

**Selektivität der p53-Antwort auf
genotoxischen Streß**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Daniel Speidel

geboren am 20.07.1973

in Bonn

2004

Referent: Prof. Dr. Walter Müller
Korreferent: Prof. Dr. Wolfgang Deppert
Tag der Promotion: 02. August 2004

Wer eine Sache will ergründen,
muß, mein ich, Phantasie entbinden,
muß ahnen, spielen, muß erfinden.
Und führt kein gerader Weg zum Ziel,
der andern Wege sind so viel.

Galileo Galilei

Zusammenfassung

Der Tumorsuppressor p53 spielt eine zentrale Rolle in der zellulären Reaktion auf genotoxischen Streß. Aktiviert durch DNA-Schäden induziert p53 zwei unterschiedliche zelluläre Reaktionen: Zellzyklusarrest oder Apoptose. In einem Fall wird die geschädigte Zelle am Leben erhalten, im anderen Fall durch den kontrollierten Zelltod zerstört. Was die Entscheidung zwischen diesen beiden konträren Szenarien bestimmt, ist trotz intensivster Forschung noch immer nicht verstanden.

Im Zentrum dieser Arbeit stand die Analyse, wie die unterschiedlichen Signale von p53 nach genotoxischem Streß integriert werden und die Selektivität der p53-vermittelten Schadensreaktion erreicht wird. Hauptziel dabei war, Aufschluß über die molekularen Mechanismen zu erhalten, auf denen die Entscheidung zwischen p53-abhängigem Zellzyklusarrest und p53-abhängiger Apoptose beruht.

Das experimentelle System bei den hier vorgelegten Untersuchungen bildeten etablierte Maus-Fibroblasten-Zelllinien, die mit UV- und Gamma-Bestrahlung geschädigt wurden. Je nach Bestrahlungsart und -dosis konnten so gezielt verschiedene Schadensreaktionen in den Zellen induziert werden. Durch systematischen Vergleich der p53-abhängigen Signale in den verschiedenen bestrahlten Zellen wurden Parameter der p53-Aktivität identifiziert und charakterisiert, die verantwortlich für die Selektivität der zellulären Reaktion auf genotoxischen Streß sind.

Wie die hier vorgelegten Daten zeigen, ist die Selektivität der p53-Antwort auf genotoxischen Streß Resultat eines Zusammenspiels transkriptioneller und nicht-transkriptioneller Aktivitäten des Tumorsuppressors. Dabei beruht die Zellzyklus-regulierende und anti-apoptotische Wirkung von p53 auf einer transkriptionellen Aktivität. Eine differentielle Induktion pro- und anti-apoptotischer Zielgene konnte jedoch nicht beobachtet werden. Für die Induktion von Apoptose hingegen scheinen vor allem nicht-transkriptionelle Aktivitäten entscheidend zu sein, deren differentielle Regulation hier erstmals gezeigt werden konnte. So wurden die p53-Proteinmenge und die Aktivierung von Bax als Determinanten der p53-abhängigen Apoptose identifiziert.

Untersuchungen von Zellen, die mutiertes p53 exprimieren, ergaben, daß die Fähigkeit der Bax-Aktivierung in einigen transkriptionell-inaktiven mutierten p53 Proteinen erhalten ist. Die Expression solcher mut p53 Proteine macht Zellen besonders sensitiv gegenüber DNA-Schäden und deutet auf eine potentiell onkogene Wirkung derartiger mut p53 Proteine hin.

Mit der Identifizierung differentiiell regulierter Parameter der p53-Aktivität erbringen die hier vorgelegten Untersuchungen den Beweis dafür, daß p53 selbst und nicht andere Faktoren die Selektivität der zellulären Reaktion auf genotoxischen Streß steuert. Der Befund, daß die pro-apoptotische Wirkung von p53 vor allem auf nicht-transkriptionellen Mechanismen beruht, ist überraschend und zeigt zum ersten Mal eine physiologische Relevanz solcher Aktivitäten sowie deren *in vivo* Regulation.

Schlagworte: p53; DNA-Schäden; Apoptose; Zellzyklusarrest

Abstract

The tumor suppressor p53 plays a pivotal role in the cellular response to genotoxic stress. Various stress signals, e.g. DNA-damage stabilize and activate the p53 protein. Upon activation p53 triggers two different types of cellular stress responses: cell cycle arrest or apoptosis. While induction of a cell cycle arrest rescues the damaged cell, activation of the apoptotic program leads to its elimination. So far, it is still not clear which signaling pathways determine the outcome of the cellular stress response and thereby selectivity of the p53 response.

This study analyzed how different signaling pathways upstream and downstream of p53 are integrated upon genotoxic stress. The main goal of this work was the identification of molecular mechanisms that determine whether activation of p53 leads to induction of cell cycle arrest or to apoptosis.

The experimental system used consisted of established mouse fibroblast cell lines. Cells were treated with different doses of UV- or Gamma-irradiation. Thereby, different outcomes of the damage response could be specifically induced. Systematic comparison of p53-dependent signals in the differently irradiated cells allowed identifying parameters of p53 activity responsible for the selectivity of the cellular DNA-damage response.

Data show that selectivity of the p53-dependent DNA-damage response depends on transcriptional and non-transcriptional activities of p53. Cell cycle regulatory and anti-apoptotic effects are mainly due to p53's transcriptional activity which does not appear to be differentially regulated. Specifically, up-regulation of p21 was shown to be very important for protection against apoptosis. In contrast, the pro-apoptotic function of p53 seems to rely mainly on non-transcriptional activities. Data showed that the amount of p53 protein and activation of Bax are differentially regulated determinants of p53-dependent apoptosis.

Analysis of mutant p53 expressing cells revealed that the ability to activate Bax is retained in some transcriptionally inactive p53 mutants. Expression of such mutant p53 proteins enhances sensitivity of cells against genotoxic stress. This finding suggests a potential oncogenic function of those mutant p53 proteins.

In conclusion, the identification of differentially regulated parameters of p53-activity demonstrates that p53 itself and not other factors determine the selectivity of the cellular stress response. The finding that the major contribution to p53's pro-apoptotic effects in irradiated fibroblasts results from transcription-independent mechanisms was somehow unexpected. Thereby, this study for the first time provides evidence for the physiological relevance of such transcription-independent p53-activities and their *in vivo* regulation.

Key words: p53; DNA-damage; apoptosis; cell cycle arrest

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	1
1. Signalwege in der zellulären Antwort auf DNA-Schäden	2
2. Defekte in der Schadensantwort und Krebserkrankungen.....	4
3. Der Tumorsuppressor p53	5
4. Biologische Aktivität von p53	6
5. Modellvorstellungen zur Selektivität der p53-abhängigen Schadensantwort.....	15
PROBLEMSTELLUNG	17
MATERIALIEN	18
1. Zelllinien.....	18
1.1 Primäre Zellen.....	18
1.2 Murine Zelllinien	18
1.3 Humane Zelllinien	19
2. Antikörper.....	19
2.1 Antikörper aus Überständen von Hybridom-Zelllinien	19
2.2 Sonstige Antikörper/Seren	19
2.3 Enzymgekoppelte Antikörper	21
2.4 Farbstoffgekoppelte Antikörper.....	21
3. Proteine und Enzyme	22
4. Plasmide.....	22
5. Chemikalien und andere Materialien.....	22
6. Kits	24
7. Allgemeine Puffer und Nährmedien	24
8. Geräte.....	25

METHODEN 27

1. Zellkultur	27
1.1 Kultivierung von adhärenen Zellen	27
1.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen	27
2. Bestrahlung von Zellen.....	28
2.1 UV-Bestrahlung.....	28
2.2 Gamma-Bestrahlung	29
3. Aufbereitung der bestrahlten Zellen.....	29
3.1 Herstellung von Zellsedimenten	29
3.2 Fixierung der Zellen für die Durchflußcytometrie.....	30
3.3 Fixierung der Zellen für die Immunfluoreszenz	30
4. Proteinanalytische Methoden	31
4.1 Zellyse.....	31
4.2 Proteinbestimmung	32
4.3 Immunpräzipitation.....	32
4.4 SDS-PAGE	33
4.5 Western Blot und immunologische Detektion.....	34
4.6 ECL-Reaktion	34
5. Zellbiologische Methoden.....	35
5.1 Transiente Transfektion	35
5.2 Durchflußcytometrie (FACS-Analyse).....	36
5.3 β -Galactosidase-Färbung	36
5.4 Konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie.....	37

ERGEBNISSE 40

1. Bestrahlung mit geringer Dosis beeinträchtigt das Wachstum von NIH 3T3 Zellen nicht dauerhaft, während schwere Strahlenschäden Apoptose oder einen terminalen Wachstumsarrest induzieren.....	40
2. Alle Bestrahlungsarten führen zur Stabilisierung und Aktivierung von p53.....	45
3. Anti- und po-apoptotische Zielgene von p53 werden in verschiedenen bestrahlten NIH 3T3 Zellen nicht differentiell hochreguliert	46
4. p53-Menge und -Modifikation werden in verschiedenen bestrahlten NIH 3T3 Zellen differentiell reguliert, hohe Mengen korrelieren mit Apoptose	48
5. Die starke Stabilisierung von p53 nach 100 J/m ² UV-Bestrahlung ist nicht Folge einer gestörten Wechselwirkung mit Mdm2.....	51
6. Der terminale Wachstumsarrest von 20 Gy Gamma-bestrahlten NIH 3T3 Zellen läßt sich durch hohe p53-Mengen in Apoptose überführen	53
7. Die Aktivierung von Bax ist unabhängig von einer Induktion des Proteins und selektiv für Apoptose	57

8. Die Bax-Translokation in 100 J/m ² UV-bestrahlten NIH 3T3 Zellen geht der Aktivierung von Caspase 3 voraus.....	60
9. Apoptose in p53-null 10-1 Zellen erfolgt ohne Bax-Aktivierung	61
10. Die Translokation von Bax in die Mitochondrien kann durch Expression von wildtyp p53 in 10-1 Zellen wiederhergestellt werden und ist Transkriptions-unabhängig	64
11. Balb/c 3T3tx Zellen exprimieren transkriptionell-inaktives mutiertes p53, können jedoch Bax aktivieren	67
12. Mut p53 exprimierende Balb/c 3T3tx Zellen aktivieren Bax auch nach 10 J/m ² UV- und 20 Gy Gamma-Bestrahlung	71
13. Der durch 20 Gy Gamma-Bestrahlung induzierte terminale Wachstumsarrest schützt vor p53-unabhängiger Apoptose und ist p53- und p21-vermittelt.....	76
14. Humane Colonicarcinom-Zellen zeigen nach Bestrahlung die gleiche Schadensantwort wie Maus-Fibroblasten	79
DISKUSSION	83
1. Selektivität der p53-abhängigen Schadensreaktion	83
2. Funktion und Regulation transkriptioneller p53-Aktivitäten.....	85
3. Die p53-Proteinmenge als pro-apoptotisches Signal	87
4. Differentielle Regulation der Aktivierung von Bax	90
5. Bax-Aktivierung in mut p53 Zellen.....	92
LITERATURVERZEICHNIS	95
ANHANG	108

Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
β-Gal	Seneszenz-assoziierte β-Galactosidase
Cdk(s)	Cyclin dependent kinase(s)
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s medium
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemoluminescence
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FCS	Fetal calf serum
HA	Hämagglutinin
IP	Immunpräzipitation
mut	mutant
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PGS	Protein G-Sepharose
PI	Propidiumiodid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PP	Polypropylen
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV40	Simian Virus 40
T-Ag	Großes SV40 Tumor-Antigen
TBS	Tris buffered saline
UV	Ultraviolettes Licht
wt	wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indosyl β-D-Galactosid

Einleitung

Schäden in der DNA einer einzigen Zelle können für einen vielzelligen Organismus oft dramatische Folgen nach sich ziehen. Dies geschieht dann, wenn das zelluläre Kontrollsystem, das die Integrität des Genoms überwacht, versagt. In diesem Fall können DNA-Schäden, die durch eine Reihe unvermeidbarer Umwelteinflüsse wie Sonnenlicht, ionisierende Strahlung oder Chemikalien induziert werden, unerkant bleiben oder werden nicht oder nicht vollständig durch zelleigene Reparaturmechanismen behoben. Ist die geschädigte Zelle noch teilungsfähig und das Voranschreiten im Zellzyklus wird nicht verhindert, erfolgt durch Weitergabe auf Tochterzellen eine Amplifizierung und Fixierung des Schadens. Da Bruchstellen und Schäden in der DNA zu Mutationen, Chromosomensegment-Translokationen, Deletionen oder Amplifikationen führen können, ist die Bildung von Tumoren bei höheren Organismen eine mögliche Konsequenz.

Tumorzellen zeichnen sich unter anderem dadurch aus, daß sie Mutationen im Genom anreichern und sich unkontrolliert teilen. In normalem Gewebe hingegen sind offensichtlich nur solche Zellen teilungsfähig, bei denen DNA-Schäden repariert wurden, während Zellen mit irreparablen Schäden eliminiert werden. Dies impliziert eine fein aufeinander abgestimmte Regulation der zellulären Signalwege von Zellteilung, DNA-Reparatur und programmiertem Zelltod (Apoptose), die in Tumorzellen gestört ist.

Das Tumorsuppressorprotein p53, dessen Gen in 50-60% aller menschlichen Tumore durch Mutationen verändert ist, spielt eine zentrale Rolle in der zellulären Antwort auf genotoxischen Streß und bei der Aufrechterhaltung genomischer Integrität. So ist eine Aktivierung von p53 durch genotoxischen Streß und die Beteiligung an den komplexen zellulären Prozessen wie Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur und Apoptose, durch zahlreiche Untersuchungen belegt. Bisher wurden die genannten zellulären Reaktionen auf genotoxischen Streß jedoch meist einzeln und isoliert charakterisiert. Weitestgehend unklar ist jedoch, durch welche Signale die Entscheidung sowie die Koordination zwischen den sich zum Teil ausschließenden zellulären Prozessen bestimmt wird.

Im Zentrum des Projektes dieser Dissertation steht die Analyse, wie die Signale der p53-abhängigen Reaktionen auf genotoxischen Streß integriert werden und somit die Selektivität der p53-abhängigen Schadensantwort erreicht wird. Hauptziel dabei ist die Identifizierung möglicher Mechanismen, auf denen die Entscheidung zwischen p53-abhängigem Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur auf der einen Seite bzw. p53-abhängiger Apoptose auf der anderen Seite beruht.

1. Signalwege in der zellulären Antwort auf DNA-Schäden

Die Signalwege, die nach Eintreten von DNA-Schäden das zelluläre Kontrollsystem aktivieren, sind komplex und Gegenstand intensivster Forschung. Die Komplexität beruht auf der Vielzahl der Parameter, die bei einer effektiven und adäquaten Schadensantwort Berücksichtigung finden müssen (siehe **Abbildung 1**). Die wichtigsten Faktoren dabei sind sicherlich Art und Ausmaß des Schadens.

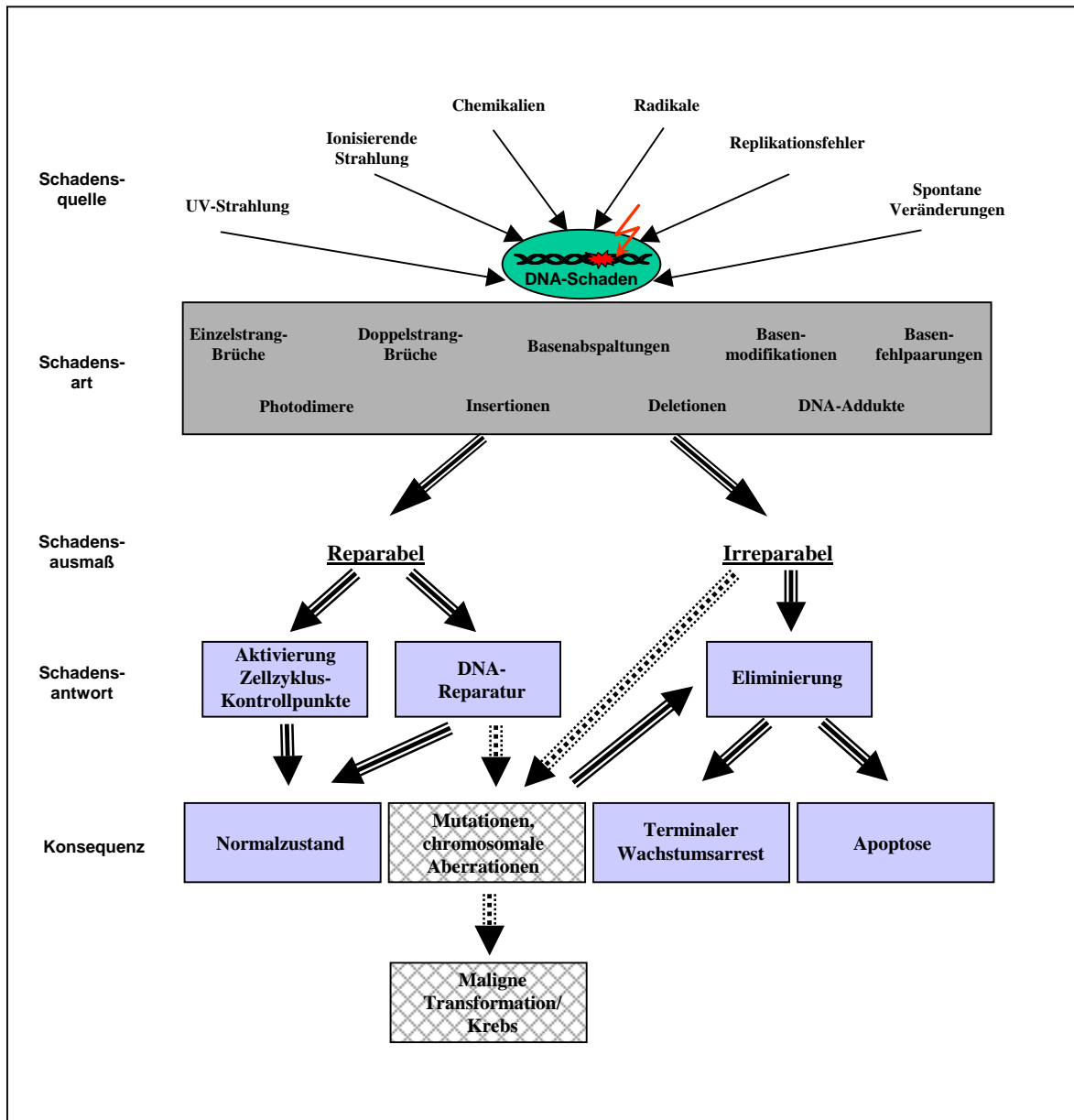


Abbildung 1: Die zelluläre Antwort auf genotoxischen Streß. Verschiedene Schadensquellen induzieren verschiedene Arten von DNA-Schäden. Je nach Ausmaß des Schadens wird das Schicksal der geschädigten Zelle durch die entsprechende Schadensantwort bestimmt. Eine vorübergehende Aktivierung der Zellzyklus-Kontrollpunkte verbunden mit DNA-Reparatur beseitigt die Schäden, und die Zelle wird nach Beenden der Schadensantwort wieder in den Normalzustand versetzt. Bei irreparablen Schäden werden Eliminierungsprogramme, wie Apoptose oder terminaler Wachstumsarrest aktiviert. Werden irreparabel geschädigte Zellen nicht eliminiert oder erfolgt die DNA-Reparatur nur unvollständig oder fehlerhaft, manifestieren sich Mutationen und chromosomale Aberrationen im Genom, die zu einer malignen Transformation und Krebs führen können.

Die Art des Schadens wird dadurch bestimmt, wie und durch welches Agens der Schaden induziert wurde. So führt Bestrahlung mit ultraviolettem (UV) Licht zu Photodimeren und Modifikation von Basen (Thoma, 1999), während ionisierende Strahlung überwiegend Doppelstrangbrüche verursacht (Übersichtsartikel: Fei und El-Deiry, 2003; Iliakis *et al.*, 2003). Chemikalien können zur Vernetzung mit Proteinen, Basenmodifikation oder –abspaltung und Strangbrüchen führen oder durch Einlagerung in die DNA deren räumliche Struktur verändern. Die Erkennung und Behebung der verschiedenen Schadensarten geschieht über zahlreiche miteinander vernetzte Signalwege, an denen eine Vielzahl spezifischer Komponenten beteiligt sind (Übersichtsartikel: Cline und Hanawalt, 2003). All diese Signalwege konvergieren jedoch in einer fundamentalen Weichenstellung, die vom Ausmaß des Schadens abhängt und das „Schicksal“ der geschädigten Zelle bestimmt. Dabei gibt es zwei grundsätzliche Szenarien:

1. Der Schaden ist reparabel und die genomische Integrität kann durch Reparaturprozesse wiederhergestellt werden. In diesem Fall wird durch Aktivierung der Zellzyklus-Kontrollpunkte ein temporärer Arrest der Zellteilung induziert, um eine Amplifikation des Schadens zu verhindern. Daneben erfolgt die Reparatur des Schadens. Nach Abschluß des Reparaturvorgangs werden Zellzyklusarreste und sonstige Streß-induzierte Signale abgeschaltet und die Zelle wieder in den „Normal“-Zustand versetzt.
2. Das Ausmaß des Schadens ist so groß, daß eine vollständige Reparatur nicht möglich ist. Um die genomische Integrität des Gesamtorganismus sicherzustellen, wird die geschädigte Zelle in diesem Fall durch kontrollierten Zelltod (Apoptose) eliminiert bzw. durch einen terminalen Wachstumsarrest dauerhaft von weiteren Zellteilungen, durch die Mutationen und chromosomale Aberrationen auf Tochterzellen weitergegeben werden könnten, ausgeschlossen.

Die molekularen Mechanismen, welche die Entscheidung für eines der beiden Szenarien herbeiführen, sind bislang weitestgehend unklar. Unmittelbar einleuchtend ist hingegen, daß Defekte in der Entscheidungskompetenz bezüglich Überleben oder Eliminierung auf Einzelzellebene dramatische Folgen für das Fortleben des Gesamtorganismus haben: Werden Zellen mit nur geringen und im Normalfall reparablen Schäden nicht am Leben erhalten, sondern eliminiert, wird der Organismus unter normalen Umwelteinflüssen seine Gewebesubstanz kaum aufrechterhalten können. Werden im anderen Fall geschädigte Zellen nicht eliminiert und ihre Teilung verhindert, manifestieren sich die Schäden dauerhaft im Genom; die maligne Transformation und die Bildung von Tumoren ist dann eine fast notwendige Konsequenz.

2. Defekte in der Schadensantwort und Krebserkrankungen

Wichtige Erkenntnisse in die Signalwege der zellulären Schadensantwort wurden anhand von Zellen mit einem Phänotyp gewonnen, der mit einem Krankheitsbild und Defekten in der Schadensantwort in Zusammenhang gebracht werden konnte. Neben relativ seltenen Krankheiten, die auf eine begrenzte Anzahl von veränderten Genen zurückgeführt werden konnten (Übersichtsartikel: Shiloh, 2003; d'Andrea und Grompe, 2003), stellen die Krebserkrankungen die zahlenmäßig größte und in Hinblick auf die genetischen Veränderungen die heterogenste Gruppe dar.

Die Entstehung von Krebs ist ein mehrstufiger Prozess, der zu einem Verlust der zellulären Wachstumskontrolle und einer übermäßigen Proliferation führt (Übersichtsartikel: Hahn und Weinberg, 2002). Dieser Prozess kann phänomenologisch durch zwei unterschiedliche Mechanismen erklärt und beschrieben werden, der Inaktivierung Wachstums-inhibierender Faktoren (sog. Tumorsuppressoren) sowie der Aktivierung Proliferations-stimulierender Signale (sog. Proto-Onkogene).

Ursache für den Verlust der Proliferationskontrolle können genetische Defekte und Veränderungen sein, aber auch die Infektion mit bestimmten Viren, deren Proteine mit zahlreichen zellulären Faktoren interagieren und dadurch die Regulation des Zellzyklus der Wirtszelle beeinflussen (Übersichtsartikel: zur Hausen, 2001). So konnte ein eindeutiger Zusammenhang beispielsweise zwischen Gebärmutterhals-Krebs und dem humanen Papillomavirus HPV (Übersichtsartikel: zur Hausen, 2002) oder Leberkrebs und dem Hepatitis B-Virus nachgewiesen werden (Übersichtsartikel: Kensler *et al.*, 2003). Unabhängig von einer viralen Infektion sind jedoch vor allem Mutationen oder Deletionen in wachstumsregulierenden Genen, wie sie unter anderem durch DNA-Schäden hervorgerufen werden, verantwortlich für eine übermäßige Proliferation und die daraus resultierende Tumorbildung (Hartwell und Kastan, 1994; Paulovich *et al.*, 1997; Samuel *et al.*, 2002).

Weist eine Zelle Defekte in der Erkennung oder Behebung von DNA-Schäden auf oder unterliegt sie unverhältnismäßig oft DNA-schädigenden Einflüssen, ist es aus statistischen Gründen nur eine Frage der Zeit, bis auch Gene der Proliferationskontrolle von Schäden betroffen und funktionell verändert werden. Entgeht eine derart geschädigte Zellen dem zellulären Reparatursystem, entsteht eine sich unkontrolliert teilende und aufgrund ihrer Toleranz bezüglich Veränderungen der DNA-Sequenz genetisch instabile Tumorzelle (Übersichtsartikel: Samuel *et al.*, 2002). Viele Tumorzellen zeichnen sich darüber hinaus durch eine erhöhte Resistenz gegen Apoptose-induzierende Agenzien aus. Dies stellt bei der Behandlung von Krebspatienten ein schwerwiegendes Problem dar, da die gezielte Induktion von Apoptose das Ziel chemo- und strahlentherapeutischer Ansätze ist (Übersichtsartikel: Makin und Hickman, 2000; Johnstone *et al.*, 2002).

3. Der Tumorsuppressor p53

Trotz der Heterogenität von Krebszellen bezüglich ihrer genetischen Defekte gibt es einige Gene, die auffallend häufig in ihrer Funktionalität betroffen sind und somit von besonderem Interesse für die Krebsforschung sind. Zu ihnen gehört das Tumorsuppressorgen p53, das in 50-60% aller menschlichen Tumore Mutationen aufweist oder durch virale Proteine inaktiviert ist (Hainaut und Hollstein, 2000).

Das humane p53-Gen kodiert ein 393 Aminosäuren großes Protein (murin: 390 Aminosäuren), das seine biologische Funktionalität als Tetramer entfaltet (Übersichtsartikel: Ko und Prives, 1996; Janus *et al.*, 1999; Vousden und Lu, 2002; Oren, 2003). Neben zwei enzymatischen Aktivitäten, der 3'-5' Exonukleaseaktivität (Mummenbrauer *et al.* 1996) sowie der Eigenschaft, das *annealing* von komplementären Nukleinsäuren zu katalysieren (Oberosler *et al.*, 1993), beruhen die meisten der p53-vermittelten zellulären Prozesse auf der Aktivität des Tumorsuppressors, als Transkriptionsfaktor die Expression einer großen Zahl von Zielgenen zu induzieren. Andere Gene werden von p53 möglicherweise reprimiert (Zhao *et al.*, 2000).

Die durch p53 transaktivierten Zielgene lassen sich in Sets funktioneller Gruppen einteilen (Zhao *et al.*, 2000). Zahlenmäßig am größten und in ihrer Bedeutung innerhalb der p53-vermittelten Signalwege am besten charakterisiert sind dabei zwei funktionelle Gruppen: Gruppe 1 beinhaltet Gene, die Zellzyklusarreste einleiten, wie *p21/WAF1/Cip1*, *14-3-3 σ* oder *gadd45*, während Gruppe 2 Gene enthält, deren Produkte zu Apoptose führen, wie *Bax*, *PIG-3*, *NOXA*, *PUMA* sowie *Fas/APO-1* und *KILLER/DR5*.

Neben der Aktivität eines Transkriptionsfaktors wurden Protein-Protein-Interaktionen von p53 mit einer Vielzahl von zellulären und viralen Proteinen beschrieben, über die der Tumorsuppressor Transaktivierungs-unabhängig zelluläre Prozesse beeinflusst (Übersichtsartikel: Ko und Prives, 1996; Janus *et al.*, 1999). Zu den Bindungspartnern von p53 zählen unter anderem Faktoren der Replikation wie RPA und Polymerase α -Primase (Dutta *et al.*, 1993; Li und Botchan, 1993; Abramova *et al.*, 1997; Wolter, 2001; Chemnitz, 2003), Faktoren des Reparatursystems wie CSB, Ref-1 und DNA-Polymerase β (Wang *et al.*, 1995; Gaiddon *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2001) sowie Apoptose-regulierende Proteine wie Bcl-2 und Bcl-xl (Mihara *et al.*, 2003). Essentiell für die transaktivierende Wirkung von p53 ist die Rekrutierung von basalen Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel TFIIF, TBP und TAF 31 (Xiao *et al.*, 1994; Horikoshi *et al.*, 1995; Lu und Levine, 1995), die ebenfalls durch Protein-Protein Interaktion vermittelt wird.

In einer normalen Zelle liegt p53 als Protein mit kurzer Halbwertszeit in sehr geringen Mengen als „latentes“ Protein vor, dessen Funktionalität weitestgehend unklar ist. Durch Streß-Signale, wie Bestrahlung mit UV oder ionisierender Strahlung, zahlreiche chemotherapeutische Chemikalien, erhöhte Mengen von reaktiven Sauerstoffverbindungen, Infektion mit Viren, Aktivierung von Onkogenen, Hypoxie oder Depletion von Nukleotiden wird der Tumorsuppressor stabilisiert (Jin und Levine, 2001). Die resultierenden großen Mengen von p53 akkumulieren überwiegend im Zellkern (Fritsche *et al.*, 1993) und induzieren die Transaktivierung der p53-abhängigen Zielgene, deren Produkte dann Zellzyklusarrest bzw. Apoptose einleiten. Voraussetzung für Stabilisierung und Aktivierung sowie eine Regulation der vielfältigen biologischen Aktivitäten des Tumorsuppressors scheint die Modifikation von p53 durch Phosphorylierung, Acetylierung, Rybosylierung, O-Glycosylierung oder Sumoylierung zu sein (Übersichtsartikel: Jayaraman und Prives, 1999; Appella und Anderson, 2000; Melchior und Hengst, 2002). Eine besondere Rolle in der Aktivierung haben dabei die Proteinkinasen ATM und ATR, die direkt oder indirekt durch von ihnen aktivierte andere Kinasen eine Phosphorylierung an Serin-15 und Serin-20 katalysieren (Übersichtsartikel: Shiloh, 2003).

Die Deaktivierung von p53 erfolgt im wesentlichen Mdm2-gesteuert durch proteasomalen Abbau des Tumorsuppressors (Haupt *et al.*, 1997; Kubbutat, *et al.*, 1997). Die Ubiquitin-Ligase Mdm2 bindet an p53 und bewirkt dessen Inaktivierung sowohl durch Export aus dem Zellkern wie auch durch Konjugation mit Ubiquitin, dem Signalpeptid für proteasomalen Abbau (Übersichtsartikel: Kubbutat und Vousden, 1998; Chène, 2003). Da *Mdm2* zur Gruppe der p53-abhängigen Zielgene gehört (Barak *et al.*, 1993), unterliegt das Verhältnis der p53 und Mdm2 Proteinmengen einem autoregulatorischem Rückkopplungsmechanismus, dessen Kontrolle wesentlich für die Steuerung der p53-vermittelten Signalwege ist (Wu *et al.*, 1993; Picksley und Lane, 1993). Dementsprechend beeinflussen Modifikationen von beiden Proteinen deren Interaktion (Übersichtsartikel: Ashcroft und Vousden, 1999; Chène, 2003; Shiloh, 2003).

4. Biologische Aktivität von p53

Die zentrale Funktion von p53 besteht darin, die genomische Integrität zu bewahren (Lane, 1992; Janus *et al.*, 1999). Dies erfolgt in der Reaktion auf genotoxischen Streß auf zwei verschiedene Arten. Durch Einleitung eines Zellzyklusarrests wird eine Amplifizierung des Schadens verhindert, die geschädigte Zelle jedoch am Leben erhalten, während sie durch den kontrollierten Zelltod (Apoptose) eliminiert wird. p53 beeinflusst die Signalwege der Zellzyklusregulation wie die der Apoptose auf verschiedene Weisen und spielt daher eine wichtige Rolle in der Regulation und Koordination von Zellwachstum und Zelltod.

EINFLUß AUF ZELLYCYKLUS UND REPARATUR

Die Vermehrung eukaryontischer Zellen durch Teilung kann durch das Modell des vier-phasigen Zellzyklus beschrieben werden (siehe **Abbildung 2A** sowie Übersichtsartikel: Iliakis, 1997; Lundberg und Weinberg, 1999). Darin werden die Phasen der replikativen DNA-Synthese-Aktivität (S-Phase) sowie der mitotischen Zellteilung (M-Phase) durch zwei *gap*-Phasen (G1 sowie G2-Phase) unterbrochen, in denen ein Größenwachstum sowie die Vorbereitung der nachfolgenden Zellzyklusphase erfolgt. Ruhende, das heißt nicht proliferationsaktive Zellen befinden sich im sogenannten G0-Stadium.

Der Eintritt in den Zellzyklus wie auch das Voranschreiten durch die verschiedenen Phasen wird streng kontrolliert und im wesentlichen durch die Aktivität von Zellzyklus-regulierenden Kinasen gesteuert. Diese Kinasen bestehen aus einer regulatorischen Untereinheit, einem Cyclin, sowie einer enzymatisch aktiven Untereinheit, der Cyclin-abhängigen Kinase (Cdk). Jede Cdk interagiert mit einem spezifischen Subset von Cyclinen, umgekehrt können auch Cycline mit mehreren verschiedenen Cdks wechselwirken. Neben der kontrollierten Assoziation von Cyclinen und Cdks wird die Aktivität der zellzyklusregulierenden Kinasen durch Modifikationen und die Wechselwirkung mit Cdk-Inhibitoren beeinflusst. Insgesamt ergibt sich so ein hocheffektives Regulationssystem zur Steuerung des Zellwachstums.

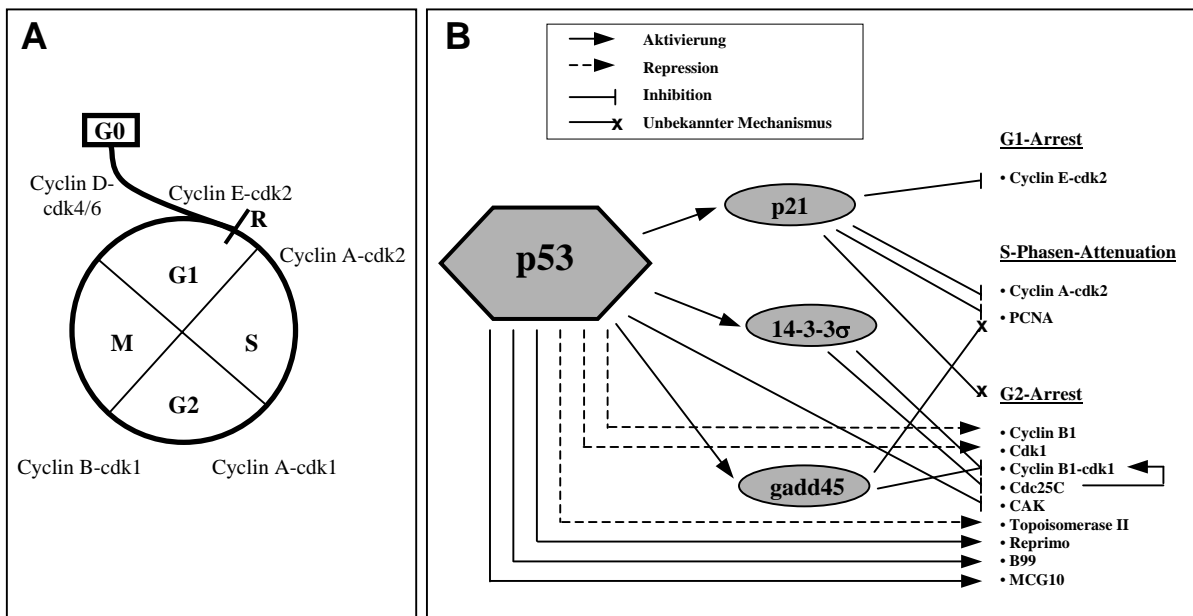


Abbildung 2: Zellzyklus und Beteiligung von p53 an der Zellzyklusregulation. (A) Das Voranschreiten durch den Zellzyklus wird durch spezifische Komplexe aus Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks) gesteuert. R kennzeichnet den Restriktionspunkt, nach dessen Überschreiten ruhende Zellen aus G0 notwendigerweise mindestens eine Zyklus durchlaufen. **(B)** p53 kann über verschiedene Mechanismen in die Zellzyklusregulation eingreifen und direkt oder über Zielgene die Progression durch den Zyklus blockieren oder verzögern.

Zur Bewahrung der genomischen Integrität eines Organismus ist es von zentraler Bedeutung, daß Mutationen der DNA-Sequenz oder sonstige DNA-Schäden beim Durchlaufen des Zellzyklus nicht vervielfältigt oder auf Tochterzellen weitergegeben werden. Zu diesem Zweck verfügen Säugerzellen über Zellzyklus-Kontrollpunkte an den Übergängen der G1 zur S-Phase sowie von G2 nach M, die durch DNA-Schäden aktiviert werden und durch Inhibierung der entsprechenden Cdk den Übergang in die nachfolgende Zellzyklusphase verhindern können (Übersichtsartikel: Iliakis, 1997; Taylor und Stark, 2001; Samuel *et al.*, 2002; Agami und Bernards, 2002; Nyberg *et al.*, 2003; Iliakis *et al.*, 2003). Die resultierende Blockade in der Zellzyklusprogression bezeichnet man je nach Position im Zellzyklus als G1- bzw. G2-Arrest. Darüber hinaus ist ein Intra-S-Kontrollpunkt bekannt, der, ebenfalls Schadens-aktiviert, die Progression durch die S-Phase verzögern kann (Übersichtsartikel: Bartek und Lukas, 2001; Nyberg *et al.*, 2002; Woo und Poon, 2003).

Der Tumorsuppressor p53 ist an der Induktion von Zellzyklusarresten in G1 und G2 über verschiedene, durch ihn transaktivierte und reprimierte Zielgene sowie über Protein-Protein-Interaktionen beteiligt (siehe **Abbildung 2B**).

Am klarsten erwiesen hinsichtlich einer physiologischen Relevanz bei der Auslösung eines p53-vermittelten Wachstumsarrests ist der Beitrag der p53-abhängigen Zielgene p21, 14-3-3 σ und Gadd45 (El-Deiry *et al.*, 1993; Hermeking *et al.*, 1997; Kastan *et al.*, 1992). Durch genotoxischen Streß aktiviert, induziert p53 unter anderem die Expression dieser drei Faktoren, die auf unterschiedliche Weise in die Zellzyklus-Regulation eingreifen.

Der Cdk-Inhibitor p21 hemmt durch direkte Bindung an cdk2 die für den Eintritt in die S-Phase notwendige enzymatische Aktivität des Cyclin E-cdk2 Komplex und löst dadurch einen G1-Arrest aus (Harper *et al.*, 1993, Xiong *et al.*, 1993; Dulic *et al.*, 1994). Durch Bindung an Cyclin A-cdk2 (Ogryzko *et al.*, 1997; Chemnitz, 2003) und den Replikationsfaktor PCNA (Waga *et al.*, 1994) wirkt p21 außerdem auch hemmend auf die Progression durch die S-Phase. Wenngleich der Mechanismus noch nicht geklärt wurde und ein G2-Arrest auch in p21-defizienten Zellen beobachtet werden kann, scheint p21 auch eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung eines Schaden-induzierten G2-Arrests zuzukommen (Bunz *et al.*, 1998; Taylor und Stark, 2001).

Der Sequestrierungsfaktor 14-3-3 σ wird in einigen Zellen nach genotoxischem Streß ebenfalls p53-abhängig hochreguliert (Hermeking *et al.*, 1997). 14-3-3 σ bindet an Cyclin B1-cdk1 wie auch an cdc25c, eine für die Aktivierung von CyclinB-cdk1 notwendige Phosphatase. Durch die Bindung an 14-3-3 σ werden beide Faktoren, deren Aktivität im Zellkern für einen Übertritt in die M-Phase notwendig ist, im Cytoplasma gehalten (Chan *et al.*, 1999). Der Transport der aktivierten Kinase

bzw. ihres Aktivators in den Zellkern wird so verhindert und die Zelle in G2 arretiert (Hermeking *et al.*, 1997; Chan *et al.*, 1999).

Der Übertritt in die Mitose wird auch von *gadd45*, einem weiteren von p53 transaktivierten Zielgen, unterbunden (Wang *et al.*, 1999). Seine Wirkung übt das *gadd45* Protein vermutlich durch direkte Wechselwirkung mit *cdk1* aus (Zhan *et al.*, 1999). Durch diese Interaktion bewirkt *gadd45* eine Dissoziation von Cyclin B1 und *cdk1* und inaktiviert auf diese Weise die den G2/M-Übergang katalysierende Kinase (Zhan *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999). Der Befund, daß *gadd45* mit dem Replikationsfaktor PCNA interagiert (Smith *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995), gibt Hinweise auf eine mögliche Funktion innerhalb der S-Phase, auch wenn die biologische Relevanz dieser Interaktion noch nicht klar ist. Darüber hinaus scheint *gadd45* direkt an Reparaturprozessen geschädigter DNA beteiligt zu sein (Smith *et al.*, 2000).

Weitere, von p53 induzierte Zielgene, die zu einem p53-vermittelten Zellzyklusarrest beitragen könnten, deren Wirkungsmechanismus jedoch noch unklar ist, sind *Reprimo* (Ohki *et al.*, 2000), *B99* (Utrera *et al.*, 1998) sowie *MCG10* (Zhu und Chen, 2000).

Neben der Transaktivierung von Genen, deren Produkte dann die Zellzyklus-Progression inhibieren, gibt es zunehmende Hinweise, daß p53 auch durch Repression Proliferations-stimulierender Faktoren zu einem Wachstumsarrest beiträgt (Taylor und Stark, 2001). Wenngleich die Wirkungsmechanismen der p53-induzierten Repression weitestgehend unklar sind, zeigen verschiedene Studien eine Repression der Promotoren von *cdk1* und *Cyclin B1*, die nur in Zellen mit funktionellem wildtyp p53 zu beobachten ist (Azzam *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 1999; Passalaris *et al.*, 1999; Taylor und Stark, 2001). Unabhängig davon könnte p53 durch Repression von *Topoisomerase II* zu einem p53-vermittelten G2-Arrest beitragen (Sandri *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997; Clifford *et al.*, 2003).

Zusätzlich zu Transaktivierung oder Transrepression wurde auch eine direkte Protein-Protein-Interaktion von p53 als möglicher Mechanismus für einen p53-vermittelten Wachstumsarrest beschrieben. So inhibiert p53 durch Bindung an die CDK-aktivierende Kinase CAK deren Kinase-Aktivität, die wiederum für die Aktivierung von Cyclin A-cdk2 und Cyclin B-cdk1 nötig ist (Schneider *et al.*, 1998; Taylor und Stark, 2001).

Neben dem unmittelbaren Unterbinden der Zellzyklus-Progression ist die Funktion der Zellzyklusarreste eng mit DNA-Reparatur assoziiert. Gemäß gängigen Modellvorstellungen wird die Zeit eines durch genotoxischen Streß verursachten temporären Zellzyklusarrests dafür verwendet, vorhandene DNA-Schäden durch Reparatur zu beseitigen. Abgesehen von den bereits beschriebenen Funktionen in der Induktion des Arrests an sich, ist p53 darüber hinaus auch direkt an DNA-Reparaturvorgängen während des Arrests beteiligt (Smith *et al.*, 1995; Therrien *et al.*,

1999; Rubbi und Milner, 2003). Die Mechanismen, über die p53 in DNA-Reparatur involviert ist, sind nur unvollständig aufgeklärt. Es gibt jedoch gute Hinweise, daß der Tumorsuppressor Reparatur einerseits durch die Transaktivierung von Reparaturfaktoren wie z.B. *DDB2* oder *p53R2* (Hwang *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 2000) fördert, andererseits auch über Transkriptions-unabhängige Mechanismen wie etwa die Interaktion mit weiteren Reparaturfaktoren Einfluss auf die Erkennung und Beseitigung von DNA-Schäden ausübt (Übersichtsartikel: Janus *et al.*, 1999; McKay *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2001; Smith und Seo, 2002).

