v/v)
1 M	KCl

pH-Wert mit H₃PO₄ einstellen auf pH 8,5

RNA Ladepuffer

80 %	Formamid
1 mM	EDTA (pH 8,0)
0,1 %	Bromphenolblau
0,1 %	Xylenecyanol

RPMI Medium

10,43 g/l	RPMI-1640 Pulver
2 g/l	NaHCO ₃

gelöst in H₂O

pH-Wert einstellen auf pH 7,3

Sammelgel

175 mM	Tris/HCl pH 6,8
4 %	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5/1)
0,1 %	SDS

Polymerisierung durch Zugabe von 1/100 Volumen APS (10% w/v) und 1/500 Volumen TEMED

SDS-Laufpuffer

25 mM	Tris
200 mM	Glycin
0,1 %	SDS

TBE-Puffer

89 mM	Tris
89 mM	Borsäure
2 mM	EDTA

TBS

20 mM	Tris/HCl (pH 7,6)
140 mM	NaCl

TCM-Puffer

10 mM	Tris/HCl
10 mM	CaCl ₂
10 mM	MgCl ₂

TfB I

10 mM	MOPS pH 7,0
10 mM	RbCl
75 mM	CaCl ₂
15 %	Glycerol (v/v)

TfB II

30 mM	Kaliumacetat pH 5,8
50 mM	MnCl ₂
100 mM	RbCl
10 mM	CaCl ₂

TdT-Reaktionsmix

1 x	TdT Reaktionpuffer
20 U	Terminale Desoxynukleotidyl Transferase
0,1 mM	BrdUTP

TE-Puffer

10 mM	Tris/HCl pH 8,0
1 mM	EDTA

TE+-Puffer

10 mM	Tris/HCl pH 8,0
1 mM	EDTA
150 mM	NaCl

Transferpuffer

50 mM	Tris
192 mM	Glycin

pH-Wert einstellen auf pH 8,3

Trenngel

375 mM	Tris/HCl pH 8,8
10-15 %	Acrylamid/Bisacrylamid (37,5/1)
0,1 %	SDS

*Polymerisierung durch Zugabe von 1/200 Volumen
APS (10% w/v) und 1/2000 Volumen TEMED*

TSC-Puffer (5x)

200 mM	Tris/HCl pH 7,5
30 mM	MgCl ₂
50 mM	NaCl
10 mM	Spermidin

Waschpuffer

0,2 %	Tween 20
-------	----------

gelöst in TBS

IV.2 Methoden

IV.2.1 Präparation und Kultivierung muriner Milzzellen

Genotypisierung

Da BALB/c p53^(-/-) Mäuse nur bedingt fortpflanzungsfähig sind, wurden heterozygote Mäuse verpaart und die Nachkommen genotypisiert. Dazu wurden Schwanzbiopsie entnommen und die genomische DNA präpariert. Die Präparation erfolgte mit dem „DNeasy“ Kit (Qiagen, Hilden). 1 µl des die genomische DNA enthaltende Eluats wurde als Matrize in die Test-PCR eingesetzt. Die Reaktion (25 µl) fand erfolgte mit folgenden Komponenten: PCR-Puffer (1x), dNTP-Mix (1x), *Taq*-Polymerase (0,025 U/µl), Primer 1 (0,5 µM), Primer 2 (0,5 µM). Die Amplifikation (35 Zyklen) wurde mit folgendem Programm durchgeführt: Initiale Denaturierung (5 min, 94°C), Denaturierung (40 s, 94°C), Annealing (30 s, 56°C), Elongation (50 s, 72°C), finale Elongation (5 min, 72°C). Die PCR-Produkte wurden anschließend über ein Agarosegel (1,5%) aufgetrennt. Das 600 bp Produkt entsteht durch Amplifikation des wt Allels, während das 280 bp die Gegenwart des neo Allels der p53 knockout Maus anzeigt.

Präparation muriner Milzzellen

Nach zervikaler Translokation wurde die Bauchhöhle geöffnet und die Milz präpariert. Alle weiteren Schritte erfolgten in gekühlten Lösungen. Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurde die Milz mit dem Stempel einer Spritze unter mehrfachem Spülen mit Kulturmedium durch ein Drahtsieb gedrückt. Zur besseren Suspension wurden die Zellen mehrfach auf und ab pipetiert. Die Zellsuspension zweier Milzen wurde auf 25 ml aufgefüllt und zentrifugiert (250g, 10 min, 4°C). Zur Lyse der Erythrozyten wurde das Zellpellet in 10 ml NH₄HCO₃-Lösung (0,89 %) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Zellverklumpungen wurden vorsichtig entfernt. Die Lyse wurde durch Zugabe von 40 ml Kulturmedium beendet. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und das Zellpellet wurde in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Die Suspension wurde auf eine Zelldichte von 4×10⁶ Zellen/ml eingestellt.

Kultivierung muriner Milzzellen

Nach der Präparation wurden die Milzzellen in 25 ml Gewebekulturflaschen (10 ml Suspension), in 24-Loch-Gewebekulturplatten (1,4 ml Suspension) bzw. in 96-Loch-Gewebekulturplatten (0,18 ml Suspension) kultiviert (37°C, 5% CO₂, rel. Luftfeuchtigkeit 95%). Die Stimulation von Zellen erfolgte direkt nach der Präparation mit Concanavalin A (3 µg/ml) oder mit Ionomycin (500 ng/ml) und PMA (10 ng/ml). Bei der Verwendung von Inhibitoren erfolgt zunächst eine Vorinkubation mit dem Inhibitor für 45 min. Der PKC-Inhibitor GF109203X wurde in einer Konzentration von 2 µM eingesetzt.

Proliferationsanalyse

Die Proliferationsanalyse basiert auf dem Eintritt von Zellen in die S-Phase des Zellzyklus. Die Phase der DNA-Synthese kann durch dem Kulturmedium zugesetztes, radioaktiv-markiertes Thymidin erfasst werden. Die Szintillationszählung ermöglicht eine Quantifizierung der DNA-Markierung (Einbaurate).

Die Markierung erfolgte in durch Zugabe von 10 µl [³H]-Thymidin zu $7,2 \times 10^5$ Zellen (96-Loch-Gewebekulturplatte). Nach einer Inkubation von 60 min wurde die Platte bei -70°C eingefroren. Zur Analyse wurde die Platte aufgetaut und die Zellen mit Hilfe des Zellharvesters lysiert (H₂O), auf Szintillationsfilter gesaugt und gewaschen. Die Filter wurden getrocknet und im Szintillationszähler gemessen.

IV.2.2 Arbeiten mit Bakterienzellen

Stammhaltung

Zur Langzeitlagerung von Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden 4 ml LBA-Medium mit 100 µl einer gesättigten ÜNK angeimpft und bei 37°C als Schüttelkultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 angezogen. Dies entspricht der frühen logarithmischen Wachstumsphase. 800 µl Aliquots dieser Kultur wurden dann mit 200 µl sterilem Glycerin (83 % v/v) gemischt und bei -70°C gelagert.

Gewinnung transformationskompetenter Zellen

Kompetente Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass ihre Zellwand für DNA-Vektoren, die im Verlauf der Transformation in die Zellen eingeschleust werden, durchlässig ist. Dies kann durch eine Behandlung mit Rubidiumchlorid erreicht werden (Hanahan, 1983).

100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer gesättigten ÜNK des jeweiligen Bakterienstammes angeimpft und bei 37°C als Schüttelkultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Die Zellen wurden sedimentiert (Sorvall/SS34, 3000 rpm, 10 min, RT), in 30 ml Tfb I resuspendiert und 30 min inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde in 5 ml Tfb II resuspendiert. Die Suspension wurde 15 min inkubiert, dann wurden Aliquots (100 µl) in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

Transformation kompetenter Bakterien

Die bei -70°C gelagerten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 100 ng Plasmid-DNA wurden mit vorgekühltem TCM-Puffer auf 40 µl verdünnt, zu 100 µl kompetenter Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Während einer Inkubationszeit von 45 min auf Eis adsorbierte die DNA an die Bakterien. Anschließend wurden die Zellen für 60 s auf 42°C erhitzt. Der Hitzeschock diente der erleichterten Aufnahme der DNA durch die Bakterien. Dem Ansatz wurde dann 1 ml LB-Medium zugesetzt. Zur Ausprägung der plasmidkodierte Antibiotikaresistenz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert (Mikrozentrifuge, 14.000 rpm,

2 s), und der Überstand wurde bis auf 100 µl verworfen. In diesem Volumen wurden die Zellen resuspendiert und mit einem sterilen Drygalski-Spaltel auf einer LBA-Platte ausgestrichen. Kolonien transformierter Bakterien wurden nach einer Inkubationszeit von ca. 15 h bei 37°C sichtbar. Einzelstehende Kolonien stellten jeweils einen Klon dar und konnten in LBA-Medium angezogen werden.

IV.2.3 Präparation, Analyse und Klonierung von DNA

Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* Zellen

Die Plasmidpräparation aus Bakterienzellen basiert auf einer alkalischen SDS-Lyse der Zellen und der anschließenden Abtrennung der Plasmid-DNA von anderen kleineren Nukleinsäuren über einen Anionenaustauscher; die chromosomale DNA wird zuvor durch Kaliumacetat präzipitiert (Birnboim & Doly, 1979). Die Ausbeute bei *high copy* Plasmiden (z.B. pGEM, pUC) beträgt 100-500 µg bei einem eingesetzten Kulturvolumen von 250 ml.

250 ml LBA-Medium wurden mit 1 ml einer ÜNK angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden sedimentiert (Sorvall/GS-3, 5000 rpm, 10 min, 4°C) und in 12 ml Puffer S1 aufgenommen. Nach Zugabe von 12 ml des Puffers S2 wurde die Suspension vorsichtig durchmischt und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. 12 ml des Puffers S3 wurden zugegeben. Die Suspension wurde durch mehrmaliges Invertieren gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Zelltrümmer, denaturierte Proteine und chromosomale DNA wurden sedimentiert (Sorval/SS34, 10.000 rpm, 30 min, 4°C). Der Überstand wurde auf eine mit Puffer N2 äquilibrierte Anionenaustauschersäule (Nucleobond AX500, Macherey-Nagel) gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit je 12 ml Puffer N3 erfolgte die Elution der Plasmid-DNA mit 6 ml Puffer N5. Die DNA wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol präzipitiert und sedimentiert (Sorval/SS34, 10.000 rpm, 30 min, 4°C). Das resultierende DNA-Pellet wurde vorsichtig mit Ethanol (70 % v/v) gewaschen, getrocknet und in einem geeigneten Puffer (TE-Puffer pH 8,0; H₂O) aufgenommen. Die Konzentration und Reinheit wurde photometrisch bestimmt; zusätzlich wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

Restriktionsspaltung von DNA

Die spezifische Spaltung von DNA erfolgt mit Restriktionsendonukleasen. Sie dient u.a. der analytischen Charakterisierung unbekannter Sequenzen, der Kontrolle von Klonierungen oder der Linearisierung von zirkulärer DNA. In der Regel kann 1 U Restriktionsenzym die Spaltung von 1 µg DNA in 1 h katalysieren.

Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 20-50 µl in dem für das Enzym optimalen Puffer. Die erhaltene DNA wurde gereinigt, und der Erfolg der Spaltung gelelektrophoretisch kontrolliert.

Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanolfällung

Die Phenol/Chloroform Extraktion ist eine Methode zur Reinigung von Nukleinsäuren und dient in erster Linie der Abtrennung von Proteinen aus Nukleinsäurepräparationen.

Die Ansätze wurden mit 1 Volumen Phenol (Tris-gesättigt) versetzt, kräftig gemischt (Vortex) und dann zentrifugiert (Mikrozentrifuge, 14.000 rpm, 2 min). Die obere, wässrige Phase wurde mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, gemischt (Vortex) und erneut zentrifugiert. Die Nukleinsäure wurde aus der oberen, wässrigen Phase gefällt. Die Proben wurden mit 0,3 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,0) und 2,5 Volumen Ethanol (abs.) versetzt und bei -70°C für 20 min inkubiert. Dann wurden die Nukleinsäuren sedimentiert (Mikrozentrifuge, 14.000 rpm, 30 min, 4°C) mit Ethanol (70 % v/v) gewaschen, an der Luft getrocknet und in einem geeigneten Puffer aufgenommen (TE-Puffer, H₂O).

Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente der analytischen und präparativen Trennung von DNA-Fragmenten. Lineare DNA-Fragmente wandern im Agarosegel umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts. Je nach Fragmentgröße werden Agarosegele von 0,8-1,5 % verwendet.

Die Agarose wurde durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst, nach Abkühlen auf 50°C mit EtBr-Lösung (1 µl/50 ml) versetzt und in die Gelkammer gegossen. Die Proben wurden mit 1/10 Volumen Probenpuffer A versetzt und aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Längenstandard (Marker) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in TAE-Puffer bei 100 V (konstant) durchgeführt. Die Banden wurden nach Beendigung der Elektrophorese durch UV-Illumination sichtbar gemacht (Fluoreszenz bei Anregung im UV-Bereich, 312 nm).

Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Quantifizierung der Nukleinsäurekonzentration erfolgt photometrisch. DNA und RNA zeigen ein charakteristisches Absorptionsspektrum im UV-Bereich mit einem Maximum bei 260 nm, das zur Konzentrationsbestimmung herangezogen wird. Um Aussagen zur Qualität und Reinheit einer Probe zu machen, wird das Spektrum von 320-220 nm aufgenommen.

Zur Messung in einer Quarzküvette (Volumen 100 µl) wurde die Probe mit H₂O auf eine ungefähre Konzentration von 0,01 µg/µl eingestellt. Aus der OD₂₆₀ kann dann die Konzentration bestimmt werden:

$$c_{\text{RNA}} [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \cdot 44,19 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$c_{\text{DNA}} [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \cdot 50 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Aufnahme eines Spektrums von 320-220 nm erfolgte nach Null-Abgleich bei 320 nm, da die Nukleinsäureabsorption an dieser Stelle null ist. Der charakteristische Kurvenverlauf wurde beispielsweise durch hohe Salzkonzentrationen oder Proteinverunreinigungen verändert. Zur Abschätzung der Reinheit wurde das sog. 260/280-Verhältnis berechnet (= OD₂₆₀ / OD₂₈₀). Für reine RNA-Proben resultiert ein Wert von 2,0 ± 0,05; reine DNA-Proben ergeben 1,8 ± 0,05.

Klonierung

Die zur Synthese radioaktiv markierter RNA benötigten Plasmide wurde durch Klonierung der entsprechenden cDNA-Sequenzen in das Plasmid pBlueskript II KS bzw. pBlueskript II SK hergestellt. Die dazu benötigte cDNA wurde ausgehend von muriner Lymphozyten RNA über eine RT-PCR hergestellt bzw. lag in klonierter Form vor. Die für die einzelnen Klonierungen verwendeten Primer, Plasmide und Restriktionsenzyme sind in Tabelle 2 aufgeführt.

neues Konstrukt	cDNA-Fragment	Ausgangs-plasmid	Ausgangs cDNA	Primer	verwendete Restriktions-schnittstellen
pBSII- α -fas	fas	pBlueskript II SK	RT-PCR Produkt	fas-a, fas-s	<i>KpnI</i> / <i>XbaI</i>
pBSII- α -p21	p21	pBlueskript II SK	RT-PCR Produkt	cip-a, cip-s	<i>AccI</i> / <i>ApaI</i>
pBSII- α -bax	bax	pBlueskript II SK	RT-PCR Produkt	bax-a, bax-s	<i>KpnI</i> / <i>PstI</i>
pBSII- α -mdm2	mdm2	pBlueskript II KS	Plasmid	/	<i>SacI</i> / <i>XbaI</i>
pBSII- α -noxa	noxa	pBlueskript II SK	RT-PCR Produkt	noxa-a, noxa-s	direkt kloniert *

Tabelle 2: Plasmide zur Herstellung von antisense RNA Sonden (*Ausgangsplasmid über *SmaI* linearisiert)

Nach Verdau der cDNA und des Zielplasmids mit geeigneten Restriktionsenzymen wurden die DNA-Fragmente über ein Agarosegel aufgereinigt (Gelextraction Kit, Qiagen, Hilden). Die entsprechende Bande wurde detektiert, und das Agarosestück mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Zum Aufschmelzen der Agarose und Binden der DNA an eine Matrix wurden 300 μ l Puffer QX1 und 10 μ l Glassmilch zugegeben. Nach einmaligem Waschen mit Puffer QX1 (500 μ l) und zweimaligem Waschen mit Puffer PE (500 μ l) wurde die Glassmilch getrocknet und die DNA mit Elutionspuffer EB eluiert. Nach der Quantifizierung (Plasmide) oder Abschätzung (cDNA) der Ausbeuten wurden die Fragmente ligiert. Dazu wurden etwa 50 ng Plasmid und eine 1-5-facher molarer Überschuss an cDNA-Fragment eingesetzt. Die Ligation erfolgte in 20 μ l in Ligase-Puffer (1x) in Gegenwart von 200U T4 DNA-Ligase (16°C, 14 h). 10 μ l des Ansatzes wurden anschließend direkt zur Transformation kompetenter Bakterienzellen eingesetzt.

IV.2.4 PCR und verwandte Methoden

Reverse Transkription

Die Reverse Transkription ist das enzymatische Umschreiben von RNA in DNA, die sog. cDNA (*copy DNA*). Die Reaktion kann mit viralen Polymerasen erfolgen, die ein DNA-Oligonukleotid (Primer) in 5'-3'-Richtung verlängern komplementär zur RNA verlängern.

Zur cDNA-Synthese mussten RNA (5 μ g) und Primer (2 pmol) zunächst denaturiert werden (10 min, 70°C, schnelles Abkühlen auf Eis). Die Reaktion fand dann in 25 μ l unter folgenden Bedingungen statt: RT-Puffer (1x), DTT (10 mM), dNTP-Mix (1x), Reverse

Transkriptase (Superscript II, 200 U). Nach Inkubation für 1 h bei 42°C wurde das Enzym für 15 min bei 75°C inaktiviert. Der Reaktionsansatz wurde direkt zur PCR eingesetzt.

Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine schnelle und sensitive Methode zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Segmente (Saiki *et al.*, 1988). Die Verwendung einer thermostabilen Polymerase ermöglicht die zyklische Denaturierung von DNA und die anschließende Verlängerung von Oligonukleotiden (Primer).

Die Reaktion fand in 50 µl unter folgenden Bedingungen statt: PCR-Puffer (1x), dNTP-Mix (1x), *Taq*-Polymerase (0,025U/µl), Primer 1 (0,5 µM), Primer 2 (0,5 µM). Als Ausgangs-DNA wurden 2 µl einer Reversen Transkriptions-Reaktion oder 10 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Das Zyklusprogramm (35 Zyklen) wurde ausgehend von folgenden Starteinstellungen für die Reaktionen optimiert: Initiale Denaturierung (5 min, 94°C), Denaturierung (30 s, 94°C), Annealing (30 s, 55°C), Elongation (45 s, 72°C), finale Elongation (5 min, 72°C). PCR-Produkte, die zur Klonierung vorgesehen waren, wurden mit *Pwo*-Polymerase amplifiziert.

Sequenzierung

Die Didesoxy-Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977) basiert auf dem statistischen Kettenabbruch einer Polymerase-Reaktion durch Zusatz von Didesoxynukleotiden (ddNTPs) zu den Desoxynukleotiden (dNTPs). Die Variante der Methode stellt das *cycle sequencing* (Sears *et al.*, 1992) dar, das PCR-basiert mit einer Mutante der *Taq*-Polymerase abläuft.

Die Reaktion wurde mit dem ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Biosystems) durchgeführt. In diesem System dienen Fluorophor-markierte ddNTPs als Reaktionsterminatoren. Der Ansatz enthielt in einem Volumen von 20 µl folgende Komponenten: 400 ng Plasmid-DNA, 10 pmol Primer, 3 µl BigDye (Kit) und 5 µl HalfTerm (Kit). Die Reaktion erfolgt mit folgendem Zyklusprogramm (25 Zyklen): Initiale Denaturierung (1 min, 96°C), Denaturierung (10 s, 96°C), Annealing (5 s, 50°C), Elongation (4 min, 60°C). Anschließend wurde der Ansatz mit Ethanol (ohne Waschschrift) gefällt und getrocknet. Die Gelanalyse erfolgte in einem ABI-Sequenator 377 (PE Biosystems).