Unabhängig von einem temporären Zellzyklusarrest wurde in einigen Zelllinien nach genotoxischem Streß ein dauerhafter, sogenannter irreversibler oder terminaler Wachstumsarrest beobachtet. Terminal arretierte Zellen weisen eine charakteristische Seneszenz-ähnliche Morphologie auf; sie proliferieren nicht, sterben jedoch auch nicht. Die Induktion eines solchen terminalen Arrests scheint nur unter sehr spezifischen Bedingungen in Abhängigkeit von Zelltyp und Art des schädigenden Agens stattzufinden. So reagieren Fibroblasten auf hohe Dosen ionisierender Strahlung mit einem terminalen Wachstumsarrest, während Zellen des hämatopoetischen Systems nach gleicher Bestrahlung durch Apoptose eliminiert werden (Gudkov und Komarova, 2003). Verschiedene, aus soliden humanen Tumoren gewonnene Zelllinien zeigten einen terminalen Wachstumsarrest nach Behandlung mit chemotherapeutischen Medikamenten (Chang *et al.*, 1999a; te Poele *et al.*, 2002), was zur Einsicht führte, daß der terminale Arrest eine wichtige und klinisch relevante Reaktion von Tumoren auf cytotoxische Agenzien darstellt (Übersichtsartikel: Roninson, 2003).

Die Mechanismen, die für die Induktion eines terminalen Wachstumsarrest verantwortlich sind, sind weitestgehend unbekannt. Unklar ist des weiteren auch, welche Signale einen temporären Arrest in einen permanenten, irreversiblen Wachstumsstopp überführen (Gudkov und Komarova, 2003). Verschiedene Studien zeigen jedoch, daß p53 sowie p21 wichtige Faktoren für die Induktion eines terminalen Wachstumsarrests sind (Chang *et al.*, 1999b; Chang *et al.*, 2001; te Poele *et al.*, 2002; Gudkov und Komarova, 2003).

EINFLUSS AUF APOPTOSE

Die Fähigkeit, Zellen durch ein kontrolliertes Programm (Apoptose) eliminieren zu können, ist für mehrzellige Organismen in mehrerer Hinsicht von zentraler Bedeutung, so zum Beispiel bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Gewebesubstanz und –form sowie bei der Immunantwort. Nach schweren irreparablen DNA-Schäden schließlich ist der gesteuerte Zelltod die wichtigste Möglichkeit, um die Fixierung von Gendefekten zu verhindern und die genomische Integrität des Gesamtorganismus zu erhalten (Übersichtsartikel: Orrenius *et al.*, 2003). Wenngleich Apoptose auch unabhängig von p53 stattfinden kann, gilt die Zelltod-induzierende Aktivität des

Tumorsuppressors, die über verschiedene Mechanismen erfolgen kann (siehe unten), als zentral für die Eliminierung potentiell tumorigener Zellen (Vousden, 2000; Moll und Zaika, 2001; Fridman und Lowe, 2003).

Der Prozess des kontrollierten Zelltods ist durch eine klar gegliederte Reihenfolge morphologisch erkennbarer Schritte gekennzeichnet (Kerr *et al.*, 1972). Zunächst kondensieren Zellkern und Cytoplasma, die Zelle verliert an Volumen, und die Zellmembran zeigt Ausstülpungen. Im weiteren Verlauf werden Zellkern und DNA fragmentiert, und die Zelle zerbricht in apoptotische Vesikel. Dies sind Membran-umhüllte Fragmente, die im physiologischen Kontext schnell von umliegenden Zellen oder Makrophagen erkannt und durch Phagozytose beseitigt werden.

Wenngleich es auch andere Mechanismen der Apoptose gibt (Übersichtsartikel: Orrenius *et al.*, 2003), erfolgt der Vollzug des kontrollierten Zelltods im wesentlichen durch die Aktivität spezifischer Proteasen, den sogenannten Caspasen. Diese bewirken die Zerstörung der Zelle durch Spaltung einer Vielzahl von Proteinen (Übersichtsartikel: Thornberry und Lazebnik, 1998; Earnshaw *et al.*, 1999). Unter den Caspase-Substraten finden sich für die Zellstruktur essentielle Faktoren, wie Cytoskelett-Proteine und Komponenten der Kern-Lamina, aber auch Proteine, die in DNA-Reparatur, Replikation und in der Schadensantwort beteiligt sind (Thornberry und Lazebnik, 1995; Earnshaw *et al.*, 1999; Pelizon *et al.*, 2002). Darüber hinaus werden durch Caspasen auch Apoptose-spezifische Endonukleasen aktiviert, die die DNA fragmentieren. Das prominenteste Beispiel hierfür stellt die Caspase-aktivierte Desoxyribonuklease CAD dar, die durch proteolytischen Abbau ihres assoziierten Inhibitors ICAD aktiviert wird (Liu *et al.*, 1997; Enari *et al.*, 1998).

Aktivierung und Ablauf des apoptotischen Programms unterliegen entsprechend ihrem „finalen“ Ausgang einer strikter Kontrolle. Ein Schlüsselereignis dabei ist die Aktivierung der Caspasen. Caspasen werden als Proenzyme (Procaspasen) synthetisiert und durch proteolytische Spaltung aktiviert (Thornberry und Lazebnik, 1998; Earnshaw *et al.*, 1999). Von dem ca. einem Dutzend bislang bekannter Caspasen wurden Caspase 3, 6 und 7 als sogenannte Effektorcaspasen charakterisiert, d.h. sie sind im wesentlichen für die oben geschilderten morphologischen Veränderungen während der Apoptose verantwortlich. Die Funktion der Initiatorcaspasen 2, 8, 9 und 10 besteht hingegen in der proteolytischen Aktivierung der Effektorcaspasen (Thornberry und Lazebnik, 1998; Degterev *et al.*, 2003).

Soweit bisher bekannt, kann die Aktivierung der Initiatorcaspasen über mindestens zwei verschiedene, voneinander unabhängige Signalwege erfolgen (Übersichtsartikel: Orrenius *et al.*, 2003), die beide vom Tumorsuppressor p53 beeinflusst werden können (siehe **Abbildung 3**). Beide Signalwege sind durch sich gegenseitig aktivierende Faktoren verbunden und konvergieren auf der Ebene der Effektorcaspasen.

Bei der Rezeptor-vermittelten, sogenannten extrinsischen Apoptose besteht das primäre Signal in der Bindung eines extrazellulären Liganden an Oberflächenrezeptoren der Zellmembran. Die Ligandenbindung führt zu einer Konformationsänderung der cytosolischen Bestandteile des Rezeptors, durch die wiederum die Bindung von cytosolischen Faktoren, dem Adaptormolekül FADD und Procaspase 8, möglich wird (Boldin *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996). Der resultierende Proteinkomplex wird als *death-inducible signaling complex* (DISC) bezeichnet und führt zur Aktivierung der Initiatorcaspase 8. Je nach Zelltyp induziert Caspase 8 dann durch direkte Spaltung oder indirekt über verschiedene Zwischenschritte die Aktivierung der Effektorcaspase 3 (Scaffidi *et al.*, 1998; Schmitz *et al.*, 1999).

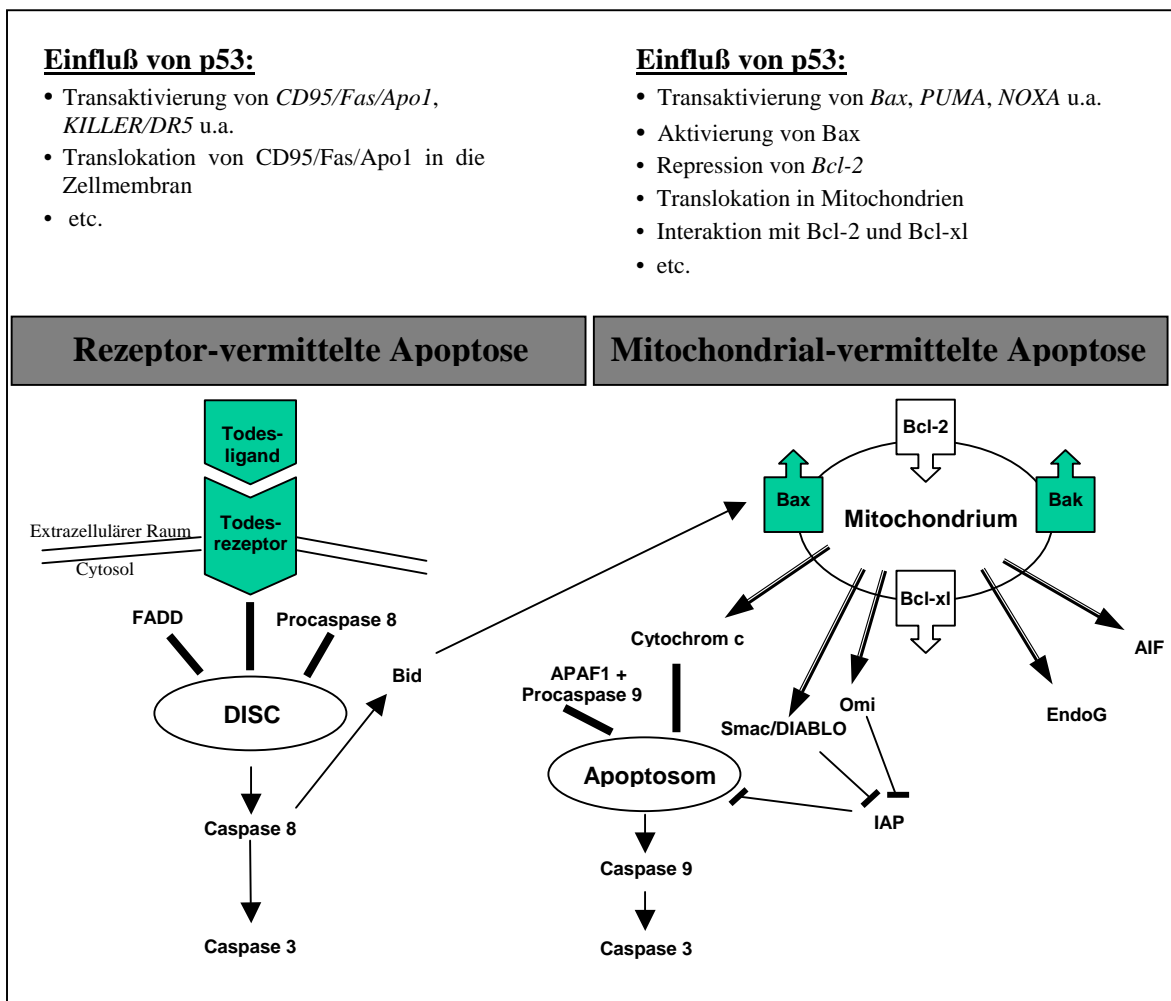


Abbildung 3: Signalwege zur Apoptose. Apoptose wird im wesentlichen durch zwei Signalwege eingeleitet, die von p53 über verschiedene Mechanismen beeinflusst werden. Bei der Rezeptor-vermittelten, extrinsischen Apoptose besteht das Primärsignal in der Bindung eines Liganden an den Todesrezeptor. Dieser bildet dann zusammen mit FADD und Procaspase 8 den *death inducible signaling complex* DISC, der zur Aktivierung von Caspase 8 und Caspase 3 führt. Caspase 3 ist eine der Effektorcaspasen, die direkt durch proteolytischen Abbau zellulärer Proteine den Zelltod herbeiführen. Je nach Zelltyp wird Caspase 3 nicht direkt von Caspase 8 gespalten, sondern Caspase 8 aktiviert via Bid den Signalweg der mitochondrialen Apoptose. Die Initialisierung der mitochondrialen Apoptose erfolgt durch die Freilassung mitochondrialer Proteine in das Cytosol. Die Durchlässigkeit der mitochondrialen Membran wird durch die pro- und anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie, darunter Bax, Bak, Bcl-2 und Bcl-xl gesteuert. Cytosolisches Cytochrom c bildet zusammen mit APAF1 und Procaspase 9 das Apoptosom, das zur Aktivierung von Caspase 9 und Caspase 3 führt. Smac/DIABLO und Omi begünstigen Apoptose durch Neutralisierung der IAPs (*inhibitors of apoptosis proteins*). Die mitochondrialen Faktoren AIF und EndoG sind im Zellkern an der Fragmentierung des Chromatins beteiligt.

Entscheidend für die Eliminierung von Zellen nach DNA-Schädigung sind die Signalwege der sogenannten intrinsischen Apoptose. Dabei erfolgt die Initialisierung des Eliminierungs-Programms intrazellulär durch die Freisetzung mitochondrialer Moleküle in das Cytoplasma. Dementsprechend wird diese Signalkaskade auch als mitochondrial-vermittelte Apoptose bezeichnet (Übersichtsartikel: Wang, 2001).

Gelangt Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Cytoplasma, bildet es dort zusammen mit Apaf-1 und Procaspase 9 das sogenannte Apoptosom, welches Caspase 9 aktiviert (Li *et al.*, 1997). Aktivierte Caspase 9 wiederum spaltet direkt die Effektor-Procaspase 3 und überführt sie in die aktive Form (Li *et al.*, 1997).

Ein anderes mitochondriales Protein, Smac/Diablo, bindet nach Freisetzung in das Cytoplasma dort an eine Reihe von Caspase-Inhibitoren, die sogenannten IAPs (*inhibitor of apoptosis proteins*), und trägt durch Inaktivierung dieser Inhibitoren zur Caspase-Aktivierung bei (Du *et al.*, 2000). IAPs können über ihre BIR-Domäne sowohl mit aktivierter Caspase 3 und 9 interagieren, wodurch sie ihren inhibitorischen Einfluß ausüben, wie auch mit Smac/Diablo. Da sich die Bindung von IAPs an Caspasen bzw. an Smac/Diablo gegenseitig ausschließt, konkurriert Smac/Diablo somit kompetitiv mit den Caspasen um die Bindungsstellen der IAPs (Srinivasula *et al.*, 2001). Durch Verdrängung der Caspasen aus dem inhibitorischen Komplex mit den IAPs unterstützt das mitochondriale Protein so das Voranschreiten des apoptotischen Programms. Ähnlich wirkend führt auch die cytoplasmatische Freisetzung der mitochondrialen Serin-Protease Omi/HtrA2 zu einer Auflösung der Caspase-IAP-Interaktion (Hegde *et al.*, 2002).

Caspase-unabhängig begünstigen darüber hinaus mindestens zwei weitere mitochondriale Proteine (*apoptosis inducing factor* AIF und Endonuclease G), die ihre Aktivität im Zellkern entfalten, den Vollzug des gesteuerten Zelltods. So gibt es gute Belege für eine Rolle von AIF und EndoG bei der apoptotischen Kondensation des Chromatins und der DNA-Fragmentierung (Susin *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2001).

Die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien und damit die Initialisierung des intrinsischen Apoptose-Signalwegs wird kontrolliert durch die Durchlässigkeit der äußeren Mitochondrienmembran (Kroemer, 2003). Zentrale Regulatoren dabei sind die Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie (Übersichtsartikel: Cory und Adams, 2002; Tsujimoto, 2003), die unterteilt werden können in anti- und pro-apoptotische Faktoren. Mitglieder der Bcl-2-Familie sind zum Teil integrale Bestandteile der äußeren Mitochondrienmembran und/oder können dorthin rekrutiert werden. Wenngleich die Signalintegration innerhalb dieser komplexen Proteinfamilie bei weitem nicht vollständig verstanden ist, konnte klar gezeigt werden, daß die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak in der Lage sind, durch Homodimerisierung und/oder andere Mechanismen porenartige Kanäle durch die äußere Mitochondrienmembran zu bilden. Die Entstehung dieser Kanäle führt dann zu einer Veränderung des Membranpotentials und einer Freisetzung der oben beschriebenen Apoptose-auslösenden Proteine aus dem Mitochondrium in das Cytoplasma

(Übersichtsartikel: Eposti und Dive, 2003; Scorrano und Korsmeyer, 2003). Neben der Bildung von Homo- und Heterodimeren wird die Aktivität der Bcl-2 Proteinfamilie durch das Mengenverhältnis von pro- und anti-apoptotischen Faktoren, deren intrazellulärer Lokalisation, durch Modifikation und proteolytische Spaltung beeinflusst (Cory und Adams, 2002; Tsujimoto, 2003).

Die genauen Mechanismen, über die der Tumorsuppressor p53 nach genotoxischem Streß seine apoptotische Funktion ausführt, sind trotz intensivster Forschung nicht hinreichend verstanden. Klar ist jedoch, daß p53 sowohl über die Transaktivierung von pro-apoptotischen Zielgenen und eventuell der Transrepression anti-apoptotischer Gene wie auch über nicht-transkriptionelle Eigenschaften an Initiation und Ablauf des kontrollierten Zelltods beteiligt ist (Übersichtsartikel: Vousden, 2000; Schuler und Green, 2001; Moll und Zaika, 2001; Vousden und Lu, 2002; Oren, 2003; Fridman und Lowe, 2003). Da es bislang nicht gelang, die Induktion eines bestimmten Zielgenes bzw. eine einzige Aktivität von p53 alleine als zentrales Ereignis der p53-abhängigen Apoptose zu identifizieren, geht man davon aus, daß der von p53 vermittelte Zelltod Resultat der kumulativen Wirkung mehrerer verschiedener pro-apoptotischer Signale ist.

Die Zahl der zumeist über *screening*-Methoden identifizierten p53-Zielgene mit einer pro-apoptotischen Funktion nimmt stetig zu. Darunter finden sich Faktoren der Rezeptor-vermittelten Apoptose, wie die Todesrezeptoren *CD95/Fas/APO-1* (Owen-Schaub *et al.*, 1995) und *KILLER/DR5* (Wu *et al.*, 1997), ebenso wie Komponenten der mitochondrial-vermittelten Apoptose, so zum Beispiel die pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder *Bax* (Miyashita und Reed, 1995), *PUMA* (Nakano und Vousden, 2001; Yu *et al.*, 2001, 2003) und *NOXA* (Oda *et al.*, 2000) sowie der Apoptosom-Bestandteil *APAF-1* (Moroni *et al.*, 2001; Fortin *et al.*, 2001; Robles *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurden weitere p53-abhängig exprimierte Gene wie zum Beispiel *PIG-3* (Polyak *et al.*, 1997), *PTEN* (Stambolic *et al.*, 2001) oder *PERP* (Attardi *et al.*, 2000) entdeckt, von denen eine Beteiligung, nicht jedoch ein eindeutiger Wirkungsmechanismus am apoptotischen Programm belegt werden konnte.

Ebenfalls durch *screening*-Methoden ermittelt, gibt es Hinweise, daß p53 die Expression einer Reihe von Genen, darunter auch anti-apoptotische Faktoren wie *Bcl-2*, durch Repression verringert (Ginsberg *et al.*, 1991a; Haldar *et al.*, 1994; Miyashita *et al.*, 1994). Da die Spezifität und molekularen Mechanismen einer solchen Repression durch p53 noch völlig unklar sind, wird über die Bedeutung der Repression im Zuge der Apoptose-Induktion kontrovers diskutiert.

Neben der Induktion von pro-apoptotischen Genen gibt es klare Hinweise auf eine weitere Funktion von p53 bei der Einleitung des kontrollierten Zelltods, die unabhängig von der transkriptionellen Aktivität des Tumorsuppressors ausgeübt wird. So wurde bereits in den frühen

1990er Jahren gezeigt, daß p53-abhängige Apoptose auch in Anwesenheit von Inhibitoren der Transkription oder Translation (Caelles *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994; Gao und Tsuchida, 1999) oder auch durch Transfektion mit transaktivierungs-inaktiven Mutanten von p53 induziert werden kann (Haupt *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996; Kokontis *et al.*, 2001). Erst neuere Untersuchungen gaben jedoch Aufschluss über potentielle Wirkungsmechanismen der nicht-transkriptionell vermittelten p53-abhängigen Apoptose. So zeigte die Arbeitsgruppe von Ute Moll, daß eine Translokation des Tumorsuppressors in die Mitochondrien der Apoptose-Induktion vorangeht (Marchenko *et al.*, 2000). Zusammen mit der beobachteten Interaktion von p53 mit den anti-apoptotischen, an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierten Proteinen Bcl-2 und Bcl-xl ergibt sich ein Hinweis, daß p53 durch seine intrazelluläre Lokalisation und Protein-Protein-Interaktionen direkt den mitochondrialen Apoptose-Signalweg aktiviert (Mihara *et al.*, 2003). Neben der damit implizierten Inaktivierung der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xl durch p53 demonstrieren zwei neue Studien, daß p53 auch direkt und unabhängig von Transkription oder Translation das pro-apoptotische Protein Bax aktivieren kann (Chipuk *et al.*, 2003, 2004). Durch direkte Interaktion kann p53 darüber hinaus auch die Aktivierung von Bak vermitteln (Leu *et al.*, 2004).

Auch bei der Rezeptor-vermittelten Apoptose gibt es Hinweise, daß p53 unabhängig von seiner transkriptionellen Aktivität durch andere Mechanismen zum programmierten Zelltod beiträgt. So wurde gezeigt, daß p53 den Transport von Todesrezeptoren an die äußere Zellmembran beeinflussen kann (Bennett *et al.*, 1998).

5. Modellvorstellungen zur Selektivität der p53-abhängigen Schadensantwort

Die Vielzahl der von p53 transaktivierten Gene mit jeweils verschiedenen Funktionen sowie die bekannten nicht-transkriptionellen Aktivitäten von p53 machten es bisher unmöglich, das Netzwerk, das nach genotoxischem Streß aktiviert wird und in dessen Zentrum der Tumorsuppressor sitzt, in Gänze zu verstehen. Da p53, wie oben beschrieben, nach DNA-Schaden sowohl einen temporären Zellzyklusarrest induzieren und damit das Überleben der geschädigten Zelle gewährleisten kann als auch eine Eliminierung durch Apoptose einleiten kann, ist die Frage nach den Mechanismen, welche die Selektivität der p53-abhängigen Schadensantwort bestimmen, eines der zentralen Themen für das Verständnis der biologischen Funktion von p53.

Bei dem Versuch, die Selektivität der p53-abhängigen Reaktion auf genotoxischen Streß zu verstehen, entwickelten sich zwei verschiedene Modellvorstellungen, in denen p53 einmal als „dummes“ (*dumb*) bzw. als „schlaues“ (*smart*) Protein charakterisiert wurde (Vousden, 2000).

Das Modell des „dummen“ p53 geht davon aus, daß der Tumorsuppressor nach genotoxischem Streß immer die gleichen Signalkaskaden aussendet, d.h. sowohl pro- wie auch anti-apoptotische Zielgene aktiviert. Die Entscheidung, welche Signale dominieren, und ob die geschädigte Zelle überlebt oder durch Apoptose eliminiert wird, liegt nicht bei p53, sondern wird bestimmt durch den zellulären Kontext.

Im Modell des „schlau“ p53 steuert der Tumorsuppressor selbst den Ausgang der Schadensreaktion. Die Selektivität wird dabei im wesentlichen bestimmt durch differentielle Transaktivierung der verschieden wirkenden Zielgene. Mechanistisch wird dieses Konzept getragen von der Idee, daß p53 durch verschiedene Modifikationen (Phosphorylierung, Acetylierung, SUMOylierung und andere) eine selektive Kompetenz zur Aktivierung von Zellzyklusarrest bzw. Apoptose erhält. Da Modifikationen immer auch Einfluss auf die Konformation eines Proteins haben, sollten Konformationsänderungen von p53 auch die Affinität zu Promotoren und Protein-Bindungspartnern ändern und dadurch ein Überwiegen von Überlebens- bzw. Apoptosesignalen herbeiführen können.

Für und gegen jedes dieser Modelle sprechen zahlreiche experimentelle Daten (Übersichtsartikel: Vogt Sionov und Haupt, 1999; Vousden, 2000; Vousden und Lu, 2002; Oren, 2003), ein überzeugender Beweis für die Gültigkeit nur eines Modells gelang bisher noch nicht. Gleichmaßen unverstanden bleibt auch die Frage, wie die Koordination der nicht-transkriptionellen mit den auf Transaktivierung beruhenden Aktivitäten von p53 erfolgt und inwieweit erstere überhaupt von Bedeutung für den Ausgang der p53-abhängigen Schadensreaktion sind. Insgesamt bleibt die Frage nach den Mechanismen, welche die Selektivität der p53-abhängigen Schadensantwort bestimmen, somit noch immer nicht befriedigend beantwortet.

Problemstellung

Der Tumorsuppressor p53 induziert nach DNA-Schädigung zwei unterschiedliche zelluläre Reaktionen: Zellzyklusarrest oder Apoptose. In einem Fall wird die geschädigte Zelle am Leben erhalten, im anderen Fall durch den kontrollierten Zelltod zerstört. Was die Entscheidung zwischen diesen beiden Szenarien bestimmt, ist trotz intensivster Forschung noch immer nicht verstanden. Ziel dieser Arbeit ist es, Aufschluß über die molekularen Mechanismen zu erhalten, welche die Entscheidung zwischen diesen konträren Schadensreaktionen bestimmen und somit für die Selektivität der p53-Antwort auf genotoxischen Streß verantwortlich sind.

Durch Bestrahlung mit UV- bzw. ionisierender Gamma-Strahlung in verschiedenen Dosen sollten in der etablierten murinen Zelllinie NIH 3T3, die intaktes wildtyp p53 exprimiert, DNA-Schäden induziert werden, welche jeweils zu unterschiedlichen Schadensreaktionen der bestrahlten Zellen führen. Ein systematischer Vergleich der p53-abhängigen Signale in den verschieden bestrahlten Zellen sollte dabei die Identifizierung von Unterschieden ermöglichen, die verantwortlich für die Selektivität der Schadensantwort sein könnten. Insbesondere sollte geklärt werden, ob die Selektivität auf eine differentielle Transaktivierung pro- bzw. anti-apoptotischer Zielgene von p53 zurückzuführen ist oder auf nicht-transkriptionelle Aktivitäten des Tumorsuppressors. In weitergehenden Analysen sollte versucht werden, die molekularen Mechanismen zu erhellen, über die die p53-vermittelte Entscheidung zwischen Überleben und Eliminierung getroffen wird. Durch vergleichende Untersuchungen mit bestrahlten Zellen, in denen p53 nicht exprimiert wird oder durch Mutationen verändert ist, sollte darüber hinaus untersucht werden, inwieweit das Fehlen von funktionellem wildtyp p53 bzw. die Expression von mutiertem p53 einen substanziellen Einfluß auf den Ausgang der Schadensantwort hat.

Nachdem Untersuchungen an murinen Zellsystemen viele Vorteile bieten, letztendlich jedoch nur ein Modell darstellen, um das klinisch relevante Verhalten humaner Zellen nach DNA-Schädigung besser zu verstehen, sollte im weiteren analysiert werden, inwieweit die anhand muriner Zellen gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Selektivität der p53-abhängigen Schadensantwort auf humane Krebszellen übertragen werden können. Zu diesem Zweck sollte die Schadensantwort von murinen und humanen Zellen nach jeweils gleichartiger DNA-Schädigung verglichen werden.

Materialien

1. Zelllinien

1.1 PRIMÄRE ZELLEN

Mausembryo-Fibroblasten (MEFs) früher Passagen (Passagen 2-5) aus wildtyp p53, p53 (-/-) sowie p21 (-/-) Balb/c Mäusen wurden freundlicherweise von Andrea Hermannstädter und Nina Heinlein (HPI Hamburg) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in DMEM mit 10 % FCS.

1.2 MURINE ZELLINIEN

- NIH 3T3 Aus Swiss Mausembryo-Fibroblasten gewonnene, spontan immortalisierte Zelllinie mit intaktem wildtyp p53 (Jainchill *et al.*, 1969; Aaronson und Torado, 1968). ATCC #CRL1658. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Elke Will (HPI Hamburg). Kultivierung in DMEM mit 10 % FCS.
- Balb/c 3T3 Aus Balb/c Mausembryo-Fibroblasten gewonnene, spontan immortalisierte Zelllinie mit intaktem wildtyp p53 (Aaronson und Torado, 1968). ATCC #CCL163. Kultivierung in DMEM mit 10 % FCS.
- Balb/c 3T3tx Aus Balb/c 3T3 Zellen gewonnene, spontan transformierte Zelllinie mit mutiertem p53 [tx-1 Allel: Tyr -> Asp (Codon 230) und Met -> Ile (Codon 237); tx-50 Allel: Tyr -> Asp (Codon 230)] (Milner und Cook, 1986; Milner *et al.*, 1991; Zerrahn *et al.*, 1992). Kultivierung in DMEM mit 5 % FCS.
- 10-1 Aus Balb/c Mausembryo-Fibroblasten gewonnene Zelllinie, in der das p53-Gen auf beiden Allelen deletiert ist, auf Protein-Ebene somit p53-null (Harvey und Levine, 1991). Kultivierung in DMEM mit 10 % FCS.
- 10-1cG9 Durch Einzelzell-Klonierung aus 10-1 Zellen gewonnene, stabil transfizierte Zelllinie, die temperatur-sensitives p53 [Cys -> Val (Codon 135)] exprimiert (Ziegler, 1998). Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Wolfgang Deppert (HPI Hamburg). Kultivierung in DMEM mit 10 % FCS.
- T3T3 Aus 3T3 Zellen gewonnene Zelllinie mit mutiertem p53 [Tyr -> Asp (Codon 230) und Glu -> Asp (Codon 287)] (Yewdell *et al.*, 1986; Milner *et al.*, 1991; Zerrahn *et al.*, 1992). Kultivierung in DMEM mit 10 % FCS.
- MethA Aus Balb/c Mausembryo-Fibroblasten gewonnene, durch Methylcholanthren transformierte Zelllinie mit mutiertem p53 [1. Allel: Cys ->Phe (Codon 132); 2. Allel: Glu -> Gly (Codon 168) und Met -> Ile (Codon 234)] (DeLeo *et al.*, 1977; Eliyahu *et al.*, 1988). Kultivierung in DMEM mit 5 % FCS.
- mKSA Aus Balb/c Mausembryo-Fibroblasten gewonnene, SV40 transformierte und SV40 T-Ag exprimierende wildtyp p53 Zelllinie (Kit *et al.*, 1969). Kultivierung in DMEM mit 5 % FCS.

1.3 HUMANE ZELLINIEN

- HCT116 Humane Colon-Carcinom-Zelllinie mit wildtyp p53, aus der durch gerichtete homologe Rekombination verschiedene Tochter-Zelllinien (defizient für p53 bzw. p21) gewonnen wurden (Bunz *et al.*, 1998; Waldman *et al.*, 1995). Diese Zelllinien wurden in DMEM mit 10 % FCS kultiviert und freundlicherweise von Dr. Bert Vogelstein (John Hopkins University, Baltimore, USA) zur Verfügung gestellt.
- A549 Humane Lungencarcinom-Zelllinie mit intaktem wildtyp p53 (Giard *et al.*, 1973). ATCC #CCL185. Kultivierung in DMEM mit 10 % FCS.

2. Antikörper

Die eingesetzten Verdünnungen und Mengen sind jeweils in Klammern gesetzt angegeben und beziehen sich je nach Verwendung auf Western-Blot Analysen (WB), Immunpräzipitation (IP) oder Immunfluoreszenz (IF).

2.1 ANTIKÖRPER AUS ÜBERSTÄNDEN VON HYBRIDOM-ZELLINIEN

- DO-1 Muriner monoklonaler Antikörper gegen den N-Terminus von humanem p53 (Vojtesek *et al.*, 1992). Die Hybridom-Zelllinie wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. David Lane (Dundee, UK). (WB: 1:20)
- 4B2 Muriner monoklonaler Antikörper gegen den N-Terminus von Mdm2 (Chen *et al.*, 1993). (WB: 1:15)
- PAb 248 Muriner monoklonaler Antikörper gegen den N-Terminus von p53 (Yewdell *et al.*, 1986). Verwendet als konzentrierter Überstand aus der T-Maus. (WB: 1:200; IF: 1:50; IP: 50µl)
- PAb 240 Muriner monoklonaler Antikörper gegen p53 in mutanter Konformation (Gannon *et al.*, 1990). Verwendet als konzentrierter Überstand aus der T-Maus. (WB: 1:250; IP: 50µl)
- PAb 246 Muriner monoklonaler Antikörper gegen p53 in wildtyp Konformation (Yewdell *et al.*, 1986). (IP: 1 ml)

2.2 SONSTIGE ANTIKÖRPER/SEREN

- Anti-Actin Polyklonaler Antikörper aus Ziege. Santa Cruz Biotechnology #sc-1616 (I-19). (WB: 1:500)
- Anti-Bax Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen den N-Terminus von Bax. Upstate #06-499 (Biomol, Hamburg). (WB: 1:1000; IF: 1:200; IP: 3µl)
- Anti-Bcl-xL Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen den C-Terminus von Bcl-xL. Santa Cruz Biotechnology #sc-8392 (H-5). (WB: 1:100)

Anti-Caspase 3	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen aktive Caspase 3 (cleaved caspase-3 (Asp175)). Cell Signaling #9661. (WB: 1:1000; IF: 1:300)
Anti-Cdc6	Meerschweinchen-Serum. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Irene Dornreiter (HPI Hamburg). (WB: 1:2000)
Anti-Gadd45	Monoklonaler Antikörper aus Maus. Santa Cruz Biotechnology #sc-6850 (C-4). (WB: 1:100)
Anti-GFP	Gemisch zweier monoklonaler Antikörper aus Maus. Roche #1814460. (WB: 1:1000)
Anti-HA	Monoklonaler Antikörper aus Ratte. Roche #1867423. (WB: 1:1000; IF: 1:200)
Anti-Mdm2	Meerschweinchen-Serum (Prof. Deppert, HPI Hamburg). (WB: 1:2000)
Anti-p21	Monoklonaler Antikörper aus Maus. BD PharMingen #556430. (WB: 1:400)
Anti-p53 (DO-1)	Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen den N-Terminus (aa 21-25) von humanem p53. Oncogene #OP43 (Ab-6) (Merck Biosciences, Bad Soden). (WB: 1:1000; IP: 2µg)
Anti-p53 (DO-12)	Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen eine zentrale Region (aa 256-270) von p53. Serotec #MCA 1705 (Biozol, Eching). (WB: 1:1000; IP: 2µg)
Anti-p53 (ICA.9)	Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen den C-Terminus (aa 383-393) von p53. Serotec #MCA 1708 (Biozol, Eching). (WB: 1:1000; IP: 2µg)
Anti-p53 (sapu)	Kaninchen-Serum. Scottish Antibody Production Unit #S238-120. (WB: 1:5000; IF: 1:1000)
Anti-p53-Ser15	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen phosphoryliertes p53. Spezifisch für an Serin 15 phosphoryliertes p53 (Phospho-p53-Ser15). Cell Signaling #9284. (WB: 1:1000)
Anti-PARP	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen, erkennt das intakte 116 kDa Protein sowie das apoptotische 84 kDa Fragment. Alexis #210-302-R100. (WB: 1:2000)
Anti-PIG-3	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen. Oncogene #PC268 (Ab-1) (Merck Biosciences, Bad Soden). (WB: 1:500)
Anti-PUMA	Polyklonaler Antikörper gegen den C-Terminus von PUMA aus Kaninchen. Imgenex #IMG-459 (Biocarta, Hamburg). (WB: 1:500)
Anti-SAF-A (K371)	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Frank Fackelmayer (HPI Hamburg). (WB: 1:500)

Anti-Tubulin	Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen α -Tubulin. Oncogene #CP06 (Ab-1) (Merck Biosciences, Bad Soden). (WB: 1:5000)
Anti-14-3-3 σ	Polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen den N-Terminus von 14-3-3 σ . Santa Cruz Biotechnology #sc-7681 (N-14). (WB: 1:100)

2.3 ENZYMGEKOPPELTE ANTIKÖRPER

Anti-Maus-HRP	IgG (H+L) aus Esel, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase. Jackson #715-035-150 (Dianova, Hamburg). (WB: 1:10 000)
Anti-Kaninchen-HRP	IgG (H+L) aus Esel, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase. Rockland #611-703-127 (Biomol, Hamburg). (WB: 1:15 000)
Anti-Ziege-HRP	IgG (H+L) aus Esel, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase. Rockland #605-703-125 (Biomol, Hamburg). (WB: 1:10 000)
Anti-Ratte-HRP	IgG (H+L) aus Ziege, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase. Jackson #112-035-102 (Dianova, Hamburg). (WB: 1:5000)
Anti-Meerschweinchen-HRP	IgG (H+L) aus Ziege, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase. Rockland #606-103-129 (Biomol, Hamburg) (WB: 1:10 000)

2.4 FARBSTOFFGEKOPPELTE ANTIKÖRPER

Anti-Maus-DTAF	IgG (H+L) aus Ziege, konjugiert mit DTAF, adsorbiert gegen Human, Kaninchen, Rind, Pferd, Schwein. Dianova #115-015-146 (IF: 1:100)
Anti-Maus-Alexa488	IgG aus Esel, konjugiert mit Alexa488, minimal kreuzreaktiv. Molecular Probes #A-21202 (MoBiTec, Göttingen). (IF: 1:400)
Anti-Maus-Alexa555	IgG aus Esel, konjugiert mit Alexa555, minimal kreuzreaktiv. Molecular Probes #A-31570 (MoBiTec, Göttingen). (IF: 1:1000)
Anti-Kaninchen-Alexa488	IgG aus Esel, konjugiert mit Alexa488, minimal kreuzreaktiv. Molecular Probes #A-21206 (MoBiTec, Göttingen). (IF: 1:1000)
Anti-Kaninchen-Alexa555	IgG aus Esel, konjugiert mit Alexa555, minimal kreuzreaktiv. Molecular Probes # A-31572 (MoBiTec, Göttingen). (IF: 1:1000)
Anti-Kaninchen-RhodX	IgG aus Esel, konjugiert mit Rhodamin Red-X, adsorbiert gegen Human, Maus, Ratte, Rind, Ziege, Schwein, Pferd, Meerschweinchen. Dianova #711-295-152. (IF: 1:250)
Anti-Ratte-Alexa488	IgG aus Ziege, konjugiert mit Alexa488, minimal kreuzreaktiv. Molecular Probes #A-11006 (MoBiTec, Göttingen). (IF: 1:500)

3. Proteine und Enzyme

Aprotinin	(Trasylol®) Bayer, Leverkusen
BSA (Fraktion V)	Biomol, Hamburg
Leupeptin	Biomol, Hamburg
Pefabloc®	Biomol, Hamburg
Pepstatin A	Biomol, Hamburg
RNase A	Sigma, Taufkirchen (#R-6513)
Trypsin (1:250)	Biochrom, Berlin
AMV Reverse Transcriptase	Promega #M5101
Taq DNA-Polymerase	Eppendorf, Hamburg #0032 002.307

4. Plasmide

838	Expressionsvektor, kodiert für ein Fusionsprotein aus β -Galactosidase und GFP. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Dr. Frank Fackelmayer (HPI Hamburg)
pCIneo wtp53 ^{HA}	Expressionsvektor (9,5 kb) mit Ampicillin-Resistenz, kodiert für murines wildtyp p53 mit einem Hämagglutinin (HA)-Tag unter der Kontrolle des CMV-Promotors, hergestellt aus chimärer DNA, d.h. zusammengesetzt aus p53 cDNA und genomischen Intron-Sequenzen (Hermannstädter, 2003). Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Andrea Hermannstädter (Abt. Prof. Deppert, HPI Hamburg)
pC GFP I	Expressionsvektor (5,5 kb) für das <i>Green fluorescent protein</i> (GFP) mit Ampicillin-Resistenz. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Andrea Hermannstädter (Abt. Prof. Deppert, HPI Hamburg)

5. Chemikalien und andere Materialien

Soweit nicht anders angegeben, wurden handelsübliche Chemikalien in Analysequalität der Firmen Fluka und Sigma (Taufkirchen), Merck (Darmstadt) und Serva (Heidelberg) verwendet. Spezielle (Bio)-Chemikalien und andere Materialien wurden von folgenden Herstellern bezogen:

ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing	PE Biosystems, Weiterstadt
Actinomycin D	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (#A9415)
Agarose	Sigma, Taufkirchen

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
19:1 Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 40% (w/v)	Gibco/BRL Life Technologies, Eggenstein
X-Gal	Peqlab, Erlangen (#37-2610)
Complete Mini (Proteaseinhibitoren)	Roche, Mannheim (#1836153)
4-Cumarsäure	Sigma, Taufkirchen
Deckgläschen 18 x 18 mm	Hecht, Sondheim
Dimethylformamid (DMFA)	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Bad Soden
DMEM Pulver	Gibco/BRL Life Technologies, Eggenstein
DNA Standard-Marker (100 bp)	<i>100 base-pair ladder</i> , Amersham Pharmacia, Freiburg #27-4001-01
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot (#X0192)
DRAQ5 [®]	Alexis, Grünberg (#BOS-889-001-R200)
Einfrierröhrchen	Nunc (VWR, Frankfurt)
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Esel-Normalserum	Dianova, Hamburg (#017-000-121)
Falcon [®] -Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Filterpapier Whatman 3MM	Schleicher und Schüll, Dassel
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching - Österreich
Gewebekulturflaschen (80 cm ²)	Nunc (VWR, Frankfurt)
Gewebekulturschalen (Ø 6; 9; 14 cm)	<i>NunclonTM Δ Surface</i> , Nunc (VWR, Frankfurt)
Handschuhe <i>Safeskin</i> (Nitril)	Kimberly Clark, Zaventem–Belgien (#52003M)
Immobilon TM -P Membran	Millipore, Eschborn
L-Glutamin 200 mM	PAA, Pasching - Österreich (#M11-004)
Luminol	Sigma, Taufkirchen
Magermilchpulver	<i>frema Reform</i> , De-Vau-GE, Lüneburg
Mitotracker Green [®] FM	Molecular Probes #M-7514 (MoBiTec, Göttingen)
Nonidet [®] P40 (NP-40)	Fluka, Taufkirchen (#74385)
Objektträger 76 x 26 mm	Omnilab, Hamburg
Parafilm „M“	American National Can TM Greenwich
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biozym, Hess. Oldendorf
Polyvinylalkohol	Sigma, Taufkirchen (#P8136)
PP-Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen
PP-Zentrifugenröhrchen (250 ml)	Corning, New York - USA
Propidiumiodid	Sigma, Taufkirchen
Protein Assay Farbstoff-Konzentrat	BioRad, München

Protein-Molekulargewichtsmarker	<i>Prestained SDS-7B</i> , Sigma, Taufkirchen
Protein G Sepharose	Amersham Pharmacia, Freiburg
Röntgenfilm Super RX	Fuji, Düsseldorf
Röntgenfilm CEA RP NIF New	PMA Bode, Hamburg
Röntgenfilm Kodak Biomax™ MR	Amersham, Freiburg
RPMI-1640 Pulver	Gibco/BRL Life Technologies, Eggenstein
Steriles Wasser	DeltaSelect, Pfullingen
TEMED	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Tween®-20	Fluka, Taufkirchen

6. Kits

Nucleofector™ Kit R	amaxa, Köln
Nucleo Spin Tissue Kit	Macherey-Nagel, Düren (#74095250)
QIAEX II Gel extraction kit	Qiagen, Hilden (#20021)
QIAshredder™	Qiagen, Hilden (#79656)
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden (#74104)
SuperSignal® West Dura extended duration substrate	Pierce #34075 (Perbio Science, Bonn)

7. Allgemeine Puffer und Nährmedien

- PBS

137 mM	Natriumchlorid
2,7 mM	Kaliumchlorid
10 mM	Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)
1,8 mM	Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)
pH 7,4	

- RPMI-1640 Medium

10,4 g/l	RPMI-1640 Pulver (Gibco/BRL)
2,0 g/l	Natriumhydrogencarbonat

in Sterilem Wasser (DeltaSelect)
pH 7,3

- DMEM Medium

13,4 g/l	DMEM-Pulver (Gibco/BRL)
3,7 g/l	Natriumhydrogencarbonat

in Sterilem Wasser (DeltaSelect)
pH 7,3

- 10x TBS
 100 ml 1 M Tris-HCl pH 8,0
 300 ml 5 M NaCl
 aufgefüllt mit *Millipore*-Wasser auf 1 l
 - 10x Tris-Glycin
 146,4 g Glycin
 60,6 g Tris
 aufgefüllt mit *Millipore*-Wasser auf 1 l
- Bei 1:10 Verdünnung ist pH 8,3

8. Geräte

Analysenwaagen	<i>PM 360, PM 460, PM 3000, 54AR</i> (Mettler, Gießen)
Brutschrank	<i>Forma Scientific water-jacketed incubator 3250</i> (Labotect, Göttingen)
Brutschrank	<i>HeraCell</i> (Heraeus, Hanau)
CCD-Kamera	<i>Spot</i> mit <i>Spot software</i> (Intas, Göttingen)
Durchflußcytometer	<i>Coulter epics XL-MCL</i> (Beckmann Coulter, Krefeld)
Geldokumentations-System	<i>BioDocAnalyze</i> (Biometra, Göttingen)
Gelelektrophorese-System (Agarose)	<i>Horizon[®] 58, Horizon[®] 11.14</i> (Gibco/BRL, Eggenstein)
Heizblock	<i>Techne Dri-Block[®] DB-2A</i> (Thermo-Dux, Wertheim)
Horizontalschüttler	<i>3015</i> (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	<i>TCS-NT</i> (Leica, Bensheim)
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	<i>LSM 510 Meta</i> (Zeiss, Oberkochen)
Magnetrührer	<i>MR 3002</i> (Heidolph, Kelheim)
Fluoreszenz-Mikroskop	<i>DM RA</i> (Leica, Bensheim)
Phasenkontrast-Mikroskop	<i>Axiovert 25</i> (Zeiss, Oberkochen)
Minigel-Elektrophorese-Apparatur	<i>Hoefler Mighty Small II</i> (Hoefler, San Francisco – USA)
Nucleofector I	amaxa, Köln
pH-Meter	<i>PHM 82</i> (Radiometer, Kopenhagen – Dänemark)
Photometer	<i>BioSpec-1601 E</i> (Shimadzu, Duisburg)
Pipette	<i>Eppendorf Research 0,5-10 µl</i> (Eppendorf, Hamburg)
Pipetten	<i>Gilson Pipetman P20, P200, P1000</i> (Abimed, Langenfeld)
Spannungsquelle (Gele)	<i>Electrophoresis Power Supply – EPS 200</i> (Pharmacia, Freiburg)
Spannungsquelle (Western)	<i>Power Pac 200</i> (BioRad, München)
Tankblotapparatur	<i>Mini Trans-Blot Cell</i> (BioRad, München)
Thermocycler	<i>Primus 96 plus</i> (MWG-Biotech, Ebersberg)

Thermomixer	<i>Thermomixer comfort</i> (Eppendorf, Hamburg)
UV-Crosslinker	<i>1800</i> (Stratagene, Amsterdam – Niederlande)
Vortex	<i>Vortex-GenieTM</i> (Bender&Hobein, Zürich – Schweiz)
Wasserbad	<i>Type1012</i> (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)
Zentrifuge	<i>Biofuge pico</i> (Heraeus, Hanau)
Zentrifuge	<i>Rotanta 96R</i> (Hettich, Tuttlingen)
Zentrifuge	<i>Centrifuge5415C</i> (Eppendorf, Hamburg)
Zentrifuge	<i>Centrifuge5810R</i> (Eppendorf, Hamburg)

Methoden

1. Zellkultur

1.1 KULTIVIERUNG VON ADHÄRENTEN ZELLEN

Alle verwendeten Zellen wurden als adhärent wachsende Kulturen gehalten. Die Kultivierung erfolgte in dem für jede Zelllinie jeweils spezifisch angegebenen Medium unter Zusatz von FCS sowie ggf. L-Glutamin (Zelllinien-spezifische Details siehe **Materialien**). Alle Zellen bis auf 10-1cG9 wurden bei 37 °C, 5 % CO₂-Atmosphäre und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % in Kultur gehalten. 10-1cG9 Zellen, die temperatursensitives p53 exprimieren, wurden bei einer Temperatur von 39 °C gehalten. Die Kultivierung erfolgte in beschichteten Gewebekulturschalen (Nunc), wobei die Zellpopulationen subkonfluent gehalten wurden. Die Zellen wurden je nach Dichte des Zellrasens und Wachstumsgeschwindigkeit alle drei bis vier Tage passagiert und dabei im Verhältnis 1:3 bis 1:10 verdünnt. Für die Passagierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen, durch die Zugabe von *Trypsin-Lösung* (kurze Inkubation bei 37 °C) abgelöst und in frischem Medium suspendiert. Abhängig von der gewünschten Verdünnung wurde ein bestimmtes Aliquotes der Zellsuspension mit Medium auf ein Gesamtvolumen von pro Schale 20 ml (Ø 14 cm) bzw. 10 ml (Ø 9 cm) oder 5 ml (Ø 6 cm) aufgefüllt. Um bei den Bestrahlungsexperimenten die Untersuchung von Zellen in der Phase exponentiellen Wachstums zu gewährleisten, erfolgte eine Passagierung immer ein oder zwei Tage vor der Bestrahlung.

- *Trypsin-Lösung*
 - 2 % (v/v) Trypsin-Stammlösung (Biochrom)
 - 5 mM EDTA pH 8,0

in PBS; sterilfiltriert

1.2 AUFTAUEN UND EINFRIEREN VON ZELLEN

Eingefrorene und in flüssigem Stickstoff oder bei –80 °C gelagerte Zellen wurden schnell im Wasserbad (37 °C) aufgetaut und in 15 ml vorgewärmtes (37 °C) Kulturmedium überführt. Nach Zentrifugation (7 min; 200 g; RT) wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen in frischem, für die jeweilige Zelllinie geeigneten Medium (5-20 ml) resuspendiert und in Kultur genommen. Bei adhärent wachsenden Zellen wurde zur Entfernung von toten Zellen am nächsten Tag ein Mediumwechsel vorgenommen.

Zum Einfrieren adhärent wachsender Zellen wurden die Zellen durch Behandlung mit Trypsin vom Plattenboden abgelöst und in 10 ml frischem Kulturmedium je 9 cm Platte aufgenommen. Die

Zellen wurden abzentrifugiert (7 min; 200 g; RT), der Überstand abgenommen und die Zellen in 1,5 ml *Einfriermedium* (pro Ø 9 cm Platte) aufgenommen. Je 1,5 ml (entspricht ca. $0,5 - 1 \times 10^7$ Zellen) der resultierenden Zellsuspension wurden in ein auf Eis vorgekühltes Einfrierrohrchen (Nunc) überführt und in einer Styroporbox durch Inkubation für 1h bei -20 °C und anschließend über Nacht bei -80 °C langsam abgekühlt. Die Langzeit-Lagerung von Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zum Einfrieren von in Suspension wachsenden Zellen wurden die Zellen durch Zentrifugation (7 min; 250 g; RT) sedimentiert, in einem entsprechenden Volumen Einfriermedium ($0,5 - 1 \times 10^7$ Zellen/ 1,5 ml) aufgenommen und wie oben beschrieben weiter abgekühlt.

- *Einfriermedium*

90 % FCS

10 % DMSO

Lagerung bei -20 °C , Auftauen im Kühlschrank bei 4 °C

2. Bestrahlung von Zellen

Zur Untersuchung der Schadensreaktion von Zellen wurden DNA-Schäden durch Bestrahlung mit UV-Licht oder Gamma-Strahlung induziert. Hierfür wurden Zellen verwendet, die sich in der Phase exponentiellen Wachstums befanden. Um Aussagen über den zeitlichen Verlauf verschiedener Schadensreaktionen treffen zu können, wurden die Zellen nach der Bestrahlung wieder unter normalen Bedingungen in Kultur gehalten und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung für die Verwendung in mehreren Analysemethoden (siehe **3.**) aufgearbeitet.

2.1 UV-BESTRAHLUNG

Zur UV-Bestrahlung adhärent wachsender Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Waschflüssigkeit wurde entfernt und die Zellen in den Gewebekulturschalen ohne Deckel mit der jeweiligen Dosis UV-Licht ($10-100\text{ J/m}^2$) im *UV-Crosslinker 1800* (Stratagene) bestrahlt. Anschließend wurde frisches Medium zugefügt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen unter normalen Bedingungen im Brutschrank inkubiert und nach verschiedenen Zeiten aufbereitet. Als „mock“-Kontrollansätze wurden einige Zellplatten nach einmaligem Waschen und Zugabe von frischem Medium zu verschiedenen Zeitpunkten parallel zur Aufbereitung bestrahlter Zellen aufgearbeitet.

2.2 GAMMA-BESTRAHLUNG

Für die Gamma-Bestrahlung von Zellen wurde die „Lisa“-Anlage mit einer offenen Caesium-137 Quelle am Heinrich-Pette-Institut verwendet. Unterschiedliche Strahlendosen wurden dabei über verschiedene Expositionszeiten erzielt. Unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität der Strahlenquelle entsprach eine Expositionszeit von 50 sec in etwa einer Strahlendosis von 1 Gy.

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte ohne Entfernung des Mediums, anschließend wurden die Zellen bis zu ihrer Aufarbeitung unter normalen Bedingungen in Kultur gehalten.

3. Aufbereitung der bestrahlten Zellen

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung (2-72 h) sowie von unbehandelten Zellen (0 h) und den „*mock*“-Kontrollansätzen erfolgte die Aufbereitung der Zellen für die Verwendung in verschiedenen Analyseverfahren.

3.1 HERSTELLUNG VON ZELLEDIMENTEN

Zur Herstellung von Zellsedimenten adhärent wachsender Zellen wurde das Medium von den Gewebekulturschalen abgesaugt und die Zellen zwei- bis dreimal mit vorgekühltem (4 °C) PBS gewaschen. Nach Absaugen der Waschflüssigkeit wurden die Zellen mit einem Gummischaber vom Plattenboden abgelöst und in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße überführt. Durch Zentrifugation (6 min; 310 g; 4 °C) in einer Kühlzentrifuge (Rotanta) wurden die Zellen sedimentiert. Die Überstände wurden abgesaugt, die Lagerung der Zellsedimente bis zur weiteren Verwendung (siehe 4.1) erfolgte bei -70 °C. Während des gesamten Vorgangs wurde auf eine möglichst schnelle Arbeitsweise geachtet. Je nach Verwendung und Zelldichte wurden ein bis drei Ø 14 cm Zellplatten zur Herstellung eines Zellsedimentes eingesetzt.

Bei in Suspension wachsenden Zellen wurde die Zellsuspension in 50 ml Falcon-Gefäße überführt und zentrifugiert (6 min; 310 g; 4 °C). Der Medium-Überstand wurde entfernt, die Zellsedimente in reichlich gekühltem (4 °C) PBS aufgenommen, resuspendiert und erneut zentrifugiert (6 min; 310 g; 4 °C). Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellsediment in 1-2 ml gekühltem (4 °C) PBS aufgenommen und je nach Menge in ein bis zwei 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Durch Zentrifugation (6 min; 310 g; 4 °C) erfolgte die Sedimentierung der Zellen. Die Überstände wurden abgesaugt, die Lagerung der Zellsedimente bis zur weiteren Verwendung (siehe 4.1) erfolgte bei -70 °C. Während des gesamten Vorgangs wurden die Gefäße mit den Zellsuspensionen bzw. -sedimenten auf Eis gehalten und auf eine möglichst schnelle Arbeitsweise geachtet.

3.2 FIXIERUNG DER ZELLEN FÜR DIE DURCHFLUßCYTOMETRIE

Zur Verwendung für die durchflußcytometrische Zellzyklusanalyse (siehe 5.2) wurden die Zellen mit Ethanol fixiert.

Aus Gewebekulturschalen (Ø 9 cm) mit adhärenen Zellen wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen einmal mit *PBS/EDTA* gewaschen. Durch kurze Inkubation bei 37 °C mit *Trypsin-Lösung* (siehe 1.1) wurden die Zellen vom Plattenboden abgelöst und in 10 ml 4 °C kaltem *PBS/EDTA* aufgenommen. Die resultierende Suspension wurde in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, zentrifugiert (6 min; 310 g; 4 °C) und der Überstand abgenommen. Zur Fixierung wurden je Zellsediment unter stetigem Vortexen (geringe Stufe) zunächst 500 µl gekühltes (4 °C) *PBS/EDTA* zugegeben, danach tropfenweise 5 ml gekühlter (-20 °C) 80 % Ethanol zugefügt. Um einen möglichst guten Austausch des intrazellulären Wassers gegen Ethanol zu gewährleisten, wurden die Zellsuspensionen mindestens 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

Bei Suspensionszellen wurde ein Aliquotes von mindestens 1×10^6 Zellen in ein 15 ml PP-Röhrchen überführt und zentrifugiert (6 min; 310 g; 4 °C). Nach Abnehmen des Überstandes wurden die Zellen wie oben beschrieben mit 500 µl *PBS/EDTA* (4 °C) und 5 ml Ethanol 80 % (-20 °C) fixiert.

- *PBS/EDTA*
0,1 % (w/v) EDTA in PBS
pH 7,5

3.3 FIXIERUNG DER ZELLEN FÜR DIE IMMUNFLUORESCENZ

Für die Herstellung mikroskopischer Präparate wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert. Dafür wurden vor dem Passagieren der Zellen eine entsprechende Anzahl von sterilen Deckgläschen (18 x 18 mm) in den Zellkulturplatten vorgelegt, an denen die adhärenen Zellen dann anwachsen. Zur Fixierung wurde das Medium von den Zellplatten abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden auf geeigneten Ständern in -20 °C kalte *Fixierlösung* getaucht und dort bis zur weiteren Verwendung (siehe 5.4), mindestens jedoch über Nacht, bei -20 °C gelagert.

- *Fixierlösung*
Methanol/Aceton (1:1)
Vorgekühlt auf -20 °C

4. Proteinanalytische Methoden

4.1 ZELLYSE

Zu den noch gefrorenen Zellsedimenten (siehe 3.1) wurde bei Lagerung auf Eis ein ungefähr gleiches Volumen gekühlter (4 °C) *EIA-Lysepuffer*⁺ gegeben. Durch mehrfaches kräftiges Ratschen der Eppendorf-Gefäße über eine geriffelte Oberfläche wurden die Zellen im Lysepuffer suspendiert. Die Ansätze wurden zur Lyse 30 min auf Eis inkubiert, das oben beschriebene Ratschen wurde dabei gelegentlich wiederholt. Zur Abtrennung von Zelltrümmern erfolgte eine Zentrifugation (30 min; 20817 g; 4 °C), die Überstände (Lysate) wurden anschließend in frische Eppendorf-Gefäße überführt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde gemäß der Methode nach Bradford (siehe 4.2) durchgeführt. Im Anschluß wurden die Lysate in eine Immunpräzipitation (siehe 4.3) eingesetzt oder mit einem entsprechenden Volumen an *6x Sample buffer* versetzt, durch Erhitzen für 5 min bei 95 °C denaturiert und bis zur Verwendung bei –20 °C gelagert. Für Immunpräzipitationen (siehe 4.3) wurde die Lyse unter Zusatz von Phosphatase-Inhibitoren in *EIA-Lysepuffer*⁺⁺ durchgeführt.

- *EIA-Lysepuffer*

50 mM	HEPES
150 mM	Natriumchlorid
0,1 %	NP-40

pH 7,0-7,5; eingestellt mit KOH; sterilfiltriert

- *EIA-Lysepuffer*[±]

EIA-Lysepuffer mit

0,1 %	Leupeptin (5 mg/ml in Wasser/Glycerol (1:1); Lagerung bei –20 °C)
1 %	Pepstatin A (1 mg/ml in Methanol; Lagerung bei –20 °C)
1 %	Pefablock sc (25 mg/ml in Wasser/Glycerol (1:1); Lagerung bei –20 °C)
1 %	Trasyolol

oder alternativ:

1 Tablette *complete mini* (Roche) pro 10 ml *EIA-Lysepuffer*

jeweils frisch angesetzt und auf Eis gelagert

- *EIA-Lysepuffer*⁺⁺

<i>EIA-Lysepuffer</i> ⁺ mit	
5 mM	Natriumfluorid
4 mM	EGTA pH 7,5
1 mM	EDTA pH 7,5

- *6x Sample buffer*

350 mM	Tris-HCl pH 6,8
35 % (v/v)	Glycerol
10 % (w/v)	SDS
0,6 M	DTT
0,12 g/l	Bromphenolblau

Lagerung in Aliquoten bei –20 °C

4.2 PROTEINBESTIMMUNG

Die Bestimmung der Proteinkonzentration gemäß der Methode nach Bradford (1976) beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue an basische und aromatische Aminosäuren in saurer Lösung und einer damit verbundenen Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm (Pingoud und Urbanke, 1997). Die Ermittlung der Proteinkonzentration aus der gemessenen Absorption bei 595 nm (Abs_{595}) erfolgt dabei mit Hilfe einer zuvor angefertigten BSA Standard-Eichreihe.

Zur Durchführung wurde 1 μ l des Lysats (siehe 4.1) mit 800 μ l Wasser vermischt, 200 μ l *Bradford Reagenz* zugegeben und nach guter Durchmischung und 7 min Inkubation bei Raumtemperatur Abs_{595} in Halbmikro-Plastikküvetten gemessen. Als Nullwert wurde ein Ansatz mit 1 μ l *EIA-Lysepuffer*⁺ anstelle des Lysats verwendet. Von allen Proben wurden Doppelbestimmungen gemacht und die jeweilige Konzentration aus dem Mittelwert der erhaltenen Absorptionen bestimmt.

- *Bradford Reagenz*
Protein Assay Farbstoff-Konzentrat (BioRad)

4.3 IMMUNPRÄZIPITATION

Aus E1A-Lysaten (siehe 4.1) wurden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern die entsprechenden Proteine und mit ihnen assoziierte Bindungspartner präzipitiert.

Zunächst wurden die Antikörper an Protein G-Sepharose gebunden. Aus 100-150 μ l einer 10 % *Protein G-Sepharose (PGS)-Suspension* in E1A-Puffer wurde die PGS durch kurzes Zentrifugieren (1 min; 1000 rpm; 4 °C) sedimentiert und einmal mit *EIA-Lysepuffer*⁺⁺ (siehe 4.1) gewaschen. Nach erneuter kurzer Zentrifugation und Absaugen des Überstands wurde die PGS mit dem entsprechenden Antikörper (Überstand von Hybridomzellen bzw. aufgereinigter Antikörper, mit *EIA-Lysepuffer*⁺⁺ auf ein Mindestvolumen von 400 μ l aufgefüllt) versetzt und für 45-60 min unter kontinuierlichem Schwenken auf einem Horizontalschüttler bei 4°C inkubiert. Dabei erfolgte eine Adsorption der Antikörper an die PGS. Für die Immunpräzipitation wurde Zellysat (siehe 4.1) mit einem Proteingehalt von 300-2000 μ g zugesetzt. Während der folgenden 1-1,5 h Inkubation bei 4 °C unter kontinuierlichem Schwenken auf einem Horizontalschüttler erfolgte die Antigen-Antikörperbindung. Im Anschluß wurde die PGS dreimal mit 400 μ l *EIA-Lysepuffer*⁺⁺ gewaschen und mit 20 μ l *2x Sample-buffer* zur Denaturierung und Ablösung der Proteine von der PGS für 5 min bei 95 °C erhitzt.

Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proben bis zur Verwendung in der SDS-PAGE (siehe 4.4.) bei -20 °C gelagert.

- 10 % PGS-Suspension

Zum Waschen und Äquilibrieren wurde die PGS (Pharmacia) im 10-fachen Volumen sterilen Wassers suspendiert, bis zum Absetzen bei 4°C aufbewahrt und der Überstand abgenommen. Dieser Vorgang wurde 4-5 mal mit frischem Wasser, danach 2 mal mit EIA-Lysepuffer (siehe 4.1) wiederholt. Zur Herstellung der Gebrauchssuspension (10 %) wurde ein entsprechendes Volumen *EIA-Lysepuffer* zugegeben. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

- 2x Sample-buffer

0,125 M	Tris-HCl pH 6,8
20 %	Glycerol
4 % (w/v)	SDS
200 mM	Dithiothreitol
10 mg/l	Bromphenolblau

Lagerung in Aliquoten bei -20 °C

4.4 SDS-PAGE

Das Gießen der Minigele (100 mm x 80 mm x 1,0 mm) nach vorheriger Entgasung der jeweiligen Lösungen (ohne APS und TEMED) im Ölpumpenvakuum (ca. 30 min) sowie die Durchführung der Elektrophorese erfolgte unter Verwendung des Hoefer-Systems. Eingesetzt in die denaturierende Elektrophorese wurden jeweils Lysate mit einer Proteinmenge von 50-100 µg bzw. der gesamte Überstand aus der Immunpräzipitation. Zur Abschätzung von Molekulargewichten wurden auf jedem Gel außerdem jeweils 7-10 µl des *Prestained Markers SDS-7B* (Sigma) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei konstanten 20-25 mA/Gel durchgeführt.

- Trenngele (Mengen jeweils für 5 Gele)

	10 %	13 %
Acrylamid/Bisacrylamid	15 ml	19,5 ml
4x Tris/SDS-Puffer pH 8,8	11,25 ml	11,25 ml
Wasser bidest.	11,25 ml	14,25 ml
APS 10 %	150 µl	150 µl
TEMED	30 µl	30 µl

- Sammelgel (Mengen jeweils für 5 Gele)

Acrylamid/Bisacrylamid	3,9 ml
4x Tris/SDS Puffer pH 6,8	7,5 ml
Wasser bidest.	18,3 ml
10 % APS	150 µl
TEMED	30 µl

- 4x Tris/SDS Puffer pH 6,8

0,5 M	Tris-HCl
0,4 %	SDS

- 10x Laufpuffer (5 l)

151 g	Tris Base
720 g	Glycin
50 g	SDS
- 4x Tris/SDS Puffer pH 8,8

1,5 M	Tris-HCl
0,4 %	SDS

bei 1:10 Verdünnung ist pH 8,3

4.5 WESTERN BLOT UND IMMUNOLOGISCHE DETEKTION

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden im Tankblot-Verfahren (Apparatur Bio-Rad) in 60 min bei konstanten 100 V unter Eiskühlung aus den Gelen der SDS-PAGE (siehe 4.4) auf PVDF-Membranen (*Immobilon-P*, Millipore) transferiert. Zur Vorbereitung dafür wurden die Membranen zunächst durch Benetzen mit Methanol aktiviert und nach Abspülen unter fließendem Wasser (deionisiert) kurz in *Blot-Puffer* äquilibriert. Nach erfolgtem Transfer wurden die Membranen zur Besetzung freier Bindungsplätze unter Schwenken für 45 min in *Block-Puffer* inkubiert und kurz (1-2 min) mit *TBS-Tween* gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe des spezifischen primären Antikörpers (siehe **Materialien 2.1** und **2.2**) und Inkubation über Nacht unter Schwenken bei 4 °C. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurden die Membranen viermal für je 15 min bei RT mit *TBS-Tween* gewaschen, 1 h bei RT unter Schwenken mit dem sekundären, Peroxidase-konjugierten Antikörper (siehe **Materialien 2.3**) inkubiert, erneut viermal für je 15 min mit *TBS-Tween* gewaschen und in die ECL-Reaktion (siehe 4.6) eingesetzt. Zur Weiterverwendung wurden die Membranen kurz mit *TBS-Tween* gewaschen und getrocknet oder erneut für 30-45 min in *Block-Puffer* inkubiert, um in eine neue Immunreaktion eingesetzt zu werden. Getrocknete Membranen wurden vor Einsatz in einer weiteren Immunreaktion zunächst mit Methanol benetzt, unter fließendem Wasser (deionisiert) abgespült und für 30-45 min in Blockpuffer inkubiert.

- Blot-Puffer

192 mM	Glycin
50 mM	Tris
pH 8,3	
- TBS-Tween

10 mM	Tris pH 8,0
150 mM	NaCl
0,2 %	Tween-20
- Block-Puffer

5 % Magermilchpulver oder 2 % BSA in *TBS-Tween*

4.6 ECL-REAKTION

Zur Sichtbarmachung von Banden wurden die Membranen (siehe 4.5) mit *ECL-Reaktionslösung* 1 min im Dunkeln inkubiert und dann für verschiedene Zeiten (15 sec-5 min) auf Röntgen-Filmen

(Kodak-*Biomax* und CEA) exponiert. Die an die sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (HRP) spaltet dabei das in der *ECL-Reaktionslösung* angebotene Substrat Wasserstoffperoxid, die entstehenden Radikale lösen dann eine Chemilumineszenz-Reaktion aus, welche zur Schwärzung des Röntgen-Films an der Position des gebundenen HRP-gekoppelten Antikörpers führt.

Im Falle schwer zu detektierender Proteine wurde an Stelle der selbst hergestellten *ECL-Reaktionslösung* das käufliche *SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate* Pierce-Reagenz (Perbio Science) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

- Lösung A
 - 200 µl *Luminol-Stammlösung*
 - 88 µl *4-Cumarsäure-Stammlösung*
 - 20 ml 100 mM Tris-HCl pH 8,5
 - Lösung B
 - 30 µl Wasserstoffperoxid 30 %
 - 20 ml 100 mM Tris-HCl pH 8,5
- jeweils frisch angesetzt
- jeweils frisch angesetzt; im Kühlschrank
ca. 1 Woche haltbar
- Stammlösungen Luminol/ 4-Cumarsäure
 - Luminol (3-Aminophthalhydrazid): 443 mg in 10 ml DMSO (250 mM)
 - 4-Cumarsäure (p-Hydroxyzimtsäure): 74 mg in 5 ml DMSO (90 mM)
 - Lagerung in Aliquoten bei -20 °C
 - ECL-Reaktionslösung
 - 1:1 Gemisch aus *Lösung A* und *Lösung B*, unmittelbar vor Gebrauch angesetzt

5. Zellbiologische Methoden

5.1 TRANSIENTE TRANSFEKTION

Zur transienten Überexpression von p53 bzw. GFP wurden NIH 3T3 Zellen mit entsprechenden Plasmiden (pCIneo wtp53^{HA}, 838 und pC GFP I) transfiziert. Die Transfektion wurde mit Hilfe des *Nucleofector* (amaxes, Köln) unter Verwendung des *Nucleofector Kit R* (amaxes, Köln) und des Programms A-24 gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden 5 µg Plasmid-DNA für 1x10⁶ Zellen verwendet. Die benötigten Plasmide in für die Transfektion ausreichender Menge wurden freundlicherweise von Andrea Hermannstädter und Andrea Schwander (HPI Hamburg) zur Verfügung gestellt.

5.2 DURCHFLUSSCYTOMETRIE (FACS-ANALYSE)

Mit Hilfe durchflußcytometrischer Messungen wurde der Zellzyklusstatus, d.h. die prozentualen Anteile der distinkten Zellzyklusphasen innerhalb einer Zellpopulation, beobachtet (FACS-Analyse). Die Unterscheidung von G1, S und G2/M Phase-Zellen sowie apoptotischer Zellfragmente beruht dabei auf dem unterschiedlichen DNA-Gehalt in der Zelle, der durch Färbung mit dem DNA-Interkalator Propidiumiodid detektiert werden kann; G2 und M-Zellen sind mit dieser Methode nicht unterscheidbar.

Für die DNA-Färbung wurden die in Ethanol fixierten und bei -20 °C gelagerten Zellen (siehe 3.2) zunächst auf Raumtemperatur erwärmt (ca. 5 min) und anschließend aus der ethanolschen Suspension abzentrifugiert (6 min; 310 g; 16 °C). Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in jeweils 5 ml *PBS/EDTA* (siehe 3.2) vorsichtig resuspendiert und für ca. 5 min bei RT stehen gelassen. Nach erneuter Zentrifugation (6 min; 310 g; 16 °C) und Absaugen des Überstands wurden die Zellsedimente in je 0,5-1 ml *Färbelösung* resuspendiert und für mindestens 30 min bei Dunkelheit und 37 °C im Wasserbad inkubiert. Vor der Messung wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Messung der Propidiumiodid-Fluoreszenz erfolgte an einem *Coulter epics XL-MCL*-Gerät (Beckmann-Coulter) mit der Betriebs-Software *System II* (Beckmann-Coulter), dabei wurden jeweils 10 000 Ereignisse ohne Dubletten erfaßt. Für die Darstellung der FACS-Profile wurde die *Expo-32* Software (Beckmann-Coulter) verwendet, zur quantitativen Zellzyklusanalyse wurde die Software *Multicycle* (Phoenix) eingesetzt.

- Färbelösung

1:15 *Propidiumiodid-Stammlösung*

1:30 *RNase A-Stammlösung*

in PBS

jeweils frisch angesetzt, lichtgeschützt gelagert

- Propidiumiodid-Stammlösung

0,5 mg/ml Propidiumiodid in 380 mM Natriumcitrat pH 7,0. Lagerung lichtgeschützt bei 4 °C

- RNase A-Stammlösung

10 mg/ml RNase A in 10 mM Natriumacetat pH 5,2 lösen, 15 min kochen, nach langsamer Abkühlung auf Raumtemperatur pH-Wert durch Zugabe von 1/10 Volumen 1 M Tris-HCl pH 7,4 einstellen. Lagerung in Aliquoten bei -20 °C .

5.3 β -GALACTOSIDASE-FÄRBUNG

Zur Detektion Seneszenz-assoziiierter β -Galactosidase-Aktivität wurde das Medium von adhärent wachsenden Zellen abgenommen und der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen. Durch Zugabe

von *Paraformaldehyd-Lösung* und Inkubation für 3 min bei RT wurden die Zellen fixiert. Nach Absaugen der *Paraformaldehyd-Lösung* wurde der Zellrasen zwei- bis dreimal mit PBS für je 5 min auf einem Horizontalschüttler gewaschen und mit frisch angesetzter *Färbelösung* überschichtet (5-10 ml pro Ø 9 cm Platte). Für die enzymatische Reaktion der endogenen Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase, die zur Bildung eines blauen Farbstoffs führt, wurden die Zellplatten mit der *Färbelösung* für 16-30 h im Bakterien-Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die *Färbelösung* abgesaugt und der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen. Zur Auswertung wurden die Zellen lichtmikroskopisch auf eine Blaufärbung untersucht, die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer CCD-Kamera (Intas).

- *Paraformaldehyd-Lösung*

3 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS
pH 7,2

- *Färbelösung*

1:20 Verdünnung *Lösung B* in *Lösung A*
unmittelbar vor Gebrauch angesetzt

- *Lösung A*

40 mM Citronensäure-Monohydrat
40 mM Natriumphosphat
150 mM Natriumchlorid
2 mM Magnesiumchlorid
pH 6,0 einstellen

5 mM Kaliumferrocyanid (Fe II)
5 mM Kaliumferricyanid (Fe III)

jeweils frisch angesetzt

- *Lösung B*

20 mg X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-inosyl- β -Galactosid) in DMFA
Lagerung lichtgeschützt bei -20 °C

5.4 KONFOKALE FLUORESCENZ-MIKROSKOPIE

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Bax und anderen Proteinen wurden auf Deckgläschen kultivierte und mit Methanol/Aceton fixierte Zellen (siehe 3.3) mit spezifischen Antikörpern sowie dem Mitochondrien-Farbstoff *Mitotracker Green FM* (Molecular Probes) gefärbt und mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert.

Für die Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern wurden die in Methanol/Aceton bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerten Deckgläschen (siehe **3.3**) zunächst in einem PBS-Bad rehydriert (ca. 10 min). Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Deckgläschen für 10-15 min mit Esel-Normalserum (1:50 in PBS) behandelt und im Anschluß für 60 min mit den Protein-spezifischen ersten Antikörpern (verdünnt in PBS, siehe **Materialien 2.2**) inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen in PBS für jeweils ca. 7 min. Anschließend wurden die Deckgläschen mit den sekundären, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern (verdünnt in PBS, siehe **Materialien 2.4**) für 30 min behandelt und hiernach erneut dreimal mit PBS für 7 min gewaschen. Im Anschluß wurden die Deckgläschen mit *Mounting-Medium* eingebettet und auf Objektträgern fixiert (siehe unten) oder zuvor mit *Mitotracker Green FM* und/oder *DRAQ5* gefärbt.

Mit dem Farbstoff *Mitotracker Green FM* konnten spezifisch Mitochondrien unabhängig von deren Membranpotential angefärbt werden. Der Farbstoff kann durch einen Laser bei 488 nm angeregt werden, reichert sich in den Mitochondrien an und emittiert eine Fluorescein-ähnliche Fluoreszenz bei 490 nm (Herstellerangaben Molecular Probes). Für die Mitochondrien-Färbung wurden die Deckgläschen im Anschluß an die Immunfärbung (siehe oben) mit einer $0,5\text{ }\mu\text{M}$ frisch angesetzten Lösung aus *Mitotracker Green FM* in PBS für genau 10 min behandelt, anschließend dreimal für je 7 min in PBS gewaschen und eingebettet (siehe unten).

Für eine Färbung des Zellkerns wurde der DNA-Interkalator *DRAQ5* (Alexis) verwendet. Dieser Farbstoff kann durch einen Laser bei 646 nm angeregt werden und emittiert eine Fluoreszenz bei 670 nm (Herstellerangaben). Die Deckgläschen wurden 5 min mit einer 1:1000 Verdünnung von *DRAQ5* (entspricht einer Endkonzentration von $5\text{ }\mu\text{M}$) in PBS behandelt und ohne Waschen sofort eingebettet.

Zum Einbetten der Zellen wurde je ein Tropfen *Mounting-Medium* auf einem Objektträger vorgelegt. Die Deckgläschen wurden kurz in deionisiertes Wasser getaucht und nach Abtupfen letzter Flüssigkeitsreste mit der zellbewachsenen Seite nach unten vorsichtig auf den Objektträger aufgelegt. Durch Lagerung der Objektträger bei Raumtemperatur über Nacht im Dunkeln trocknete das *Mounting-Medium*, Zellen und Deckgläschen wurden so auf den Objektträgern fixiert.

Die Analyse der mikroskopischen Präparate erfolgte mit einem 63x Öl-Immersionsobjektiv an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Zeiss *LSM 510 Meta* bzw. Leica *TCS-NT*).

Die Blockierung und alle oben beschriebenen Färbeschritte wurden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt. Diese bestand aus einer mit feuchtem Whatman-Papier ausgelegten Kunststoff- oder Glaswanne. Auf dem Boden über der Papierschicht wurde ein Stück

Aluminiumfolie ausgebreitet, auf dem jeweils 100 µl der Blockier- bzw. Antikörper-/Farbstoff-Lösung aufgetragen wurden. Die Deckgläschen wurden mit der zellbewachsenen Seite nach unten vorsichtig auf die Flüssigkeitstropfen aufgelegt. Während der Inkubationszeiten wurde die Färbewanne mit einem Licht-undurchlässigen Deckel, an dessen Innenseite feuchtes Whatman-Papier befestigt war, abgedeckt. Zum Waschen in PBS wurden die Deckgläschen in einen Deckgläschenständer überführt und mit diesem in ein PBS-Bad getaucht, das auf einem Kippschüttler vorsichtig geschwenkt wurde.

- Mounting-Medium

12 g Polyvinylalkohol in 84 ml *Millipore*-Wasser und 6 ml 1M Tris-HCl pH 8,5 einrühren (über Nacht) und 30 % Glycerol zufügen.

Ergebnisse

1. Bestrahlung mit geringer Dosis beeinträchtigt das Wachstum von NIH 3T3 Zellen nicht dauerhaft, während schwere Strahlenschäden Apoptose oder einen terminalen Wachstumsarrest induzieren

DNA-Schädigung kann in Zellen zwei grundsätzlich verschiedene Schadensreaktionen hervorrufen. Im ersten Fall kann der Schaden verarbeitet und bewältigt werden; die geschädigte Zelle überlebt und kehrt wieder in den Normalzustand zurück. Im zweiten Fall ist eine vollständige Behebung des Schadens nicht möglich, und die Zelle startet ein Eliminierungsprogramm wie Apoptose oder terminalen Wachstumsarrest. Wenngleich die molekularen Mechanismen, die die Entscheidung zwischen diesen beiden Szenarien bestimmen, noch völlig unklar sind, kann dennoch plausibel postuliert werden, wann eine Zelle überleben und wann sie eliminiert werden sollte:

Ist das Schadensausmaß gering, sollte der Schaden durch Reparaturvorgänge behoben werden können, die Zelle nach Abschluß der Schadensantwort in den Normalzustand zurückkehren und somit überleben. Bei einem Schadensausmaß, das so groß ist, daß eine vollständige Reparatur nicht möglich ist, sollte eine solche Zelle zur Bewahrung der genomischen Integrität durch Apoptose eliminiert oder durch einen terminalen Wachstumsarrest zumindest dauerhaft von einer Zellteilung ausgeschlossen werden.

Zur Überprüfung der oben gemachten Annahmen sollte zunächst untersucht werden, ob in der murinen wildtyp p53 Zelllinie NIH 3T3 der Ausgang der Schadensreaktion tatsächlich durch Variation des Schadensausmaßes gezielt beeinflusst werden kann. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit je einer geringen und einer hohen Dosis UV- oder ionisierender Gamma-Strahlung geschädigt. Die dabei verwendeten Strahlendosen (10 und 100 J/m² UV sowie 2 und 20 Gy Gamma) wurden in Hinblick auf den gewünschten Ausgang empirisch ermittelt.

Die Schadensantwort von bestrahlten NIH 3T3 Zellen wurde zunächst durch eine durchflußcytometrische Zellzyklusanalyse (FACS-Analyse) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung untersucht. Bei dieser Methode wird die Verteilung einer Zellpopulation auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus über die Fluoreszenzintensität des DNA-Interkalators Propidiumiodid erfaßt, die wiederum direkt proportional zum DNA-Gehalt einer Zelle ist. Neben G1, S und G2/M-Zellen können daher auch DNA-haltige Zellfragmente, wie sie bei der Apoptose entstehen, erfaßt und unterschieden werden. Veränderungen des FACS-Profiles geben wichtige Hinweise auf die Aktivierung der Zellzyklus-Kontrollpunkte.

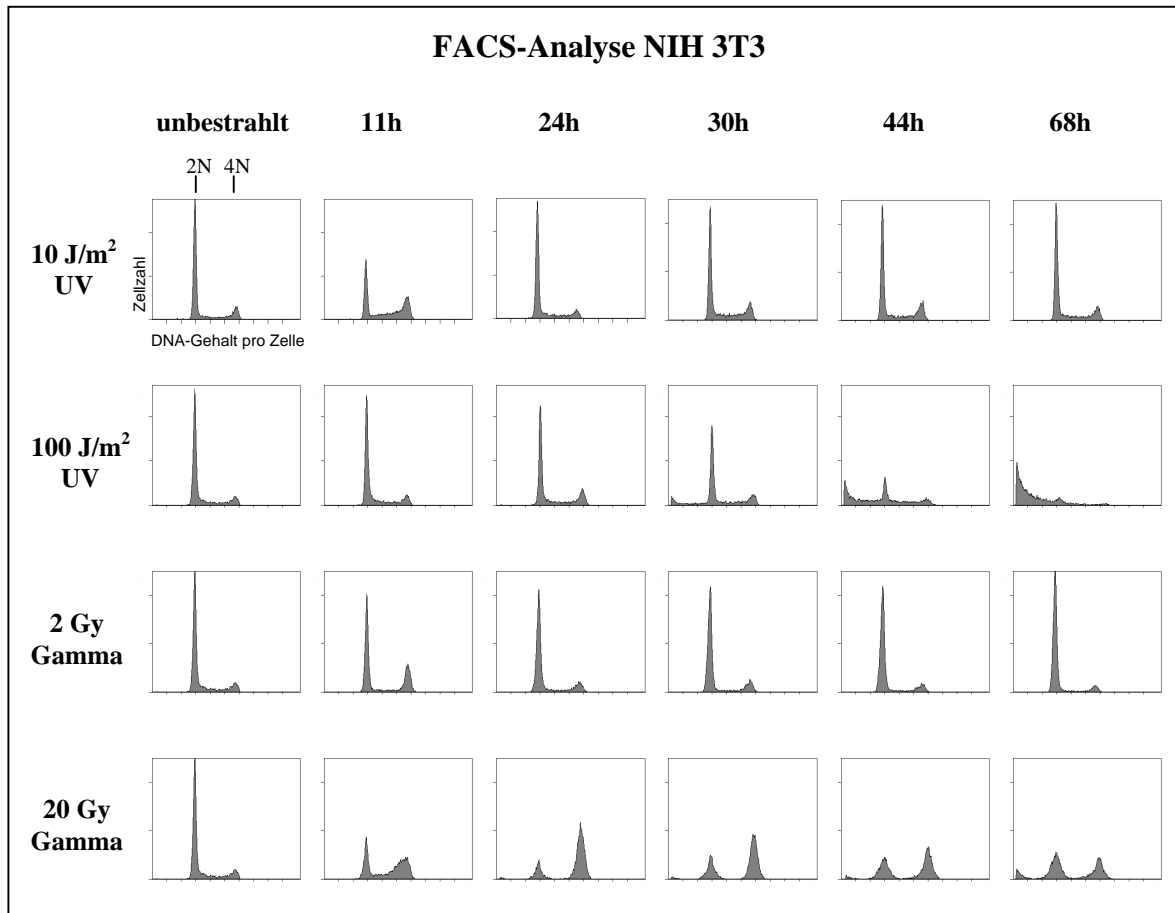


Abbildung 4: Unterschiedliche Bestrahlung von NIH 3T3 Zellen induziert unterschiedliche Schadensantworten. Zellzyklusprofile bestrahlter NIH 3T3 Zellen. Die Zellen wurden mit verschiedenen Dosen UV- und Gamma-Strahlung bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit Ethanol fixiert. Für die durchflußcytometrische Analyse wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und jeweils 10 000 Zellen erfaßt. 10 J/m² UV- und 2 Gy Gamma-bestrahlte Zellen zeigen temporäre Veränderungen in der Zellzyklus-Verteilung, Bestrahlung mit 100 J/m² UV führt zur DNA-Fragmentierung, während Bestrahlung mit 20 Gy Gamma einen terminalen Wachstumsarrest induziert.

Wie aus **Abbildung 4** ersichtlich ist, reagieren NIH 3T3 Zellen auf die unterschiedlichen Bestrahlungsarten sehr verschieden. Ausgehend von einem für proliferierende Zellkulturen normalen FACS-Profil bei unbestrahlten Zellen mit ca. 75 % G1-Phase Zellen (DNA-Gehalt: 2N), 15 % S-Phase Zellen (DNA Gehalt zwischen 2 und 4N) und 10 % G2/M-Phase Zellen (DNA Gehalt: 4N) führen alle Bestrahlungsarten zu signifikanten Änderungen in der Verteilung der Zellpopulation auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Dieser Befund zeigt, daß alle Bestrahlungsarten Proliferation und Zellzyklus-Progression der Zellen beeinflussen und stören. Auch die geringen Schäden, induziert durch Bestrahlung mit einer niedrigen Dosis (10 J/m² UV und 2 Gy Gamma), sind somit offenbar ausreichend, um eine deutlich erfaßbare Schadensantwort in NIH 3T3 Zellen hervorzurufen.

Wie aus den FACS-Profilen hervorgeht, unterscheiden sich Qualität und Kinetik der durch die verschiedenen Bestrahlungsarten induzierten Schadensantworten beträchtlich:

Während die Bestrahlung mit einer niedrigen Dosis (10 J/m² UV und 2 Gy Gamma) nur zu temporären Veränderungen (gut sichtbar an den FACS-Profilen 8 h nach Bestrahlung) führt, und die FACS-Profile zum Ende des Beobachtungszeitraums wieder eine normale Verteilung zeigen, induzieren starke DNA-Schäden (100 J/m² UV und 20 Gy Gamma) dauerhafte Veränderungen.

Bei Bestrahlung mit 100 J/m² UV erscheint ab 30 h nach Schadensinduktion ein zusätzlicher *peak* im FACS-Profil links von der Position der G1-Zellen. Dieser *peak* repräsentiert DNA-haltige Fragmente mit einem *subG1* DNA-Gehalt, wie sie im Zuge des apoptotischen Prozesses gebildet werden, aber auch durch mechanische Beanspruchung der Zellen beim Fixierungs- und Färbeprozess während der Aufbereitung für die FACS-Analyse entstehen können. Im Falle der 100 J/m² UV-Bestrahlung nimmt der *subG1 peak* beginnend ab 30 h kontinuierlich zu und beinhaltet 68 h nach Bestrahlung ca. 90 % aller Zellen. Die stetige Zunahme solcher Zelltrümmer während des Beobachtungs-Zeitraums spricht stark dafür, daß die Bestrahlung mit 100 J/m² UV in NIH 3T3 Zellen das apoptotische Programm aktiviert und eine derart bestrahlte Zellpopulation durch den Prozeß des programmierten Zelltods vollständig eliminiert wird.

Im Gegensatz zu den 10 J/m² UV- und 2 Gy Gamma-bestrahlten Zellen, bei denen während des gesamten Beobachtungs-Zeitraums keinerlei *subG1*-Fragmente detektiert wurden, weisen die FACS-Profile der 20 Gy Gamma-bestrahlten Zellen 44 h und 68 h nach Bestrahlung einen kleinen *subG1 peak* auf, dieser repräsentiert jedoch nur einen geringen Prozentsatz der Zellen. Obwohl dieser Befund gegen eine quantitative apoptotische Eliminierung der Zellen durch 20 Gy Gamma-Bestrahlung spricht, zeigen die signifikant veränderten FACS-Profile der 20 Gy bestrahlten Proben zu den späten Zeitpunkten doch klar, daß derart geschädigte Zellen dauerhaft in ihrer Proliferation gestört sind. In der Tat sind ab 30 h nach Bestrahlung nur noch geringe Veränderungen in den FACS-Profilen sichtbar. Dabei ist insbesondere auffällig, daß sich die Zellpopulation fast ausschließlich auf Zellen mit einem 2N oder 4N DNA-Gehalt konzentriert, während praktisch keine replizierenden S-Phase Zellen erkennbar sind. Dieser Befund ist konsistent mit einem sogenannten terminalen oder irreversiblen Wachstumsarrest, wie er auch bereits für Fibroblasten als Reaktion auf Gamma-Strahlung hoher Dosis beschrieben wurde (Gudkov und Komerova, 2003).