IV.2.5 RNA Präparation

Die Isolation von sauberer, intakter RNA ist grundlegend für die Klonierung von Genen und für die Analyse von Genexpression. Die Schwierigkeit der RNA Präparation besteht in erster Linie darin, dass Ribonukleasen sehr stabile Enzyme sind, die keine Cofaktoren benötigen. Der erste Schritt der Präparation besteht daher in einer Zellyse unter Bedingungen, die zur weitgehenden Denaturierung der RNAsen führen. Die RNA wird dann durch eine saure Phenolextraktion von anderen zellulären Makromolekülen abgetrennt.

Guanidinthiocyanat ist eine der effektivsten Protein-denaturierenden Substanzen. Die *single-step* Methode zur RNA Präparation basiert auf der Eigenschaft von RNA in einer wässrigen Phase mit 4 M Guanidinthiocyanat bei pH 4 zu verbleiben in Gegenwart einer organischen Phenol/Chloroform-Phase (Chomczynski & Sacchi, 1987). Unter diesen sauren Bedingungen reichern sich DNA Fragmente (bis 10 kb) und Proteine in der organischen Phase an. Daher ist die Fragmentierung der DNA im Zuge der Zellyse notwendig (Homogenisation). Die RNA kann nach der Extraktion aus der wässrigen Phase mit Isopropanol gefällt werden.

Die RNA-Präparation erfolgte ausgehend von Zellpellets, die bei -70°C gelagert werden können. Der AIO-Mix wurde frisch angesetzt und auf Eis gekühlt. Die Zellyse erfolgte mit 2 ml AIO-Mix für $4-8 \times 10^7$ Milzzellen auf Eis. Zur Homogenisation wurde das Lysat zehnmal mit einer 21G Nadel in eine 1,5 ml Spritze gezogen. Das Homogenat wurde mit 200 μl Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) versetzt, gemischt (Vortex) und 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (Mikrozentrifuge, 14.000 rpm, 4°C , 15 min) wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wurde durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol und durch Inkubation bei -20°C (3h) gefällt. Nach der Zentrifugation (s.o.) wurde das RNA-Pellet mit Ethanol (75% v/v) gewaschen, getrocknet und in 50 μl H_2O resuspendiert. Wässrige RNA-Lösungen wurden bei -70°C gelagert.

IV.2.6 RNase Protection Assay (RPA)

Der *RNase protection assay* (Zinn *et al.*, 1983; Melton *et al.*, 1984) ist eine sensitive Methode zur Detektion und Quantifizierung von RNA. Die Methode beruht auf der Eigenschaft von Ribonuclease A und T1 einzelsträngige RNA, nicht jedoch vollständig Basen-gepaarte doppelsträngige RNA zu verdauen. Zunächst wird eine radioaktiv-markierte RNA-Sonde synthetisiert, die zu der analysierenden RNA komplementär ist. Diese Sonde wird mit der Proben-RNA (Gesamt-RNA) hybridisiert. Der anschließende RNase A/T1 Verdau führt zum Abbau der nicht-komplementären RNA sowie zum Abbau des Sondenüberschusses. Die geschützten Fragmente können von nicht vollständig verdauten bzw. partiell hybridisierten Sonden-Fragmente gelelektrophoretisch getrennt werden. Die entsprechenden Banden werden nach der Exposition des Gels über den Phosphorimager quantifiziert.

Synthese und Aufreinigung radioaktiv markierter RNA (Sonde)

Die spezifische Synthese einzelsträngiger RNA ist *in vitro* mit Hilfe von Bakteriophagen-codierten RNA-Polymerasen und geeigneten DNA-Vektoren (Plasmide) möglich (Melton *et al.*, 1984; Krieg & Melton, 1987). Zur *in vitro* Transkription eignet sich die SP6, T7 oder T3 RNA-Polymerase. Die Plasmide müssen die jeweiligen Promotor-Sequenzen vor den zu transkribierenden Abschnitten enthalten. Vor der *in vitro* Transkription wird das Plasmid linearisiert (Restriktionsspaltung); der Reaktionsabbruch ist dann durch das Ende des Plasmids festgelegt (*run off* Transkription). Die *in vitro* Transkription zur Herstellung von

RNA-Sonden mit einer spezifischen Aktivität von $6\text{-}9 \times 10^8$ cpm/ μg erfolgt bei limitierenden Konzentrationen eines markierten Nukleotids.

Die Reaktion wurde in einem Ansatz von 20 μl durchgeführt und enthielt folgende Komponenten: TSC-Puffer (1x), DTT (10 mM), 3NTP-Mix (0,5 mM), UTP (5 μM), Plasmid-DNA (linearisiert, 50 ng/ μl), RNasin (1 U/ μl), [$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]UTP (0,09 MBq/ μl) und T7 RNA-Polymerase (0,4 U/ μl). Nach einer Inkubation für 60 min bei 37°C wurde die Plasmid-DNA durch Zusatz von 20 U DNase I (RNase-frei) verdaut (15 min, 37°C). Zur Abtrennung der nicht-inkorporierten Nukleotide und der Proteine wurde die RNA durch eine Phenol/Chloroform Extraktion und eine sich anschließende Ethanol fällung gereinigt. Das RNA-Pellet wurde in Formamidladelösung aufgenommen, erhitzt (95°C, 2 min) und über ein denaturierendes Harnstoffgel (s.u.) weiter aufgereinigt. Die Position der Sonde im Gel wurde durch Kurzexposition bestimmt (2 min). Das entsprechende Gelstück wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Elution der Sonde erfolgte mit 300 μl Elutionspuffer R (4 h, Schüttler im Kühlraum). Der Radioaktivitätsgehalt wird mittels Cherenkov-Zählung bestimmt.

Hybridisierung

In ein Reaktionsgefäß wurden 8 μg Proben-RNA und $0,5 \times 10^5$ cpm der Sonde mit H_2O zu einem Volumen von 30 μl vereinigt. Durch Zugabe von 3 μl Ammoniumacetatlösung (5 M) und 85 μl Ethanol wurde die RNA gefällt (15 min, -70°C). Nach der Zentrifugation (Mikrozentrifuge, 13.000 rpm, 20 min, 4°C) wurde der Überstand abgenommen, das Pellet an der Luft getrocknet und anschließend in 20 μl Hybridisierungspuffer gelöst (Probe leicht erhitzen und vorsichtig mischen). Anschließend wurde die gelöste RNA denaturiert (10 min, 95°C) und zur Hybridisierung 16-24 h bei 45°C inkubiert.

Ribonukleaseverdau

Zu jeder Hybridisierungsreaktion wurden 300 μl A/T1 Verdau Puffer gegeben. Der Verdau erfolgt für 45 min bei 30°C. Die Reaktion wird durch Zugabe von 5 μl SDS (20%), 5 μl Proteinase K (10 mg/ml) und 25 μg Hefe-RNA gestoppt (30 min, 37°C). Anschliessend wurde die geschützte RNA mit PCI-Mix extrahiert aus der wässrigen Phase mit Ethanol gefällt. Nach der Zentrifugation (Mikrozentrifuge, 13.000 rpm, 4°C, 15 min) wurde das Pellet vorsichtig mit Ethanol (75% v/v) gewaschen und kurz an der Luft getrocknet. Dann wurde das Pellet in 20 μl RNA Ladepuffer aufgenommen und zur besseren Resuspension leicht erhitzt.

Gelanalyse (denaturierendes Polyacrylamidgel)

Denaturierende Polyacrylamidgele werden zur analytischen Trennung niedermolekularen Nukleinsäuregemischen und zur präparativen Reinigung von radioaktiv markierten Nukleinsäuren (s.o.) eingesetzt.

Es wurden Harnstoffgele (6 % Acrylamid) der Größe $42 \times 30 \times 0,8 \text{ cm}^3$ verwendet. Vor dem Probenauftrag wurde das Gel auf 50°C vorgewärmt (30 min, 70 W). Der Gellauf erfolgte dann bei 70 W für 2 h. Analytische Gele wurden getrocknet und einem Röntgenfilm exponiert. Die quantitative Auswertung erfolgte nach Screenexposition über einen Phosphorimager.

IV.2.7 Proteinbiochemische Methoden

Gesamtzellextrakte

Die bei -70°C gelagerten Zellpellets (4×10^7 Zellen) wurden auf Eis aufgetaut und mit 150 μl kaltem NP40-Lysepuffer (versetzt mit Proteaseinhibitoren) versetzt. Nach Inkubation auf Eis (30 min) wurden die Lysate durch Zentrifugation (Microzentrifuge, 13000 rpm, 25 min, 4°C) geklärt. Der Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt, und die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt. Alternativ wurden die Zellpellets mit SDS-Lysepuffer (200 μl) versetzt und 2 min zur Denaturierung der Proteine auf 95°C erhitzt. Die Proben wurden dann abgekühlt und zum Scheren der DNA mit Ultraschall behandelt (2mal 10s). Nach erneutem Erhitzen wurden die Lysate durch Zentrifugation geklärt und die Proteinkonzentration der Überstände bestimmt.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Bradford, 1976) beruht auf der Anfärbbarkeit von Proteinen durch den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250.

Je nach Proteingehalt wurden 2-10 μl Gesamtzellextrakt mit Bradfordreagenz (BioRad, 5x Konzentrat) versetzt. Nach 10 min Inkubation wurde die Absorbtion bei 595 nm bestimmt. Zur Kontrolle der Linearität des Assays und zur Ermittlung des Proteinkonzentration wurde gegen eine Standardreihe (BSA in Lysepuffer) gemessen.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der analytischen Trennung von Proteingemischen und erlaubt eine Abschätzung des Molekulargewichts. Die Beweglichkeit der Protein-SDS-Komplexe ist eine Funktion ihres Molekulargewichts (Laemmli, 1970).

Es wurden Gele der Größe $10 \times 8 \times 0,1 \text{ cm}^3$ verwendet. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen Probenpuffer L (NP-40 Lyse) bzw. Probenpuffer X (SDS Lyse) versetzt und bei 95°C 3 min erhitzt. Die Proteine wurden dann in einer diskontinuierlichen Elektrophorese (SDS-Laufpuffer) zunächst in einem Sammelgel (4% Acrylamid, pH 6,8) fokussiert und dann in einem Trenngel (10/12,5/15% Acrylamid, je nach Proteingröße, pH 8,8) aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei 30 mA (konstant).