Zusammenfassend zeigt die durchflußcytometrische Analyse, daß alle verwendeten Bestrahlungsarten eine klare Schadensantwort in NIH 3T3 Zellen hervorrufen. Während die Induktion eines geringen Schadens (10 J/m² UV und 2 Gy Gamma) nur zu temporären Veränderungen des Zellzyklusprofils führt, resultiert eine starke Schädigung (100 J/m² UV und 20 Gy Gamma) in einer dauerhaften, wenngleich auch für UV und Gamma-Strahlung sehr unterschiedlichen Veränderung.

Dieses Ergebnis der FACS-Analyse deutet darauf hin, daß der Ausgang der Schadensreaktion tatsächlich durch das Ausmaß des induzierten DNA-Schadens gezielt beeinflusst werden kann. Während nach geringem Schaden anscheinend der Normalzustand wiederhergestellt wird, werden schwer geschädigte NIH 3T3 Zellen offenbar eliminiert oder dauerhaft von weiteren Zellteilungen ausgeschlossen.

Zur weiteren Bestätigung dieser Annahme wurden NIH 3T3 Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg (bis zu 14 Tagen nach Bestrahlung) beobachtet und in Kultur gehalten. In der Tat zeigten Zellen nach 10 J/m^2 UV- und 2 Gy Gamma-Bestrahlung im Langzeitversuch ein normales Verhalten und verhielten sich bezüglich ihrer Wachstumsrate in Kultur wie unbestrahlte Kontrollzellen (ohne Abbildung). Das Überleben und Proliferationsverhalten der Zellpopulation wurde somit durch die Induktion eines geringen DNA-Schadens langfristig nicht beeinträchtigt.

Im Gegensatz dazu waren ungefähr 3 Tage nach 100 J/m^2 UV-Bestrahlung nur noch im Kulturmedium schwimmende Zelltrümmer, aber keinerlei adhärierenden Zellen mehr vorhanden (ohne Abbildung), was konsistent ist mit einer vollständigen Eliminierung der bestrahlten Zellpopulation durch die starken UV-Schäden. Die 20 Gy Gamma-bestrahlten NIH 3T3 Zellen zeigten ein wiederum anderes Verhalten: Sie blieben größtenteils adhärent und hefteten sich nach Ablösung durch Trypsin beim Passagieren wieder an den Plattenboden an, jedoch fanden keine Zellteilungen mehr statt (ohne Abbildung). Dies spricht dafür, daß die Zellen nach schweren Gamma-Schäden zwar ihre Lebensfähigkeit behalten, jedoch dauerhaft von Zellteilungen und Wachstum ausgeschlossen sind.

Um die zellulären Eliminierungsprogramme, Apoptose und terminaler Wachstumsarrest, als Folge schwerer DNA-Schädigung nach UV- bzw. Gamma-Bestrahlung eindeutig nachzuweisen, wurden dafür spezifische Methoden verwendet.

Die Zerstörung einer Zelle im Zuge des programmierten Zelltods erfolgt im wesentlichen durch den gesteuerten Abbau von Proteinen und DNA (Thornberry und Lazebnik, 1998). Die Protease Caspase 3 gehört als eine der Effektor-Caspasen dabei zu den Faktoren, deren Aktivität maßgeblich für das Voranschreiten des Zerstörungsprozeß verantwortlich sind (Degterev *et al.*, 2003). Das Vorhandensein von aktiver Caspase 3, die durch proteolytische Spaltung im Zuge der Induktion des apoptotischen Programms aus dem Proenzym Procaspase 3 gebildet wird, kann daher als Marker für Apoptose dienen. Zum Nachweis von aktiver Caspase 3 in Western-Blot Analysen wurde ein spezifischer Antikörper verwendet, der nur die proteolytisch aktive Form (Banden bei 17 und 19 kDa), nicht jedoch die inaktive Procaspase 3 erkennt. Wie **Abbildung 5a** zeigt, ist die aktive Form von Caspase 3 nur in Lysaten aus Zellen nach 100 J/m^2 UV-Bestrahlung detektierbar. Damit konsistent können Spaltprodukte von Cdc6, einem Replikationsfaktor, der während der Apoptose durch Caspase 3 proteolytisch abgebaut wird (Pelizon *et al.* 2002), ebenfalls nur nach 100 J/m^2

UV-Bestrahlung nachgewiesen werden. Das Vorhandensein von aktiver Caspase 3 korreliert somit klar mit der proteolytischen Aktivität des Enzyms. Dies zeigt, daß 100 J/m² UV-Bestrahlung als einzige der verwendeten Bestrahlungs-Varianten Apoptose in NIH 3T3 Zellen auslöst. Der Western-Blot gegen Tubulin zeigt eine gleichmäßige Beladung der Gele.

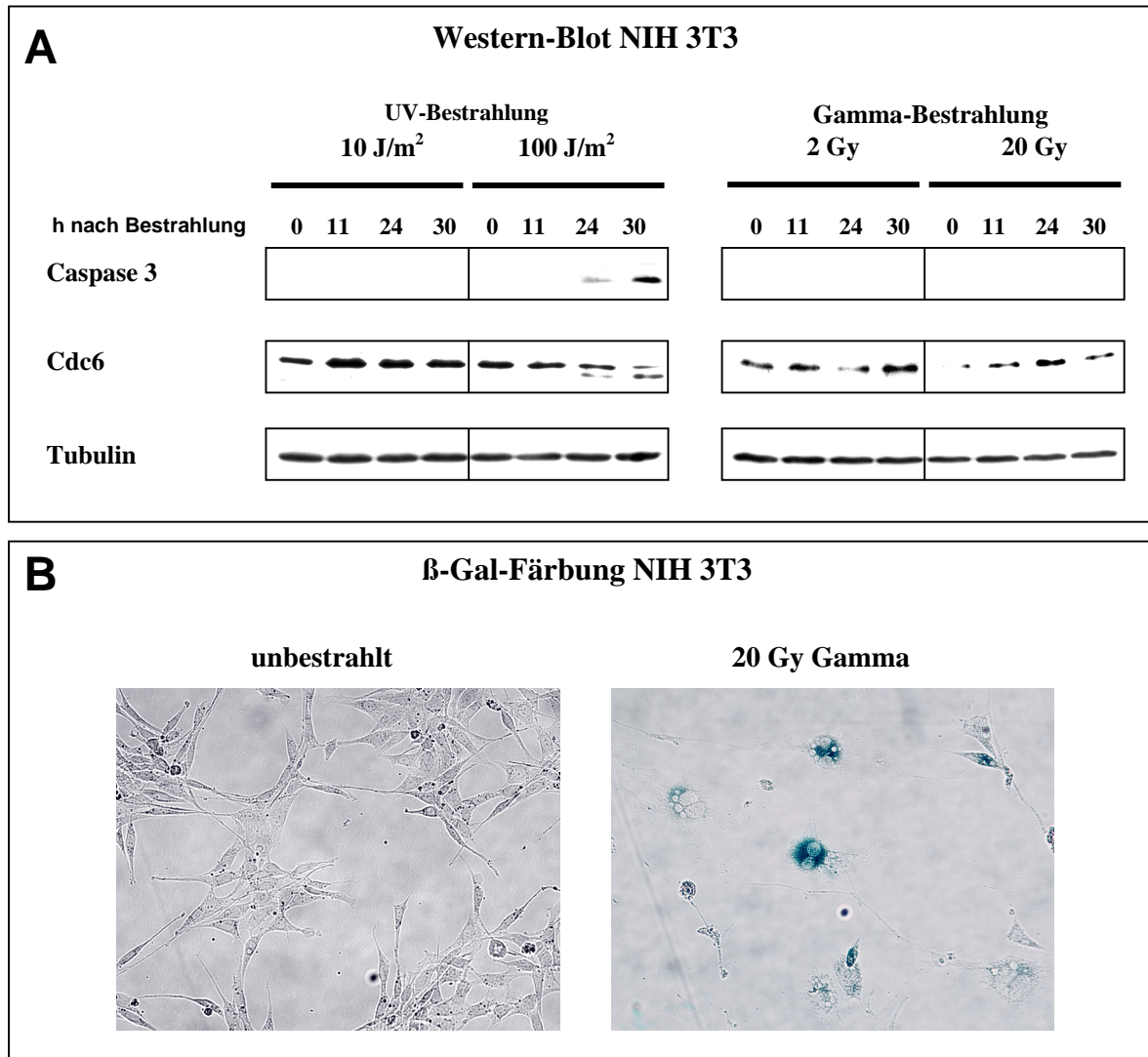


Abbildung 5: Bestrahlung mit hohen Dosen UV oder Gamma induziert die Eliminierung von NIH 3T3 Zellen. (A) Western-Blot unterschiedlich bestrahlter NIH 3T3 Zellen zum Nachweis von Apoptose. Die Zellen wurden jeweils mit unterschiedlichen Dosen UV- und Gamma-Strahlung geschädigt, zu den angegebenen Zeiten nach Bestrahlung geerntet und für die Western-Blot Analyse aufbereitet. Die Apoptosemarker, aktive Caspase 3 sowie das apoptotische Fragment von Cdc6, sind nur nach Bestrahlung mit 100 J/m² UV detektierbar. (B) Lichtmikroskopische Aufnahmen 20 Gy Gamma-bestrahlter und unbestrahlter NIH 3T3 Zellen nach β-Galactosidase Färbung zum Nachweis eines terminalen Wachstumsarrests. NIH 3T3 Zellen wurden 12 Tage nach 20 Gy Gamma-Bestrahlung zusammen mit unbestrahlten Kontrollzellen über eine β-Gal-Färbung auf die Aktivität von Seneszenz-assoziiierter β-Galactosidase und die für den terminalen Wachstumsarrest charakteristischen morphologischen Veränderungen untersucht. Die bestrahlten Zellen zeigen Micronucleisation und Vakuolenbildung und sind im Vergleich zu der unbestrahlten Kontrolle stark vergrößert. Die Blaufärbung der bestrahlten Zellen beruht auf der Umsetzung des Farbstoffs X-Gal und ist ein Marker für die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β-Galactosidase.

Charakteristisch für den terminalen Wachstumsarrest sind morphologische Veränderungen der Zellen sowie die Expression der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase (Chang *et al.*, 2002). Wie sich zeigte, weisen 20 Gy Gamma-bestrahlte NIH 3T3 Zellen die entsprechenden Merkmale auf: Lichtmikroskopisch ist deutlich eine starke Vergrößerung und Abflachung der Zellen festzustellen, darüber hinaus weisen viele Zellen Micronuclei und starke Vakuolen-Bildung auf (**Abbildung 5b**). Die Bildung eines blauen Farbstoffs nach Inkubation der Zellen mit X-Gal zeigt klar, daß in 20 Gy Gamma-bestrahlten NIH 3T3 Zellen eine hohe Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase vorhanden ist (**Abbildung 5b**). Im Gegensatz dazu konnte weder in unbestrahlten NIH 3T3 Zellen (**Abbildung 5b**) noch nach 10 J/m² UV- oder 2 Gy Gamma-Bestrahlung (Daten nicht abgebildet) β -Galactosidase-Aktivität nachgewiesen werden.

Insgesamt zeigt sich damit, daß durch Unterschiede in Art und Ausmaß eines induzierten DNA-Schadens der Ausgang der Schadensreaktion in NIH 3T3 Zellen gezielt beeinflußt werden kann. Schädigung mit einer niedrigen Dosis UV- oder Gamma-Strahlung (10 J/m² bzw. 2 Gy) führt zu temporären Veränderungen in der Zellzyklusprogression, beeinträchtigt die Lebensfähigkeit der Zellen jedoch nicht, da nach Abschluß der Schadensantwort ein normales Wachstumsverhalten zu beobachten ist. Im Gegensatz dazu werden nach schwerer Schädigung (100 J/m² bzw. 20 Gy) die zellulären Eliminierungsprogramme aktiviert. Während 100 J/m² UV-Bestrahlung NIH 3T3 Zellen durch die Aktivierung des apoptotischen Programms vollständig zerstört, induziert eine hohe Dosis Gamma-Strahlung einen terminalen Wachstumsarrest, durch den die bestrahlten Zellen zwar nicht zerstört werden, jedoch dauerhaft von Zellteilungen und Wachstum ausgeschlossen werden.

2. Alle Bestrahlungsarten führen zur Stabilisierung und Aktivierung von p53

Der Tumorsuppressor p53 gilt als einer der Schlüsselfaktoren in der zellulären Reaktion auf DNA-Schäden (Jin und Levine, 2001). Wie zahlreiche Untersuchungen belegen, spielt p53 eine Rolle sowohl bei der Schadensantwort, die ein Überleben der geschädigten Zelle gewährleistet wie auch bei der Eliminierung von Zellen durch Apoptose und terminalen Wachstumsarrest (Vousden und Lu, 2002; Oren, 2003).

Um zu untersuchen, inwieweit p53 an den unterschiedlichen Strahlen-induzierten Schadensreaktionen von NIH 3T3 Zellen beteiligt ist, wurden Western-Blot Analysen durchgeführt.

Als zentrale Kennzeichen einer Aktivierung von p53 gelten die Stabilisierung des Tumorsuppressors auf Protein-Ebene sowie die Phosphorylierung durch die ATM- bzw. ATR-Kinase an Serin-15 (Jin und Levine, 2001).

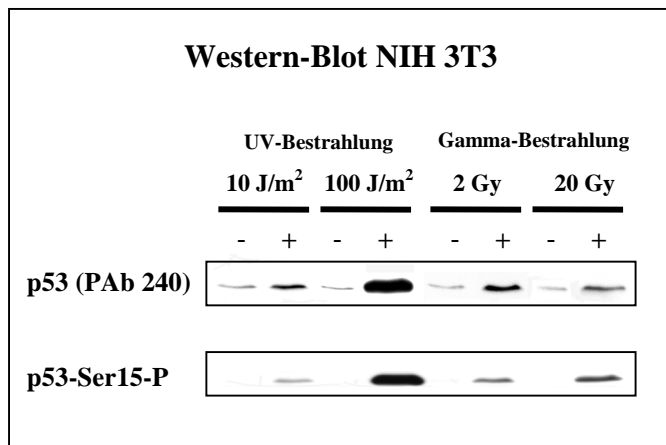


Abbildung 6: Unterschiedliche Bestrahlungsarten führen zur Stabilisierung und Aktivierung von p53. Western-Blot unterschiedlich bestrahlter NIH 3T3 Zellen. Zellen wurden wie angegeben bestrahlt (+) oder unbestrahlt belassen (-), 8 h nach Bestrahlung geerntet und für die Western-Blot Analyse aufbereitet. Eine Stabilisierung von p53 (Antikörper: PAb 240) sowie die aktivierende Phosphorylierung an Serin 15 werden durch alle Bestrahlungs-Varianten induziert.

Abbildung 6 zeigt, daß alle verwendeten Bestrahlungsarten zu einer Stabilisierung und Aktivierung von p53 führen. Der unterschiedliche Verlauf bzw. Ausgang der Schadensreaktion von NIH 3T3 Zellen in Folge der verschiedenen Bestrahlungsarten (siehe **1.**) ist somit nicht auf eine selektive Aktivierung von p53 zurückzuführen. Dies impliziert auch, daß p53-abhängige Signale in alle verschiedenen Schadensreaktionen von NIH 3T3 Zellen einfließen. Das experimentelle System aus verschieden bestrahlten NIH 3T3 Zellen erweist sich damit als geeignetes Modell, um nach Signalen und molekularen Mechanismen zu suchen, die den Ausgang der p53-abhängigen Schadensreaktion bestimmen und eine Selektivität hinsichtlich der Entscheidung zwischen Überleben und Eliminierung bewirken.

3. Anti- und po-apoptotische Zielgene von p53 werden in verschieden bestrahlten NIH 3T3 Zellen nicht differentiell hochreguliert

Die Beobachtung, daß p53 in NIH 3T3 Zellen durch alle verwendeten Bestrahlungsarten aktiviert wird, impliziert in Hinblick auf den je unterschiedlichen Ausgang der Schadensreaktion zwei mögliche Erklärungen:

Im ersten Fall bestimmt p53 selbst durch differentiell geregelte, nachgeordnete Signale den Ausgang der Schadensreaktion (Modell des „schlau“ p53). Im anderen Fall sind die von p53 ausgehenden Signale unabhängig von Bestrahlungsart und Schadensausmaß jeweils gleich, und andere, p53-unabhängige Mechanismen sind verantwortlich für die Entscheidung zwischen Überleben und Eliminierung als Folge des induzierten DNA-Schadens (Modell des „dumm“ p53). Zur Untersuchung, welches dieser Modelle konsistent mit der Situation in bestrahlten NIH 3T3 Zellen ist, wurden die p53-abhängigen Signale in verschieden bestrahlten NIH 3T3 Zellen miteinander verglichen und auf mögliche Unterschiede hin analysiert.

Die zentrale Aktivität von p53 besteht gemäß gängigen Vorstellungen in der Transaktivierung von Zielgenen. Deren Genprodukte, zu denen sowohl pro- wie auch anti-apoptotische Faktoren

gehören, sind dann die eigentlichen Vollzieher der mit p53 assoziierten biologischen Effekte. Zunächst wurde anhand repräsentativer Beispiele daher untersucht, ob in verschiedenen bestrahlten NIH 3T3 Zellen eine differentielle Induktion p53-abhängiger pro- bzw. anti-apoptotischer Faktoren zu beobachten ist, die mit dem unterschiedlichen Ausgang der Schadensreaktion korreliert und damit als mögliche Ursache für die Selektivität der Schadensantwort in Frage kommt.

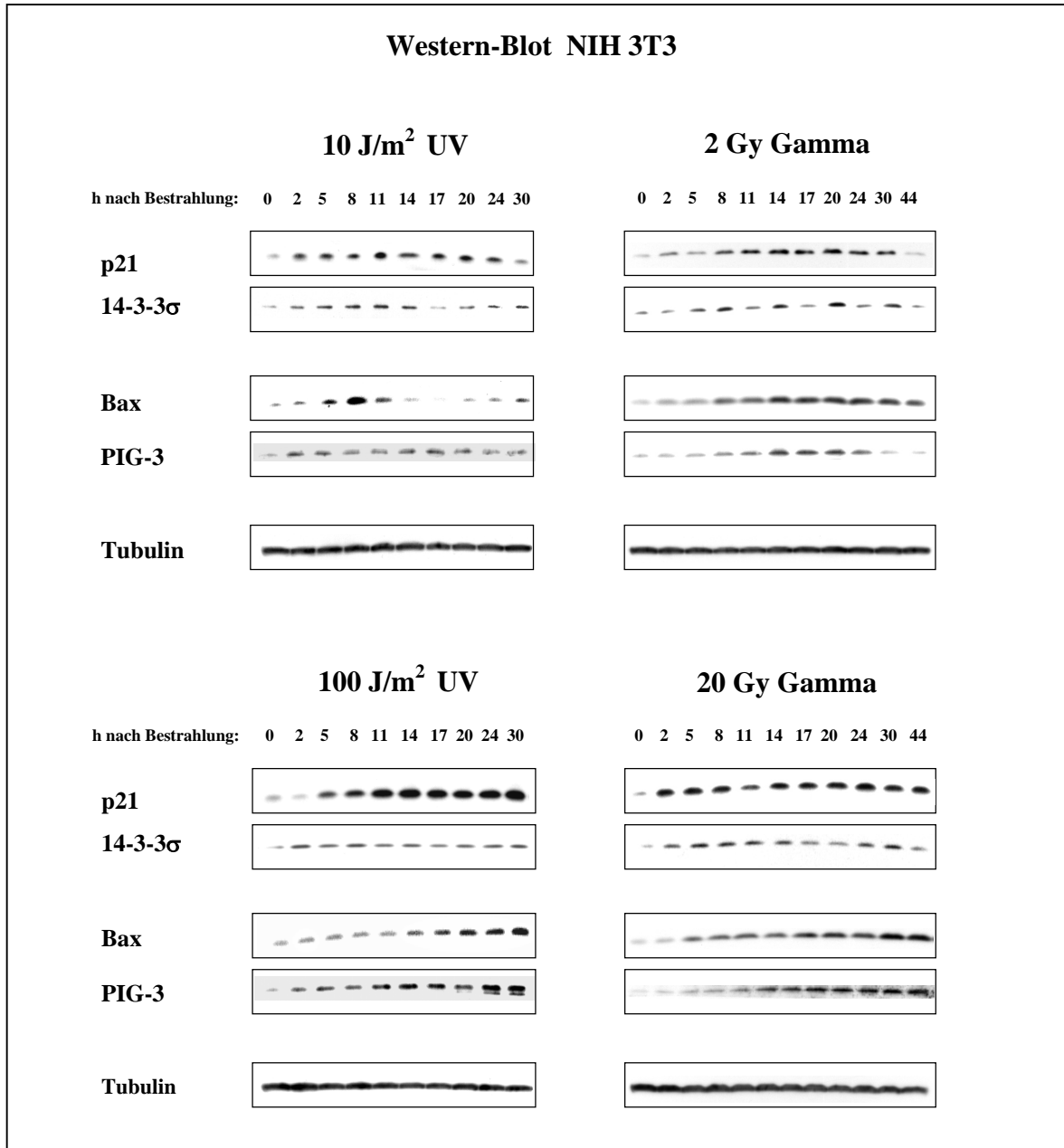


Abbildung 7: Alle Bestrahlungsarten führen gleichermaßen zu einer Induktion Zellzyklus-regulierender anti-apoptotischer wie auch pro-apoptotischer Zielgene von p53 in NIH 3T3 Zellen. Western-Blot unterschiedlich bestrahlter NIH 3T3 Zellen. Die Zellen wurden mit verschiedenen Dosen UV- und Gamma-Strahlung geschädigt, zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und in einer Western-Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern untersucht. Nach allen Bestrahlungsarten ist eine Induktion der Zellzyklus-regulierenden und anti-apoptotischen Proteine p21 und 14-3-3σ wie auch der pro-apoptotischen Proteine Bax und PIG-3 zu sehen. Der Nachweis von Tubulin zeigt die Beladung der Gele mit je gleichen Gesamtprotein-Mengen.

Zu der Vielzahl der bislang bekannten Zielgene von p53 gehören die pro-apoptotischen Faktoren *Bax* (Miyashita und Reed, 1995) und *PIG-3* (Polyak *et al.*, 1997), sowie die Zellzyklus-Regulatoren *p21* (El-Deiry *et al.*, 1993) und *14-3-3 σ* (Hermeking *et al.*, 1997), die eine anti-apoptotische Wirkung haben. Western-Blot Analysen, in denen die Expression dieser vier genannten, p53-regulierten Zielgene auf Proteinebene untersucht wurde, zeigen klar, daß alle Bestrahlungsarten unabhängig vom Ausgang der Schadensreaktion zu einer Induktion pro- und anti-apoptotischer Proteine führen (**Abbildung 7**). In der Tat scheint p53 zumindest im verwendeten experimentellen System Zielgene unterschiedlicher Wirkungsklassen als Transkriptionsfaktor nicht selektiv oder differentiell zu aktivieren. Eine selektive Hochregulation von p53-abhängigen Zielgenen, die entweder Apoptose einleiten oder anti-apoptotisch wirken, scheidet bei verschiedenen bestrahlten NIH 3T3 Zellen somit als Erklärungsmöglichkeit für den jeweils unterschiedlichen Ausgang und die Selektivität der Schadensreaktion aus.

Trotz der nicht-differentiellen Induktion pro- und anti-apoptotischer Zielgene von p53 fällt im Expressionsmuster der untersuchten Proteine dennoch ein interessanter Unterschied auf zwischen den Bestrahlungsarten, die je einen geringen bzw. einen schwereren DNA-Schaden verursachen: Während bei geringen DNA-Schäden (10 J/m² UV und 2 Gy Gamma) die Hochregulation der untersuchten p53-Zielgene ein temporärer Effekt ist und die Mengen der analysierten Genprodukte zum Ende des Beobachtungs-Zeitraums wieder abnehmen, bleiben die Mengen aller p53-regulierten Proteine im Falle der starken DNA-Schädigung (100 J/m² UV bzw. 20 Gy Gamma) dauerhaft erhöht (**Abbildung 7**). Interessanterweise ist das Expressions- und Induktionsmuster der analysierten Proteine für die letztgenannten Bestrahlungsarten trotz des unterschiedlichen Ausgangs der Schadensreaktion (Apoptose bei 100 J/m² UV bzw. terminaler Wachstumsarrest bei 20 Gy Gamma) erstaunlich ähnlich. Dieser Befund zeigt deutlich, daß eine bloße Induktion von *bona fide* pro-apoptotischen Proteinen wie z.B. *Bax* alleine nicht ausreichend ist, um Apoptose auszulösen und wirft die Frage auf, welche zusätzlichen Signale dafür notwendig sind.

4. p53-Menge und -Modifikation werden in verschiedenen bestrahlten NIH 3T3 Zellen differentiell reguliert, hohe Mengen korrelieren mit Apoptose

Die Korrelation zwischen einer temporären Hochregulation von p53-Zielgenen bei geringem DNA-Schaden und einer dauerhaften Induktion bei schweren Schäden legt nahe, daß die Dauer der p53-Aktivität ein wichtiger Parameter bei der Entscheidung ist, ob die Schadensantwort von NIH 3T3 Zellen in der Wiederherstellung des Normalzustands endet oder zur Eliminierung der geschädigten Zellen durch Apoptose oder terminalen Wachstumsarrest führt. Darüber hinaus läßt die dauerhafte

Hochregulation der p53-Zielgene nach schwerer Schädigung vermuten, daß die Eliminierung derart geschädigter Zellen p53-abhängig erfolgt.

Wie bereits erwähnt (siehe 2.), sind Stabilisierung und Phosphorylierung an Serin 15 wichtige Merkmale einer Schadens-induzierten Aktivierung von p53.

Um zu überprüfen, inwieweit die unterschiedliche Dauer der Hochregulation von p53-Zielgenen in verschiedenen bestrahlten NIH 3T3 Zellen (siehe 3.) mit einer differentiell regulierten Aktivität von p53 korreliert, wurden Western-Blot Analysen durchgeführt. Dabei wurde das Ausmaß und die Kinetik einer Stabilisierung des p53-Proteins sowie dessen Phosphorylierung an Serin 15 in NIH 3T3 Zellen nach verschiedenen Bestrahlungsarten untersucht.

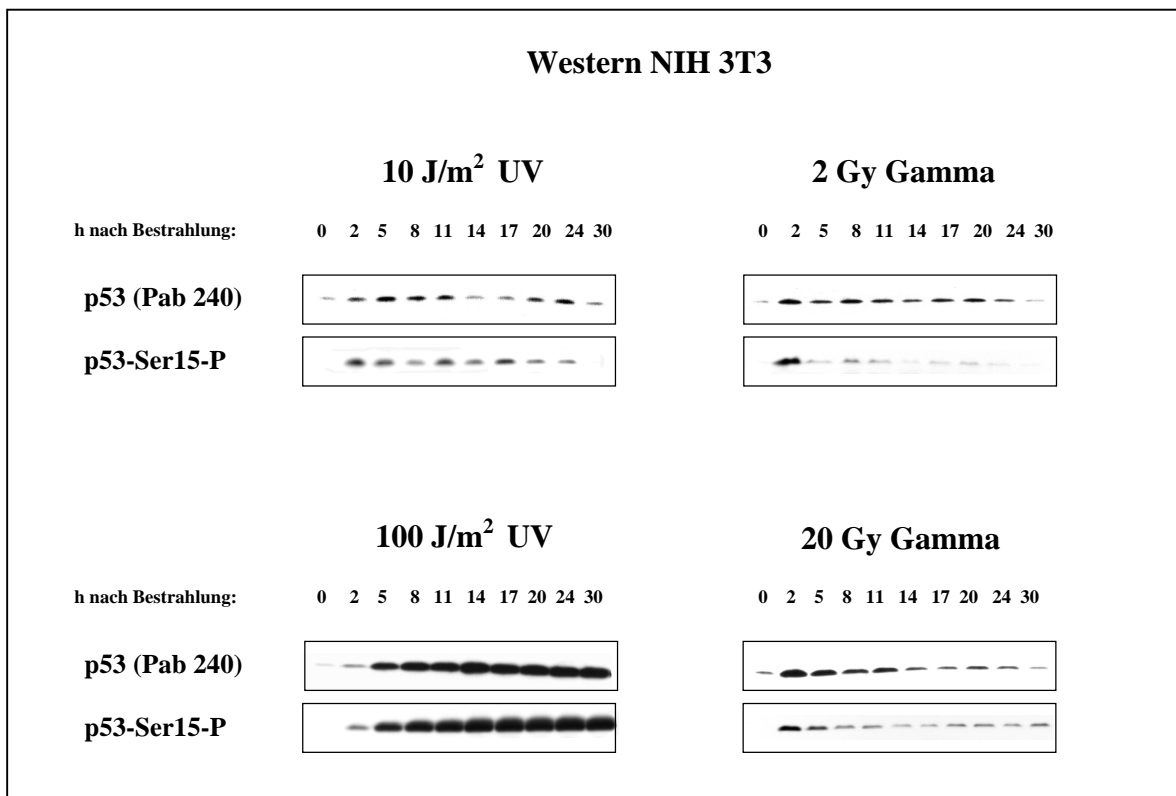


Abbildung 8: Proteinmenge und Modifikation von p53 in verschiedenen bestrahlten NIH 3T3 Zellen werden differentiell reguliert. Western-Blot unterschiedlich bestrahlter NIH 3T3 Zellen. Die Zellen wurden mit verschiedenen Dosen UV- und Gamma-Strahlung geschädigt, zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und in einer Western-Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern untersucht. Die Apoptose-induzierende Bestrahlung mit 100 J/m² UV führt zu einer besonders starken Akkumulation von aktiviertem p53.

Wie **Abbildung 8** zeigt, gibt es je nach Bestrahlungsart erhebliche Unterschiede in den untersuchten Parametern. Zunächst ist offensichtlich, daß p53-Stabilisierung und die Phosphorylierung an Serin 15 unabhängig voneinander reguliert werden. Dies ist besonders deutlich bei den 2 Gy Gamma-bestrahlten Zellen zu erkennen: Während erhöhte Mengen an p53 im Zeitraum zwischen 2 und 24 h zu sehen sind, ist phosphoryliertes p53 in deutlicher Menge nur 2 h nach Bestrahlung zu detektieren und nimmt dann sehr rasch ab. Ein gegenläufiger Effekt läßt sich

bei den 10 J/m^2 UV-bestrahlten Proben beobachten. Hier sind deutliche Mengen von Serin 15-phosphoryliertem p53 zwischen 2 und 24 h nach Bestrahlung ohne größere Schwankungen in der Signalstärke zu detektieren, während die Gesamtmenge von p53 in zwei Wellenbewegungen mit Maxima bei 5 und 24 h sowie einem intermediären Minimum bei 14 h dynamischen Schwankungen unterliegt.

Unabhängig von diesen Unterschieden haben beide Bestrahlungsarten mit einer niedrigen Dosis gemeinsam, daß zum Ende des Beobachtungszeitraums keinerlei Serin 15-phosphoryliertes p53 mehr detektierbar ist. Zugleich werden auch die Stabilisierungseffekte bei diesen Bestrahlungsarten vollständig aufgehoben, und die Gesamtmenge des Tumorsuppressors ist 30 h nach Bestrahlung mit 10 J/m^2 UV oder 2 Gy Gamma wieder vergleichbar mit der von unbestrahlten Zellen. Die temporäre Hochregulation der p53-abhängigen Zielgene nach geringem DNA-Schaden (siehe **Abbildung 7**) korreliert somit mit einer ebenso temporären Stabilisierung und Serin 15-Phosphorylierung des Tumorsuppressors, was einhergeht mit einer Schadensantwort, die zu einer Wiederherstellung des Normalzustands und Überleben der geschädigten Zellen führt.

Entsprechend korreliert eine persistierende p53-Aktivität mit einer dauerhaften Hochregulation von p53-Zielgenen und der Eliminierung der geschädigten Zellen. Eine solche Korrelation ist jedoch nur richtig bei Berücksichtigung der Serin 15-Phosphorylierung als Marker für die Aktivität von p53. In der Tat bleibt die Serin 15-Phosphorylierung von p53, wenngleich in unterschiedlicher Menge, bei beiden zur Eliminierung führenden Bestrahlungsarten (100 J/m^2 UV und 20 Gy Gamma) bis zum Ende des Beobachtungszeitraums erhalten (**Abbildung 8**). Dies spricht dafür, daß eine Abschaltung der p53-vermittelten Aktivitäten bis einschließlich 30 h nach 100 J/m^2 UV- bzw. 20 Gy Gamma-Bestrahlung nicht erfolgt, was konsistent ist mit dem Expressionsmuster der p53-Zielgene, die bei diesen Bestrahlungsarten ebenfalls dauerhaft hochreguliert bleiben (siehe **Abbildung 7**). Die persistierende Aktivität von p53 nach Bestrahlung mit hoher Dosis weist dabei darauf hin, daß p53 an beiden Eliminierungsreaktionen in NIH 3T3 Zellen, Apoptose und terminaler Wachstumsarrest, beteiligt ist.

Nicht unmittelbar korrelieren lassen sich hingegen Unterschiede in der p53 Menge und das Expressionsmuster der p53-Zielgene. So zeigt das Induktionsmuster der untersuchten p53-Zielgene eine auffällige Ähnlichkeit für die Bestrahlungen mit 100 J/m^2 UV und 20 Gy Gamma (siehe **Abbildung 7**). Deutliche Unterschiede sind jedoch bei Vergleich der p53-Stabilisierung sichtbar. So wird p53 bei Schädigung mit 100 J/m^2 UV in einem weitaus stärkeren Ausmaß stabilisiert als bei allen anderen Bestrahlungsarten (**Abbildung 8**). Die erreichte große Menge an p53 wird dabei nach einer Induktionsphase von ca. 5 h nach 100 J/m^2 UV-Bestrahlung bis zum Ende des Beobachtungszeitraums in maximaler Stärke aufrecht erhalten. Damit synchron akkumuliert auch Serin 15-phosphoryliertes p53 in großer Menge.

Trotz der Ähnlichkeit in der Zielgen-Induktion ist das Ausmaß der p53-Stabilisierung nach 20 Gy Gamma-Bestrahlung im Gegensatz zur 100 J/m² UV-Behandlung deutlich geringer und eher vergleichbar mit den Effekten nach 10 J/m² UV- und 2 Gy Gamma-Bestrahlung. Auch in der Kinetik ähnelt das Stabilisierungsmuster von p53 nach 20 Gy Gamma-Bestrahlung mehr den Bestrahlungsarten mit geringer Dosis als der Schädigung mit 100 J/m² UV (**Abbildung 8**).

Der oben beschriebene Befund macht deutlich, daß die Menge des p53 Proteins und seine transkriptionelle Aktivität nicht unmittelbar zusammenhängen. Offensichtlich sind also geringe Mengen von p53 bei nur vorübergehender Stabilisierung aber dauerhafter Aktivierung (20 Gy Gamma) genauso in der Lage eine dauerhafte und starke Hochregulation von p53 Zielgenen zu induzieren wie weitaus größere Mengen (100 J/m² UV). Die Tatsache, daß dennoch eine differentielle Regulation der p53-Menge nach verschiedenen Bestrahlungsarten zu beobachten ist, läßt daher vermuten, daß über die Menge des Tumorsuppressor-Proteins eine Transaktivierungs-unabhängige Aktivität von p53 gesteuert wird. Da ausschließlich nach 100 J/m² UV-Bestrahlung, die zur besonders starken Stabilisierung von p53 führt, eine Eliminierung der bestrahlten NIH 3T3 Zellen durch Apoptose zu beobachten war (siehe **1.**), liegt es nahe, einen möglichen Zusammenhang zwischen großen p53-Mengen und der Aktivierung des apoptotischen Programms zu vermuten.

Vor einer Abklärung, ob eine starke Stabilisierung von p53 nicht nur mit Apoptose korreliert, sondern auch kausal mit der Eliminierung der bestrahlten Zellen durch den programmierten Zelltod zusammenhängt (siehe **6.**), wurde zunächst jedoch untersucht, inwieweit eine selektiv regulierte Wechselwirkung mit Mdm2 für die differentielle Stabilisierung von p53 verantwortlich ist.

5. Die starke Stabilisierung von p53 nach 100 J/m² UV-Bestrahlung ist nicht Folge einer gestörten Wechselwirkung mit Mdm2

Für die Regulation der p53-Proteinmenge und die Deaktivierung des Tumorsuppressors nach erfolgter Schadensantwort ist die Wechselwirkung von p53 mit der Ubiquitin-Ligase Mdm2 ein zentrales Ereignis. Das *Mdm2*-Gen wird von p53 transaktiviert, sein Genprodukt wiederum bindet an den Tumorsuppressor und markiert ihn durch die Anheftung von Ubiquitin-Resten für den Export aus dem Zellkern und proteasomalen Abbau (Kubbutat und Vousden, 1998; Ashcroft und Vousden, 1999; Shmueli und Oren, 2004).

Wie die Western-Blot Analyse (**Abbildung 9a**) zeigt, wird das Mdm2 Protein in NIH 3T3 Zellen durch alle Bestrahlungsarten induziert. Im Fall der 2 Gy Gamma-, 20 Gy Gamma- sowie der

10 J/m² UV-Bestrahlung ist die Induktion von Mdm2 mit einer vorübergehenden Stabilisierung von p53 verbunden (vgl. **Abbildung 8**). Dieses Verhalten steht in Einklang mit dem oben beschriebenen autoregulatorischen *feedback loop*, durch den p53 und Mdm2 miteinander verbunden sind.

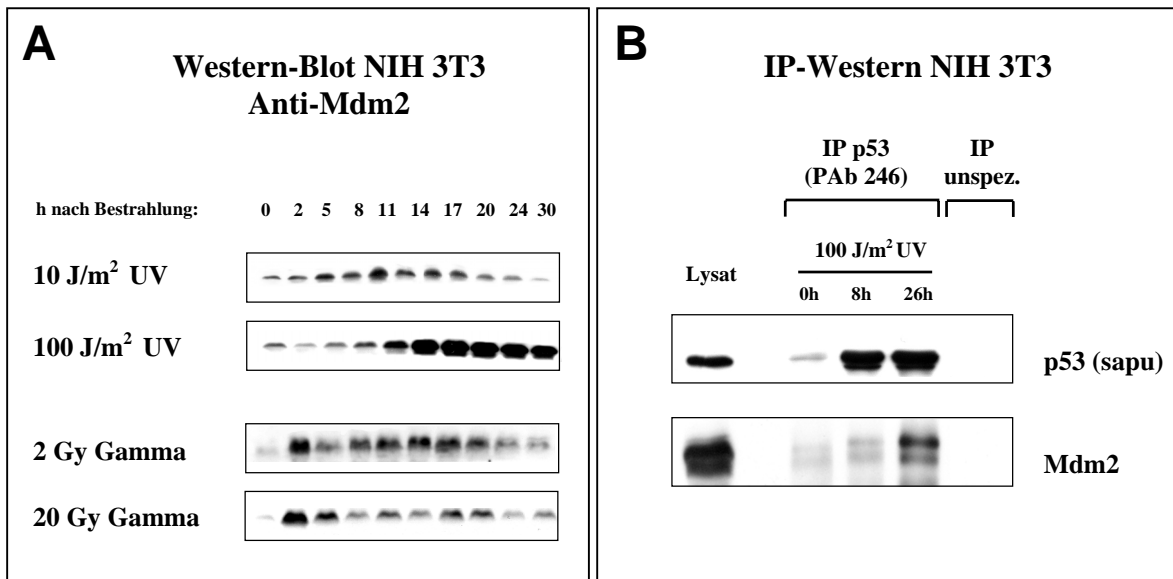


Abbildung 9: Hohe p53-Mengen nach 100 J/m² UV-Bestrahlung sind nicht das Resultat geringer Mdm2-Mengen oder einer gestörten p53-Mdm2-Interaktion. (A) Western-Blot unterschiedlich bestrahlter NIH 3T3 Zellen zum Nachweis von Mdm2. Die Zellen wurden mit verschiedenen Dosen UV- und Gamma-Strahlung geschädigt, zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und in einer Western-Blot Analyse mit einem spezifischen Mdm2-Antiserum untersucht. Alle Bestrahlungsarten führen zu einer Induktion von Mdm2. Besonders große Mengen von Mdm2 werden nach Bestrahlung mit 100 J/m² UV gebildet und bis zum Ende des Beobachtungszeitraums aufrecht erhalten. **(B)** Interaktion von p53 und Mdm2 in 100 J/m² UV-bestrahlten NIH 3T3 Zellen. P53 wurde mit dem spezifischen Antikörper PAb 246 zu den angegebenen Zeiten nach Bestrahlung aus Zellysat mit einer Proteinmenge von jeweils 1 mg präzipitiert. In einer nachfolgenden Western-Blot Analyse wurde das Präzipitat auf p53 (Antikörper: sapu) und Mdm2 (Meerschweinchen-Antiserum) untersucht. Als Spezifitätskontrolle wurde eine Immunpräzipitation mit unspezifischem Maus IgG (IP unspez.) durchgeführt, dabei wurde Zellysat aus 100 J/m² UV-bestrahlten NIH 3T3 Zellen 8h nach Bestrahlung mit einer Proteinmenge von 1 mg eingesetzt. Das im Western-Blot mitgeführte Lysat diente zur Kontrolle der Laufhöhe.

Im Fall der 100 J/m² UV-Bestrahlung akkumulieren in NIH 3T3 Zellen hingegen große Mengen von p53 und Mdm2 (**Abbildung 8 und 9a**). Dieser Befund ist insofern erstaunlich, als Mdm2, wie bereits erwähnt, die proteolytische Degradation von p53 einleitet. Nach bisherigem Kenntnisstand entfaltet Mdm2 seine Wirkung, indem es an p53 bindet und dabei mittels seiner Ubiquitin-Ligase-Aktivität Ubiquitinreste an den Tumorsuppressor heftet. Da der Abbau des Tumorsuppressors in 100 J/m² UV-bestrahlten NIH 3T3 Zellen jedoch trotz großer Mengen Mdm2 offensichtlich unterbunden wird, wurde deshalb überprüft, ob in 100 J/m² UV-bestrahlten NIH 3T3 Zellen die Interaktion von Mdm2 und p53 gestört ist. Zu diesem Zweck wurde p53 mit dem spezifischen Antikörper PAb246 aus unbestrahlten und 100 J/m² UV-bestrahlten NIH 3T3 Zellen präzipitiert. In der nachfolgenden Western-Blot Analyse wurde das Präzipitat auf p53 sowie daran gebundenes Mdm2 untersucht.

Abbildung 9b zeigt, daß 100 J/m² UV-Bestrahlung eindeutig die Komplexbildung von p53 und Mdm2 induziert. So kann bereits 8 h nach Bestrahlung eine leicht erhöhte Menge von gebundenem Mdm2 in den p53-Präzipitaten nachgewiesen werden, während 26 h nach Bestrahlung deutlich größere und gut detektierbare Mengen des Proteinkomplexes vorliegen. Dieser Befund macht deutlich, daß die auffällig starke Stabilisierung von p53 nach 100 J/m² UV-Bestrahlung weder auf eine verringerte Induktion des Mdm2-Gens noch auf eine gestörte Komplexbildung beider Proteine zurückzuführen ist. Hieraus ergibt sich, daß andere Faktoren und Mechanismen den Mdm2-vermittelten Abbau von p53 unterbinden können ohne die Interaktion beider Proteine zu beeinträchtigen.

6. Der terminale Wachstumsarrest von 20 Gy Gamma-bestrahlten NIH 3T3 Zellen läßt sich durch hohe p53-Mengen in Apoptose überführen

Die beobachtete Korrelation einer auffällig starken Stabilisierung von p53 mit der Induktion von Apoptose nach 100 J/m² UV-Bestrahlung in NIH 3T3 Zellen (siehe 4.) wirft die Frage auf, ob die selektive Produktion großer p53-Mengen ursächlich mit der Einleitung des programmierten Zelltods zusammenhängt. Um dies zu überprüfen, wurden Transfektionsexperimente durchgeführt, da sich durch transiente Transfektion auf Einzellebene die Expression großer Mengen eines gewünschten Proteins erzielen läßt.

Um die potentiell apoptotische Wirkung großer Mengen von p53 zu überprüfen, wurde murines wildtyp p53, das mit einem Hämagglutinin-Tag (HA-Tag) versehen war, in NIH 3T3 Zellen transfiziert. Als Kontrolle wurden Zellen parallel mit einem Kontrollplasmid transfiziert, das für das *Green fluorescence protein* GFP bzw. ein Fusionsprotein aus β -Galactosidase und GFP kodiert. Durch Vergleich der p53-transfizierten Zellen mit den Kontrollansätzen konnte so unterschieden werden zwischen Effekten, die auf eine spezifische p53-Aktivität zurückzuführen sind, und solchen, die nur auf der Überexpression eines Proteins beruhen bzw. durch das Transfektions-Procedere hervorgerufen werden.