Western-Blot

Proteine, die durch SDS-PAGE aufgetrennt wurden, können auf eine Membran transferiert werden (*blotting*) und sind dann zugänglich für eine Immundetektion [Tobwin, 1979]. Nach dem Blockieren unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran können die Proteine spezifisch durch zwei aufeinanderfolgende Antikörperbindungsschritte detektiert werden.

Nach der SDS-PAGE wurde die in Methanol aktivierte PVDF-Membran (1 min) mit Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Elektrobloß-Apparatur für 1 h bei 100 V unter Kühlung. Die Membran wurde dann auf einem Schwenktisch, wie bei allen weiteren Schritten, in Blockpuffer inkubiert (1 h). Anschliessend erfolgte die Inkubation mit einem spezifischen Antikörper (verdünnt in Blockpuffer). Nicht gebundener Antikörper wurde durch viermalige Inkubation in Waschpuffer für je 15 min entfernt. Dann folgte die Inkubation (1 h) mit einem in Blockpuffer verdünnten Peroxidasegekoppelten Zweitantikörper, der gegen den Erstantikörper gerichtet ist. Nach erneutem Waschen (viermal je 15 min) erfolgte die Detektion der Immunkomplexe über eine Chemilumineszenzreaktion. Dazu wurde die Membran mit 10 ml Detektionslösung bedeckt und 1 min inkubiert. Die feuchte Membran wurde dann in eine Filmkassette überführt, mit Folie bedeckt und einem Röntgenfilm exponiert (1-5 min).

IV.2.8 DNA-Fragmentierungsanalyse

Ein zentrales Ereignis des Apoptoseprogramms einer Zelle ist die Aktivierung einer spezifischen Endonuklease, die die genomische DNA internukleosomal in Fragmente von 180-200 bp oder Vielfachen davon schneidet (Wyllie, 1980). Diese Fragmente können in einem Agarosegel aufgetrennt werden und sind dann als DNA-Leiter sichtbar (*DNA laddering*).

Die Präparation der DNA erfolgte aus Zellpellets (4×10^6 Zellen). Die Pellets wurden mit 250 μ l Lysepuffer DL versetzt. Nach intensivem Mischen (Vortex) und Zusatz von 5 μ l Proteinase K (10 mg/ml) wurde für 6 h bei 50°C auf dem Schüttler inkubiert. Der Ansatz wurde dann zweimal mit Phenol (Tris-gesättigt) und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) extrahiert. Die DNA wurde dann aus der wässrigen Phase mit Ethanol präzipitiert. Nach Resuspension in TE⁺ (2h, 37°C, Schüttler) und photometrischer Konzentrationsbestimmung wurden 2,5 μ g DNA in einem Agarosegel aufgetrennt.

IV.2.9 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ist eine Laser-gestützte Technologie, die zur Messung charakteristischer Eigenschaften von Zellen eingesetzt wird. Neben Lichtstreuungseigenschaften können über optische Filter Fluoreszenzemissionen von entsprechend gefärbten Zellen erfasst werden. Die Analyse vieler tausend Zellen erfolgt dabei auf Einzelzellbasis und erlaubt Aussagen über die statistische Verteilung einer Eigenschaft.

Bestimmung des zellulären DNA-Gehalts

Die Diskriminierung von Zellen unterschiedlichen DNA Gehalts mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse der Zellzyklusverteilung und des Ploidiegrades von Zellpopulationen. Nach Färbung mit dem DNA Fluorochrom Propidiumiodid zeigen die aufgezeichneten Histogramme eine Population G_0/G_1 -Zellen mit einheitlichem, geringen DNA-Gehalt (G_0/G_1 -Peak) sowie eine Population mit dem doppelten DNA-Gehalt (G_2 -Peak). Zellen in der S-Phase weisen einen intermediären DNA-Gehalt auf und bilden eine Population zwischen den Peaks. Zellen höheren Ploidiegrades erscheinen in Bereichen jenseits des G_2 -Peaks.

Eine Modifikation des Standardprotokolls ermöglicht zusätzlich eine Erfassung apoptotischer Zellen. Apoptotische Zellen degradieren die genomische DNA mit einer spezifischen Endonuklease. Die dabei entstehenden Fragmente können leicht aus den Zellen extrahiert werden, so dass apoptotische Zellen als Population mit dem DNA-Gehalt kleiner als G_0/G_1 -Zellen erscheinen (sub- G_1 -Population).

Zur Bestimmung der sub- G_1 -Population wurden 4×10^6 Zellen pelletiert (250g, 5 min, 4°C) und mit kaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in 100 µl kaltem PBS resuspendiert. Unter leichter Bewegung (Vortex) wurde 1 ml Ethanol (80% v/v, -20°C) zugegeben. Zur vollständigen Fixierung wurden die Zellen mindestens 3 h bei -20°C gelagert. Nach Durchmischen der Suspension wurde ein Aliquot (400 µl) entnommen und pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 800 µl PI-Färbelösung resuspendiert und 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte über den 605/35 nm Bandpassfilter (FL3).

TUNEL-Immunphänotypisierung

Die durchflußzytometrische Erfassung apoptotischer Zellen kann neben der Bestimmung der sub G_1 -Population auch mit Hilfe der TUNEL-Methode erfolgen. Diese Methode hat den Vorteil mit einer Immunphänotypisierung kompatibel zu sein. Die TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP nick end labeling) basiert auf dem *tail labeling* der in apoptotischen Zellen erzeugten DNA-Strangbrüche. Dabei werden Desoxynucleotidderivate an die 3'OH-Enden mit Hilfe des Enzyms Terminale Desoxynukleotidyl Transferase angehängt. Die Verwendung von BrdUTP als Substrat und die anschließende Detektion mit Hilfe eines Fluoreszenzmarkierten anti-BrdU-Antikörpers führt zu einer verbesserten Sensitivität des Assays gegenüber dem Standardprotokoll (Li & Darzynkiewicz, 1995).

Die Färbung von intakten Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern wird zur Identifikation von Zelltypen innerhalb gemischter Zellpopulationen eingesetzt. Als Identifikationsmarker dienen geeignete Zelloberflächenantigene. Die Kopplung dieser Immunphänotypisierung mit der TUNEL-Methode ermöglicht Aussagen in welchen Zelltypen Apoptose stattfindet.

Es wurden 2×10^6 Zellen pelletiert (250g, 5 min, 4°C) und mit PBS-BSA gewaschen. Nach Vorinkubation (15 min, RT) der Zellen in 100 µl PBS-BSA mit Ratten IgG (200 µg/ml) wurde der Fluorochrom-gekoppelte Antikörper (1 µg/ 1×10^6 Zellen) zugesetzt. Der Inkubation

im Dunkeln (30 min, 4°C) folgten 3 Waschschritte mit PBS-BSA. Anschliessend wurde das Zellpellet in 100 µl PBS resuspendiert und mit 1 ml PBS-Formaldehyd versetzt. Zur Fixierung wurde 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde einmal mit PBS-BSA gewaschen, in 100 µl PBS resuspendiert und mit 1 ml Ethanol (80% v/v, -20°C) unter leichter Bewegung (Vortex) versetzt. Nach Inkubation für mindestens 3 h bei -20°C wurde zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden 40 µl TdT-Reaktionsmix zugegeben und bei 37°C unter leichtem Schütteln für 45 min inkubiert. Der Ansatz wurde anschliessend mit 500 µl PBS-BSA-T aufgefüllt und zentrifugiert. Zur Färbung wurden 20 µl BrdU-Färbemix (enthält Fluorescein-gekoppelten gegen BrdU-gerichteten Antikörper) zugegeben und im Dunkeln unter leichtem Schütteln inkubiert (RT, 30 min). Dann wurde der Ansatz mit 500 µl PBS aufgefüllt. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte zur Erfassung der TUNEL-positiven Zellen über den 505/25 nm Bandpassfilter (FL1) und über den 560/90 nm Bandpassfilter (FL2) zur Detektion der Immunophänotypisierung.

Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$

Die spezifische Messung des mitochondrialen Membranpotentials $\Delta\Psi_m$ erfolgt mit dem kationischen Farbstoff JC-1 (Reers *et al.*, 1991; Smiley *et al.*, 1991). JC-1 (5,5,6',6'-tetrachloro-1,1,3',3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanin-Iodid) zeigt grüne Fluoreszenz (Exzitationswellenlänge 490 nm, Emission 527 nm) in niedrigen Konzentrationen und rote Fluoreszenz (Exzitationswellenlänge 490 nm, Emission 590 nm) bei Akkumulation zu höheren Konzentrationen (Bildung sog. J-Aggregate). Die intramitochondriale Konzentration und damit die Fluoreszenz ist abhängig vom mitochondrialen Membranpotential. Daher zeigt sich eine Depolarisierung in einem Abfall des Verhältnis von rot/grüner Fluoreszenzintensität. Im Gegensatz zu anderen Farbstoffen wie DiOC₆ (3,3'-Dihexyloxocarbocyanin) zeichnet sich die JC-1 Färbung durch eine höhere Spezifität für das mitochondriale Membranpotential gegenüber dem Plasmamembranpotential aus (Salvioli *et al.*, 1997).

Zur Bestimmung von $\Delta\Psi_m$ wurden 4×10^6 Zellen mit JC-1 (5 µg/ml in PBS) im Dunkeln inkubiert (20 min, RT) und einmal mit PBS gewaschen. Die durchflußzytometrische Analyse erfolgte mit dem 505/25 nm (FL1) und dem 560/90 nm (FL2) Bandpassfilter.