Western-Blot Analysen zeigen, daß die Transfektion mit den Plasmiden *pCIneo wtp53^{HA}* bzw. *pC GFP I* zur Expression der entsprechenden Proteine in NIH 3T3 Zellen führt (**Abbildung 10a**). So kann ektop exprimiertes HA-p53 sowohl mit einem HA-spezifischen Antikörper als auch mit dem p53-spezifischen Antiserum (sapu) detektiert werden. Aufgrund der geringen Größe des HA-Tags (9 Aminosäuren) ist eine gute Trennung von endogenem p53 und ektopen HA-p53 im verwendeten 13 % Polyacrylamid-Gel jedoch nicht möglich, weshalb die theoretisch erwarteten zwei Banden für die verschiedenen p53-Populationen im Western-Blot unter Verwendung des

sapu-Antiserums nicht aufgelöst werden und als eine starke Bande erscheinen (**Abbildung 10a**). Die Expression des Kontroll-Proteins GFP konnte ebenfalls im Western-Blot nachgewiesen werden (**Abbildung 10a**). Darüber hinaus erlaubte die Eigenschaft von GFP, grün zu fluoreszieren, einen einfachen visuellen Nachweis seiner Expression und eine Abschätzung der Transfektionseffizienz, die in der Regel zwischen 20 und 30 % lag (ohne Abbildung). Vergleichbare Effizienzen wurden für die HA-p53 Transfektion durch mikroskopische Analyse ermittelt, wobei ektopes p53 durch Immun-Färbung mit einem HA-spezifischen Antikörper und einem sekundären Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper sichtbar gemacht wurde (ohne Abbildung).

Eine potentiell pro-apoptotische Wirkung großer Mengen von p53 wurde unter Berücksichtigung verschiedener hypothetischer Wirkungsmechanismen untersucht:

Im ersten Fall sind große Mengen p53 alleine unabhängig von genotoxischem Streß ausreichend, um NIH 3T3 Zellen durch Apoptose zu eliminieren. Bei Richtigkeit dieser Hypothese sollte die bloße Transfektion von HA-p53 in NIH 3T3 Zellen Apoptose induzieren.

Eine denkbare andere Möglichkeit wäre, daß große p53-Mengen nur in Zusammenspiel mit anderen pro-apoptotischen Signalen, wie sie z.B. durch genotoxischen Streß ausgelöst werden, zur Induktion des programmierten Zelltods führen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden transfizierte NIH 3T3 Zellen mit 20 Gy Gamma-Strahlung geschädigt. Wie bereits beschrieben (siehe **3.**), zeigen 100 J/m² UV- und 20 Gy Gamma-bestrahlte NIH 3T3 Zellen ein sehr ähnliches Induktions- und Expressionsmuster der p53-Zielgene (siehe **Abbildung 7**). Während 100 J/m² UV-Bestrahlung bei gleichzeitiger Akkumulation sehr großer Mengen von p53 zu Apoptose führt (vgl. **Abbildungen 5a** und **8**), wird das apoptotische Programm nach 20 Gy Gamma-Bestrahlung trotz dauerhaft induzierter pro-apoptotischer Proteine, aber ohne Generierung sehr großer p53-Mengen, nicht aktiviert (vgl. **Abbildungen 5a, 7** und **8**). Im Falle einer pro-apoptotischen Wirkung großer p53-Mengen, die sich nur im Zusammenspiel mit anderen Streß-induzierten Signalen entfaltet, sollte sich der durch 20 Gy Gamma-Bestrahlung in NIH 3T3 Zellen induzierte terminale Wachstumsarrest durch Transfektion mit p53 in Apoptose umwandeln lassen.

Als dritte Möglichkeit mußte schließlich in Betracht gezogen werden, daß der Zusammenhang zwischen großen Mengen p53 und Apoptose, wie er aufgrund der Ergebnisse in 100 J/m² UV-bestrahlten NIH 3T3 Zellen vermutet wurde, ein rein korrelativer ist; die auffällig starke Stabilisierung von p53 nach 100 J/m² UV-Bestrahlung jedoch nicht kausal für die Induktion von Apoptose verantwortlich ist. In diesem Fall sollten sich p53-transfizierte Zellen mit oder ohne Bestrahlung nicht anders verhalten als GFP-transfizierte Kontrollzellen.

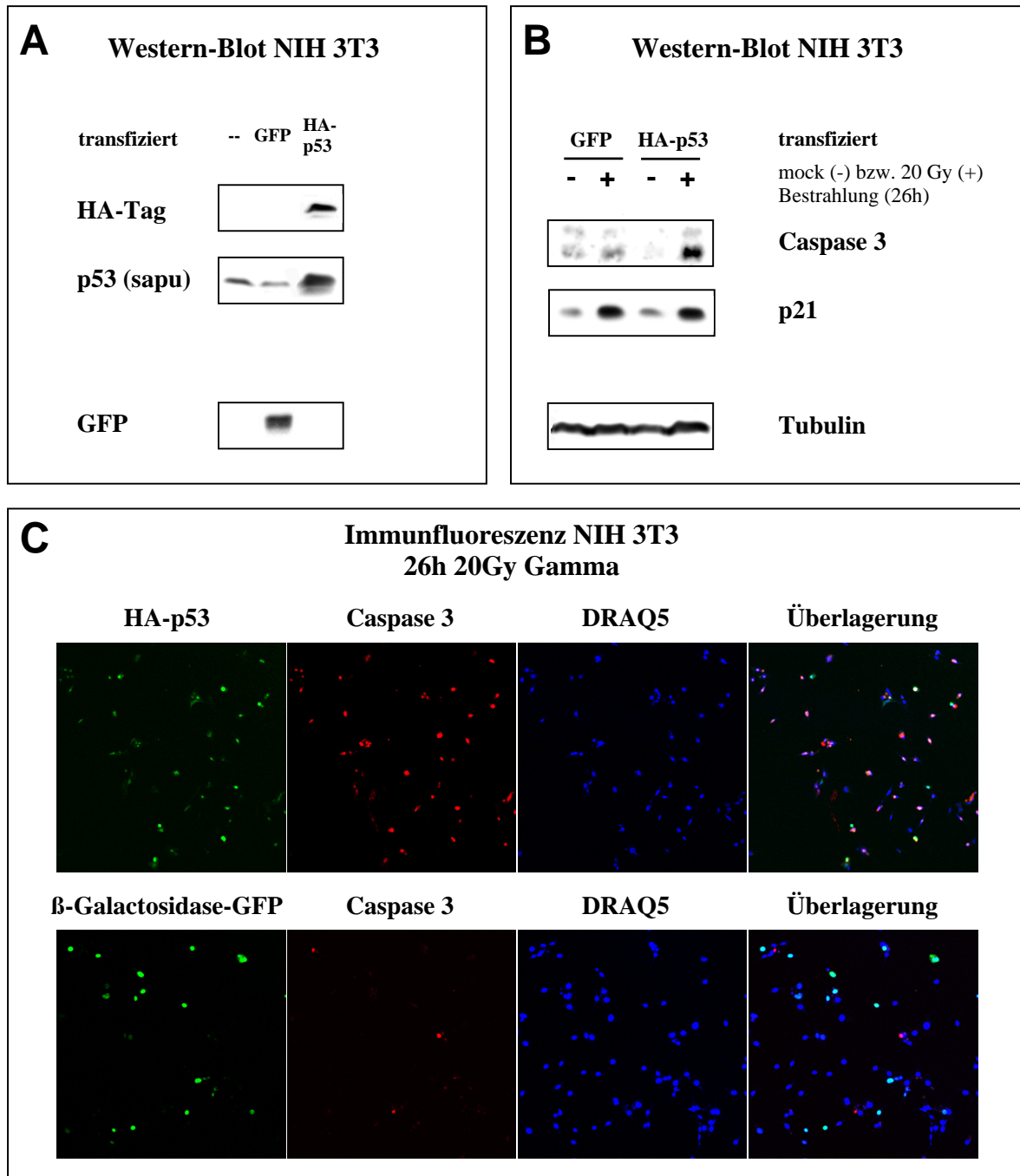


Abbildung 10: Mittels ektop exprimierter großer p53-Mengen läßt sich der durch 20 Gy Gamma-Bestrahlung induzierte terminale Wachstumsarrest in Apoptose umwandeln. (A) Western-Blot transient transfizierter NIH 3T3 Zellen zum Nachweis ektop exprimierter Proteine. NIH 3T3 Zellen wurden mit Expressionsvektoren kodierend für GFP bzw. HA-p53 transfiziert und die Expression der entsprechenden Proteine mit Antikörpern gegen GFP und HA überprüft. Mit dem polyklonalen anti-p53 Antikörper sapu wurde die Gesamtmenge an p53 (endogen + transfiziert) nachgewiesen. **(B)** Western-Blot transient transfizierter und 20 Gy Gamma-bestrahlter NIH 3T3 Zellen zum Nachweis von Apoptose. NIH 3T3 Zellen wurden mit GFP bzw. HA-p53 transfiziert und 16 h nach Transfektion mock behandelt (-) oder mit 20 Gy Gamma-Bestrahlung (+) geschädigt. 26 h nach Bestrahlung wurden die Zellen für die Western-Blot Analyse aufbereitet. Die Induktion von Apoptose wurde durch den Nachweis aktiver Caspase 3 ermittelt. Der Nachweis von p21 zeigt, daß ektop exprimiertes HA-p53 keinen Einfluß auf die Bestrahlungs-induzierte Hochregulation von p53-Zielgenen hat. Zur Überprüfung des Auftrags gleicher Proteinmengen erfolgte der Nachweis von Tubulin. **(C)** Immunfluoreszenz transient transfizierter und 20 Gy Gamma-bestrahlter NIH 3T3 Zellen zum Nachweis von Apoptose. NIH 3T3 Zellen wurden mit β-Galactosidase-GFP bzw. HA-p53 transfiziert, 18 h nach Transfektion 20 Gy Gamma-bestrahlt und 26 h nach Bestrahlung für die Immunfluoreszenz fixiert und gefärbt. Die ektop exprimierten Proteine sind in grün, aktive Caspase 3 ist in rot dargestellt. Mit DRAQ5 (blau) erfolgte die Anfärbung der Zellkerne.

Zur Überprüfung der oben beschriebenen Hypothesen wurden NIH 3T3 Zellen unter Verwendung des *Nucleofector*-Systems (Amaxa) mit Expressionsvektoren kodierend für HA-wtp53 und GFP bzw. einem β -Galactosidase/GFP-Fusionsprotein transfiziert. 16-18 h nach Transfektion wurde eine Hälfte dieser Zellen mit 20 Gy Gamma-Bestrahlung geschädigt, die andere Hälfte wurde unbestrahlt belassen. 26 h nach Bestrahlung bzw. *mock*-Behandlung wurden die Zellen geerntet, und für die Western-Blot Analyse bzw. die Immunfluoreszenz aufbereitet. Als Merkmal der Apoptose-Induktion wurde dabei die Expression aktiver Caspase 3 untersucht.

Wie **Abbildung 10b** zeigt, exprimieren GFP-transfizierte NIH 3T3 Zellen mit und ohne 20 Gy Gamma-Bestrahlung geringe Mengen an Caspase 3. Allerdings hat die Bestrahlung dieser Zellen keine weitere Steigerung der Apoptoserate zur Folge. Dies weist darauf hin, daß die Überexpression von GFP cytotoxische Nebeneffekte verursacht, jedoch keinen Einfluß auf den Ausgang der durch genotoxischen Streß ausgelösten Schadensantwort hat. Dementsprechend sind GFP-transfizierte Zellen auch auf Einzelzellebene nach 20 Gy Gamma-Bestrahlung überwiegend Caspase 3 negativ, wie aus dem in **Abbildung 10c** dargestellten repräsentativen Ausschnitt einer mikroskopischen Immunfluoreszenz-Analyse zu ersehen ist.

Im Gegensatz dazu zeigen die p53-transfizierten NIH 3T3 Zellen ein deutlich anderes Verhalten. So induziert die bloße Transfektion von p53 in NIH 3T3 Zellen keine nennenswerte Expression aktiver Caspase 3. Dies zeigt, daß große Mengen an p53 alleine nicht ausreichen, um das apoptotische Programm in NIH 3T3 Zellen zu aktivieren. In Kombination mit 20 Gy Gamma-Bestrahlung, die in NIH 3T3 Zellen alleine ebenfalls nicht zur Induktion von Apoptose führt (siehe **1.**), ergibt sich jedoch ein klarer pro-apoptotischer Effekt. So ist 26 h nach Bestrahlung eine deutlich größere Menge aktiver Caspase 3 als in den unbestrahlten oder den bestrahlten GFP-transfizierten Zellen zu detektieren, was eindeutig die Induktion von Apoptose in den p53-transfizierten und 20 Gy Gamma-bestrahlten NIH 3T3 Zellen anzeigt (**Abbildung 10b**). Dasselbe Ergebnis erbringt die mikroskopische Immunfluoreszenz-Analyse (**Abbildung 10c**).

Durch große Mengen des p53 Proteins kann somit der Ausgang der Schadensreaktion in NIH 3T3 Zellen gezielt von einem terminalen Wachstumsarrest in Apoptose umgewandelt werden. Die differentiell regulierte Menge des Tumorsuppressors erweist sich damit als ein Parameter, der ursächlich für eine pro-apoptotische Wirkung von p53 verantwortlich ist.

Wie die vorangegangenen Experimente (siehe **3.** und **4.**) bereits zeigten, hat das Ausmaß der endogenen p53-Stabilisierung in bestrahlten NIH 3T3 Zellen keinen nennenswerten Effekt auf das Ausmaß der Zielgen-Induktion. Um sicherzustellen, daß auch artifiziell durch ektope Expression erreichte große p53-Mengen keine quantitativen Änderungen auf der Ebene der Zielgene verursachen, wurde die p53-Zielgen Induktion in transfizierten und 20 Gy Gamma-bestrahlten NIH 3T3 Zellen untersucht. Wie in **Abbildung 10b** anhand der Expression von p21 dargestellt,

unterscheiden sich GFP- und p53-transfizierte NIH 3T3 Zellen hinsichtlich der induzierten p21-Mengen nicht, die Überprüfung weiterer p53-Zielgene ergab dasselbe Ergebnis (ohne Abbildung).

Dieser Befund weist darauf hin, daß der durch Transfektion von p53 verursachte pro-apoptotische Effekt vermutlich nicht auf eine Veränderung transkriptioneller Aktivitäten zurückzuführen ist. Vielmehr bestätigt sich die Annahme, daß über die differentielle Regulation der p53-Menge in NIH 3T3 Zellen eine nicht-transkriptionelle Aktivität des Tumorsuppressors gesteuert wird, die kausal für die Entscheidung zwischen Wachstumsarrest und Apoptose als Reaktion auf genotoxischen Streß verantwortlich ist. Gleichzeitig implizieren die bisherigen Ergebnisse, daß p53 den Ausgang der Schadensreaktion, insbesondere die Induktion von Apoptose, in bestrahlten NIH 3T3 Zellen maßgeblich beeinflußt.

7. Die Aktivierung von Bax ist unabhängig von einer Induktion des Proteins und selektiv für Apoptose

Der Befund, daß sich die Schadensantwort in NIH 3T3 Zellen p53-vermittelt von Wachstumsarrest zu Apoptose umwandeln läßt ohne dabei auffällige Veränderungen im Expressionsmuster von p53-Zielgenen mit sich zu ziehen, deutet darauf hin, daß die kausal für die Auslösung von Apoptose verantwortliche Aktivität von p53 eine nicht-transkriptionelle ist. Neueste Studien schlagen für eine derartige Aktivität von p53 zwei mögliche Mechanismen vor: Die Arbeitsgruppe von Ute Moll konnte p53 in naher Assoziation mit und sogar innerhalb von Mitochondrien nachweisen und schlägt die Apoptose-spezifische Lokalisation des Tumorsuppressors an den Mitochondrien als den entscheidenden Parameter vor, mit dem p53 den Signalweg der intrinsischen Apoptose kontrollieren und aktivieren könnte (Marchenko *et al.*, 2000; Mihara *et al.*, 2003). Zwei andere Arbeiten (Chipuk *et al.*, 2003 und 2004) zeigten, daß cytoplasmatisches p53 unabhängig von einer transkriptionellen Aktivität das pro-apoptotische Protein Bax aktivieren kann und dadurch den Prozeß des programmierten Zelltods initialisiert.

Um festzustellen, ob die selektiv durch 100 J/m^2 UV-Bestrahlung ausgelöste Induktion der Apoptose in bestrahlten NIH 3T3 Zellen durch eine differentiell regulierte, nicht-transkriptionelle Aktivität von p53 bestimmt wird, wurden Immunfluoreszenz-mikroskopische Analysen durchgeführt.

Zunächst wurde in einer Doppelfärbung die Lokalisation von p53 im Verhältnis zu den Mitochondrien überprüft. Dabei zeigte sich, daß p53 nach allen Bestrahlungsarten zum überwiegenden Teil (ca. 98 %) im Zellkern lokalisiert war (ohne Abbildung). In 100 J/m^2 UV-bestrahlten, apoptotischen NIH 3T3 Zellen war zwar ein geringer Teil des Tumorsuppressors im

Cytoplasma nachweisbar, eine Kolokalisation mit mitochondrialen Strukturen konnte jedoch nicht detektiert werden (ohne Abbildung).

Interessante Unterschiede zwischen den verschiedenen bestrahlten NIH 3T3 Zellen ergaben sich jedoch bei Untersuchung der Bax-Aktivierung.

Das pro-apoptotische Protein Bax gehört zur Bcl-2 Proteinfamilie, die verantwortlich ist für die Durchlässigkeit der äußeren Mitochondrien-Membran (Cory und Adams, 2002; Tsujimoto, 2003; Kroemer, 2003). Nach derzeitigem Wissensstand ist Bax ein als Monomer diffus im Cytosol gelöstes Protein (Wolter *et al.*, 1997). Apoptotische Stimuli, wie bestimmte Arten von genotoxischem Streß, induzieren durch Konformationsänderung die Bildung von Bax-Oligomeren sowie die Insertion in die äußere Mitochondrienmembran (Hsu *et al.*, 1997; Desagher *et al.*, 1999; Nomura *et al.*, 1999; Antonsson *et al.*, 2001). Die Einlagerung von Bax in die Mitochondrien-Membran führt dann zu einer Porenbildung und einem Abfall des Membranpotentials an der äußeren Membran (Eposti und Dive, 2003). Dadurch gelangen mitochondriale Faktoren wie Cytochrom c oder Smac/Diablo in das Cytoplasma und aktivieren dort die proteolytische Kaskade der Caspasen, die dann zur Zerstörung der Zelle führt (Wang, 2001; Scorrano und Korsmeyer, 2003). Aufgrund dieses Wirkungsmechanismus kann die Translokation von Bax in die Mitochondrien-Membran als Marker einer Bax-Aktivierung gelten.

Nachdem in NIH 3T3 Zellen nach allen Bestrahlungsarten eine Hochregulation von Bax zu beobachten war (siehe **Abbildung 7**) wurde untersucht, ob dies auch immer mit einer Aktivierung verbunden ist. Die Aktivierung von Bax wurde in der Immunfluoreszenz durch gleichzeitige Färbung von Bax und den Mitochondrien untersucht. Dabei wurde Bax durch Antikörper-Markierung immunhistochemisch sichtbar gemacht, während die Mitochondrien mit dem spezifischen Farbstoff *Mitotracker GreenTM* angefärbt wurden. Die Analyse erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop.

Wie **Abbildung 11** zeigt, ist Bax bereits in unbestrahlten NIH 3T3 Zellen gut detektierbar, jedoch nicht, wie beschrieben, als diffus cytosolisches Protein. Vielmehr konzentriert sich Bax auf distinkte *foci*, die zwar überwiegend cytoplasmatisch, jedoch auch im Zellkern lokalisiert sind. Darüber hinaus zeigen die konfokalen Bilder, daß sehr oft eine nahe Assoziation von Bax und Mitochondrien zu sehen ist, jedoch keine Kolokalisation. Dasselbe gilt für 10 J/m² UV- und 20 Gy Gamma-bestrahlte NIH 3T3 Zellen, in denen sich trotz erheblicher Hochregulation von Bax keine auffälligen Unterschiede im Färbemuster oder der Lokalisation von Bax erkennen lassen. Ein deutlich anderes Bild ergeben jedoch die 100 J/m² UV-bestrahlten Zellen: Hier ist die Translokation von Bax und eine Kolokalisation mit den Mitochondrien eindeutig zu sehen. Verbunden damit ist eine Konzentrierung und Aggregat-Bildung der Bax *foci*, die vermutlich auf einer Oligomerisierung des Proteins beruht.

Somit zeigt sich klar, daß Bax-Induktion und Bax-Aktivierung zwei unabhängig regulierte Vorgänge sind. Während eine Induktion von Bax in bestrahlten NIH 3T3 Zellen unabhängig vom Ausgang der Schadensreaktion zu beobachten ist und nicht differentiell reguliert wird, erfolgt die Aktivierung des pro-apoptotischen Proteins selektiv nur bei 100 J/m² UV-Bestrahlung, die zu Apoptose führt. Wie die selektive Generierung großer p53-Mengen nach 100 J/m² UV-Bestrahlung weist auch dieser Befund darauf hin, daß nicht-transkriptionelle p53-Aktivitäten entscheidend für die Induktion von Apoptose in bestrahlten NIH 3T3 Zellen sein könnten.

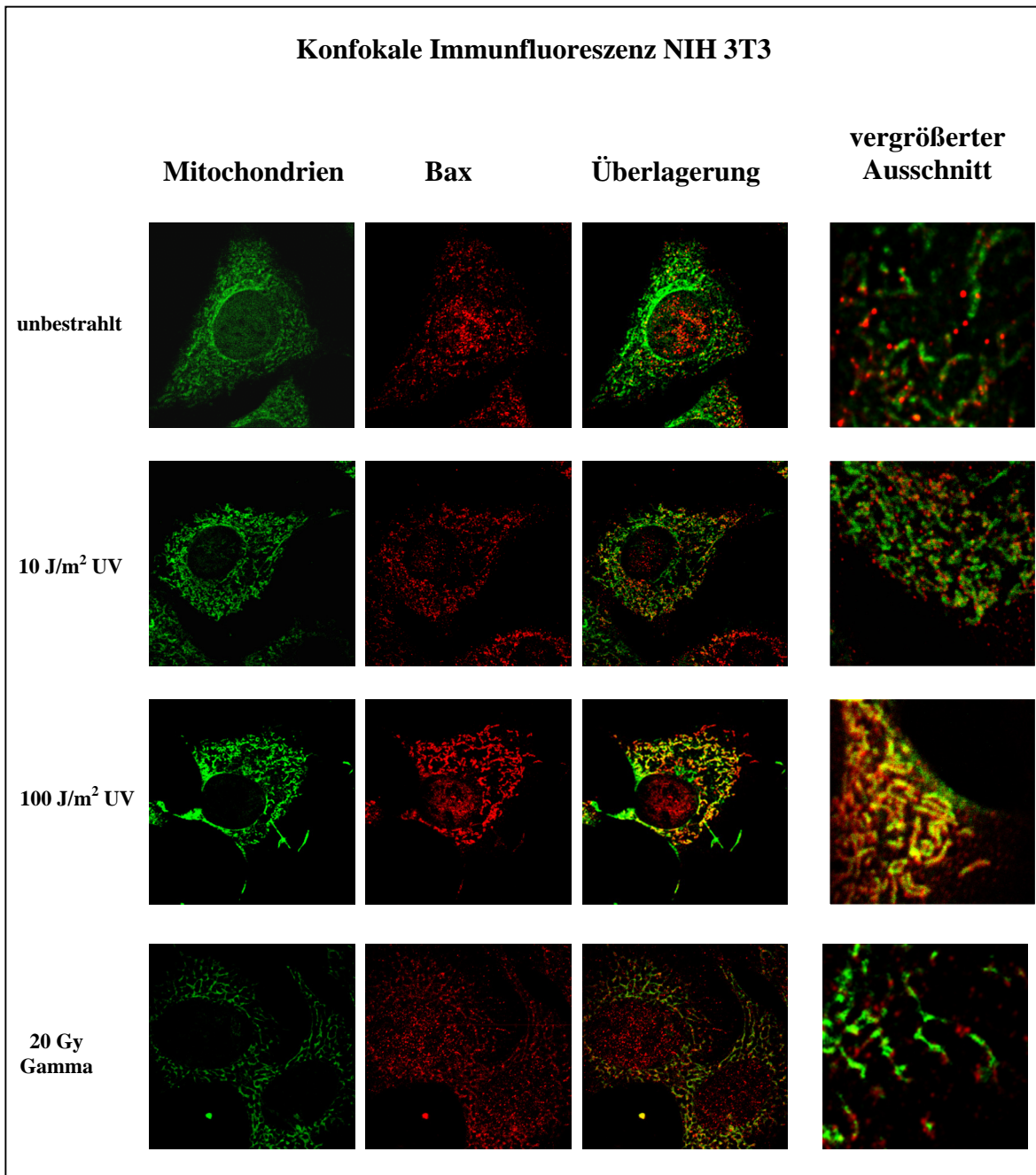


Abbildung 11: Die Translokation von Bax in die Mitochondrien ist selektiv nur nach Bestrahlung, die zu Apoptose führt, zu beobachten. Auf Deckgläschen wachsende NIH 3T3 Zellen wurden wie angegeben bestrahlt und zum Zeitpunkt der stärksten Bax-Expression (10 J/m² UV: 8 h nach Bestrahlung; 100 J/m² UV und 20 Gy Gamma: 24 h nach Bestrahlung) in Methanol/Aceton fixiert. Bax wurde mit einem spezifischen primären sowie einem sekundären Rhodamin-RedX gekoppelten sekundären Antikörper detektiert, die Mitochondrien wurden mit dem Farbstoff Mitotracker Green gefärbt. Die aufgenommenen Bilder zeigen je einen konfokalen Schnitt durch repräsentative Zellen.

8. Die Bax-Translokation in 100 J/m^2 UV-bestrahlten NIH 3T3 Zellen geht der Aktivierung von Caspase 3 voraus

Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob die beobachtete Translokation von Bax in die Mitochondrien ursächlich für die Induktion des apoptotischen Programms in 100 J/m^2 UV-bestrahlten NIH 3T3 Zellen sein könnte, wurde der zeitliche Verlauf von Bax-Translokation und Caspase 3-Aktivierung analysiert. Für den Fall, daß die Bax-Translokation tatsächlich an der Initialisierung des apoptotischen Programms im verwendeten System beteiligt ist und kein sekundäres Ereignis darstellt, sollte die Translokation von Bax anderen Markern von Apoptose wie z. B. der Expression von aktiver Caspase 3 zeitlich klar vorausgehen.

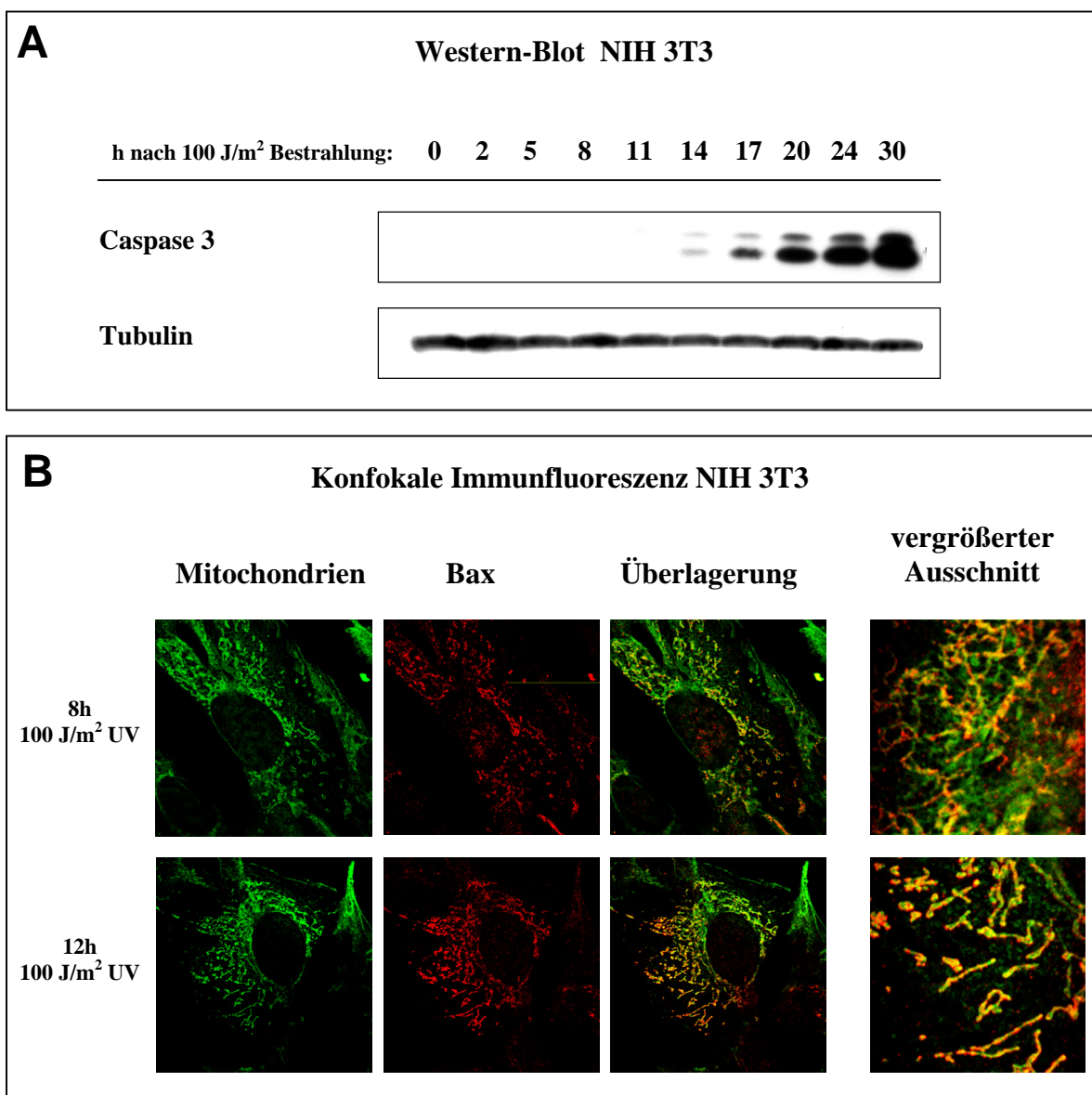


Abbildung 12: Die Translokation von Bax in die Mitochondrien geht der Aktivierung von Caspase 3 voraus. (A) Western-Blot 100 J/m^2 UV-bestrahlter NIH 3T3 Zellen. Aktive Caspase 3 ist frühestens 14 h nach Bestrahlung detektierbar, der Nachweis von Tubulin zeigt eine gleichmäßige Beladung der Gele. **(B)** Auf Deckgläschen wachsende NIH 3T3 Zellen wurden mit 100 J/m^2 UV-Bestrahlung geschädigt und zu den angegebenen Zeitpunkten in Methanol/Aceton fixiert. Bax wurde mit einem spezifischen primären sowie einem sekundären Rhodamin-RedX gekoppelten sekundären Antikörper detektiert, die Mitochondrien wurden mit dem Farbstoff Mitotracker Green gefärbt. Die aufgenommenen Bilder zeigen je einen konfokalen Schnitt durch repräsentative Zellen. Mitochondrial lokalisiertes Bax kann ab 8 h nach Bestrahlung detektiert werden.

Zur Untersuchung der zeitlichen Abfolge von Bax-Translokation und Caspase 3-Aktivierung wurden NIH 3T3 Zellen mit 100 J/m^2 UV-Bestrahlung geschädigt und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung parallel für eine Detektion von aktiver Caspase 3 im Western-Blot bzw. für die mikroskopische Analyse zum Nachweis der Bax-Translokation aufbereitet.

Wie **Abbildung 12a** zeigt, ist eine schwache Expression von aktiver Caspase 3 in NIH 3T3 Zellen frühestens 14 h nach 100 J/m^2 UV-Bestrahlung detektierbar. Bereits 6 h vorher, d.h. 8 h nach Bestrahlung, zeigen bereits einzelne Zellen die Aggregation von Bax in Mitochondrien-ähnlichen Strukturen und eine partielle Translokation des Proteins in die Mitochondrien (**Abbildung 12b**). 12 h nach Bestrahlung und damit deutlich vor eine Aktivierung von Caspase 3 weisen ca. 80 % der Zellen mitochondriales Bax auf (**Abbildung 12b**). Die Translokation von Bax in die Mitochondrien geht somit der Aktivierung von Caspase 3 zeitlich klar voraus. Dies deutet darauf hin, daß die Translokation von Bax zur sehr frühen Initialisierungsphase der Apoptose gehört und damit als Apoptose-auslösender Mechanismus in 100 J/m^2 UV-bestrahlten NIH 3T3 Zellen in Betracht zu ziehen ist.

9. Apoptose in p53-null 10-1 Zellen erfolgt ohne Bax-Aktivierung

Die bisherigen Ergebnisse weisen zum einen darauf hin, daß p53 substanziell an der Induktion von Apoptose in NIH 3T3 Zellen beteiligt ist und zum anderen, daß die Aktivierung von Bax dabei eine zentrale Rolle spielt. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen p53-Aktivität und Bax-Aktivierung *in vivo* besser zu verstehen, wurden Untersuchungen mit einer p53-null Zelllinie durchgeführt. Dabei sollte analysiert werden, inwieweit das Fehlen von p53 Auswirkungen auf die Aktivierung von Bax bzw. den Verlauf des apoptotischen Programms hat. Wie die bisher verwendeten wildtyp p53 NIH 3T3 Zellen wurde auch die 10-1 Zelllinie aus Mausembryo-Fibroblasten gewonnen. Allerdings ist das p53-Gen auf beiden Allelen durch Deletion inaktiviert, 10-1 Zellen exprimieren somit kein p53 (Harvey und Levine, 1991).

Zunächst wurde in einer Western-Blot Analyse überprüft, daß in 10-1 Zellen tatsächlich kein p53 exprimiert wird und auch keine Induktion p53-abhängiger Zielgene nach DNA-Schaden erfolgt. Dazu wurden 10-1 Zellen mit 100 J/m^2 UV-Bestrahlung geschädigt und zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung für die Western-Blot Analyse aufbereitet.

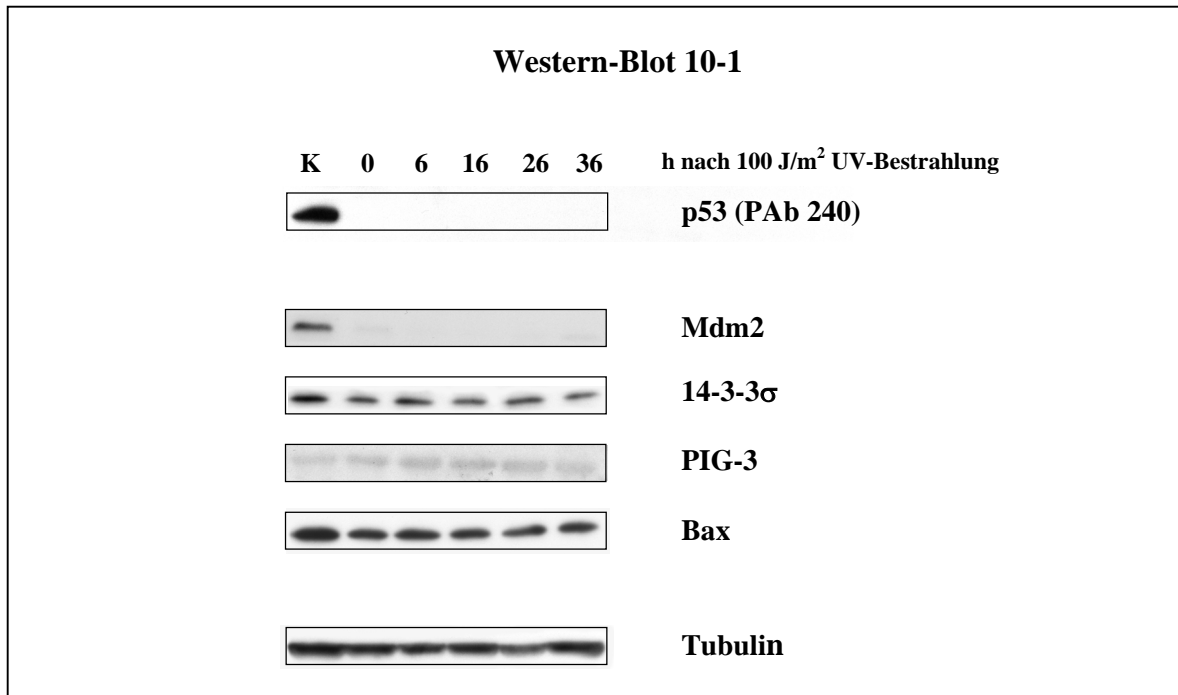


Abbildung 13: In p53-null 10-1 Zellen erfolgt keine Hochregulation von p53-Zielgenen nach 100 J/m² UV-Bestrahlung. Western-Blot 100 J/m² UV-bestrahlter 10-1 Zellen. Die Zellen wurden bestrahlt, zu den angegebenen Zeiten nach Bestrahlung geerntet und für die Western-Blot Analyse aufbereitet. Als Kontrolle (K) wurde Lysat von wildtyp p53 NIH 3T3 Zellen mitgeführt. Der Nachweis von p53, p53-Zielgenen und Tubulin erfolgte je mit spezifischen Antikörpern.

Abbildung 13 zeigt, daß in 10-1 Zellen wie zu erwarten kein p53 nachweisbar ist. Damit konsistent wird durch 100 J/m² UV-Bestrahlung, eine Behandlung, welche in wildtyp p53 NIH 3T3 Zellen zu einer starken Induktion der p53-abhängigen Zielgene *Mdm2*, *14-3-3σ*, *PIG-3* und *Bax* führt (siehe **Abbildung 7**), keines dieser Genprodukte in 10-1 Zellen hochreguliert (**Abbildung 13**). Gleichwohl induziert die Schädigung mit 100 J/m² UV-Bestrahlung die Aktivierung des apoptotischen Programms in 10-1 Zellen, wie die Expression aktiver Caspase 3 (**Abbildung 14a**) sowie die starke DNA-Fragmentierung (**Abbildung 14b**) zeigen.

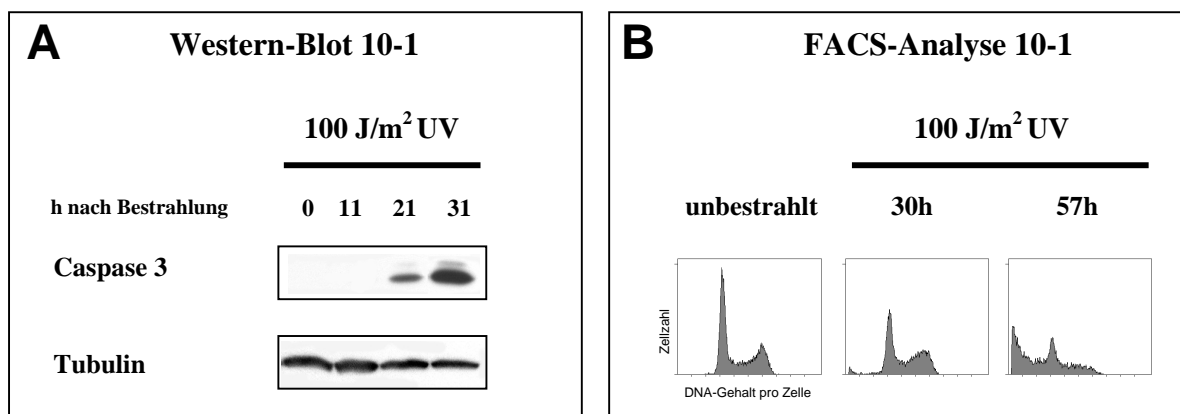


Abbildung 14: 100 J/m² UV-Bestrahlung induziert Apoptose in p53-null 10-1 Zellen. **(A)** Western-Blot 100 J/m² UV-bestrahlter 10-1 Zellen. Die Zellen wurden bestrahlt, zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung geerntet und für die Western-Blot Analyse aufbereitet. Aktive Caspase 3 ist ab 21 h nach Bestrahlung detektierbar, der Nachweis von Tubulin zeigt eine gleichmäßige Beladung des Gels. **(B)** Zellzyklusprofile 100 J/m² UV-bestrahlter 10-1 Zellen. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten nach Bestrahlung fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Bei der durchflußcytometrischen Analyse wurden 10 000 Zellen erfaßt. Ab 30 h nach Bestrahlung zeigen 10-1 Zellen eine Zunahme DNA-haltiger Zellfragmente mit einem subG1 DNA-Gehalt.

Um zu überprüfen, ob die durch Bestrahlung mit 100 J/m^2 UV induzierte Apoptose in p53-null 10-1 Zellen mit einer Aktivierung von Bax verbunden ist, wurde die Lokalisation von Bax in mikroskopischen Immunfluoreszenz-Analysen untersucht.

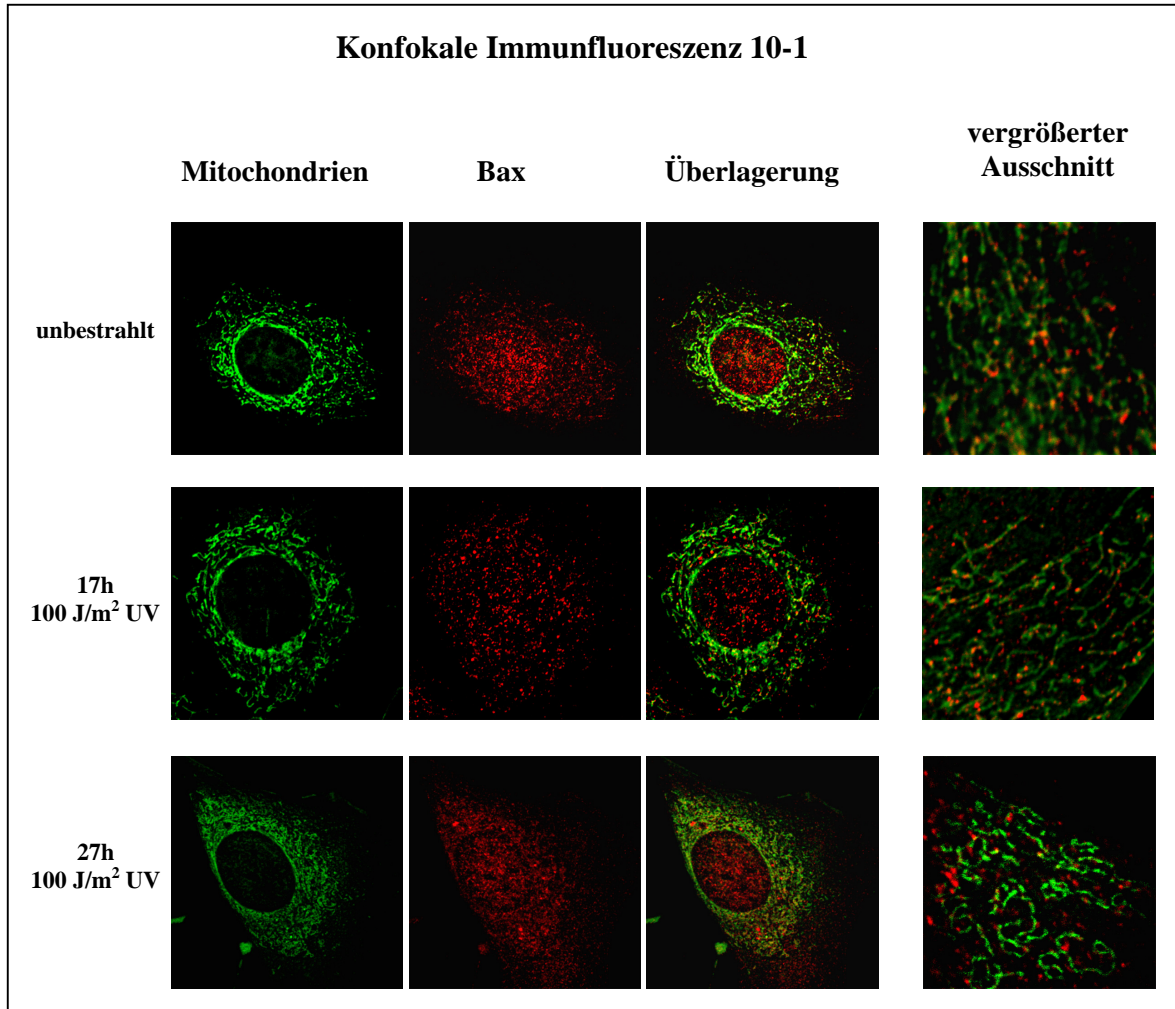


Abbildung 15: Die Translokation von Bax in die Mitochondrien findet in apoptotischen p53-null 10-1 Zellen nicht statt. Auf Deckgläschen wachsende 10-1 Zellen wurden mit 100 J/m^2 UV bestrahlt und zu den angegebenen Zeiten nach Bestrahlung in Methanol/Aceton fixiert. Bax wurde mit einem spezifischen primären sowie einem sekundären Rhodamin-RedX gekoppelten sekundären Antikörper detektiert, die Mitochondrien wurden mit dem Farbstoff Mitotracker Green gefärbt. Die aufgenommenen Bilder zeigen je einen konfokalen Schnitt durch repräsentative Zellen. 100 J/m^2 UV-Bestrahlung führt in 10-1 Zellen nicht zu einer Translokation von Bax in die Mitochondrien.