V. Literatur

- Abrahamson, J.L.A., Lee, J.M. and Bernstein, A. (1995) Regulation of p53-mediated apoptosis and cell cycle arrest by steel factor. *Mol Cell Biol*, **15**, 6953-6960.
- Adams, J.M. and Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, **281**, 1322-6.
- Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Grosse, F., Kim, E., Wiesmüller, E. and Deppert, W. (1999) Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene*, **18**, 7706-7717.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. and Yuan, J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature [letter]. *Cell*, **87**, 171.
- Antonsson, B., Conti, F., Ciavatta, A., Montessuit, S., Lewis, S., Martinou, I., Bernasconi, L., Bernard, A., Mermod, J.J., Mazzei, G., Maundrell, K., Gambale, F., Sadoul, R. and Martinou, J.C. (1997) Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science*, **277**, 370-2.
- Asada, M., Yamada, T., Ichijo, H., Delia, D., Miyazono, K., Fukumuro, K. and Mizutani, S. (1999) Apoptosis inhibitory activity of cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) in monocytic differentiation. *Embo J*, **18**, 1223-34.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, **281**, 1305-8.
- Attardi, L.D., Lowe, S.W., Brugarolas, J. and Jacks, T. (1996) Transcriptional activation by p53, but not induction of the p21 gene, is essential for oncogene-mediated apoptosis. *Embo J*, **15**, 3693-3701.
- 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 [published erratum appears in *Genes Dev* 2000 Jul 15;14(14):1835]. *Genes Dev*, **14**, 704-18.
- Azam, M., Erdjument-Bromage, H., Kreider, B.L., Xia, M., Quelle, F., Basu, R., Saris, C., Tempst, P., Ihle, J.N. and Schindler, C. (1995) Interleukin-3 signals through multiple isoforms of Stat5. *Embo J*, **14**, 1402-11.
- Barkett, M. and Gilmore, T.D. (1999) Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*, **18**, 6910-24.
- Bates, S., Phillips, A.C., Clark, P.A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R.L. and Vousden, K.H. (1998) p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature*, **395**, 124-125.
- Beere, H.M., Wolf, B.B., Cain, K., Mosser, D.D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Taylor, P., Morimoto, R.I., Cohen, G.M. and Green, D.R. (2000) Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*, **2**, 469-75.
- Birboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-23.
- Bissonnette, N. and Hunting, D.J. (1998) p21-induced cycle arrest in G1 protects cells from apoptosis induced by UV-irradiation or RNA polymerase II blockage. *Oncogene*, **16**, 3461-9.
- Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G. and Thompson, C.B. (1993) bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*, **74**, 597-608.
- Boothby, M.R., Mora, A.L., Scherer, D.C., Brockman, J.A. and Ballard, D.W. (1997) Perturbation of the T lymphocyte lineage in transgenic mice expressing a constitutive repressor of nuclear factor (NF)-kappaB. *J Exp Med*, **185**, 1897-907.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-54.
- Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J.I., Beach, D., Jacks, T. and Hannon, G.J. (1995) Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21. *Nature*, **377**, 552-557.
- Buckbinder, L., Talbott, R., Velasco-Miguel, S., Takenaka, I., Faha, B., Seizinger, B.R. and Kley, N. (1995) Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature*, **377**, 646-649.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science*, **282**, 1497-1501.

- Caelles, C., Helmborg, A. and Karin, M. (1994) p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature*, **370**, 220-223.
- Cain, K., Bratton, S.B., Langlais, C., Walker, G., Brown, D.G., Sun, X.M. and Cohen, G.M. (2000) Apaf-1 oligomerizes into biologically active approximately 700-kDa and inactive approximately 1.4-MDa apoptosome complexes. *J Biol Chem*, **275**, 6067-70.
- Cain, K., Brown, D.G., Langlais, C. and Cohen, G.M. (1999) Caspase activation involves the formation of the apoptosome, a large (approximately 700 kDa) caspase-activating complex. *J Biol Chem*, **274**, 22686-92.
- Canman, C.E., Gilmer, T.M., Coutts, S.B. and Kastan, M.B. (1995) Growth factor modulation of p53-mediated growth arrest versus apoptosis. *Genes Dev.*, **9**, 600-611.
- Canman, C.E. and Kastan, M.B. (1998) Small contribution of G1 checkpoint control manipulation to modulation of p53-mediated apoptosis. *Oncogene*, **16**, 957-966.
- Chan, T.A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1999) 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage [see comments]. *Nature*, **401**, 616-20.
- Chao, C., Saito, S., Kang, J., Anderson, C.W., Appella, E. and Xu, Y. (2000) p53 transcriptional activity is essential for p53-dependent apoptosis following DNA damage [In Process Citation]. *Embo J*, **19**, 4967-75.
- Chen, C., Edelstein, L.C. and Gelinis, C. (2000) The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol*, **20**, 2687-95.
- Chen, J.D., Wu, X.W., Lin, J.Y. and Levine, A.J. (1996a) mdm-2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol*, **16**, 2445-2452.
- Chen, X.B., Ko, L.J., Jayaraman, L. and Prives, C. (1996b) p53 levels, functional domains, and Dna damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev*, **10**, 2438-2451.
- Chiou, S.K., Rao, L. and White, E. (1994) Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 2556-2563.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D. and Pavletich, N.P. (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: Understanding tumorigenic mutations. *Science*, **265**, 346-355.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-9.
- Clarke, A.R., Gledhill, S., Hopper, M.L., Bird, C.C. and Wyllie, A.H. (1994) p53 dependence of early apoptotic and proliferative responses within the mouse intestinal epithelium following gamma-irradiation. *Oncogene*, **9**, 1767-1773.
- Clarke, A.R., Purdie-C, A., Harrison, D.J., Morris, R.G., Bird, C.C., Hooper, M.L. and Wyllie, A.H. (1993) Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*, **362**, 849-852.
- Clore, G.M., Omichinski, J.G., Sakaguchi, K., Zambrano, N., Sakamoto, H., Appella, E. and Gronenborn, A.M. (1994) High-resolution structure of the oligomerization domain of p53 by multidimensional NMR [see comments] [published erratum appears in Science 1995 Mar 10;267(5203):1515]. *Science*, **265**, 386-91.
- Collins, M.K., Marvel, J., Malde, P. and Lopez-Rivas, A. (1992) Interleukin 3 protects murine bone marrow cells from apoptosis induced by DNA damaging agents. *J Exp Med*, **176**, 1043-51.
- Coudronniere, N., Villalba, M., Englund, N. and Altman, A. (2000) NF-kappa B activation induced by T cell receptor/CD28 costimulation is mediated by protein kinase C-theta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3394-9.
- Crawford, L.V., Pim, D.C., Gurney, E.G., Goodfellow, P. and Taylor-Papadimitriou, J. (1981) Detection of a common feature in several human tumor cell lines - a 53,000-dalton protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, **78**, 41-45.
- Cross, S.M., Sanchez, C.A., Morgan, C.A., Schimke, M.K., Ramel, S., Idzerda, R.L., Raskind, W.J. and Reid, B.J. (1995) A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science*, **267**, 1353-1356.
- Damalas, A., Ben-Ze'ev, A., Simcha, I., Shtutman, M., Leal, J.F., Zhurinsky, J., Geiger, B. and Oren, M. (1999) Excess beta-catenin promotes accumulation of transcriptionally active p53. *Embo J*, **18**, 3054-63.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. and Greenberg, M.E. (1997) Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*, **91**, 231-41.
- de Stanchina, E., McCurrach, M.E., Zindy, F., Shieh, S.Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A.V., Prives, C., Roussel, M.F., Sherr, C.J. and Lowe, S.W. (1998) E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev*, **12**, 2434-42.

- Debbas, M. and White, E. (1993) Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev*, **7**, 546-554.
- Delavaine, L. and La Thangue, N.B. (1999) Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1. *Oncogene*, **18**, 5381-92.
- Deng, C., Zhang, P., Harper, J.W., Elledge, S.J. and Leder, P. (1995) Mice lacking p21 cip1/waf1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell*, **82**, 675-684.
- Deng, Y. and Wu, X. (2000) Peg3/Pw1 promotes p53-mediated apoptosis by inducing bax translocation from cytosol to mitochondria [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12050-5.
- Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., MacArthur, M. J., Montgomery, C. A., Butel, J. S., Bradley, A. (1992) Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours *Nature*, **356**, 215-221
- Dosch, H.M., Schuurman, R.K. and Gelfand, E.W. (1980) Polyclonal activation of human lymphocytes in vitro-II. Reappraisal of T and B cell-specific mitogens. *J Immunol*, **125**, 827-32.
- Dulic, V., Kaufmann, W.K., Wilson, S.J., Tlsty, T.D., Lees, E., Harper, J.W., Elledge, S.J. and Reed, S.I. (1994) p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell*, **76**, 1013-1023.
- Dulic, V., Stein, G.H., Far, D.F. and Reed, S.I. (1998) Nuclear accumulation of p21Cip1 at the onset of mitosis: a role at the G2/M-phase transition. *Mol Cell Biol*, **18**, 546-57.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M. and Kaufmann, S.H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, **68**, 383-424.
- El-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1992) Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Gen*, **1**, 45-49.
- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, **75**, 817-825.
- Eliyahu, D., Raz, A., Gruss, P., Givol, D. and Oren, M. (1984) Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature*, **312**, 646-649.
- Epinat, J.C. and Gilmore, T.D. (1999) Diverse agents act at multiple levels to inhibit the Rel/NF-kappaB signal transduction pathway. *Oncogene*, **18**, 6896-909.
- Fontoura, B.M.A., Atienza, C.A., Sorokina, E.A., Morimoto, T. and Carroll, R.B. (1997) Cytoplasmic p53 polypeptide is associated with ribosomes. *Mol Cell Biol*, **17**, 3146-3154.
- Foo, S.Y. and Nolan, G.P. (1999) NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. *Trends Genet*, **15**, 229-35.
- Forrester, K., Ambs, S., Lupold, S.E., Kapust, R.B., Spillare, E.A., Weinberg, W.C., Felley-Bosco, E., Wang, X.W., Geller, D.A., Tzeng, E., Billiar, T.R. and Harris, C.C. (1996) Nitric oxide-induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 2442-2447.
- Friedlander, P., Haupt, Y., Prives, C. and Oren, M. (1996) A mutant p53 that discriminates between p53-responsive genes cannot induce apoptosis. *Mol Cell Biol*, **16**, 4961-4971.
- Fu, L.N., Minden, M.D. and Benchimol, S. (1996) Translational regulation of human p53 gene expression. *Embo J*, **15**, 4392-4401.
- Fuchs, E.J., McKenna, K.A. and Bedi, A. (1997) p53-dependent DNA damage-induced apoptosis requires Fas/APO-1-independent activation of CPP32beta. *Cancer Res*, **57**, 2550-4.
- Fujio, Y., Kunisada, K., Hirota, H., Yamauchi-Takahara, K. and Kishimoto, T. (1997) Signals through gp130 upregulate bcl-x gene expression via STAT1-binding cis-element in cardiac myocytes. *J Clin Invest*, **99**, 2898-905.
- Gao, C. and Tsuchida, N. (1999) Activation of caspases in p53-induced transactivation-independent apoptosis. *Jpn J Cancer Res*, **90**, 180-7.
- Gorospe, M., Cirielli, C., Wang, X.T., Seth, P., Capogrossi, M.C. and Holbrook, N.J. (1997) p21waf1/Cip1 protects against p53-mediated apoptosis of human melanoma cells. *Oncogene*, **14**, 929-935.
- Gorospe, M., Wang, X., Guyton, K.Z. and Holbrook, N.J. (1996) Protective role of p21(Waf1/Cip1) against prostaglandin A2-mediated apoptosis of human colorectal carcinoma cells. *Mol Cell Biol*, **16**, 6654-60.