Wie aus **Abbildung 15** ersichtlich ist, zeigen unbestrahlte 10-1 Zellen bei Färbung von Bax ein vergleichbares Bild wie die wildtyp p53 NIH 3T3 Zellen (siehe **Abbildung 11**). Auch in den p53-null Zellen erscheint Bax in überwiegend distinkten *foci*, die sowohl cytoplasmatisch wie auch nucleär zu sehen sind. Darüber hinaus ist oft eine dichte Assoziation solcher Bax-*foci* mit den Mitochondrien zu erkennen, jedoch keine Kolokalisation (**Abbildung 15**). Dasselbe Ergebnis zeigen 100 J/m^2 UV-bestrahlte 10-1 Zellen. Im Gegensatz zu NIH 3T3 Zellen, bei denen die Apoptose-auslösende UV-Bestrahlung eine Translokation von Bax in die Mitochondrien induziert (siehe **Abbildung 11**), bleibt Bax in apoptotischen 10-1 Zellen außerhalb der Mitochondrien

(**Abbildung 15**). Die 100 J/m^2 UV-induzierte und p53-unabhängige Apoptose in p53-null 10-1 Zellen erfolgt somit ohne eine Aktivierung von Bax. Damit zeigen die zwei in ihrem p53-Status unterschiedlichen Maus-Fibroblasten-Zelllinien NIH 3T3 und 10-1 einen klaren Unterschied hinsichtlich der molekularen Mechanismen, die mit dem durch 100 J/m^2 UV-Bestrahlung induzierten programmierten Zelltod verbunden sind.

10. Die Translokation von Bax in die Mitochondrien kann durch Expression von wildtyp p53 in 10-1 Zellen wiederhergestellt werden und ist Transkriptions-unabhängig

Der Befund, daß die Translokation von Bax nur in apoptotischen wildtyp p53 NIH 3T3, nicht jedoch in apoptotischen p53-null 10-1 Zellen zu beobachten ist, deutet darauf hin, daß die Aktivierung von Bax ein p53-abhängiger Vorgang ist. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde die Konsequenz einer rekonstituierten p53-Expression in 10-1 Zellen untersucht.

Die Zelllinie 10-1cG9 wurde durch stabile Transfektion einer temperatursensitiven Mutante von p53 (tsp53 Val135) in 10-1 Zellen gewonnen (Ziegler, 1998). Das für die Transfektion verwendete tsp53 wurde in verschiedenen Zellsystemen charakterisiert (Michalovitz *et al.*, 1990; Martinez *et al.*, 1991; Ginsberg *et al.*, 1991b). Demnach liegt tsp53 bei der nicht-permissiven Temperatur ($39 \text{ }^\circ\text{C}$), die auch für die normale Kultivierung dieser Zelllinie verwendet wird, in mutanter Konformation als überwiegend cytoplasmatisches Protein vor. Nach Einstellen der permissiven Temperatur ($30 \text{ }^\circ\text{C}$) wechselt das Protein in die wildtyp-Konformation, was verbunden ist mit einer Akkumulation im Zellkern sowie der Transaktivierung von p53-Zielgenen. Infolge der Temperatur-induzierten tsp53-Aktivierung stellen die Zellen die Proliferation ein, sterben jedoch nicht ab.

Wie **Abbildung 16** zeigt, verhalten sich 10-1cG9 Zellen hinsichtlich Lokalisation und Transaktivierungs-Eigenschaften des überexprimierten tsp53-Proteins wie oben beschrieben und damit konsistent zu den publizierten Daten anderer tsp53-exprimierender Zellen. So exprimieren 10-1cG9 Zellen im Gegensatz zu den parentalen 10-1 Zellen große Mengen an p53. Wie die Immunfluoreszenz (**Abbildung 16a**) zeigt, verteilt sich das überexprimierte tsp53-Protein bei der nicht-permissiven Temperatur ($39 \text{ }^\circ\text{C}$) auf Cytoplasma und Zellkern. Bereits 5 h nach Einstellen der permissiven Temperatur ($30 \text{ }^\circ\text{C}$) akkumuliert tsp53 jedoch nahezu vollständig im Zellkern. Eine Western-Blot Analyse mit dem p53-spezifischen Antikörper PAb240 bestätigt die tsp53-Expression für beide Temperaturen (**Abbildung 16b**).

Verbunden mit dem Temperatur-Wechsel von $39 \text{ }^\circ\text{C}$ auf $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ist eine starke Induktion von p53-Zielgenen, wie am Beispiel der Genprodukte von *Mdm2* und *p21* dargestellt ist (**Abbildung 16b**). Beide p53-abhängig regulierte Proteine sind in 10-1 Zellen sowie 10-1cG9 Zellen bei nicht

permissiver Temperatur nicht nachweisbar, werden bei Kultivierung von 10-1cG9 Zellen bei permissiven 30 °C jedoch in großer Menge exprimiert. Durch Behandlung der Zellen mit dem Transkriptions-Inhibitor Actinomycin D läßt sich die Induktion von Mdm2 und p21 trotz Wechsel auf die permissive Temperatur vollständig unterbinden ohne daß dies einen Einfluß auf die Expression von p53 hat (**Abbildung 16b**).

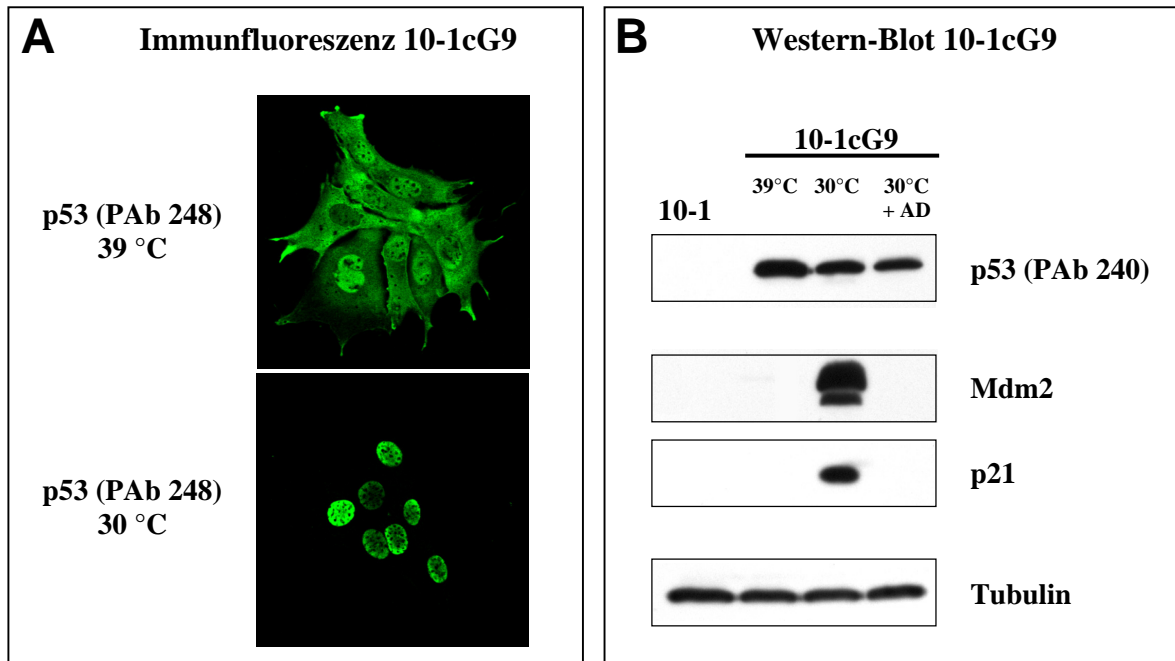


Abbildung 16: Charakterisierung der tsp53-exprimierenden Zelllinie 10-1cG9. (A) Immunfluoreszenz zum Nachweis von p53 in 10-1cG9 Zellen bei 39 °C und 5 h nach Wechsel auf 30 °C. Auf Deckgläsern wachsende Zellen wurden in Methanol/Aceton fixiert. p53 wurde mit dem spezifischen primären Antikörper PAb 248 sowie einem sekundären Alexa488-gekoppelten sekundären Antikörper detektiert. Bei der nicht-permissiven Temperatur (39 °C) ist p53 im Cytoplasma und Zellkern lokalisiert, bei der permissiven Temperatur (30 °C) akkumuliert p53 im Zellkern. **(B)** Western-Blot zum Nachweis von p53 und p53-Zielgenen. 10-1cG9 Zellen wurden bei 39 °C bzw. bei 30 °C (26 h) kultiviert und für die Western-Blot Analyse aufbereitet. Für die Behandlung mit Actinomycin D (AD) wurde dem Kulturmedium 1,5 h vor dem Wechsel auf 30 °C Actinomycin D in einer Konzentration von 4 µM zugesetzt, die Zellen wurden 26 h nach Temperaturwechsel geerntet. Als Kontrolle wurde Lysat der parentalen 10-1 Zelllinie mitgeführt. Die Kultivierung von 10-1cG9 Zellen bei 30 °C induziert die Expression der p53-Zielgene Mdm2 und p21. Behandlung mit Actinomycin D blockiert die p53-abhängige Transaktivierung von Mdm2 und p21 ohne Einfluß auf die p53-Menge zu nehmen. Der Nachweis von Tubulin zeigt eine gleichmäßige Beladung des Gels.

Um zu überprüfen, ob die Expression von p53 in 10-1 Zellen eine Bax-Translokation in die Mitochondrien apoptotischer Zellen nach sich zieht, wurden 10-1cG9 Zellen bei permissiver (30 °C) und nicht-permissiver (39 °C) Temperatur mit 100 J/m² UV-Bestrahlung geschädigt.

Wie Western-Blot Analysen zeigen, induziert diese Bestrahlung die Expression von aktiver Caspase 3 bei beiden Temperaturen (**Abbildung 17a**). 100 J/m² UV-Bestrahlung verursacht somit unabhängig von mutanter oder wildtyp Konformation des p53 Proteins Apoptose in 10-1cG9 Zellen.

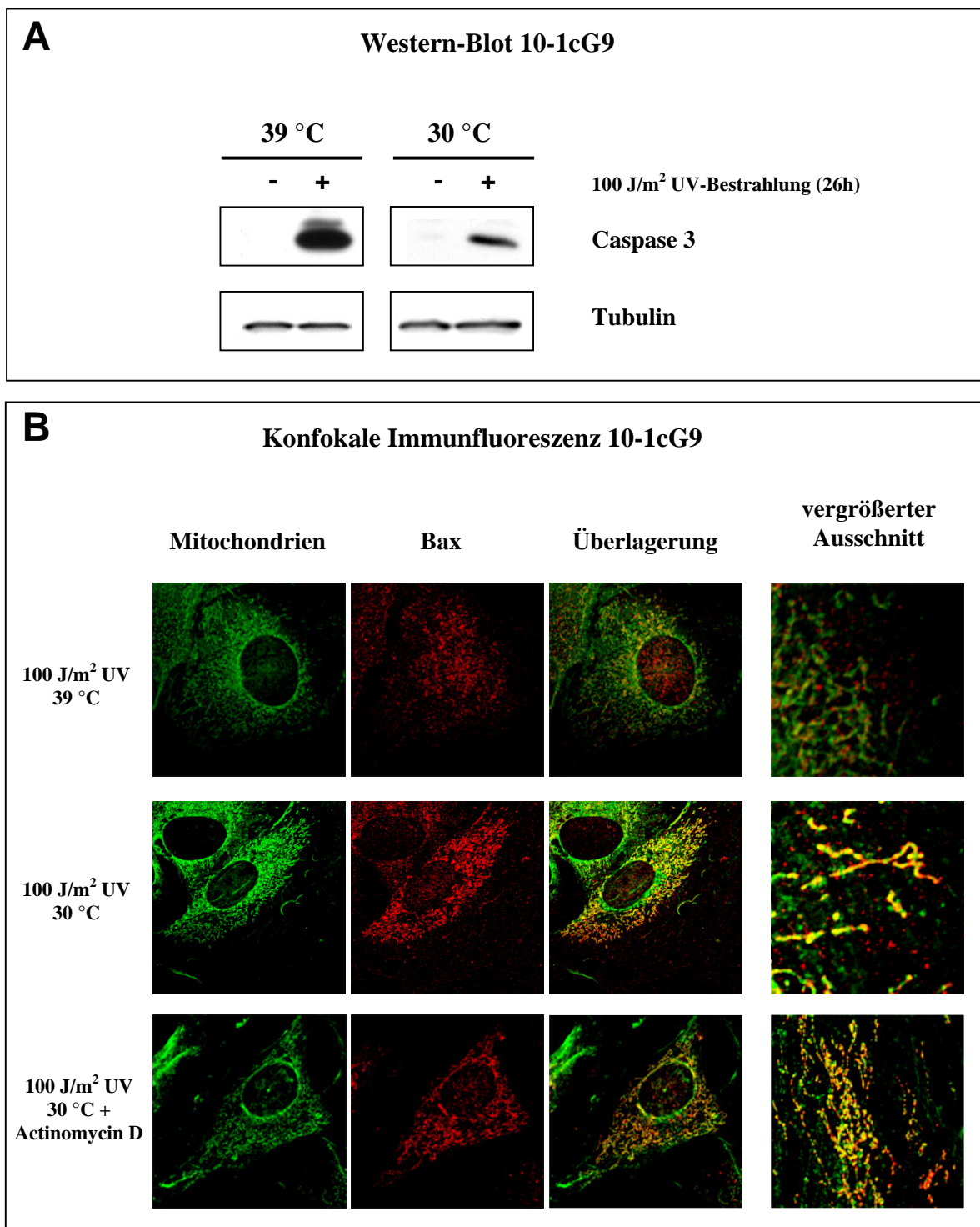


Abbildung 17: Die Translokation von Bax in die Mitochondrien lässt sich durch Expression von wildtyp *tsp53* in 10-1 Zellen wiederherstellen und ist Transkriptions-unabhängig. (A) Western-Blot 100 J/m² UV-bestrahlter 10-1cG9 Zellen bei permissiver und nicht-permissiver Temperatur zum Nachweis von Apoptose. 10-1cG9 wurden bei 39 °C bzw. 5 h bei 30 °C kultiviert, mit 100 J/m² UV (+) bzw. mock (-) bestrahlt, 26 h nach Bestrahlung geerntet und für die Western-Blot Analyse aufbereitet. UV-Bestrahlung induziert bei beiden Temperaturen die Expression aktiver Caspase 3; der Nachweis von Tubulin zeigt eine gleichmäßige Beladung der Gele. **(B)** Konfokale Immunfluoreszenz 100 J/m² UV-bestrahlter 10-1cG9 Zellen zum Nachweis einer Translokation von Bax in die Mitochondrien apoptotischer 10-1cG9 Zellen. Auf Deckgläsern wachsende 10-1cG9 Zellen wurden bei 39 °C bzw. 30 °C mit oder ohne Zusatz von 4 µM Actinomycin D (Zugabe 1,5 h vor Wechsel auf 30 °C und 6,5 h vor Bestrahlung) im Medium kultiviert und 21-26 h nach 100 J/m² UV-Bestrahlung in Methanol/Aceton fixiert. Bax wurde mit einem spezifischen primären sowie einem sekundären Alexa555-gekoppelten sekundären Antikörper detektiert, die Mitochondrien mit *Mitotracker Green*TM gefärbt. Bei der permissiven Temperatur (30 °C), nicht jedoch bei der nicht-permissiven Temperatur (39 °C) ist eine Translokation von Bax in die Mitochondrien zu sehen. Die Behandlung mit dem Transkriptionsinhibitor Actinomycin D beeinträchtigt die Bax-Translokation in apoptotischen 10-1cG9 Zellen bei der permissiven Temperatur nicht.

Interessante Unterschiede in Abhängigkeit der Kultivierungs-Temperatur zeigen sich bei Analyse der intra-zellulären Bax-Lokalisation in apoptotischen 10-1cG9 Zellen. So erfolgt die Apoptose von 10-1cG9 Zellen unter Bedingungen, in denen das *tsp53* Protein transkriptionell inaktiv ist und in mutanter Konformation vorliegt (39 °C), ohne eine Bax-Translokation in die Mitochondrien (**Abbildung 17b**). Die Expression von mutantem *tsp53* Protein in 10-1 Zellen hat somit keinen Einfluß auf die Aktivierung von Bax im Zuge des apoptotischen Programms, und 10-1cG9 Zellen verhalten sich bei nicht-permissiver Temperatur bezüglich der Bax-Translokation wie die parentale *p53*-null 10-1 Zelllinie (siehe 9.).

Im Gegensatz dazu zeigen apoptotische 10-1cG9 Zellen, bei denen *tsp53* in wildtyp-Konformation exprimiert wird (30 °C), klar eine Aggregation von Bax und die Translokation des pro-apoptotischen Proteins in die Mitochondrien (**Abbildung 17b**). Damit verhalten sich 10-1cG9 Zellen bei permissiver Temperatur wie apoptotische wildtyp *p53* NIH 3T3 Zellen (siehe 7.) und anders als die isogenen Kontrollzellen (10-1cG9 bei 39 °C) oder die parentalen *p53*-null 10-1 Zellen (siehe 8.). Der Befund, daß die Bax-Translokation in 10-1 Zellen durch die Expression von wildtyp *tsp53* erzielbar ist, zeigt somit klar, daß die Aktivierung von Bax in Folge schwerer UV-Schäden ein wildtyp *p53*-vermitteltes Ereignis ist.

Wie **Abbildung 17b** weiterhin zeigt, beruht dieses Ereignis jedoch nicht auf einer transkriptionellen Aktivität von *tsp53* in wildtyp-Konformation. So hat die Inkubation von 10-1cG9 Zellen bei permissiver Temperatur mit dem Transkriptions-Inhibitor Actinomycin D keinerlei negativen Einfluß auf die Bax-Translokation bestrahlter Zellen, obwohl die Actinomycin D-Behandlung die Induktion *p53*-abhängiger Zielgene vollständig blockiert (siehe **Abbildung 16**).

Damit ergibt sich, daß die Streß-induzierte Translokation von Bax in die Mitochondrien bestrahlter Maus-Fibroblasten ein *p53*-abhängiges, aber Transkriptions-unabhängiges Ereignis darstellt.

11. Balb/c 3T3tx Zellen exprimieren transkriptionell-inaktives mutiertes *p53*, können jedoch Bax aktivieren

Bereits seit langem ist bekannt, daß auch einige transkriptionell-inaktive mutierte *p53* Proteine (mut *p53*) über pro-apoptotische Aktivität verfügen (Übersichtsartikel: Chipuk und Green, 2003). Der Befund, daß die Aktivierung von Bax ein wildtyp *p53*-abhängiges, gleichwohl aber Transkriptions-unabhängiges Ereignis darstellt, macht es wahrscheinlich, daß bestimmte mutierte *p53*-Proteine trotz fehlender Transaktivierungs-Kompetenz die Fähigkeit zur Bax-Aktivierung beibehalten haben und sich damit von *tsp53* in mutanter Konformation unterscheiden. Diese Annahme wurde bereits durch neueste *in vitro* Studien belegt, in denen eine Membran-Permeabilisierung isolierter Mitochondrien durch die Zugabe von Bax und einem aufgereinigten

mutierten und transkriptionell-inaktiven p53-Protein (mutp53^{L25Q,W26S}) erzielt werden konnte (Chipuk *et al.*, 2004). Darüber hinaus induzierte die Mikroinjektion derselben Mutante in HeLa Zellen die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Cytoplasma (Chipuk *et al.*, 2004).

Um zu untersuchen, ob auch endogen exprimiertes, transkriptionell-inaktives mut p53 durch genotoxischen Streß *in vivo* aktiviert wird und eine Translokation von Bax induzieren kann, wurden Balb/c 3T3tx Zellen durch Bestrahlung geschädigt und näher analysiert. Die Zelllinie Balb/c 3T3tx wurde wie NIH 3T3 und 10-1 Zellen aus Mausembryo-Fibroblasten gewonnen und exprimiert heterozygot zwei mutierte p53-Proteine, mut p53^{Y230D, M237I} und mut p53^{Y230D} (Milner und Cook, 1986; Milner *et al.*, 1991; Zerrahn *et al.*, 1992).

In Western-Blot Analysen wurde zunächst überprüft, daß Balb/c 3T3tx Zellen tatsächlich inaktiv bezüglich der Induktion von p53-Zielgenen sind. Dazu wurden die Zellen mit 100 J/m² UV-Bestrahlung geschädigt, zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung geerntet und für die Western-Blot Analyse aufbereitet. Eine derartige Bestrahlung mit 100 J/m² UV-Licht führte in wildtyp p53 NIH 3T3 Zellen, nicht jedoch in p53-null 10-1 Zellen zu einer starken Induktion p53-abhängig regulierter Gene auf Proteinebene (siehe **Abbildungen 7** und **13**).

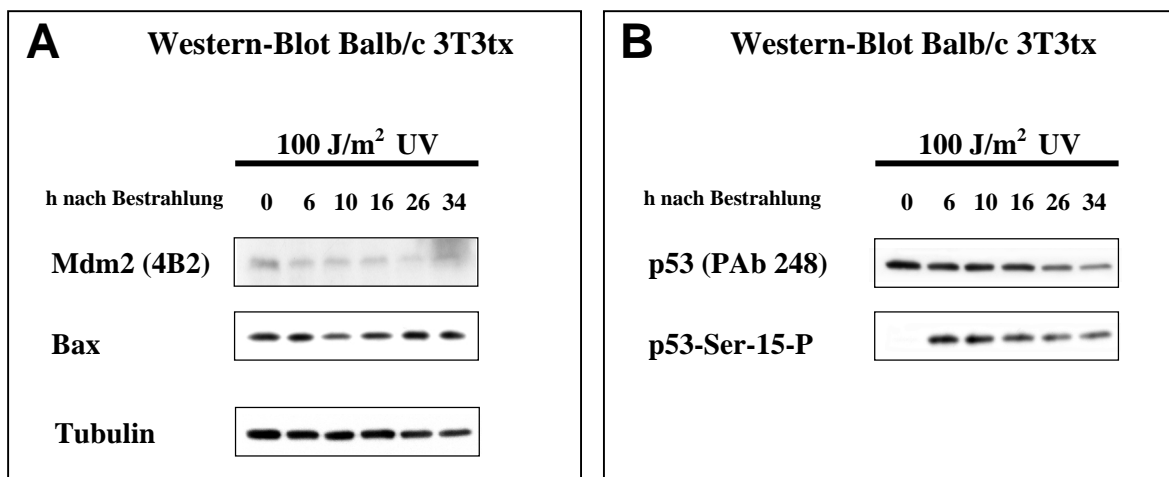


Abbildung 18: In mut p53-exprimierenden Balb/c 3T3tx Zellen erfolgt nach 100 J/m² UV-Bestrahlung keine Hochregulation von p53 und p53-Zielgenen, jedoch eine Modifikation von mut p53. Western-Blot 100 J/m² UV-bestrahlter Balb/c 3T3tx Zellen. Die Zellen wurden bestrahlt und zu den angegebenen Zeiten nach Bestrahlung für die Western-Blot Analyse aufbereitet. **(A)** Die p53-abhängig regulierten Proteine Mdm2 (Antikörper: 4B2) und Bax werden durch Bestrahlung nicht hochreguliert, der Nachweis von Tubulin zeigt eine gleichmäßige Beladung des Gels. **(B)** Mutiertes p53 (Antikörper: PAb 248) wird nach Bestrahlung nicht stabilisiert, jedoch an Serin 15 phosphoryliert.

Wie aus **Abbildung 18a** ersichtlich ist, werden die wildtyp p53-regulierten Proteine Mdm2 und Bax in Balb/c 3T3tx Zellen durch 100 J/m² UV-Bestrahlung nicht induziert. Das gleiche Resultat ergab die Analyse der Expression von p21, PIG-3 (beide Proteine waren nicht detektierbar) und 14-3-3σ (ohne Abbildung). Dies zeigt, daß das in Balb/c 3T3tx exprimierte mut p53 in der Tat transkriptionell inaktiv ist.

Wie für mutiertes p53 zu erwarten, verursacht die Bestrahlung mit 100 J/m^2 UV-Licht keine weitere Stabilisierung des p53-Proteins, das bereits in unbestrahlten Balb/c 3T3tx Zellen in großen Mengen vorliegt (**Abbildung 18b**). Allerdings erfolgt wie in wildtyp p53 Zellen (siehe **4.**) eine starke und dauerhafte Phosphorylierung von mut p53 an Serin 15 (**Abbildung 18b**). Dies deutet darauf hin, daß die Streß-induzierte Signalkaskade *upstream* von p53 in Balb/c 3T3tx Zellen intakt ist.

Um zu überprüfen, ob mut p53 exprimierende Balb/c 3T3tx Zellen die wildtyp p53-Aktivität zur Bax-Translokation trotz p53-Mutation beibehalten haben, wurde die intra-zelluläre Lokalisation von Bax in apoptotischen Balb/c 3T3tx Zellen analysiert. Wie aus den **Abbildungen 19a** und **19b** ersichtlich ist, induziert die Bestrahlung mit 100 J/m^2 UV-Licht eine Zerstörung der Balb/c 3T3tx Zellen durch Apoptose wesentlich schneller als dies bei NIH 3T3 oder 10-1 Zellen der Fall war (siehe **8.** und **9.**). So ist aktive Caspase 3 in Balb/c 3T3tx Zellen bereits ab 6 h nach Bestrahlung detektierbar (**Abbildung 19a**). Die durchflußcytometrische Analyse bestätigt darüber hinaus, daß schon 16 h nach Bestrahlung der überwiegende Teil der Zellpopulation in DNA-haltige Zellfragmente zerfallen ist (**Abbildung 19b**).

Wie sich zeigte, ist die apoptotische Eliminierung 100 J/m^2 UV-bestrahlter Balb/c 3T3tx Zellen mit einer Aktivierung von Bax verbunden. So induziert die Bestrahlung der mut p53 exprimierenden Zellen eine Translokation von Bax in die Mitochondrien, die bereits zu frühen Zeitpunkten nach Bestrahlung erfolgt (**Abbildung 19c**). Der Befund, daß Bax in unbestrahlten Balb/c 3T3tx Zellen nicht mit den Mitochondrien kolokalisiert, sondern erst nach Bestrahlung aggregiert und in die Mitochondrien translociert, zeigt, daß dieser Vorgang wie in wildtyp p53 Zellen strikt reguliert wird und einer Aktivierung bedarf. Darüber hinaus belegt die nicht mit einer Hochregulation des Proteins verbundene (siehe **Abbildung 18a**) Bax-Aktivierung in Balb/c 3T3tx Zellen die bereits in wildtyp p53 Zellen gemachte Beobachtung, daß Hochregulation und Aktivierung von Bax unabhängig voneinander regulierte Vorgänge sind (siehe **7.**).

Insgesamt verhalten sich mut p53 exprimierende Balb/c 3T3tx Zellen bezüglich der Bax-Aktivierung wie NIH 3T3 Zellen, die über intaktes wildtyp p53 verfügen, und verschieden von p53-null 10-1 Zellen, bei denen keine Bax-Translokation in die Mitochondrien zu beobachten war. Dieser Befund zeigt, daß das in Balb/c 3T3tx Zellen exprimierte, transkriptionell-inaktive mut p53 Protein die pro-apoptotische wildtyp p53-Eigenschaft beibehalten hat, die Aktivierung von Bax induzieren zu können.

Damit erweisen sich Balb/c 3T3tx Zellen als interessantes experimentelles Modell, anhand dessen studiert werden kann, inwieweit die koordinierte Aktion transkriptioneller und nicht-transkriptioneller Aktivitäten von p53 substanzuell zur Induktion der p53-abhängigen Apoptose beitragen.

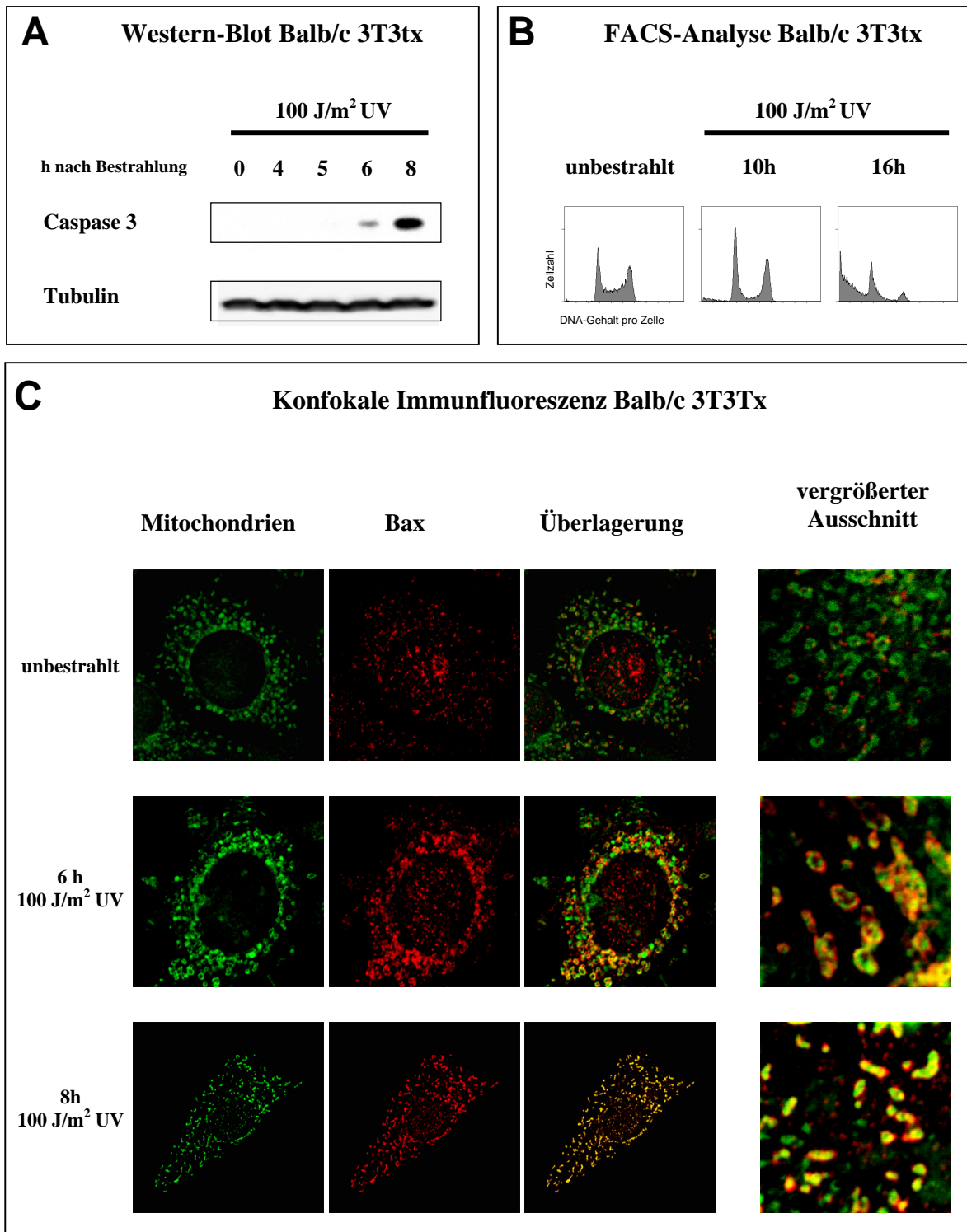


Abbildung 19: 100 J/m² UV-Bestrahlung induziert Bax-abhängige Apoptose in mut p53 exprimierenden Balb/c 3T3tx Zellen. (A) Western-Blot 100 J/m² UV-bestrahlter Balb/c 3T3tx Zellen. Die Zellen wurden bestrahlt, zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung geerntet und für die Western-Blot Analyse aufbereitet. Aktive Caspase 3 ist ab 6 h nach Bestrahlung detektierbar, der Nachweis von Tubulin zeigt eine gleichmäßige Beladung des Gels. (B) Zellzyklusprofile 100 J/m² UV-bestrahlter Balb/c 3T3tx Zellen. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten nach Bestrahlung fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Bei der durchflußcytometrischen Analyse wurden 10 000 Zellen erfaßt. Ab 10 h nach Bestrahlung zeigen Balb/c 3T3tx Zellen eine Zunahme DNA-haltiger Zellfragmente mit einem *subG1* DNA-Gehalt. (C) Konfokale Immunfluoreszenz 100 J/m² UV-bestrahlter Balb/c 3T3tx Zellen. Auf Deckgläschen wachsende Balb/c 3T3tx Zellen wurden mit 100 J/m² UV bestrahlt und zu den angegebenen Zeiten nach Bestrahlung in Methanol/Aceton fixiert. Bax wurde mit einem spezifischen primären sowie einem sekundären Alexa555 gekoppelten sekundären Antikörper detektiert, die Mitochondrien wurden mit dem Farbstoff Mitotracker Green gefärbt. Die aufgenommenen Bilder zeigen je einen konfokalen Schnitt durch repräsentative Zellen. Apoptotische Balb/c 3T3tx Zellen zeigen eine Translokation von Bax in die Mitochondrien.

12. Mut p53 exprimierende Balb/c 3T3tx Zellen aktivieren Bax auch nach 10 J/m² UV- und 20 Gy Gamma-Strahlung

Die bisherigen Ergebnisse sprechen dafür, daß die pro-apoptotische Aktivität von p53 in Maus-Fibroblasten vor allem auf nicht-transkriptionellen Mechanismen beruht. Dabei wurden zwei Parameter identifiziert, die mit einer selektiven Aktivierung der pro-apoptotische Wirkung von p53 assoziiert sind: Dies ist zum einen eine große Menge an wildtyp p53-Protein (siehe 4. und 6.) sowie die Aktivierung von Bax (siehe 7.).

Wie gezeigt wurde (siehe 11.), exprimieren Balb/c 3T3tx Zellen konstitutiv große Mengen von mut p53 und verfügen über die pro-apoptotische wildtyp p53-Fähigkeit zur Aktivierung von Bax. Gleichzeitig haben diese Zellen jedoch die Fähigkeit zur Transaktivierung anti-apoptotischer Zielgene wie p21 verloren. Ausgehend von diesen Befunden stellte sich die Frage, ob das in Balb/c 3T3tx Zellen gestörte Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen p53-Aktivitäten dazu führt, daß das apoptotische Programm auch nach solchen Schäden aktiviert wird, die in wildtyp p53-exprimierenden Zellen keine Apoptose auslösen.

Wie gezeigt wurde, induziert die Bestrahlung von wildtyp p53-exprimierenden NIH 3T3 Zellen mit 10 J/m² UV-Licht die Aktivierung von p53, eine Hochregulation von p53-abhängigen Zielgenen, jedoch eine nur moderate Stabilisierung von p53 und keine Apoptose (siehe 1. und 2.). Zur Untersuchung einer möglicherweise erhöhten Sensitivität von mut p53-exprimierenden Balb/c 3T3tx Zellen bezüglich der Induktion von Apoptose wurden diese Zellen mit 10 J/m² UV-Bestrahlung geschädigt und auf das Auftreten Apoptose-spezifischer Ereignisse überprüft. Um unterscheiden zu können, inwieweit eventuelle Effekte tatsächlich mit einer spezifischen Aktivität von mut p53 verbunden sind oder lediglich auf dem Verlust von wildtyp p53-Funktionen beruhen, wurden p53-null 10-1 Zellen als weiterer Vergleich herangezogen und ebenfalls mit 10 J/m² UV-Bestrahlung geschädigt.

Abbildung 20 zeigt, daß Bestrahlung mit 10 J/m² UV-Licht in mut p53-exprimierenden Balb/c 3T3tx Zellen, nicht jedoch in p53-null 10-1 Zellen, tatsächlich zu einer Aktivierung des apoptotischen Programms führt, was anhand der Expression von aktiver Caspase 3 (**Abbildung 20a**) sowie der Entstehung DNA-haltiger Zellfragmente sichtbar wird (**Abbildung 20b**). Interessanterweise bewirkt die Aktivierung des apoptotischen Programms durch das geringe Schadensausmaß der 10 J/m² UV-Bestrahlung keine vollständige Eliminierung der Balb/c 3T3tx Zellpopulation, sondern führt zur Zerstörung nur eines geringen Teils der bestrahlten Zellen. Dies zeigt sich an dem relativ kleinen, jedoch signifikant anwachsenden *subG1-Peak* in den entsprechenden Zellzyklusprofilen (**Abbildung 20b**). Darüber hinaus beeinträchtigt 10 J/m² UV-Bestrahlung nicht dauerhaft das Wachstum von Balb/c 3T3tx Zellen, da derart bestrahlte Zellen bei Langzeit-Kultivierung ein normales Proliferationsverhalten zeigen (ohne Abbildung).

Offensichtlich sind die durch 10 J/m^2 UV-Bestrahlung in Balb/c 3T3tx Zellen verursachten apoptotischen Signale für eine Eliminierung der gesamten Zellpopulation somit nicht ausreichend stark, so daß nur ein geringer Anteil von Zellen tatsächlich zerstört wird, für die Gesamtheit der bestrahlten Zellpopulation jedoch Überlebenssignale dominieren. Trotzdem stellt die beobachtete Induktion des apoptotischen Programms in Balb/c 3T3tx Zellen nach 10 J/m^2 UV eine signifikante Schadensreaktion dar, die nach dieser Bestrahlung weder in wildtyp p53 NIH 3T3 Zellen noch in p53-null 10-1 Zellen zu beobachten ist. Dies deutet auf einen mut p53-vermittelten pro-apoptotischen Effekt hin, obwohl Zelllinien-spezifische Besonderheiten unabhängig vom p53-Status als Ursache für die erhöhte Sensitivität bezüglich der Apoptose-Induktion nicht völlig ausgeschlossen werden können.

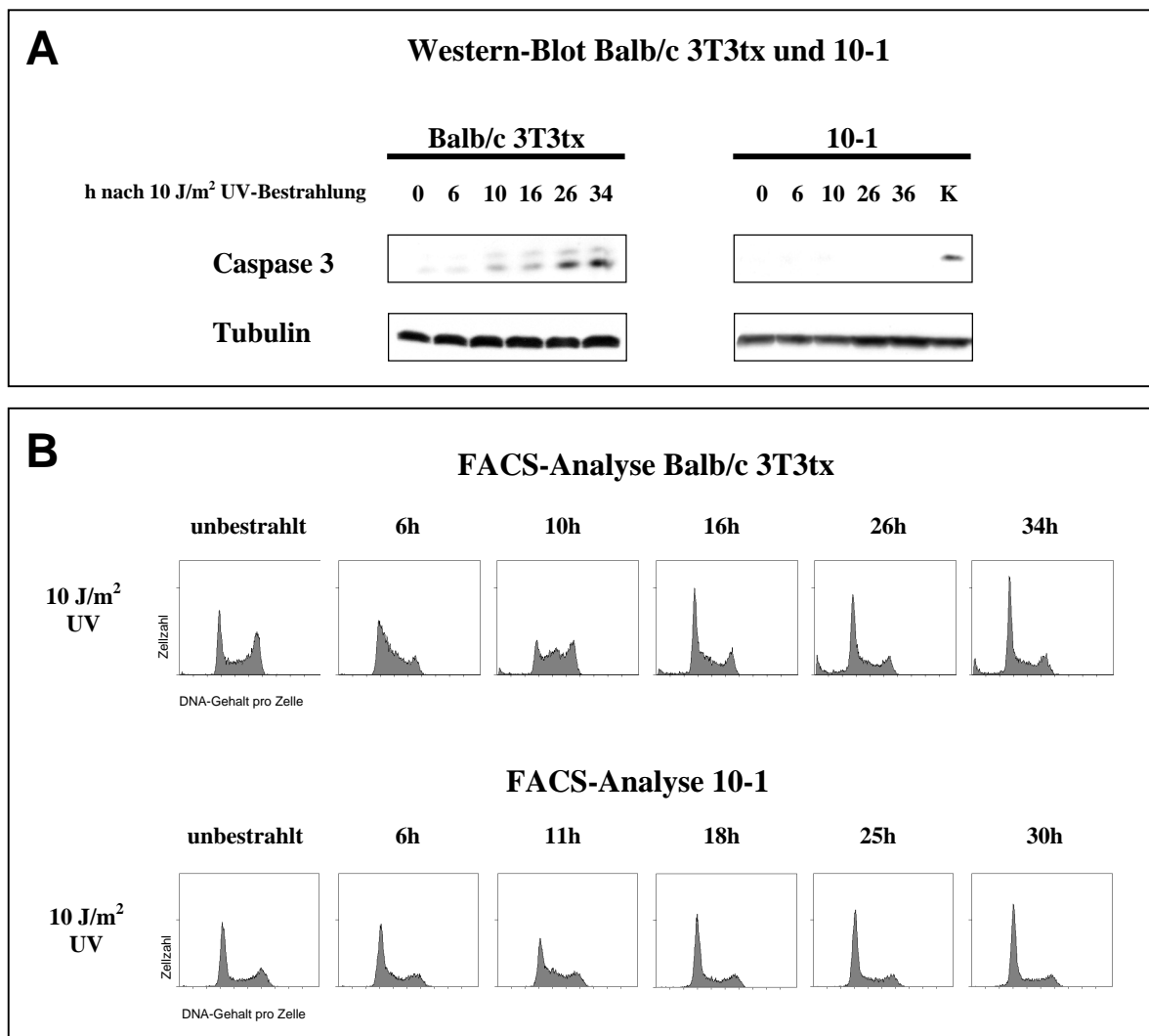


Abbildung 20: 10 J/m^2 UV-Bestrahlung induziert Apoptose in mut p53 Balb/c 3T3tx Zellen, nicht jedoch in p53-null 10-1 Zellen. (A) Western-Blot 10 J/m^2 UV-bestrahlter mit p53-exprimierender Balb/c 3T3tx und p53-null 10-1 Zellen. Die Zellen wurden bestrahlt, zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung geerntet und für die Western-Blot Analyse aufbereitet. Als Positivkontrolle (K) wurden 100 J/m^2 UV-bestrahlte 10-1 Zellen mitgeführt. Der Apoptose-Marker aktive Caspase 3 ist nach 10 J/m^2 UV-Bestrahlung nur in Balb/c 3T3tx Zellen detektierbar. Der Nachweis von Tubulin zeigt eine gleichmäßige Beladung der Gele. **(B)** Zellzyklusprofile 10 J/m^2 UV-bestrahlter Balb/c 3T3tx und 10-1 Zellen. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten nach Bestrahlung fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Bei der durchflußcytometrischen Analyse wurden 10 000 Zellen erfaßt. 10 J/m^2 UV-Bestrahlung führt nur in Balb/c 3T3tx, nicht jedoch in 10-1 Zellen zur Generierung von DNA-haltigen Zellfragmenten mit einem *subG1* DNA-Gehalt.

Um zu überprüfen, inwieweit die Aktivierung des apoptotischen Programms durch 10 J/m^2 UV-Bestrahlung in Balb/c 3T3tx Zellen mit einer Aktivität von mut p53 verbunden ist, wurde untersucht, ob die genannte Bestrahlung auch zu einer Translokation von Bax in die Mitochondrien führt, was zuvor als p53-abhängiges Ereignis charakterisiert wurde (siehe 10.).

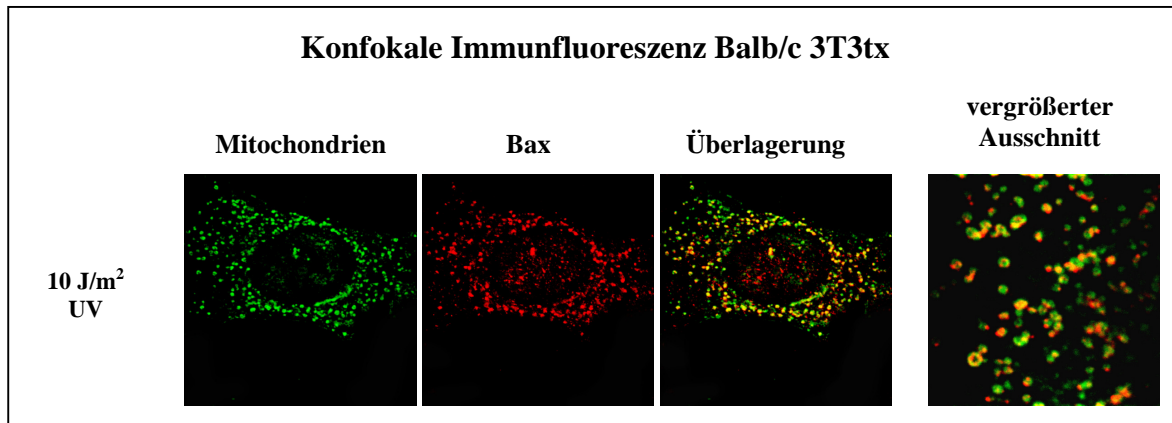


Abbildung 21: 10 J/m^2 UV-Bestrahlung induziert in mut p53 Balb/c 3T3tx Zellen die Translokation von Bax in die Mitochondrien. Konfokale Immunfluoreszenz 10 J/m^2 UV-bestrahlter Balb/c 3T3tx Zellen. Auf Deckgläschen wachsende Balb/c 3T3tx Zellen wurden mit 10 J/m^2 UV-Licht bestrahlt und 24 h nach Bestrahlung in Methanol/Aceton fixiert. Bax wurde mit einem spezifischen primären sowie einem sekundären Rhodamin-RedX gekoppelten sekundären Antikörper detektiert, die Mitochondrien wurden mit dem Farbstoff Mitotracker Green gefärbt. Die aufgenommenen Bilder zeigen je einen konfokalen Schnitt durch repräsentative Zellen. Apoptotische Balb/c 3T3tx Zellen zeigen eine partielle Translokation von Bax in die Mitochondrien.

Wie **Abbildung 21** zeigt, führt 10 J/m^2 UV-Bestrahlung in Balb/c 3T3tx tatsächlich zu einer Translokation von Bax in die Mitochondrien. Die Tatsache, daß diese p53-abhängige Aktivierung von Bax beobachtet werden kann, unterstützt die Hypothese, daß die erhöhte Sensitivität bezüglich der Apoptose-Induktion von Balb/c 3T3tx Zellen mit einer Aktivität von mut p53 verbunden ist. Diese Hypothese wird des weiteren unterstützt durch die Beobachtung, daß das Ausmaß der Bax-Translokation direkt mit der Stärke des apoptotischen Effekts korreliert. So sind in der gezeigten Überlagerung (**Abbildung 21**) neben kolokalisierenden Signalen für Bax und Mitochondrien immer auch Bax-freie Mitochondrien zu erkennen. Die nur partielle Kolokalisation von Bax und Mitochondrien liefert damit eine mögliche und plausible Erklärung für den Befund, daß nach 10 J/m^2 UV-Bestrahlung nur ein geringer Anteil der bestrahlten Zellpopulation durch Apoptose eliminiert wird (siehe oben).

Insgesamt unterscheiden sich mut p53 exprimierende Balb/c 3T3tx Zellen deutlich von Mausfibroblasten mit wildtyp p53 oder keiner p53-Expression (p53-null), bei denen die Bestrahlung mit 10 J/m^2 UV-Licht nicht zu einer Bax-Aktivierung und/oder Apoptose führt (siehe 1. und 7. sowie **Abbildung 20**). Diese Sensitivität der untersuchten mut p53 Zellen in Bezug auf die Induktion von Apoptose belegt zusätzlich die aus den Untersuchungen mit wildtyp p53 Zellen abgeleitete Beobachtung, daß große Mengen von aktiviertem p53 pro-apoptotische Wirkung haben

und dieser Effekt unabhängig von einer transkriptionellen Aktivität des Tumorsuppressors ist (siehe 6.). Darüber hinaus weist der beobachtete Unterschied zwischen mut p53-exprimierenden und p53-null Zellen darauf hin, daß Mutationen des Tumorsuppressors, die mit dem Verlust transkriptioneller Aktivität verbunden sind, nicht notwendigerweise den Verlust aller biologischen Funktionen zur Folge haben. Wie die erhöhte Apoptose-Sensitivität von Balb/c 3T3tx Zellen zeigt, kann eine solche partielle Beibehaltung von wildtyp p53-Eigenschaften sogar zu einem ganz neuen Phänotyp führen.

Zur weiteren Bestätigung einer mut p53-vermittelten erhöhten Sensitivität bezüglich der Induktion von Apoptose und somit eines Zugewinns pro-apoptotischer Aktivität wurden Balb/c 3T3tx Zellen mit 20 Gy Gamma-Bestrahlung geschädigt. Diese Schadenssetzung führte in wildtyp p53 NIH 3T3 Zellen nicht zur Aktivierung von Bax und Apoptose, sondern induzierte einen terminalen Wachstumsarrest (siehe 1. und 7.). Wiederum wurden p53-defiziente 10-1 Zellen als weiterer Vergleich herangezogen und ebenfalls mit 20 Gy Gamma-Bestrahlung geschädigt.

Wie aus **Abbildung 22** anhand der Expression aktiver Caspase 3 sowie der Generierung DNA-haltiger Zellfragmente ersichtlich ist, induziert 20 Gy Gamma-Bestrahlung sowohl in Balb/c 3T3tx wie auch in 10-1 Zellen eine Eliminierung der bestrahlten Zellpopulationen durch Apoptose. Die Zellzyklusprofile (**Abbildung 22b**) zeigen dabei deutlich, daß die Bestrahlung mit 20 Gy Gamma zur vollständigen Zerstörung der bestrahlten Zellpopulationen führt. Damit unterscheidet sich die Schadensantwort dieser mut p53-exprimierenden (Balb/c 3T3tx) bzw. p53-defizienten (10-1) Zellen substantiell von dem terminalen Wachstumsarrest, den NIH 3T3 Zellen mit intaktem wildtyp p53 nach 20 Gy Gamma-Bestrahlung zeigen.

Die Tatsache, daß 20 Gy Gamma-Bestrahlung sowohl in p53-defizienten wie auch mut p53-exprimierenden Zellen Apoptose auslöst, läßt keine Rückschlüsse darauf zu, ob mut p53-abhängige oder p53-unabhängige Mechanismen ursächlich entscheidend für die Induktion der Apoptose in 20 Gy Gamma-bestrahlten Balb/c 3T3tx Zellen sind. Die Tatsache, daß in derart bestrahlten Balb/c 3T3tx Zellen eine Translokation von Bax in die Mitochondrien zu beobachten ist (**Abbildung 22c**), zeigt jedoch, daß mut p53 am apoptotischen Programm zumindest beteiligt ist.

Da 20 Gy Gamma-Bestrahlung in wildtyp p53-exprimierenden NIH 3T3 Zellen keine Bax-Aktivierung induziert und nicht zu Apoptose führt, bestätigt dieser Befund somit einen Zugewinn pro-apoptotischer Aktivitäten in Balb/c 3T3tx Zellen aufgrund der mut p53-Expression.

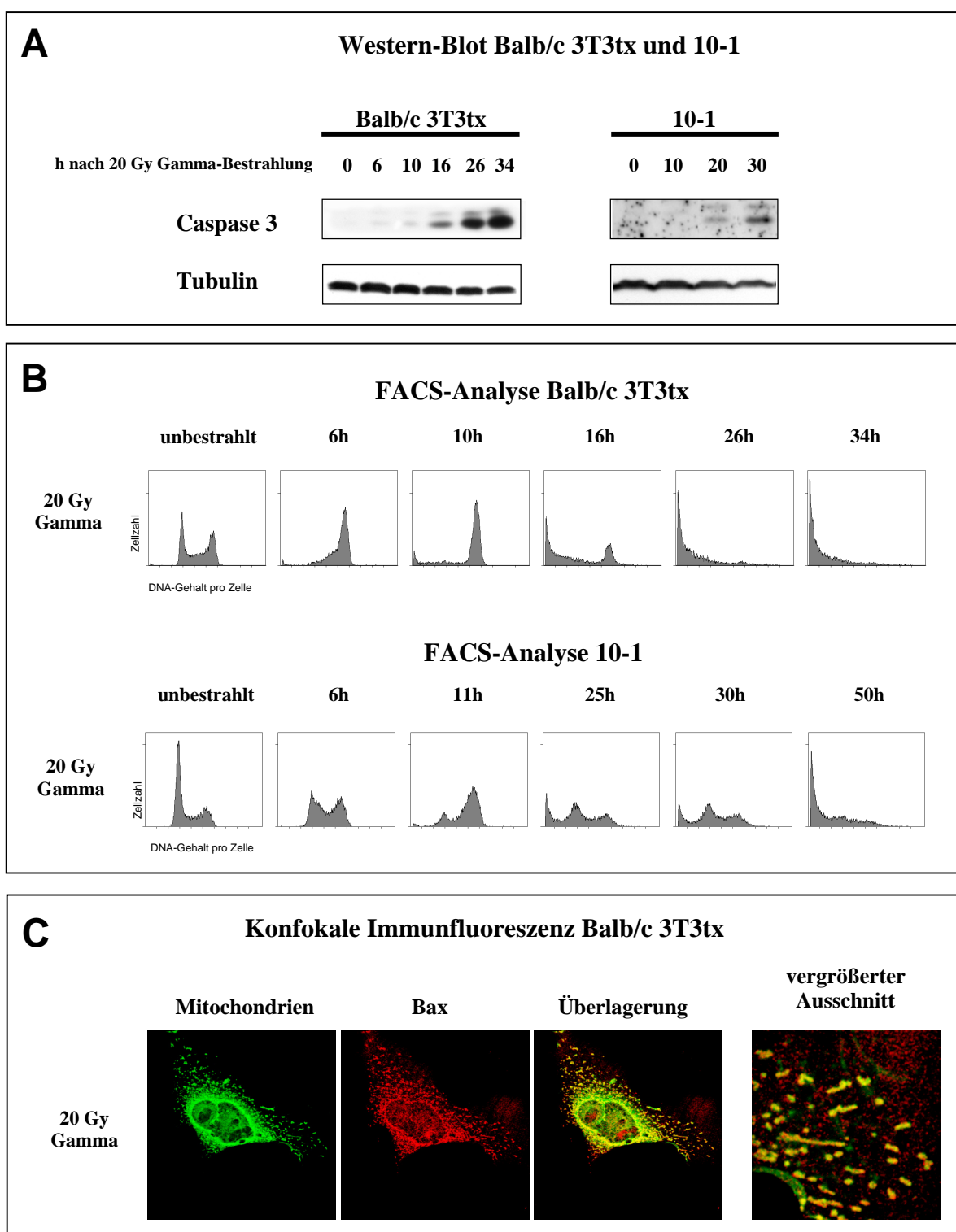


Abbildung 22: 20 Gy Gamma-Bestrahlung induziert Apoptose in Balb/c 3T3tx und 10-1 Zellen.

(A) Western-Blot 20 Gy Gamma-bestrahlter mit p53-exprimierender Balb/c 3T3tx und p53-null 10-1 Zellen. Die Zellen wurden bestrahlt, zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung geerntet und für die Western-Blot Analyse aufbereitet. Der Apoptose-Marker aktive Caspase 3 ist nach Bestrahlung in beiden Zelllinien detektierbar. Der Nachweis von Tubulin zeigt eine gleichmäßige Beladung der Gele. (B) Zellzyklusprofile 20 Gy Gamma-bestrahlter Balb/c 3T3tx und 10-1 Zellen. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeiten nach Bestrahlung fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Bei der durchflußcytometrischen Analyse wurden 10 000 Zellen erfaßt. 20 Gy Gamma-Bestrahlung führt in beiden Zelllinien zur vollständigen Fragmentierung der bestrahlten Zellpopulation. (C) Konfokale Immunfluoreszenz 20 Gy Gamma-bestrahlter Balb/c 3T3tx Zellen. Auf Deckgläschen wachsende Balb/c 3T3tx Zellen wurden mit 20 Gy Gamma-Bestrahlung geschädigt und 24 h nach Bestrahlung in Methanol/Aceton fixiert. Bax wurde mit einem spezifischen primären sowie einem sekundären Rhodamin-RedX gekoppelten sekundären Antikörper detektiert, die Mitochondrien wurden mit dem Farbstoff Mitotracker Green gefärbt. Die aufgenommenen Bilder zeigen je einen konfokalen Schnitt durch repräsentative Zellen. Apoptotische Balb/c 3T3tx Zellen zeigen eine Translokation von Bax in die Mitochondrien.

13. Der durch 20 Gy Gamma-Bestrahlung induzierte terminale Wachstumsarrest schützt vor p53-unabhängiger Apoptose und ist p53- und p21-vermittelt

Die Bestrahlung mit 20 Gy Gamma führte in den bisher untersuchten Mausfibroblasten-Zelllinien zu je verschiedenen Schadensreaktionen: Während p53-defiziente 10-1 Zellen und mut p53-exprimierende Balb/c 3T3tx Zellen durch Apoptose eliminiert werden (siehe 12.), waren in wildtyp p53 NIH 3T3 Zellen nach der selben Bestrahlung keinerlei Anzeichen von Apoptose detektierbar (siehe 1.). Stattdessen induzierte die 20 Gy Gamma-Bestrahlung in diesen Zellen einen terminalen Wachstumsarrest (siehe 1.).

Um zu überprüfen, inwieweit dieser Schutz vor 20 Gy Gamma-induzierter Apoptose, der in NIH 3T3 Zellen, nicht jedoch in 10-1 oder Balb/c 3T3tx Zellen zu beobachten war, tatsächlich auf dem verschiedenen p53-Status beruht, wurden verschiedene andere Fibroblasten-Zelllinien sowie primäre Mausembryo-Fibroblasten (MEFs) mit definiertem p53-Status durch 20 Gy Gamma-Bestrahlung geschädigt und hinsichtlich der Induktion von Apoptose untersucht.

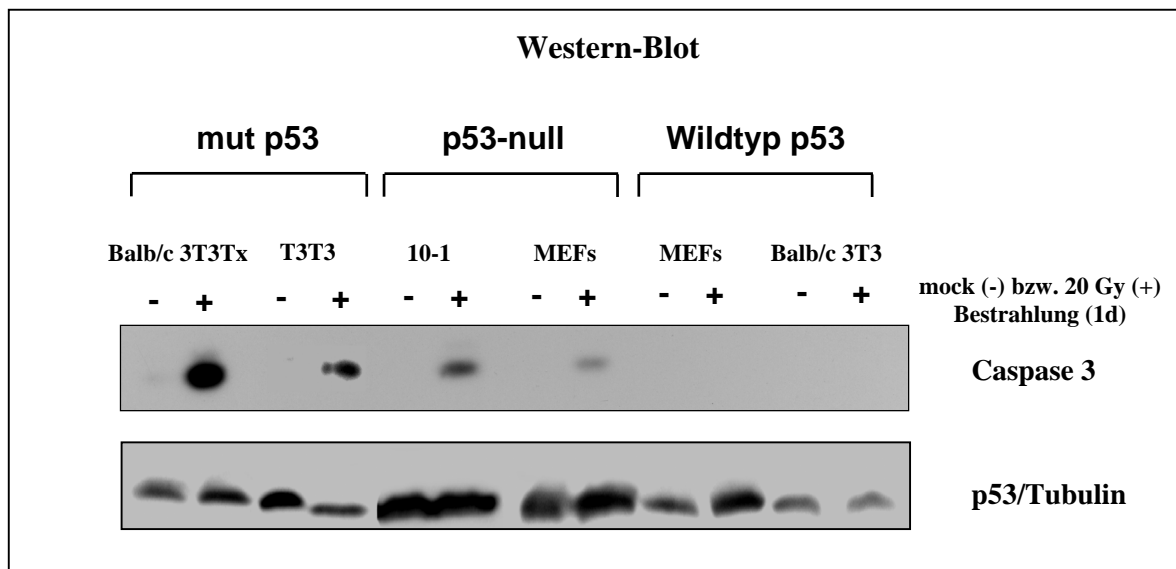


Abbildung 23: Wildtyp p53-exprimierende Maus-Fibroblasten sind vor 20 Gy Gamma-induzierter Apoptose geschützt. Western-Blot 20 Gy Gamma-bestrahlter Maus-Fibroblasten mit verschiedenem p53-Status zum Nachweis von Apoptose. Mut p53-exprimierende Balb/c 3T3tx und T3T3 Zellen, p53-null 10-1 Zellen und primäre p53 (-/-) Mausembryo-Fibroblasten (MEFs), wildtyp p53-exprimierende MEFs sowie Balb/c 3T3 Zellen mit intaktem wildtyp p53 wurden mit 20 Gy Gamma bestrahlt, 1 Tag nach Bestrahlung geerntet und für die Western-Blot Analyse aufbereitet. Der Apoptose-Marker aktive Caspase 3 ist nach 20 Gy Gamma-Bestrahlung nur in mut p53-exprimierenden und p53-defizienten, nicht jedoch in wildtyp p53-exprimierenden Mausfibroblasten detektierbar. Der Nachweis von mut p53 (Balb/c 3T3tx und T3T3) bzw. Tubulin (10-1, MEFs sowie Balb/c 3T3) zeigt den Auftrag je gleicher Proteinmengen.

Wie **Abbildung 23** anhand der Expression von aktiver Caspase 3 zeigt, sind Fibroblasten mit intaktem wildtyp p53 in der Tat geschützt vor 20 Gy Gamma-induzierter Apoptose. Sowohl primäre Zellen (MEFs) als auch Balb/c 3T3 Zellen verhalten sich somit wie NIH 3T3 Zellen (siehe 1.). Im Gegensatz dazu induziert die Bestrahlung mit 20 Gy Gamma in allen getesteten Fibroblasten, die p53-defizient sind (p53 (-/-) MEFs und 10-1) oder mutiertes p53 (Balb/c 3T3tx und T3T3) exprimieren, die Expression von aktiver Caspase 3 und führt zur Eliminierung dieser Zellen durch Apoptose.

Damit erweist sich wildtyp p53 zumindest im Falle der 20 Gy Gamma-Bestrahlung überraschenderweise als dominant anti-apoptotischer Faktor, der die Zellen auch vor p53-unabhängiger Apoptose schützt. Da wildtyp p53 Zellen, wie anhand von NIH 3T3 Zellen gezeigt, mit der Induktion eines terminalen Wachstumsarrests auf die 20 Gy Gamma-Bestrahlung reagieren (siehe 1.), liegt die Annahme nahe, daß die Induktion eines solchen Arrests unmittelbar mit dem beobachteten Schutz gegen 20 Gy Gamma-induzierte p53-unabhängige Apoptose zusammenhängt. Um diese Annahme überprüfen zu können, mußte zunächst ermittelt werden, auf welchen Mechanismen die Induktion des terminalen Wachstumsarrests in 20 Gy Gamma-bestrahlten wildtyp p53 Zellen beruht.

Wie verschiedene Studien zeigen, ist die Expression großer Mengen des Kinaseinhibitors p21 ein wichtiger Parameter für die Induktion eines terminalen Wachstumsarrests (Bond *et al.*, 1996; Fang *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2002). So konnte ein solcher Arrest mit den Merkmalen eines seneszenten Phänotyps in den gleichen NIH 3T3 Zellen, die für die hier vorgelegten Untersuchungen verwendet wurden, durch Überexpression von p21 hervorgerufen werden (Chen *et al.*, 2002).

Um zu überprüfen, inwieweit auch in 20 Gy Gamma-bestrahlten Zellen die Induktion des terminalen Wachstumsarrests auf eine strikt p53-abhängige Hochregulation von p21 zurückzuführen sein kann, wurde durch Western-Blot Analyse im direkten Vergleich die Expression von p21 in 20 Gy Gamma-bestrahlten NIH 3T3 (wt p53), 10-1 (p53-null) sowie Balb/c 3T3tx (mut p53) Zellen überprüft.

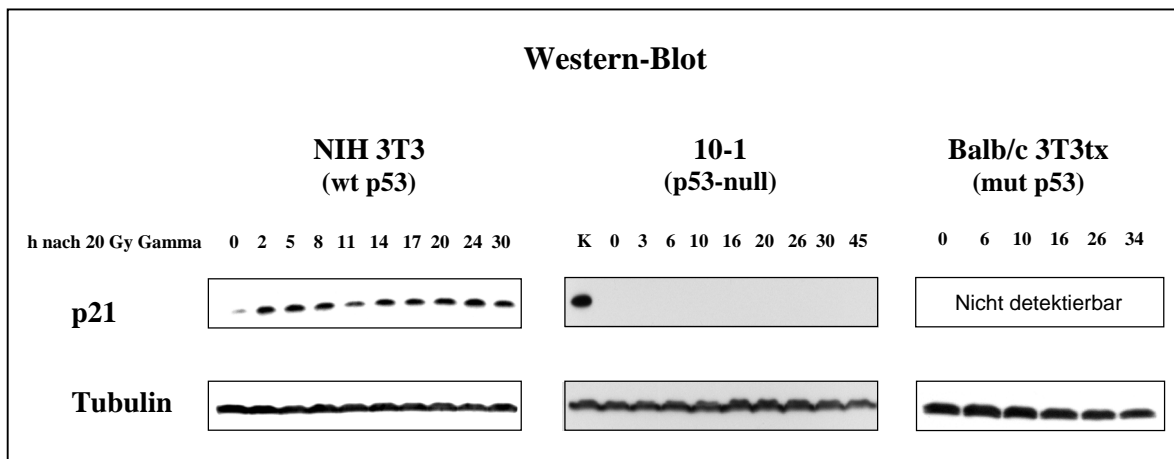


Abbildung 24: Die Hochregulation von p21 in 20 Gy Gamma-bestrahlten Maus-Fibroblasten ist wildtyp p53-abhängig. Western-Blot 20 Gy Gamma-bestrahlter Maus-Fibroblasten mit verschiedenem p53-Status zum Nachweis von p21. Wildtyp p53-exprimierende NIH 3T3 Zellen, p53-defiziente 10-1 Zellen sowie mut p53-exprimierende Balb/c 3T3tx Zellen wurden mit 20 Gy Gamma bestrahlt, zu den angegebenen Zeiten nach Bestrahlung geerntet und für die Western-Blot Analyse aufbereitet. Die Hochregulation von p21 ist nach 20 Gy Gamma-Bestrahlung nur in wildtyp p53-exprimierenden NIH 3T3, nicht jedoch in p53-defizienten und mut p53-exprimierenden Maus-Fibroblasten detektierbar. Der Nachweis von Tubulin zeigt eine gleichmäßige Beladung der Gele. Als Kontrolle (K) bei der Analyse von 10-1 Zellen wurde Lysat von 20 Gamma-bestrahlten NIH 3T3 Zellen mitgeführt.

Wie aus **Abbildung 24** ersichtlich ist, wird p21 in p53-defizienten 10-1 Zellen und mit p53-exprimierenden Balb/c 3T3x Zellen durch 20 Gy Gamma-Bestrahlung nicht hochreguliert, sondern ist während des gesamten Beobachtungszeitraums in beiden Zelllinien überhaupt nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu führt 20 Gy Gamma-Bestrahlung in wildtyp p53-exprimierenden NIH 3T3 Zellen zu einer starken Hochregulation von p21, wie auch bereits vorher demonstriert wurde (siehe **Abbildung 7**). Somit zeigt sich, daß die Induktion eines p53-abhängigen terminalen Wachstumsarrests sowie der Schutz vor p53-unabhängiger Apoptose in 20 Gy Gamma-bestrahlten Maus-Fibroblasten mit einer strikt p53-abhängigen Hochregulation von p21 korreliert.

Um zu überprüfen, inwieweit die Induktion des terminalen Wachstumsarrests in 20 Gy Gamma-bestrahlten Zellen und ein Schutz vor p53-unabhängiger Apoptose mit der beobachteten Hochregulation von p21 nicht nur korreliert, sondern ursächlich darauf zurückgeführt werden kann, wurden primäre Mausembryo-Fibroblasten (MEFs) mit einer p53- oder p21-Defizienz nach 20 Gy Gamma-Bestrahlung in FACS- und Western-Blot-Analysen untersucht und mit wildtyp MEFs verglichen.

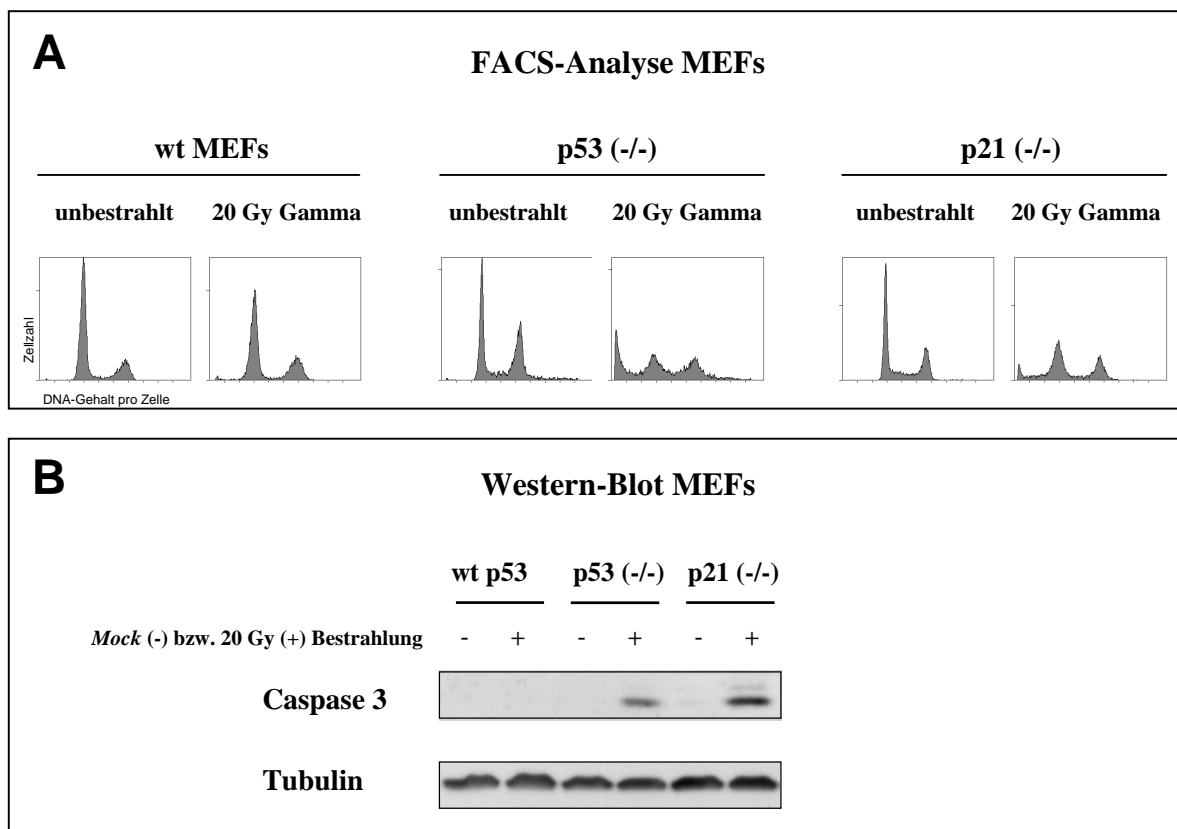


Abbildung 25: Der Schutz vor Apoptose in 20 Gy Gamma-bestrahlten Maus-Fibroblasten ist p21-vermittelt. (A) Zellzyklusprofile 20 Gy Gamma-bestrahlter Mausembryo-Fibroblasten. Unbestrahlte sowie 20 Gy Gamma-bestrahlte MEFs des angegebenen Genotyps wurden 26 h nach Bestrahlung fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Bei der durchflußcytometrischen Analyse wurden je 10 000 Zellen erfaßt. 20 Gy Gamma-Bestrahlung führt in p53-null sowie in p21-null, nicht jedoch in wildtyp MEFs zur Generierung apoptotischer Zellfragmente mit einem *subG1* DNA-Gehalt. (B) Western-Blot 20 Gy Gamma-bestrahlter Mausembryo-Fibroblasten zum Nachweis von Apoptose. MEFs des angegebenen Genotyps wurden *mock*- bzw. 20 Gy Gamma-bestrahlt, 26 h nach Bestrahlung geerntet und für die Western-Blot Analyse aufbereitet. Der Apoptosemarker aktive Caspase 3 ist nach 20 Gy Gamma-Bestrahlung in p53-null sowie p21-null MEFs, nicht jedoch in wildtyp MEFs detektierbar. Der Nachweis von Tubulin zeigt eine gleichmäßige Beladung des Gels.

Abbildung 25a zeigt, daß sich das Zellzyklusprofil 20 Gy Gamma-bestrahlter wildtyp Mausembryo-Fibroblasten deutlich von denen der p53- bzw. p21-defizienten MEFs unterscheidet. Während in bestrahlten wildtyp MEFs konsistent zur anti-apoptotischen Wirkung von wildtyp p53 und der Induktion eines terminalen Wachstumsarrests kaum Zelltrümmer mit einem *subG1* DNA-Gehalt detektierbar sind, zeigen p53- und p21-defiziente MEFs klare Anzeichen von apoptotischer Zellfragmentierung. Western-Blot Analysen 20 Gy Gamma-bestrahlter MEFs bestätigen, daß in der Tat auch p21-defiziente MEFs den wildtyp p53-abhängigen Schutz gegen 20 Gy Gamma-induzierte Apoptose verloren haben, da sie nach Bestrahlung genau wie p53-null MEFs große Mengen aktiver Caspase 3 exprimieren (**Abbildung 25b**).

Damit ist die Induktion eines terminalen Wachstumsarrests und der Schutz vor Apoptose in wildtyp p53-exprimierenden 20 Gy Gamma-bestrahlten Fibroblasten auf die p53-abhängige Hochregulation von p21 zurückzuführen. Im Gegensatz zur p53-abhängigen Apoptose, die überwiegend durch Transkriptions-unabhängige Mechanismen vermittelt zu werden scheint, ist die p53-abhängige Eliminierung schwer geschädigter Zellen durch die Induktion eines terminalen Wachstumsarrest somit ein transkriptionell-gesteuertes und p21-vermitteltes Ereignis.

14. Humane Coloncancer-Zellen zeigen nach Bestrahlung die gleiche Schadensantwort wie Maus-Fibroblasten

Die bisherigen Untersuchungen mit Maus-Fibroblasten zeigten, daß p53 den Ausgang der Schadensreaktion maßgeblich beeinflußt und die Selektivität der Schadensantwort mit differentiell regulierten Aktivitäten von p53 verbunden ist. Da die gezielte Aktivierung von Eliminierungsprogrammen in Tumorzellen ein Hauptziel therapeutischer Ansätze ist, stellte sich die Frage, ob die in Maus-Fibroblasten ermittelten Ergebnisse auch auf humane Krebszellen übertragbar sind.

Die humane Coloncancer-Zelllinie HCT 116 repräsentiert ein experimentelles System für einen der häufigsten Typen bösartiger Krebserkrankungen beim Menschen. HCT 116 Zellen exprimieren intaktes wildtyp p53 und sind in verschiedenen Studien gut charakterisiert (siehe u.a. Waldman *et al.*, 1995; Bunz *et al.*, 1996; Chan *et al.*, 1999). Um zu überprüfen, inwieweit diese humanen Krebszellen auf verschiedene Bestrahlungsarten genauso reagieren wie murine Fibroblasten, wurden HCT 116 Zellen mit 10 und 100 J/m² UV- sowie 20 Gy Gamma-Bestrahlung geschädigt und die Schadensantwort anhand von FACS- und Western-Blot-Analysen untersucht.

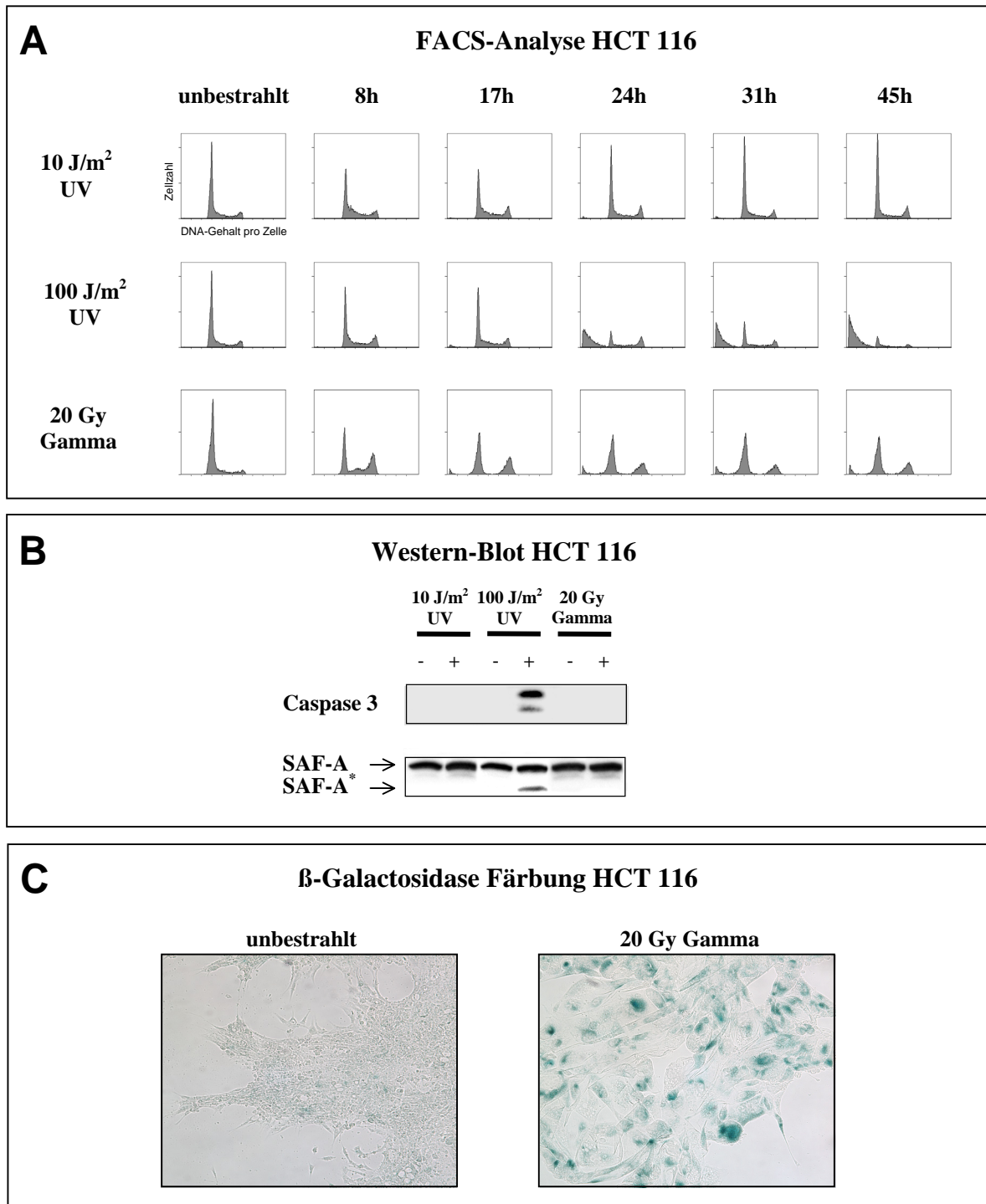


Abbildung 26: Humane wildtyp p53-exprimierende Colonicarcinom-Zellen reagieren auf verschiedene Bestrahlungen wie Maus-Fibroblasten. (A) Zellzyklusprofile verschieden bestrahlter HCT 116 Zellen. Die Zellen wurden wie angegeben verschieden bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit Ethanol fixiert. Für die durchflußcytometrische Analyse wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und jeweils 10 000 Zellen erfaßt. 10 J/m² UV bestrahlte Zellen zeigen temporäre Veränderungen in der Zellzyklusverteilung, Bestrahlung mit 100 J/m² UV führt zur DNA-Fragmentierung, während Bestrahlung mit 20 Gy einen terminalen Wachstumsarrest induziert. **(B)** Western-Blot verschieden bestrahlter HCT 116 Zellen zum Nachweis von Apoptose. Die Zellen wurden wie angegeben bestrahlt, 30 h nach Bestrahlung geerntet und für die Western-Blot Analyse aufbereitet. Die Apoptosemarker, aktive Caspase 3 sowie das apoptotische Fragment von SAF-A (SAF-A*), sind nur nach Bestrahlung mit 100 J/m² UV detektierbar. **(C)** Lichtmikroskopische Aufnahmen 20 Gy Gamma-bestrahlter und unbestrahlter HCT 116 Zellen nach β-Galactosidase Färbung zum Nachweis eines terminalen Wachstumsarrests. HCT 116 Zellen wurden 15 Tage nach 20 Gy Gamma-Bestrahlung zusammen mit unbestrahlten Kontrollzellen über eine β-Gal-Färbung auf die Aktivität von Seneszenz-assoziiierter β-Galactosidase untersucht. Die Blaufärbung der bestrahlten Zellen beruht auf der Umsetzung des Farbstoffs X-Gal und ist ein Marker für die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β-Galactosidase.

Wie **Abbildung 26** zeigt, führt die Schädigung von humanen HCT 116 Zellen mit verschiedenen Bestrahlungsarten zum selben Ausgang der Schadensreaktion wie in murinen NIH 3T3 Fibroblasten (siehe **1.**). So zeigen die Zellzyklusprofile 10 J/m² UV-bestrahlter HCT 116 Zellen temporäre Veränderungen, die zum Ende des Beobachtungszeitraums jedoch wieder aufgehoben werden (**Abbildung 26a**). Die Bestrahlung mit dieser niedrigen UV-Dosis beeinträchtigt das Wachstum von HCT 116 Zellen somit nicht dauerhaft. Das gleiche Ergebnis wurde nach 2 Gy Gamma-Bestrahlung erhalten (ohne Abbildung).

Wie auch bei NIH 3T3 Zellen wird eine Eliminierung von HCT 116 Zellen durch Apoptose nur durch Bestrahlung mit 100 J/m² UV erreicht. Nach dieser Schädigung zeigt sich eine massive Fragmentierung der bestrahlten Zellen, wie aus der FACS-Analyse ersichtlich wird (**Abbildung 26a**). Darüber hinaus induziert nur 100 J/m² UV-Bestrahlung, nicht jedoch Schädigung mit 10 J/m² UV oder 20 Gy Gamma, die Expression von aktiver Caspase 3 (**Abbildung 26b**). Parallel dazu ist auch ein apoptotisches Fragment (SAF-A*) des Kernmatrix-Proteins SAF-A, das durch Caspase 3-katalysierte proteolytische Spaltung gebildet wird (Kipp *et al.*, 2000) und somit als Marker für eine Caspase 3-Aktivität dienen kann, nur nach 100 J/m² UV-Bestrahlung detektierbar (**Abbildung 26b**).

HCT 116 Zellen sind wie auch murine wildtyp p53-exprimierende Fibroblasten (siehe **13.**) geschützt vor 20 Gy Gamma-induzierter Apoptose. So sind nach dieser Bestrahlung keinerlei Apoptosemarker wie starke Kernfragmentierung oder die Expression von aktiver Caspase 3 zu erkennen (**Abbildungen 26a und b**). Stattdessen induziert 20 Gy Gamma-Bestrahlung einen terminalen Wachstumsarrest, wie anhand des Zellzyklusprofils und der positiven β -Galactosidase-Färbung derart bestrahlter HCT 116 Zellen sichtbar wird (**Abbildungen 26a und c**).

Wie in Maus-Fibroblasten ist die Induktion eines terminalen Wachstumsarrests und der Schutz vor Apoptose nach 20 Gy Gamma-Bestrahlung auch in humanen HCT 116 Zellen p21-vermittelt. So korreliert in der wildtyp Zelllinie die Induktion des terminalen Wachstumsarrests mit einer starken Hochregulation von p21 (**Abbildung 27a**). Bei einer isogenen Tochterzelllinie HCT 116 (p21-/-), bei der p21 durch homologe Rekombination auf beiden Allelen deletiert wurde (Waldman *et al.*, 1995) ist die in wildtyp Zellen vorhandene Apoptose-Resistenz aufgehoben, und die Zellen werden nach 20 Gy Gamma-Bestrahlung durch Apoptose eliminiert. Dies zeigt sich anhand der Expression von aktiver Caspase 3 sowie der Generierung DNA-haltiger Zellfragmente mit einem *subG1* DNA-Gehalt in 20 Gy Gamma-bestrahlten p21-defizienten HCT 116 Zellen (**Abbildungen 27b und c**).

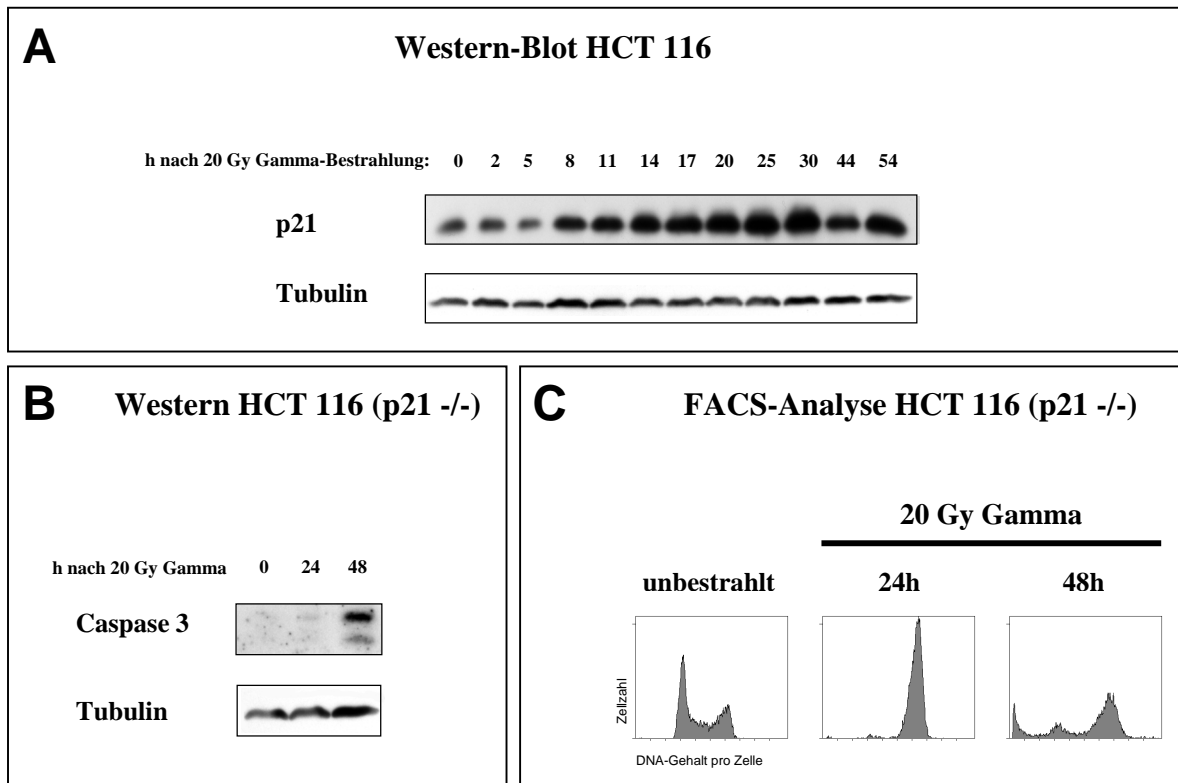


Abbildung 27: Der Schutz vor 20 Gy Gamma-induzierter Apoptose in HCT 116 Zellen ist p21-vermittelt. (A) Western-Blot 20 Gy Gamma-bestrahlter HCT 116 Zellen zum Nachweis von p21. Wildtyp HCT 116 Zellen mit intaktem wildtyp p53 und p21 wurden 20 Gy Gamma-bestrahlt, zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und für die Western-Blot Analyse aufbereitet. 20 Gy Gamma-Bestrahlung induziert in HCT 116 Zellen die Hochregulation von p21. (B) Western-Blot 20 Gy Gamma-bestrahlter p21-defizienter HCT 116 Zellen zum Nachweis von Apoptose. Die Zellen wurden bestrahlt, zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung geerntet und für die Western-Blot Analyse aufbereitet. Der Apoptosemarker aktive Caspase 3 ist nach 20 Gy Gamma-Bestrahlung detektierbar. Der Nachweis von Tubulin zeigt eine gleichmäßige Beladung des Gels. (C) Zellzyklusprofile 20 Gy Gamma-bestrahlter p21-defizienter HCT 116 Zellen. Die Zellen wurden bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit Ethanol fixiert. Für die durchflußcytometrische Analyse wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und jeweils 10 000 Zellen erfaßt. Die Bestrahlung mit 20 Gy Gamma führt zur Bildung apoptotischer Zellfragmente mit einem *subG1* DNA-Gehalt.