- Graeber, T.G., Peterson, J.F., Tsai, M., Monica, K., Fornace, A.J.J. and Giaccia, A.J. (1994) Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol.Cell.Biol.*, **14**, 6264-6277.
- Green, D.R. and Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*, **281**, 1309-12.
- Gross, A., Jockel, J., Wei, M.C. and Korsmeyer, S.J. (1998) Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Embo J*, **17**, 3878-85.
- Gross, A., McDonnell, J.M. and Korsmeyer, S.J. (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 1899-911.
- Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G.S., Henderson, J.T., Woo, M., Soengas, M.S., Elia, A., de la Pompa, J.L., Kagi, D., Khoo, W., Potter, J., Yoshida, R., Kaufman, S.A., Lowe, S.W., Penninger, J.M. and Mak, T.W. (1998) Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell*, **94**, 339-52.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-80.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, M., Keyomarsi, K. and Elledge, S.J. (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, **75**, 805-816.
- Harper, J.W., Elledge, S.J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L.H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, L., Swindell, E. and et al. (1995) Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell*, **6**, 387-400.
- Harvey, K.J., Blomquist, J.F. and Ucker, D.S. (1998) Commitment and effector phases of the physiological cell death pathway elucidated with respect to Bcl-2 caspase, and cyclin-dependent kinase activities. *Mol Cell Biol*, **18**, 2912-22.
- Harvey, M., Vogel, H., Morris, D., Bradley, A., Bernstein, A. and Donehower, L.A. (1995) A mutant p53 transgene accelerates tumour development in heterozygous but not nullizygous p53-deficient mice. *Nature Genet.*, **9**, 305-311.
- Haupt, Y., Barak, Y. and Oren, M. (1996) Cell type-specific inhibition of p53-mediated apoptosis by mdm2. *Embo J*, **15**, 1596-1606.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. and Oren, M. (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, **387**, 296-299.
- Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Vousden, K.H. and Oren, M. (1995) Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev*, **9**, 2170-2183.
- Hawrylowicz, C.M. and Klaus, G.G. (1984) Activation and proliferation signals in mouse B cells. IV. Concanavalin A stimulates B cells to leave G0, but not to proliferate. *Immunology*, **53**, 703-11.
- Hehner, S.P., Hofmann, T.G., Droge, W. and Schmitz, M.L. (1999) The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-kappa B by targeting the I kappa B kinase complex. *J Immunol*, **163**, 5617-23.
- Hermeking, H. and Eick, D. (1994) Mediation of c-myc-induced apoptosis by p53. *Science*, **265**, 2091-2093.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1997) 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell*, **1**, 3-11.
- Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M.S., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R. and Harris, C.C. (1994) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*, **22**, 3551-3555.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C.C. (1991) p53 mutations in human cancers. *Science*, **253**, 49-53.
- Honda, R., Tanaka, H. and Yasuda, H. (1997) Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett*, **420**, 25-27.
- Honda, R. and Yasuda, H. (1999) Association of p19ARF with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *Embo J*, **18**, 22-27.
- Hsu, Y.T., Wolter, K.G. and Youle, R.J. (1997) Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3668-72.
- Hupp, T.R. and Lane, D.P. (1994) Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Curr. Biol.*, **4**, 865-875.
- Innocente, S.A., Abrahamson, J.L., Cogswell, J.P. and Lee, J.M. (1999) p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 2147-52.

- Jeffrey, P.D., Gorina, S. and Pavletich, N.P. (1995) Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science*, **267**, 1498-1502.
- Jimenez, G.S., Nister, M., Stommel, J.M., Beeche, M., Barcarse, E.A., Zhang, X.Q., O'Gorman, S. and Wahl, G.M. (2000) A transactivation-deficient mouse model provides insights into trp53 regulation and function [In Process Citation]. *Nat Genet*, **26**, 37-43.
- Johnson, T.M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Lowenstein, R.A. and Finkel, T. (1996) Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 11848-11852.
- Jurgensmeier, J.M., Xie, Z., Deveraux, Q., Ellerby, L., Bredesen, D. and Reed, J.C. (1998) Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 4997-5002.
- Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Craig, R.W. (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*, **51**, 6304-6311.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26**, 239-57.
- Kim, E., Albrechtsen, N. and Deppert, W. (1997) DNA-conformation is an important determinant of sequence-specific DNA binding by tumor suppressor p53. *Oncogene*, **15**, 857-869.
- Kim, E., Rohaly, G., Heinrichs, S., Gimnopoulos, D., Meibner, H. and Deppert, W. (1999) Influence of promoter DNA topology on sequence-specific DNA binding and transactivation by tumor suppressor p53. *ONCOGENE*, **18**, 7310-18.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J*, **14**, 5579-88.
- Knudson, C.M., Tung, K.S., Tourtellotte, W.G., Brown, G.A. and Korsmeyer, S.J. (1995) Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science*, **270**, 96-9.
- Kraiss, S., Quaiser, A., Oren, M. and Montenarh, M. (1988) Oligomerization of oncoprotein p53. *J. Virol.*, **62**, 4737-4744.
- Krajewski, S., Krajewska, M., Shabaik, A., Wang, H.G., Irie, S., Fong, L. and Reed, J.C. (1994) Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of Bcl-X expression. *Cancer Res*, **54**, 5501-7.
- Kress, M., May, E., Cassingena, R. and May, P. (1979) Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J. Virol.*, **31**, 472-483.
- Krieg, P.A. and Melton, D.A. (1987) In vitro RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. *Methods Enzymol*, **155**, 397-415.
- Kroemer, G., Zamzami, N. and Susin, S.A. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today*, **18**, 44-51.
- Kubbutat, M.H.G., Jones, S.N. and Vousden, K.H. (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, **387**, 299-303.
- Kuida, K., Haydar, T.F., Kuan, C.Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M.S., Rakic, P. and Flavell, R.A. (1998) Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell*, **94**, 325-37.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Lallena, M.J., Diaz-Meco, M.T., Bren, G., Paya, C.V. and Moscat, J. (1999) Activation of IkappaB kinase beta by protein kinase C isoforms. *Mol Cell Biol*, **19**, 2180-8.
- Lambert, P.F., Kashanchi, F., Radonovich, M.F., Shiekhattar, R. and Brady, J.N. (1998) Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP. *J Biol Chem*, **273**, 33048-33053.
- Lane, D.P. and Crawford, L.V. (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, **278**, 261-263.
- Lee, H.H., Dadgostar, H., Cheng, Q., Shu, J. and Cheng, G. (1999) NF-kappaB-mediated up-regulation of Bcl-x and Bfl-1/A1 is required for CD40 survival signaling in B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9136-41.
- Lee, J.M. (1998) Inhibition of p53-dependent apoptosis by the KIT tyrosine kinase: regulation of mitochondrial permeability transition and reactive oxygen species generation. *Oncogene*, **17**, 1653-62.

- Levkau, B., Koyama, H., Raines, E.W., Clurman, B.E., Herren, B., Orth, K., Roberts, J.M. and Ross, R. (1998) Cleavage of p21Cip1/Waf1 and p27Kip1 mediates apoptosis in endothelial cells through activation of Cdk2: role of a caspase cascade. *Mol Cell*, **1**, 553-63.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. and Yuan, J. (1998) Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, **94**, 491-501.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. and Wang, X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**, 479-89.
- Li, P.F., Dietz, R. and von Harsdorf, R. (1999) p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2. *Embo J*, **18**, 6027-36.
- Li, X. and Darzynkiewicz, Z. (1995) Labelling DNA strand breaks with BrdUTP. Detection of apoptosis and cell proliferation. *Cell Prolif*, **28**, 571-9.
- Lin, X., O'Mahony, A., Mu, Y., Geleziunas, R. and Greene, W.C. (2000a) Protein kinase C-theta participates in NF-kappaB activation induced by CD3-CD28 costimulation through selective activation of IkappaB kinase beta. *Mol Cell Biol*, **20**, 2933-40.
- Lin, Y., Ma, W. and Benchimol, S. (2000b) Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis [In Process Citation]. *Nat Genet*, **26**, 122-7.
- Lin, Y.P. and Benchimol, S. (1995) Cytokines inhibit p53-mediated apoptosis but not p53-mediated G1 arrest. *Mol Cell Biol*, **15**, 6045-6054.
- Linke, S.P., Clarkin, K.C., Di Leonardo, A., Tsou, A. and Wahl, G.M. (1996) A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes Dev*, **10**, 934-947.
- Linzer, D.I.H. 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.
- Lotem, J. and Sachs, L. (1993) Hematopoietic cells from mice deficient in wild-type p53 are more resistant to induction of apoptosis by some agents. *Blood*, **82**, 1092-1096.
- Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A. and Jacks, T. (1993) p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, **362**, 847-849.
- Lu, H. and Levine, A.J. (1995) Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 5154-5158.
- Lu, Y., Yamagishi, N., Yagi, T. and Takebe, H. (1998) Mutated p21(WAF1/CIP1/SDI1) lacking CDK-inhibitory activity fails to prevent apoptosis in human colorectal carcinoma cells. *Oncogene*, **16**, 705-12.
- Ludwig, R.L., Bates, S. and Vousden, K.H. (1996) Differential activation of target cellular promoters by p53 mutants with impaired apoptotic function. *Mol Cell Biol*, **16**, 4952-4960.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. and Wang, X. (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, **94**, 481-90.
- Luo, Y., Hurwitz, J. and Massague, J. (1995) Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature*, **375**, 159-61.
- Maki, C.G., Huijbrechtse, J.M. and Howley, P.M. (1996) In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53. *Cancer Res*, **56**, 2649-2654.
- Maltzman, W. and Czyzyk, L. (1984) UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.*, **4**, 1689-1694.
- Marchenko, N.D., Zaika, A. and Moll, U.M. (2000) Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem*, **275**, 16202-12.
- McCurrach, M.E., Connor, T.M., Knudson, C.M., Korsmeyer, S.J. and Lowe, S.W. (1997) bax-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2345-9.
- Medema, R.H., Klompmaker, R., Smits, V.A. and Rijksen, G. (1998) p21waf1 can block cells at two points in the cell cycle, but does not interfere with processive DNA-replication or stress-activated kinases. *Oncogene*, **16**, 431-41.
- Meek, D.W. (1999) Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene*, **18**, 7666-75.

- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. and Green, M.R. (1984) Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res*, **12**, 7035-56.
- Minn, A.J., Velez, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M. and Thompson, C.B. (1997) Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*, **385**, 353-7.
- Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M. and Reed, J.C. (1994) Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res*, **54**, 3131-3135.
- Miyashita, T. and Reed, J.C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, **80**, 293-299.
- Momand, J., Zambetti, G.P., Olson, D.C., George, D. and Levine, A.J. (1992) The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, **69**, 1237-1245.
- Morgan, D.O. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **13**, 261-91.
- Mosner, J., Mummenbrauer, T., Bauer, C., Szakiel, G., Grosse, F. and Deppert, W. (1995) Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *EMBO J.*, **14**, 4442-4449.
- Mui, A.L., Wakao, H., O'Farrell, A.M., Harada, N. and Miyajima, A. (1995) Interleukin-3, granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-5 transduce signals through two STAT5 homologs. *Embo J*, **14**, 1166-75.
- Muller, M., Strand, S., Hug, H., Heinemann, E.M., Walczak, H., Hofmann, W.J., Stremmel, W., Krammer, P.H. and Galle, P.R. (1997) Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest*, **99**, 403-13.
- Mummenbrauer, T., Janus, F., Mueller, B., Wiesmueller, L., Deppert, W. and Grosse, F. (1996) p53 protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell*, **85**, 1089-1099.
- Muzio, M., Stockwell, B.R., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S. and Dixit, V.M. (1998) An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem*, **273**, 2926-30.
- Nagata, S. (1997) Apoptosis by death factor. *Cell*, **88**, 355-65.
- Newton, K. and Strasser, A. (2000) Ionizing radiation and chemotherapeutic drugs induce apoptosis in lymphocytes in the absence of Fas or FADD/MORT1 signaling. Implications for cancer therapy. *J Exp Med*, **191**, 195-200.
- Niculescu, A.B., 3rd, Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C. and Reed, S.I. (1998) Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication [published erratum appears in Mol Cell Biol 1998 Mar;18(3):1763]. *Mol Cell Biol*, **18**, 629-43.
- Oberosler, P., Hloch, P., Ramsperger, U. and Stahl, H. (1993) p53-catalyzed annealing of complementary single-stranded nucleic acids. *EMBO J.*, **12**, 2389-2396.
- O'Connor, L., Harris, A.W. and Strasser, A. (2000) CD95 (Fas/APO-1) and p53 signal apoptosis independently in diverse cell types. *Cancer Res*, **60**, 1217-20.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T. and Tanaka, N. (2000a) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, **288**, 1053-8.
- Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y. and Taya, Y. (2000b) p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53 [In Process Citation]. *Cell*, **102**, 849-62.
- Ohnishi, T., Wang, X., Ohnishi, K., Matsumoto, H. and Takahashi, A. (1996) p53-dependent induction of WAF1 by heat treatment in human glioblastoma cells. *J Biol Chem*, **271**, 14510-3.
- Oliner, J.D., Pietenpol, J.A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1993) Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature*, **362**, 857-60.
- Ottillie, S., Diaz, J.L., Horne, W., Chang, J., Wang, Y., Wilson, G., Chang, S., Weeks, S., Fritz, L.C. and Oltersdorf, T. (1997) Dimerization properties of human BAD. Identification of a BH-3 domain and analysis of its binding to mutant BCL-2 and BCL-XL proteins. *J Biol Chem*, **272**, 30866-72.
- Owen-Schaub, L.B., Zhang, W., Cusack, J.C., Angelo, L.S., Santee, S.M., Fujiwara, T., Roth, J.A., Deisseroth, A.B., Zhang, W.W., Kruzel, E. and et al. (1995) Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol Cell Biol*, **15**, 3032-40.

- Palmero, I., Pantoja, C. and Serrano, M. (1998) p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature*, **395**, 125-126.
- Pan, H., Yin, C., Dyson, N.J., Harlow, E., Yamasaki, L. and Van Dyke, T. (1998) Key roles for E2F1 in signaling p53-dependent apoptosis and in cell division within developing tumors. *Mol Cell*, **2**, 283-92.
- Peng, C.Y., Graves, P.R., Thoma, R.S., Wu, Z., Shaw, A.S. and Piwnicka-Worms, H. (1997) Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216 [see comments]. *Science*, **277**, 1501-5.
- Perry, M.E., Piette, J., Zawadzki, J.A., Harvey, D. and Levine, A.J. (1993) The mdm-2 gene is induced in response to UV light in a p53-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, **90**, 11623-11627.
- Pierce, A.M., Gimenez-Conti, I.B., Schneider-Broussard, R., Martinez, L.A., Conti, C.J. and Johnson, D.G. (1998) Increased E2F1 activity induces skin tumors in mice heterozygous and nullizygous for p53. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 8858-8863.
- Pietenpol, J.A., Tokino, T., Thiagalingam, S., El-Deiry, W.S., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1994) Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, **91**, 1998-2002.
- Polyak, K., Waldman, T., He, T.C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1996) Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes Dev*, **10**, 1945-1952.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1997) A model for p53-induced apoptosis [see comments]. *Nature*, **389**, 300-5.
- 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**, 713-23.
- Prisco, M., Hongo, A., Rizzo, M.G., Sacchi, A. and Baserga, R. (1997) The insulin-like growth factor I receptor as a physiologically relevant target of p53 in apoptosis caused by interleukin-3 withdrawal. *Mol Cell Biol*, **17**, 1084-92.
- Quelle, F.W., Wang, J.L., Feng, J., Wang, D.M., Cleveland, J.L., Ihle, J.N. and Zambetti, G.P. (1998) Cytokine rescue of p53-dependent apoptosis and cell cycle arrest is mediated by distinct Jak kinase signaling pathways. *Genes Dev*, **12**, 1099-1107.
- Reers, M., Smith, T.W. and Chen, L.B. (1991) J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry*, **30**, 4480-6.
- Relaix, F., Wei, X., Li, W., Pan, J., Lin, Y., Bowtell, D.D., Sassoon, D.A. and Wu, X. (2000) Pw1/Peg3 is a potential cell death mediator and cooperates with Siah1a in p53-mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 2105-10.
- Rogel, A., Popliker, M., Webb, C.G. and Oren, M. (1985) p53 cellular tumor antigen: analysis of mRNA levels in normal adult tissues, embryos, and tumors. *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 2851-2855.
- Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B. and Borner, C. (1998) Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c [see comments]. *Nature*, **391**, 496-9.
- Rowan, S., Ludwig, R.L., Haupt, Y., Bates, S., Lu, X., Oren, M. and Vousden, K.H. (1996) Specific loss of apoptotic but not cell-cycle arrest function in a human tumor derived p53 mutant. *Embo J*, **15**, 827-838.
- Ryan, K.M. and Vousden, K.H. (1998) Characterization of structural p53 mutants which show selective defects in apoptosis but not cell cycle arrest. *Mol Cell Biol*, **18**, 3692-3698.
- Sabbatini, P., Lin, J.Y., Levine, A.J. and White, E. (1995) Essential role for p53-mediated transcription in E1A-induced apoptosis. *Genes Dev*, **9**, 2184-2192.
- Sabbatini, P. and McCormick, F. (1999) Phosphoinositide 3-OH kinase (PI3K) and PKB/Akt delay the onset of p53-mediated, transcriptionally dependent apoptosis. *J Biol Chem*, **274**, 24263-9.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-91.
- Sakaguchi, K., Herrera, J.E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C.W. and Appella, E. (1998) DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev*, **12**, 2831-2841.
- Sakamuro, D., Sabbatini, P., White, E. and Prendergast, G.C. (1997) The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene*, **15**, 887-898.

- Salvioli, S., Ardizzoni, A., Franceschi, C. and Cossarizza, A. (1997) JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett*, **411**, 77-82.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-7.
- Sanz, L., Sanchez, P., Lallena, M.J., Diaz-Meco, M.T. and Moscat, J. (1999) The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF-kappaB activation. *Embo J*, **18**, 3044-53.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1998) Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J*, **17**, 1675-87.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S.J., Krammer, P.H. and Peter, M.E. (1999) Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem*, **274**, 22532-8.
- Schendel, S.L., Xie, Z., Montal, M.O., Matsuyama, S., Montal, M. and Reed, J.C. (1997) Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 5113-8.
- Schuler, M., Bossy-Wetzel, E., Goldstein, J.C., Fitzgerald, P. and Green, D.R. (2000) p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *J Biol Chem*, **275**, 7337-42.
- Sears, L.E., Moran, L.S., Kissinger, C., Creasey, T., Perry-O'Keefe, H., Roskey, M., Sutherland, E. and Slatko, B.E. (1992) Circumvent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase. *Biotechniques*, **13**, 626-33.
- 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.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben-Ze'ev, A. and Rotter, V. (1990) Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 6565-6577.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Tosky, M.S., Levine, A.J. and Rotter, V. (1991) Nuclear localization is essential for the activity of p53 protein. *Oncogene*, **6**, 2055-2065.
- Shaw, P., Bovey, R., Tardy, S., Sahli, R., Sordat, B. and Costa, J. (1992) Induction of apoptosis by wild-type p53 in a human colon tumor-derived cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, **89**, 4495-4499.
- Shim, J., Lee, H., Park, J., Kim, H. and Choi, E.J. (1996) A non-enzymatic p21 protein inhibitor of stress-activated protein kinases. *Nature*, **381**, 804-6.
- Shimizu, S., Narita, M. and Tsujimoto, Y. (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC [see comments]. *Nature*, **399**, 483-7.
- Sionov, R.V. and Haupt, Y. (1999) The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*, **18**, 6145-57.
- Smiley, S.T., Reers, M., Mottola-Hartshorn, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T.W., Steele, G.D., Jr. and Chen, L.B. (1991) Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3671-5.
- Smith, C.A., Farrah, T. and Goodwin, R.G. (1994) The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*, **76**, 959-62.
- Socolovsky, M., Fallon, A.E., Wang, S., Brugnara, C. and Lodish, H.F. (1999) Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell*, **98**, 181-91.
- 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, p14ARF, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *Embo J*, **17**, 5001-5014.
- Sun, Z., Arendt, C.W., Ellmeier, W., Schaeffer, E.M., Sunshine, M.J., Gandhi, L., Annes, J., Petrzilka, D., Kupfer, A., Schwartzberg, P.L. and Littman, D.R. (2000) PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes. *Nature*, **404**, 402-7.
- Suzuki, A., Tsutomi, Y., Akahane, K., Araki, T. and Miura, M. (1998) Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. *Oncogene*, **17**, 931-9.
- Suzuki, A., Tsutomi, Y., Miura, M. and Akahane, K. (1999) Caspase 3 inactivation to suppress Fas-mediated apoptosis: identification of binding domain with p21 and ILP and inactivation machinery by p21. *Oncogene*, **18**, 1239-44.

- Tamatani, M., Che, Y.H., Matsuzaki, H., Ogawa, S., Okado, H., Miyake, S., Mizuno, T. and Tohyama, M. (1999) Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFkappaB activation in primary hippocampal neurons. *J Biol Chem*, **274**, 8531-8.
- Tartaglia, L.A., Ayres, T.M., Wong, G.H. and Goeddel, D.V. (1993) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, **74**, 845-53.
- Thomas, A. and White, E. (1998) Suppression of the p300-dependent mdm2 negative-feedback loop induces the p53 apoptotic function. *Genes Dev*, **12**, 1975-1985.
- Thornberry, N.A., Rano, T.A., Peterson, E.P., Rasper, D.M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V.M., Nordstrom, P.A., Roy, S., Vaillancourt, J.P., Chapman, K.T. and Nicholson, D.W. (1997) A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem*, **272**, 17907-11.
- Thut, C.J., Chen, J.-L., Klemm, R. and Tjian, R. (1995) p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science*, **267**, 100-104.
- Tobwin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad sci U S A*, **76**, 8386-90
- Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K.M. and Krammer, P.H. (1989) Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science*, **245**, 301-5.
- Tsukahara, T., Kannagi, M., Ohashi, T., Kato, H., Arai, M., Nunez, G., Iwanaga, Y., Yamamoto, N., Ohtani, K., Nakamura, M. and Fujii, M. (1999) Induction of Bcl-x(L) expression by human T-cell leukemia virus type 1 Tax through NF-kappaB in apoptosis-resistant T-cell transfectants with Tax. *J Virol*, **73**, 7981-7.
- Tumang, J.R., Owyang, A., Andjelic, S., Jin, Z., Hardy, R.R., Liou, M.L. and Liou, H.C. (1998) c-Rel is essential for B lymphocyte survival and cell cycle progression. *Eur J Immunol*, **28**, 4299-312.
- Venot, C., Maratrat, M., Dureuil, C., Conseiller, E., Bracco, L. and Debussche, L. (1998) The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *Embo J*, **17**, 4668-4679.
- Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D. and Stillman, B. (1994) The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA [see comments]. *Nature*, **369**, 574-8.
- Wagner, A.J., Kokontis, J.M. and Hay, N. (1994) Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21waf1/cip1. *Genes Dev*, **8**, 2817-30.
- Wahl, C., Liptay, S., Adler, G. and Schmid, R.M. (1998) Sulfasalazine: a potent and specific inhibitor of nuclear factor kappa B. *J Clin Invest*, **101**, 1163-74.
- Waldman, T., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1995) p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res*, **55**, 5187-5190.
- Walker, K.K. and Levine, A.J. (1996) Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 15335-15340.
- Wang, C.Y., Guttridge, D.C., Mayo, M.W. and Baldwin, A.S., Jr. (1999) NF-kappaB induces expression of the Bcl-2 homologue A1/Bfl-1 to preferentially suppress chemotherapy-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, **19**, 5923-9.
- Wang, J. and Walsh, K. (1996) Resistance to apoptosis conferred by Cdk inhibitors during myocyte differentiation. *Science*, **273**, 359-61.
- Wang, X.W., Vermeulen, W., Coursen, J.D., Gibson, M., Lupold, S.E., Forrester, K., Xu, G.W., Elmore, L., Yeh, H., Hoeijmakers, J.H.J. and Harris, C.C. (1996) The XPB and XPD DNA helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway. *Genes Dev*, **10**, 1219-1232.
- Wolf, D., Harris, N. and Rotter, V. (1984) Reconstitution of p53 expression in a nonproducer Ab-MuLV-transformed cell line by transfection of a functional p53 gene. *Cell*, **38**, 119-126.
- Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G. and Youle, R.J. (1997) Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J Cell Biol*, **139**, 1281-92.
- Wu, G.S., Burns, T.F., McDonald, E.R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I.D., Kao, G., Gan, D.D., Zhou, J.Y., Muschel, R., Hamilton, S.R., Spinner, N.B., Markowitz, S., Wu, G. and el-Deiry, W.S. (1997) KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene [letter]. *Nat Genet*, **17**, 141-3.

- Wu, G.S., Burns, T.F., McDonald, E.R., 3rd, Meng, R.D., Kao, G., Muschel, R., Yen, T. and el-Deiry, W.S. (1999) Induction of the TRAIL receptor KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis but not growth arrest. *Oncogene*, **18**, 6411-8.
- Wu, L. and Levine, A.J. (1997) Differential regulation of the p21/WAF-1 and mdm2 genes after high-dose UV irradiation: p53-dependent and p53-independent regulation of the mdm2 gene. *Mol Med*, **3**, 441-51.
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D. and Levine, A.J. (1993) The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*, **7**, 1126-2232.
- Wu, X. and Levine, A.J. (1994) p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, **91**, 3602-3606.
- Wyllie, A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, **284**, 555-6.
- Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. and Beach, D. (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, **366**, 701-704.
- Yew, P.R. and Berk, A.J. (1992) Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature*, **357**, 82-85.
- Yin, C., Knudson, C.M., Korsmeyer, S.J. and Van Dyke, T. (1997) Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo. *Nature*, **385**, 637-40.
- Yonehara, S., Ishii, A. and Yonehara, M. (1989) A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med*, **169**, 1747-56.
- Yonish-Rouach, E., Grunwald, D., Wilder, S., Kimchi, A., May, E., Lawrence, J.J., May, P. and Oren, M. (1993) p53-mediated cell death: Relationship to cell cycle control. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 1415-1423.
- Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A. and Oren, M. (1991) Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*, **352**, 345-347.
- Yoshida, H., Kong, Y.Y., Yoshida, R., Elia, A.J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J.M. and Mak, T.W. (1998) Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell*, **94**, 739-50.
- Zha, J., Harada, H., Osipov, K., Jockel, J., Waksman, G. and Korsmeyer, S.J. (1997) BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *J Biol Chem*, **272**, 24101-4.
- Zha, J., Harada, H., Yang, E., Jockel, J. and Korsmeyer, S.J. (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L) [see comments]. *Cell*, **87**, 619-28.
- Zhan, Q., Antinore, M.J., Wang, X.W., Carrier, F., Smith, M.L., Harris, C.C. and Fornace, A.J., Jr. (1999) Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene*, **18**, 2892-900.
- Zhan, Q., Fan, S., Bae, I., Guillof, C., Liebermann, D.A., O'Connor, P.M. and Fornace Jr., A.J. (1994) Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene*, **9**, 3743-3751.
- Zhang, H., Hannon, G.J. and Beach, D. (1994) p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev*, **8**, 1750-8.
- Zhou, B.B., Li, H., Yuan, J. and Kirschner, M.W. (1998) Caspase-dependent activation of cyclin-dependent kinases during Fas-induced apoptosis in Jurkat cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6785-90.
- Ziegler, A., Jonason, A.S., Leffell, D.J., Simon, J.A., Sharma, H.W., Kimmelman, J., Remington, L., Jacks, T. and Brash, D.E. (1994) Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*, **372**, 773-776.
- Zindy, F., Eischen, C.M., Randle, D.H., Kamijo, T., Cleveland, J.L., Sherr, C.J. and Roussel, M.F. (1998) Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev*, **12**, 2424-2433.
- Zinn, K., DiMaio, D. and Maniatis, T. (1983) Identification of two distinct regulatory regions adjacent to the human beta-interferon gene. *Cell*, **34**, 865-79.
- Zong, W.X., Edelstein, L.C., Chen, C., Bash, J. and Gelinas, C. (1999) The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev*, **13**, 382-7.

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. and Wang, X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3 [see comments]. *Cell*, **90**, 405-13.

Anhang

Verzeichnis der Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BrdUTP	5-Bromo-2'-desoxyuridintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	<i>copy</i> DNA
ConA	Concanavalin A
cpm	<i>counts per minute</i>
CTP	Cytidintriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTPs	Didesoxynukleotide
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotide
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
FCS	fötales Kälberserum
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
Iono	Ionomycin
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-(2-ethansulfonsäure)
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen pro minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-gekoppelte PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethylethylen-diamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
TUNEL	TdT-mediated dUTP <i>nick end labeling</i>
U	Unit(s)
ÜNK	Übernachtkultur
UTP	Uridintriphosphat
wt	Wildtyp

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Heinrich-Pette Institut für Experimentelle Virologie und Immunologie (HPI) in der Abteilung Tumorstammiologie angefertigt.

Dem Abteilungsleiter Herrn Prof. Dr. W. Deppert möchte ich an erster Stelle danken für seine stetige Diskussionsbereitschaft und kompetente Betreuung sowie für die Bereitstellung aller Geräte und Materialien, inklusive spezieller knockout Mausstämme.

Mein Dank gilt darüber hinaus allen Mitarbeitern der Abteilung, insbesondere Ella Kim und Gabor Rohaly, die über exzellente fachliche Kompetenzen verfügen.

Herrn Prof. Dr. W. Müller möchte ich danken für die Übernahme der Betreuung vonseiten der Universität Hannover und des Zentrums Biochemie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner versichere ich, dass ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren zu eröffnen.

Hamburg, 08.01.2001

Stefan Heinrichs