Insgesamt reagieren humane wildtyp p53 und p21-exprimierende HCT 116 Krebszellen auf verschiedene Bestrahlungsarten in gleicher Weise wie murine Fibroblasten mit intaktem wildtyp p53. Während Bestrahlung mit niedrigen Dosen UV und Gamma zur Wiederherstellung des Normalzustands führt und das Überleben der bestrahlten Zellpopulation nicht beeinträchtigt, werden die bestrahlten Zellen nach 100 J/m^2 UV-Bestrahlung durch Apoptose eliminiert bzw. nach 20 Gy Gamma-Bestrahlung p21-vermittelt durch Induktion eines terminalen Wachstumsarrests von weiteren Teilungen ausgeschlossen und dabei gleichzeitig vor Apoptose geschützt. Das gleiche Verhalten nach den verschiedenen Bestrahlungsarten zeigen auch wildtyp p53-exprimierende A549 Zellen, die aus einem humanen Lungencarcinom gewonnen wurden (ohne Abbildung).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß viele Mechanismen, welche die Selektivität der zellulären Schadensantwort im murinen System bestimmen, auch auf humane Tumorzellen übertragbar sind.

Diskussion

1. Selektivität der p53-abhängigen Schadensreaktion

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung molekularer Mechanismen, mit denen die Selektivität der p53-abhängigen Reaktion auf genotoxischen Streß erreicht und insbesondere die Entscheidung zwischen Überleben und Eliminierung der geschädigten Zelle getroffen wird.

Wie zahlreiche Studien gezeigt haben, verfügt p53 sowohl über anti-apoptotische wie auch pro-apoptotische Aktivitäten (Übersichtsartikel: Vogt Sionov und Haupt, 1999; Vousden und Lu, 2002; Oren, 2003). Der Tumorsuppressor kann dadurch ein Überleben geschädigter Zellen gewährleisten, aber auch deren Eliminierung induzieren. Trotz intensivster Forschungsbemühungen war bislang völlig unklar, wie die konträr wirkenden p53-Aktivitäten nach DNA-Schädigung integriert werden und welche Mechanismen für die Selektivität der p53-Antwort auf genotoxischen Streß verantwortlich sind.

Eine der fundamentalen Fragen in diesem Zusammenhang ist, ob p53 selbst durch eine differentielle Regulation seiner anti- und pro-apoptotischer Aktivitäten die Selektivität der zellulären Schadensreaktion bestimmt oder ob andere Faktoren verantwortlich dafür sind, daß die Aktivierung von p53 zu Überleben oder Eliminierung der geschädigten Zelle führt.

Die Untersuchung dieser Frage stand im Zentrum der hier vorgelegten Arbeit und erfolgte anhand verschieden bestrahlter Maus-Fibroblasten der etablierten wildtyp p53 Zelllinie NIH 3T3. Durch Bestrahlung mit je einer niedrigen und einer hohen Dosis UV-Licht bzw. ionisierender Gamma-Strahlung konnten verschiedene Schadensreaktionen in NIH 3T3 Zellen gezielt hervorgerufen werden (siehe **Abbildungen 4** und **5**). So führte die Bestrahlung mit 10 J/m^2 UV oder 2 Gy Gamma zu einer temporär begrenzten Schadensreaktion, die Überleben und Proliferation der bestrahlten Zellpopulation nicht beeinträchtigte. Ein stärkeres Schadensausmaß führte zur Induktion eines terminalen Wachstumsarrests und Überleben der bestrahlten Zellen (20 Gy Gamma) bzw. zu Apoptose (100 J/m^2 UV). Unabhängig vom Ausgang der zellulären Schadensreaktion induzierten alle Bestrahlungs-Varianten eine Stabilisierung und Aktivierung von p53 sowie die Induktion von p53-Zielgenen (siehe **Abbildungen 6** und **7**). Dies zeigte, daß p53 an allen unterschiedlichen Schadensreaktionen beteiligt ist. Die verschieden bestrahlten NIH 3T3 Zellen erwiesen sich damit als geeignetes experimentelles System, um die Integration der p53-vermittelten Signale und die Selektivität der p53-Antwort auf genotoxischen Streß zu untersuchen.

Da die humanen Tumor-Zelllinien HCT116 (siehe **Abbildungen 26** und **27**) und A549 (ohne Abbildung) nach den verschiedenen Bestrahlungsarten die gleiche Schadensantwort zeigen wie

bestrahlte NIH 3T3 Zellen, ist davon auszugehen, daß viele der anhand von Maus-Fibroblasten gewonnenen Erkenntnisse auf das klinisch relevante Verhalten humaner Krebszellen nach DNA-Schädigung übertragbar sind.

Entscheidend für die Klärung, ob p53 selbst den Ausgang der zellulären Schadensreaktion steuert oder der zelluläre Kontext dafür verantwortlich ist, war die Suche nach differentiell regulierten Parametern der p53-Aktivität. Dabei waren zwei Szenarien denkbar:

Bei Vergleich der p53-abhängigen Signale in verschiedenen bestrahlten Zellen finden sich ungeachtet des unterschiedlichen Ausgangs der Schadensreaktion keine differentiell regulierten p53-Aktivitäten. Ein solcher Befund, konsistent mit dem Modell des „dummen“ p53 (Vousden, 2000), würde implizieren, daß der zelluläre Kontext und somit andere Faktoren entscheiden, zu welchem Ergebnis die Aktivierung von p53 führt.

In anderen Fall (Modell des „schlau“ p53) steuert der Tumorsuppressor selbst den Ausgang der zellulären Schadensreaktion. Dies sollte sich bei Vergleich der verschiedenen bestrahlten Zellen in differentiell regulierten p53-Aktivitäten widerspiegeln, die spezifisch und selektiv mit einer bestimmten Schadensreaktion korrelieren.

Bei Vergleich der verschiedenen bestrahlten NIH 3T3 Zellen konnten in der Tat differentiell regulierte Parameter der p53-Aktivität identifiziert werden. Damit zeigen die hier vorgelegten Untersuchungen, daß p53 nicht dem Modell des „dummen“ Proteins folgt, sondern je nach Art und Ausmaß des DNA-Schadens selektiv verschiedene zelluläre Reaktionen induziert.

Wie sich zeigte, korreliert die Dauer der p53-Aktivierung mit dem Ausgang der Schadensreaktion. So führt ein DNA-Schaden geringen Ausmaßes (10 J/m^2 UV oder 2 Gy Gamma) zu einer temporär begrenzten Aktivierung von p53 und zu einer ebenfalls temporär begrenzten Schadensantwort der Zellen. Derart geschädigte Zellen nehmen nach Abschluß der Schadensantwort wieder ein normales Proliferations-Verhalten an. Hingegen induziert Bestrahlung mit hohen Dosen (100 J/m^2 UV oder 20 Gy Gamma) eine persistierende Aktivierung von p53 und führt zur Initialisierung der zellulären Eliminierungsprogramme Apoptose oder terminaler Wachstumsarrest (siehe **Abbildungen 7 und 8**).

Die genannten Eliminierungsprogramme unterscheiden sich beträchtlich, da nur die Induktion von Apoptose zur vollständigen Zerstörung von Zellen führt. Terminal arretierte Zellen hingegen leben und bleiben metabolisch aktiv, sie sind jedoch dauerhaft von weiteren Zellteilungen ausgeschlossen (Übersichtsartikel: Shay und Roninson, 2004). Die vergleichende Analyse 20 Gy Gamma und 100 J/m^2 UV-bestrahlter NIH 3T3 Zellen ermöglichte daher besonders gut, Determinanten einer Zellzyklus-regulierenden Wirkung von solchen der p53-vermittelten Apoptose zu unterscheiden. Dabei konnten zwei differentiell regulierte Parameter der p53-Aktivität identifiziert werden, auf

denen die Entscheidung zwischen Zellzyklus-Arrest und anti-apoptotischer Wirkung oder Apoptose als Ergebnis der p53-Aktivierung beruht.

Diese differentiell regulierten Parameter betreffen interessanterweise nicht die als zentral erachtete transkriptionelle Aktivität des Tumorsuppressors. Vielmehr konnten p53-Stabilisierung und Bax-Aktivierung als *in vivo* differentiell regulierte, nicht-transkriptionelle Parameter der p53-Aktivität identifiziert und eindeutig als Determinanten der p53-abhängigen Apoptose charakterisiert werden. Die Selektivität der p53-abhängigen Schadensantwort ergibt sich somit aus dem Zusammenspiel transkriptioneller und nicht-transkriptioneller Aktivitäten von p53, die beide unabhängig voneinander reguliert werden. Wie in den folgenden Kapiteln noch im Detail ausgeführt wird, scheinen erstere dabei eine primär Zellzyklus-regulierende und anti-apoptotische Funktion zu erfüllen, während die letztgenannten für die pro-apoptotische Wirkung von p53 verantwortlich sind.

Obwohl die Existenz nicht-transkriptionell vermittelter Mechanismen der p53-abhängigen Apoptose seit langem bekannt ist (Übersichtsartikel: Chipuk und Green, 2003), blieb die Relevanz solcher Aktivitäten als Beitrag zur zellulären Schadensreaktion *in vivo* bislang völlig unklar. Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals die physiologische Bedeutung nicht-transkriptioneller Aktivitäten von p53 und deren *in vivo* Regulation. Die vorgelegten Daten machen deutlich, daß nicht-transkriptionelle Aktivitäten essentiell für die biologische Funktion von p53 sind und erst durch ihre Einbeziehung die Selektivität der p53-abhängigen Schadensreaktion verstanden werden kann.

2. Funktion und Regulation transkriptioneller p53-Aktivitäten

Gemäß gängigen Vorstellungen leisten die transkriptionell-vermittelten Aktivitäten von p53 den zentralen Beitrag zur biologischen Funktion von p53. Die meisten theoretischen Erklärungs-Modelle bezüglich der unterschiedlichen Effekte von p53 und der Selektivität der p53-Antwort basieren demgemäß auf dem Prinzip einer differentiellen Aktivierung von p53-Zielgenen (Übersichtsartikel: Vousden und Lu, 2002; Oren, 2003).

Bei Vergleich der verschieden bestrahlten NIH 3T3 Zellen ergab sich im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen jedoch kein Hinweis auf eine differentielle Regulation pro- und anti-apoptotischer p53-Zielgene (siehe **Abbildung 7**).

So wird das apoptotische Programm trotz der p53-abhängigen Induktion pro-apoptotischer Zielgene und der Hochregulation von Proteinen wie Bax oder PIG-3 nach Bestrahlung mit 10 J/m² UV, 2 Gy oder 20 Gy Gamma nicht aktiviert (siehe **Abbildungen 5** und **7**). Dies ist

insofern überraschend, als die Induktion pro-apoptotischer Proteine bislang als unbestritten wichtiger Beitrag von p53 bei der Aktivierung des apoptotischen Programmes galt (Übersichtsartikel: Vousden und Lu, 2002; Oren, 2003; Fridman und Lowe, 2003).

Nichtsdestoweniger zeigen die Western-Blot Analysen von verschiedenen bestrahlten NIH 3T3 Zellen eindeutig, daß die Induktion und Hochregulation von Bax und PIG-3 nicht ausreichend ist, um Apoptose zu induzieren. Dies wird insbesondere beim Vergleich der entsprechenden Western-Blot Analysen von 20 Gy Gamma und 100 J/m² UV-bestrahlten NIH 3T3 Zellen deutlich: Obwohl nur die Bestrahlung mit 100 J/m² UV zu Apoptose führt, induziert auch 20 Gy Gamma-Bestrahlung eine dauerhafte Hochregulation von Bax und PIG-3. Dabei sind Kinetik sowie Grad der Hochregulation für beide Bestrahlungsarten nahezu identisch (siehe **Abbildung 7**).

Wenn jedoch, wie hier gezeigt, die Induktion von pro-apoptotischen Faktoren nicht zu Apoptose führt, stellt sich die Frage nach dem biologischen „Sinn“ der beobachteten Hochregulation. Die erhaltenen Daten lassen eine klare Beantwortung nicht zu. Im Fall einer Apoptose-auslösenden Schädigung läßt sich in der Hochregulation ein pro-apoptotisch wirksamer „Verstärkungseffekt“ vermuten. Schwieriger ist die Abschätzung einer möglichen Funktion für nicht-apoptotische Zellen. Weder die hier erhaltenen noch sonstige publizierte Daten geben diesbezüglich einen konkreten Anhaltspunkt.

Möglicherweise haben beide untersuchte Proteine, Bax und PIG-3, noch andere, nicht strikt Apoptose-assoziierte Funktionen. Im Fall von Bax unterstützt auch die intra-zelluläre Lokalisation des Proteins diese spekulative Möglichkeit. So beziehen sich alle bislang beschriebenen Funktionen von Bax auf eine Lokalisation in Cytoplasma, Mitochondrien und endoplasmatischem Reticulum (Übersichtsartikel: Cory und Adams, 2002; Tsujimoto, 2003). Dennoch konnte in allen hier untersuchten Zelllinien Bax auch im Zellkern nachgewiesen werden (siehe **Abbildungen 11, 15, 19**). Auch eine andere Studie hat nucleär lokalisiertes Bax beschrieben, ohne jedoch eine funktionelle Implikation zu erbringen (Samuel *et al.*, 2001). Die Hypothese einer Apoptose-unabhängigen Funktion von Bax und PIG-3 bleibt somit rein spekulativ und die funktionelle Relevanz einer Hochregulation pro-apoptotischer Proteine durch p53 weiterhin unklar.

Im Gegensatz dazu konnte die p53-abhängige Hochregulation des Zellzyklus-regulierenden Cdk-Inhibitors p21 eindeutig mit einem anti-apoptotischen Effekt in Zusammenhang gebracht werden. Dieser Befund ergab sich klar aus vergleichenden Analysen 20 Gy Gamma-bestrahlter Fibroblasten mit unterschiedlichem p53-Status. Dabei zeigte sich, daß 20 Gy Gamma-Bestrahlung zur Aktivierung der p53-unabhängigen Apoptose führt und die Eliminierung von p53-null sowie mit p53 exprimierenden Zellen induziert (siehe **Abbildung 23**). Obwohl davon auszugehen ist, daß die gleichen pro-apoptotischen Signale nach 20 Gy Gamma-Bestrahlung auch in wildtyp p53-

exprimierenden Zellen aktiviert werden, überleben wildtyp Zellen die Bestrahlung und sind vor Apoptose geschützt (siehe **Abbildung 23**).

Wie vergleichende Analysen mit p21-null Fibroblasten zeigten, konnte dieser p53-vermittelte Schutz vor Apoptose auf die Hochregulation von p21 und somit eindeutig auf das Resultat einer transkriptionellen Aktivität des Tumorsuppressors zurückgeführt werden (siehe **Abbildung 24** und **25**). Somit erweist sich wildtyp p53 als dominant anti-apoptotischer Faktor, der, zumindest unter bestimmten Bedingungen, Zellen durch seine transkriptionelle Aktivität sogar vor p53-unabhängiger Apoptose schützen kann.

In Übereinstimmung mit gängigen Vorstellungen (Übersichtsartikel: El-Deiry, 2003) ist die transkriptionelle Aktivität des Tumorsuppressors somit erforderlich und verantwortlich für die Zellzyklus-regulierende und anti-apoptotische Wirkung von p53 in bestrahlten Maus-Fibroblasten. Gleichwohl reicht die Betrachtung transkriptioneller Aktivitäten offensichtlich nicht aus, um die Selektivität der p53Antwort auf genotoxischen Streß und insbesondere die Induktion der p53-vermittelten Apoptose zu verstehen.

Diese Feststellung ist konsistent mit anderen Studien unseres Labors, die mit murinen Lymphozyten durchgeführt wurden (Heinrichs und Deppert, 2003) und spiegelt sich auch in der Tatsache wider, daß trotz zahlreicher Bemühungen in *knockout*-Studien bislang kein p53-Zielgen identifiziert werden konnte, auf das sich alle Effekte der p53-vermittelten pro-apoptotischen Aktivität hätten zurückführen lassen (Übersichtsartikel: Oren, 2003; Fridman und Lowe, 2003).

Da die transkriptionelle Aktivität von p53 trotz Hochregulation pro-apoptotischer Zielgene demnach offensichtlich nicht ausreicht, Apoptose auszulösen, scheinen zusätzliche nicht-transkriptionelle Signale erforderlich zu sein, um das apoptotische Programm zu aktivieren. Mit der Identifizierung derartiger Signale (siehe unten) ergibt sich die Schlußfolgerung, daß die primäre Wirkung von p53, die transkriptionell vermittelt wird, in der Induktion eines temporären oder terminalen Wachstumsarrests besteht.

3. Die p53-Proteinmenge als pro-apoptotisches Signal

Der oben beschriebene p53-abhängige und p21-vermittelte anti-apoptotische Effekt kann unter bestimmten Bedingungen überwunden werden. Dies geschieht in NIH 3T3 Zellen trotz starker Hochregulation von p21 (siehe **Abbildung 7**) z.B. nach 100 J/m^2 UV-Bestrahlung. Wie sich zeigte, geht das dafür erforderliche pro-apoptotische Signal ebenfalls von p53 aus und wird über eine differentiell regulierte Stabilisierung des Tumorsuppressor-Proteins gesteuert.

Die Stabilisierung von p53 nach genotoxischem Streß gilt als zentrales Merkmal einer Aktivierung des Tumorsuppressors, die sich in der Induktion von p53-Zielgenen auswirkt (Übersichtsartikel: Ashcroft und Vousden, 1999; El-Deiry, 2003). In Übereinstimmung damit führen alle verschiedenen Bestrahlungs-Varianten, mit denen NIH 3T3 Zellen geschädigt wurden, zu einer Stabilisierung von p53 sowie der Transaktivierung von p53-Zielgenen (siehe **Abbildungen 7 und 8**).

Interessanterweise zeigten sich bei Vergleich der verschieden bestrahlten Zellen deutliche Unterschiede im Ausmaß der p53-Stabilisierung, die jedoch nicht mit der transkriptionellen Aktivität, gemessen an der Proteinmenge von p53-Zielgenen, korreliert (siehe **Abbildungen 7-8**). Wie bereits erwähnt, zeigt das Muster der Zielgen-Induktion in 100 J/m² UV- und 20 Gy Gamma-bestrahlten NIH 3T3 Zellen bezüglich Kinetik und Ausmaß der Protein-Induktion große Ähnlichkeit unabhängig vom verschiedenen Ausgang der Schadensreaktion (siehe **Abbildung 7**). Während 100 J/m² UV-Bestrahlung zur Akkumulation auffällig großer Mengen von p53 führt, ist der Stabilisierungseffekt nach 20 Gy Gamma-Bestrahlung vergleichsweise moderat (siehe **Abbildung 8**). Offenbar reichen die dabei generierten geringeren Mengen von aktiviertem p53 jedoch vollends aus, um alle untersuchten Zielgene wirksam und dauerhaft hochzuregulieren. Dies weist darauf hin, daß über die differentiell regulierte p53-Proteinmenge ein Signal vermittelt wird, das nicht unmittelbar mit der Transaktivierung von Zielgenen, jedoch mit der Induktion von Apoptose zusammenhängt.

Bereits in früheren Studien wurde ein Zusammenhang zwischen geringen p53-Mengen und einer anti-apoptotischen Wirkung sowie großen p53-Mengen und einem pro-apoptotischen Effekt demonstriert (Chen *et al.*, 1996; Lassus *et al.*, 1996; Ronen *et al.*, 1996; Seluanov *et al.*, 2001). Da diese Untersuchungen jedoch auf artifiziellen Zellsystemen mit ektop exprimiertem p53 beruhen (Chen *et al.*, 1996; Lassus *et al.*, 1996; Ronen *et al.*, 1996) oder sich auf völlig andere Fragestellungen konzentrierten (Seluanov *et al.*, 2001), blieb die Relevanz dieser Ergebnisse in Bezug auf die Rolle von endogenem p53 *in vivo* und insbesondere für die Selektivität der p53-abhängigen Schadensreaktion bislang völlig offen.

Die hier vorgelegten Ergebnisse beschreiben zum ersten Mal, daß die Menge von endogen exprimiertem p53 in ein und demselben Zellsystem (NIH 3T3) in Abhängigkeit von Art und Ausmaß des DNA-Schadens differentiell reguliert wird (siehe **Abbildung 8**). Dabei korreliert der Stabilisierungs-Grad von p53 eindeutig mit einem bestimmten Ausgang der Schadensantwort. Damit kann als erwiesen gelten, daß die p53-Proteinmenge einen auch *in vivo* relevanten Parameter für die Selektivität der p53-Wirkung darstellt. Während eine moderate p53-Stabilisierung mit einer anti-apoptotischen Zellzyklus-regulierenden Wirkung einhergeht, sind eine starke Stabilisierung und daraus resultierende große p53-Proteinmengen Determinanten eines pro-apoptotischen Effekts.

Stabilisierung und transkriptionelle Aktivität des Tumorsuppressors scheinen dabei unabhängig voneinander reguliert zu werden, was aufzeigt, daß über die Proteinmenge vor allem nicht-transkriptionelle pro-apoptotische Funktionen selektiv kontrolliert werden.

Unabhängig davon kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß veränderte Proteinmengen des Tumorsuppressors auch die Affinität zu bestimmten Zielgen-Promotoren beeinflussen (siehe auch Inga *et al.*, 2002) und sich somit auf die Transaktivierung von p53-Zielgenen, die in der vorgelegten Arbeit nicht erfaßt wurden, auswirken.

In Übereinstimmung mit der in 2. aufgestellten These, daß die primäre p53-Wirkung in Maus-Fibroblasten anti-apoptotisch ist und zur Aktivierung des apoptotischen Programms zusätzliche Signale notwendig sind, kann somit gefolgert werden, daß die starke Stabilisierung des Tumorsuppressors ein solches Signal darstellt. Die durchgeführten Transfektions-Experimente konnten diese Annahme belegen. So ließ sich die Schadensantwort 20 Gy Gamma-bestrahlter NIH 3T3 Zellen durch artifiziell erzielte große p53-Mengen von der (p53-abhängigen) Induktion eines terminalen Wachstumsarrests p53-abhängig in Apoptose umwandeln (siehe **Abbildung 10**). Durch Variation eines Parameters, nämlich der p53-Proteinmenge, konnte so die Selektivität der p53-Antwort gezielt verändert werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen könnte die gezielte Stabilisierung von p53 bei der Entwicklung neuer Wirkstoffe für die Tumorbehandlung somit ein interessanter Ansatzpunkt sein.

Auf welchen Mechanismen die differentielle Regulation der p53-Proteinmenge beruht, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

Wenngleich auch einige andere Proteine, wie z.B. Pirh2 oder Mdmx einen Einfluß auf die p53-Stabilität haben, ist die Rolle der Ubiquitin-Ligase Mdm2 als zentraler und bedeutendster Regulator der p53-Menge unstrittig (Übersichtsartikel: Ashcroft und Vousden, 1999; El-Deiry, 2003). Erstaunlicherweise war in 100 J/m² UV-bestrahlten NIH 3T3 Zellen trotz der auffällig starken p53-Stabilisierung weder eine verringerte Mdm2-Induktion noch eine gestörte Interaktion zwischen p53 und Mdm2 feststellbar (siehe **Abbildung 9**). Dies zeigt, daß andere, ebenfalls differentiiell regulierte Faktoren offensichtlich in der Lage sind, die Ubiquitin-Ligase-Aktivität von Mdm2 zu inhibieren. Alternativ wäre auch eine Neutralisierung der Mdm2-vermittelten Markierung von p53 für den proteasomalen Abbau durch andere Mechanismen denkbar. Faktoren wie p14/p19^{ARF}, c-Abl oder pRB, denen ein solcher Effekt zugeschrieben wurde (Übersichtsartikel: Ashcroft und Vousden, 1999), sind somit attraktive Kandidaten, deren Beitrag zur differentiiell regulierten p53-Stabilisierung nach genotoxischem Streß überprüft werden sollte. Interessant in diesem Zusammenhang ist auch eine mögliche Rolle des erst kürzlich entdeckten HAUSP-Protein, das über eine p53-Deubiquitinierungs-Aktivität verfügt (Li *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004).

Gerade im Kontext der hier charakterisierten Konsequenz, den die Akkumulation großer p53-Proteinmengen für die Selektivität der Schadensreaktion hat, stellt die Aufklärung der molekularen Mechanismen, welche der differentiellen Regulation der p53-Menge zu Grunde liegen, ein wichtiges Ziel künftiger Forschungsbemühungen dar.

4. Differentielle Regulation der Aktivierung von Bax

Wie bereits erwähnt (siehe 2.), scheint die Hochregulation des pro-apoptischen Proteins Bax nicht ausreichend zu sein, um das apoptotische Programm in Maus-Fibroblasten zu initialisieren. So induzierten alle verwendeten Bestrahlungs-Varianten in NIH 3T3 Zellen zwar eine Hochregulation von Bax, jedoch führte nur 100 J/m² UV-Bestrahlung zu Apoptose (siehe **Abbildungen 5 und 7**). Aus dieser Beobachtung ließ sich folgern, daß Bax entweder gar nicht an der Induktion von Apoptose in bestrahlten NIH 3T3 Zellen beteiligt ist und in diesen Zellen generell inaktiviert bleibt oder die Aktivität des Proteins unabhängig von seiner Menge über andere Parameter differentiell reguliert wird.

Mikroskopische Analysen demonstrierten, daß Menge und Aktivität von Bax tatsächlich unabhängig voneinander reguliert werden. Die Unterscheidung zwischen inaktivem und aktivierten Bax basierte dabei auf der mikroskopisch erfaßbaren Translokation des Proteins in die Mitochondrien. Wie sich zeigte, erfolgt die Translokation von Bax nicht nach 10 J/m² UV-, 2 Gy und 20 Gy Gamma-Bestrahlung, sondern selektiv nur nach 100 J/m² UV-Bestrahlung, die als einzige der genannten Bestrahlungs-Varianten Apoptose in NIH 3T3 Zellen induziert (siehe **Abbildung 11**). Die Aktivierung von Bax in 100 J/m² UV-bestrahlten NIH 3T3 Zellen ging dabei deutlich der Aktivierung von Caspase 3 voran (siehe **Abbildung 12**). Dies lieferte einen guten Hinweis darauf, daß die Bax-Translokation in die Mitochondrien tatsächlich Auslöser für die Initialisierung des apoptotischen Programms ist.

Der Befund, daß die Hochregulation von Bax *in vivo* nicht zwangsläufig mit einer Aktivierung des Proteins verbunden ist, bestätigt die These von einer primär anti-apoptischen Wirkung von p53 und der Erfordernis zusätzlicher Signale für die Induktion von Apoptose (siehe 2.). Gleichwohl ist dieses Ergebnis erstaunlich, da die Charakterisierung von Bax als pro-apoptisches Protein vor allem auf der Beobachtung beruht, daß die Überexpression von Bax und damit die Generierung großer Mengen des Proteins eine Induktion von Apoptose zur Folge hat (Kitanaka *et al.*, 1997; Pastorino *et al.*, 1998; Vogelbaum *et al.*, 1999). Die Diskrepanz der beschriebenen Beobachtungen und der hier erhaltenen Daten mag jedoch auf die erheblichen Mengenunterschiede zurückzuführen

sein, die durch eine Strahlen-induzierte Hochregulation von endogenem Protein bzw. durch ektope Expression verursacht werden.

Unabhängig von der funktionellen Relevanz einer Hochregulation pro-apoptotischer Faktoren haben zwei neueste Studien klar gezeigt, daß die Aktivierung von Bax und die Induktion Bax-vermittelter Apoptose keine transkriptionelle Aktivität erfordert (Chipuk *et al.*, 2003; Chipuk *et al.*, 2004). Die selben Studien, die parallel zur Entstehung der hier vorgelegten Arbeit veröffentlicht wurden, demonstrierten auch, daß eine solche Transkriptions-unabhängige Bax-Aktivierung von p53 vermittelt werden kann. Schwerpunkt der genannten Arbeiten war die mechanistische Aufklärung der Bax-aktivierten Apoptose durch p53. Die Durchführung erfolgte anhand von artifiziell erzeugten Zellsystemen sowie mit *in vitro* Experimenten. Während mechanistische Aspekte der p53-vermittelten Bax-Aktivierung auf diese Weise elegant untersucht werden konnten, ließen die durchgeführten Experimente jedoch keinen Rückschluß auf eine *in vivo* Relevanz dieser nicht-transkriptionellen p53-Aktivität zu.

Erst die hier vorgelegten Daten belegen, daß die Transkriptions-unabhängige Aktivierung von Bax durch p53 in der Tat eine hohe Relevanz für die p53-Antwort *in vivo* hat. Dies zeigt sich zum einen an der Tatsache, daß die Bax-Aktivierung in Zellen mit endogenem Bax und endogenem wildtyp p53 differentiell reguliert wird und selektiv mit der Induktion von Apoptose verbunden ist (siehe **Abbildung 11**). Zum anderen konnte erstmalig gezeigt werden, daß die Aktivierung von Bax im Rahmen der zellulären Schadensreaktion auf genotoxischen Streß strikt p53-abhängig ist, da sie in apoptotischen p53-null Zellen nicht stattfindet, jedoch durch Expression von wildtyp p53 wiederhergestellt werden kann (siehe **Abbildungen 15** und **17**). Darüber hinaus konnte im hier verwendeten experimentellen System bestätigt werden, daß die durch UV-Bestrahlung induzierte Bax-Aktivierung in 10-1cG9 Zellen unabhängig von einer transkriptionellen Aktivität erfolgt (siehe **Abbildung 16** und **17**).

Insgesamt erweist sich die Transkriptions-unabhängige Aktivierung von Bax damit als wichtiger Parameter der p53-abhängigen Apoptose *in vivo*. In Verbindung mit der offensichtlich unzureichenden Wirkung transkriptioneller p53-Aktivitäten in Bezug auf die Induktion von Apoptose kann darüber hinaus sogar vermutet werden, daß die Transkriptions-unabhängige Bax-Aktivierung zumindest in Fibroblasten der zentrale Regulationspunkt ist, über den p53 die Induktion von Apoptose als Reaktion auf genotoxischen Streß steuert.

Diese These wird bestätigt durch die die Tatsache, daß Bax-defiziente Onkogen-exprimierende Mausembryo-Fibroblasten über eine stark erhöhte Resistenz gegenüber DNA-schädigenden Agenzien verfügen, welche zur Aktivierung der p53-abhängigen Apoptose führen (Schuler *et al.*,

2003; Fridman und Lowe, 2003). Im Gegensatz dazu zeigen Bax-defiziente Thymocyten jedoch eine völlig normale Sensitivität gegenüber genotoxischen Streß und werden durch ionisierende Strahlung wirksam in Apoptose getrieben (Fridman und Lowe, 2003).

Die beschriebene Diskrepanz in der Apoptose-Sensitivität zwischen Fibroblasten und Thymocyten des selben genetischen (Bax -/-) Hintergrunds zeigt beispielhaft auf, daß die p53-abhängigen Signalwege je nach Gewebe völlig unterschiedlich reguliert werden. Unabhängig von den Konsequenzen einer Bax-Defizienz wurde eine Gewebespezifität von p53-Signalen auch für andere Parameter der p53-Aktivität durch zahlreiche Studien belegt (Übersichtsartikel: Fridman und Lowe, 2003; El-Deiry, 2003). Die im Rahmen dieser Arbeit an Fibroblasten erhobenen Daten sind somit nicht ohne weiteres auf andere Zelltypen, insbesondere Thymocyten, übertragbar, wo die Relevanz nicht-transkriptioneller Mechanismen, wie z.B. die Aktivierung von Bax, für die Apoptose-Induktion noch zu prüfen sein wird.

5. Bax-Aktivierung in mut p53 Zellen

Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Arbeit war die Beobachtung, daß die p53-abhängige Bax-Aktivierung und die daraus resultierende Induktion von Apoptose auch in Fibroblasten mit transkriptionell inaktivem mut p53 durch genotoxischen Streß aktiviert werden kann. Dies konnte für zwei Fibroblasten-Zelllinien belegt werden. Dabei handelt es sich um Balb/c 3T3tx Zellen, die heterozygot zwei verschiedene mutante p53 Proteine (mut p53^{Y230D, M237I} und mut p53^{Y230D}) exprimieren (siehe **Abbildungen 18** und **19**) sowie T3T3 Zellen, die mut p53^{Y230D, E287D} exprimieren (Daten nicht abgebildet). Im Gegensatz dazu konnte die Aktivierung von Bax in 10-1cG9 Zellen mit Temperatur-sensitivem mut p53^{C135V} in mutanter Konformation nicht beobachtet werden (siehe **Abbildung 17**).

Der Befund, daß auch einige mut p53-exprimierende Zellen in der Lage sind, die Aktivierung von Bax zu bewirken, bestätigt die Unabhängigkeit von Bax-Aktivierung und Bax-Induktion, die bereits in wildtyp p53 Zellen beobachtet wurde (siehe **4.**). Darüber hinaus wird deutlich, daß der Mutations-bedingte Verlust transkriptioneller Aktivität nicht zwangsläufig den Verlust aller biologischen Funktionen des p53 Proteins zur Folge hat. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit genetischen Studien, in denen gezeigt wurde, daß p53-Deletionsmutanten, denen die für die Transaktivierung essentielle *core*-Domäne fehlt, über pro-apoptotische Aktivität verfügen (Chipuk *et al.*, 2003).

Welche strukturellen Eigenschaften des p53-Proteins notwendig sind, um eine Aktivierung von Bax auslösen zu können, bleibt unklar, wie auch der genaue Mechanismus, durch den p53 die Aktivierung von Bax bewirkt. Allerdings kann die kürzlich veröffentlichte These, daß eine cytoplasmatische Lokalisation die allein entscheidende Voraussetzung für eine Bax-Aktivierung

durch p53 sei (Chipuk *et al.*, 2004), eindeutig widerlegt werden, da 10-1cG9 Zellen bei 39 °C über erhebliche p53-Mengen im Cytoplasma verfügen, jedoch Bax nicht aktivieren können (siehe **Abbildung 16** und **17**).

Balb/c 3T3tx Zellen exprimieren wie die meisten mut p53 Zellen große Mengen des mutierten Proteins. Trotz der konstitutiv hohen p53-Proteinmenge, die in wildtyp Zellen als Determinante einer pro-apoptotischen p53-Wirkung charakterisiert wurde, wird die p53-abhängige Bax-Aktivierung in Balb/c 3T3tx Zellen jedoch erst nach genotoxischem Streß induziert (siehe **Abbildungen 19**). Damit verbunden konnte, analog zur Situation in wildtyp Zellen, eine Phosphorylierung an Serin 15 des mutierten p53 Proteins detektiert werden (siehe **Abbildung 18**). Dies deutet darauf hin, daß für die Induktion der p53-abhängigen Transkriptions-unabhängigen Apoptose nicht nur große Mengen des p53 Proteins, sondern große Mengen von aktiviertem p53 erforderlich sind. Ob die beobachtete Serin 15-Phosphorylierung oder andere, nicht weiter untersuchte Modifikationen dabei für die Aktivierung entscheidend sind, bleibt jedoch offen.

Mit dem Verlust der Fähigkeit, die p53-Menge differentiell regulieren zu können, führen alle Arten von genotoxischem Streß, die eine Aktivierung von p53 induzieren, dazu, daß große Mengen von aktiviertem p53 in mut p53 Zellen vorliegen. In Verbindung mit der beibehaltenen wildtyp p53-Fähigkeit zur Bax-Aktivierung hat dies zur Folge, daß solche mut p53 Zellen eine besondere Sensitivität bezüglich der Apoptose-Induktion aufweisen.

Balb/c 3T3tx Zellen zeigen ein Verhalten, das genau dem beschriebenen Phänotyp entspricht. So aktiviert die Bestrahlung mit 10 J/m² UV oder 20 Gy Gamma eine Aktivierung von Bax und die Induktion des apoptotischen Programms in Balb/c 3T3tx Zellen (siehe **Abbildungen 20-22**). Beide Bestrahlungsarten führen zwar auch in wildtyp p53 exprimierenden NIH 3T3 Zellen zu einer Aktivierung von p53, aufgrund der nur moderaten Stabilisierung des Tumorsuppressors jedoch nicht zu Apoptose (vgl. **3**).

Damit erweist sich das transkriptionell-inaktive mutierte p53 Protein aus Balb/c 3T3tx Zellen als wirksamer pro-apoptotischer Faktor, der durch genotoxischen Streß selbst geringen Ausmaßes aktiviert wird. Die Aktivierung von mut p53 führt aufgrund der konstitutiv großen Proteinmenge unabhängig vom Ausmaß des Schadens dabei immer zu einer Initialisierung des apoptotischen Programms.

Dies zeigt sich deutlich nach 10 J/m² UV-Bestrahlung. Ein derartiger DNA-Schaden führt weder in wildtyp p53 noch in p53-null Fibroblasten zur Induktion von Apoptose, wo offensichtlich anti-apoptotische Überlebenssignale die Schadensantwort bestimmen. In 10 J/m² UV-bestrahlten Balb/c 3T3tx Zellen führt das Zusammentreffen mut p53-vermittelter pro-apoptotischer Signale mit p53-unabhängigen anti-apoptotischen Signalen zu einem besonderen Phänomen:

Aktiviertes mut p53 bewirkt eine partielle Bax-Aktivierung, was daran sichtbar ist, daß nicht alle Mitochondrien einer bestrahlten Zelle betroffen sind (siehe **Abbildung 21**). Dadurch erfolgt eine nur schwache Aktivierung des apoptotischen Programms bis in die sogenannte Exekutions-Phase, welche durch die Spaltung von Procaspase 3 gekennzeichnet ist. Aufgrund des offenbar nur unzureichend starken pro-apoptotischen Signals wird jedoch nur ein geringer Teil der bestrahlten Zellpopulation eliminiert, der überwiegende Anteil überlebt (siehe **Abbildung 20**).

Eine derartige Aktivierung, aber nur unvollständige Durchführung des apoptotischen Programms kann zu erheblichen genetischen Veränderungen, wie z.B. Chromosomensegment-Translokationen, führen (Übersichtsartikel: Vaughan *et al.*, 2002; Norbury und Zhivotovsky, 2004). Diese sind nicht unmittelbares Resultat der primären DNA-Schädigung. Vielmehr führt die nicht-koordinierte Aktion von Reparaturenzymen und Apoptose-assoziierten Nucleasen zur Verknüpfung „falscher“ DNA-Enden und Generierung von Translokationen und Fusionsgenen (Vaughan *et al.*, 2002). Da dabei auch potentiell tumorigene Veränderungen im Genom entstehen können, ist eine schwache Aktivierung des apoptotischen Programms, wie sie in Balb/c 3T3tx Zellen nach geringem DNA-Schaden beobachtet wurde, somit in höchstem Maße gefährlich für die genomische Integrität einer Zelle. Auch wenn im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurde, inwieweit 10 J/m² UV-Bestrahlung tatsächlich zur Fixierung genetischer Veränderung in den überlebenden Balb/c 3T3tx Zellen führt, muß dies als wahrscheinliche Konsequenz des geringen DNA-Schadens in Betracht gezogen werden. In diesem Falle käme mutiertem p53 als Initiator der schwachen Apoptose-Induktion eine gewisse onkogene Aktivität zu. Die nähere Beleuchtung und Charakterisierung derartiger onkogener Eigenschaften von mutierten p53-Proteinen stellen in jedem Fall ein wichtiges Ziel in Hinblick auf ein besseres Verständnis von Tumorgenese dar.

Unabhängig davon trägt der hier vorgelegte Befund, daß einige, jedoch nicht alle mutierten p53-Proteine über die wildtyp Fähigkeit zur Bax-Aktivierung verfügen, dazu bei, die offensichtliche Heterogenität von mut p53 Tumoren bezüglich des Behandlungs-Erfolgs bzw. einer Resistenz gegen Chemo- oder Strahlentherapie (Übersichtsartikel: Soussi und Bèroud, 2001; El-Deiry, 2003) besser zu verstehen.

Literaturverzeichnis

1. Aaronson, S. A., Todaro, G. J. (1968): Development of 3T3-like lines from Balb/C mouse embryo cultures: Transformation susceptibility to SV40. *J. Cell. Physiol.* **72**, 141-148
2. Abramova, N.A., Russell, J., Botchan, M., Li, R. (1997): Interaction between replication protein A and p53 is disrupted after UV damage in a DNA repair-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7186-7191
3. Agami, R., Bernards, R. (2002): Convergence of mitogenic and DNA damage signalling in the G1 phase of the cell cycle. *Cancer Lett.* **177**, 111-118
4. Antonsson, B., Montessuit, S., Sanchez, B., Martinou, J.C. (2001): Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 11615-11623
5. Appella, E., Anderson, C.W. (2000): Signaling to p53: breaking the posttranslational modification code. *Pathol. Biol. (Paris)* **48**, 227-245
6. Ashcroft, M., Vousden, K. (1999): Regulation of p53 stability. *Oncogene* **18**, 7637-7643
7. Attardi, L.D., Reczek, E.E., Cosmas, C., Demicco, E.G., McCurrach, M.E., Lowe, S.W., Jacks, T. (2000): PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family. *Genes Dev.* **14**, 704-718
8. Azzam, E.I., de Toledo, S.M., Pykett, M.J., Nagasawa, H., Little, J.B. (1997): Cdc2 is down-regulated by ionising radiation in a p53-dependent manner. *Cell Growth Differ.* **8**, 1161-1169
9. Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., Oren, M. (1993): Mdm-2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* **12**, 461-468
10. Bartek, J., Lukas, J. (2001): Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 738-747
11. Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S.W., Luzio, J.P., Simari, R., Weissberg, P. (1998): Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* **282**, 290-293
12. Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V., Wallach, D. (1998): Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* **85**, 803-815
13. Bond, J., Haughton, M., Blaydes, J., Gire, V., Wynford-Thomas, D., Wyllie, F. (1996): Evidence that transcriptional activation by p53 plays a direct role in the induction of cellular senescence. *Oncogene* **13**, 2097-2104
14. Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1998): Requirement for p53 and p21 to sustain G2-arrest after DNA damage. *Science* **282**, 1497-1501
15. Caelles, C., Helmberg, A., Karin, M. (1994): p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* **370**, 220-223
16. Chan, T.A., Hermeking, H., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1999): 14-3-3 σ is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* **401**, 616-620

17. Chang, B.D., Brode, E.V., Dokmanovic, M., Zhu, H., Ruth, A., Xuan, Y., Kandel, E.S., Lausch, E., Christov, K., Roninson, I.B. (1999a): A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res.* **59**, 3761-3767
18. Chang, B.D., Xuan, Y., Broude, E.V., Zhu, H., Schott, B., Fang, J., Roninson, I.B. (1999b): Role of p53 and p21 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene* **18**, 4808-4818
19. Chang, B.D., Swift, M.E., Shen, M., Fang, J., Broude, E.V., Roninson, I. B. (2002): Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 389-394
20. Chemnitz, J. (2003): Regulation des Intra-S-Phasen Kontrollpunktes in UV-geschädigten Primatenzellen. *Dissertation, Universität Hamburg, Fachbereich Biologie*
21. Chen, J., Marechal, V., Levine, A.J. (1993): Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4107-4114
22. Chen, I.T., Smith, M.L., O'Connor, P.M., Fornace, A.J.Jr. (1995): Direct interaction of Gadd45 with PCNA and evidence for competitive interaction of Gadd45 and p21^{Waf1/Cip1} with PCNA. *Oncogene* **11**, 1931-1937
23. Chen, X., Ko, L.J., Jayaraman, L., Prives, C. (1996): p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev.* **10**, 2438-2451
24. Chen, X., Zhang, W., Gao, Y.F., Su, X.Q., Zhai, Z.H. (2002): Senescence-like changes induced by expression of p21^{Waf1/Cip1} in NIH3T3 cell line. *Cell Res.* **12**, 229-233
25. Chène, P. (2003): Inhibiting the p53-mdm2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 102-109
26. Chipuk, J.E., Maurer, U., Green, D.R., Schuler, M. (2003): Pharmacologic activation of p53 elicits bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. *Cancer Cell* **4**, 371-381
27. Chipuk, J.E., Green, D.R. (2003): p53's believe it or not: lessons on transcription-independent death. *J. Clin. Immun.* **23**, 355-361
28. Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., Green, D.R. (2004): Direct activation of bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**, 1010-1014
29. Clifford, B., Beljin, M., Stark, G.R., Taylor, W.R. (2003): G2 arrest in response to topoisomerase II inhibitors: the role of p53. *Cancer Res.* **63**, 4074-4081
30. Cline, S.D., Hanawalt, P.C. (2003): Who's on first in the cellular response to DNA damage? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 361-372
31. Cory, S., Adams, J.M. (2002): The bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 647-656
32. d'Andrea, A.D., Grompe, M. (2003): The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 23-34
33. Degterev, A., Boyce, M., Yuan, J. (2003): A decade of caspases. *Oncogene* **22**, 8543-8567

34. DeLeo, A. B., Shiku, H., Takahashi, T., John, M., Old, L. J. (1977): Cell surface antigens of chemically induced sarcomas of the mouse. I. Murine leukemia virus-related antigens and alloantigens on cultured fibroblasts and sarcoma cells: description of a unique antigen on BALB/c Meth A sarcoma. *J. Exp. Med.* **146** (3), 720-34
35. Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., Maundrell, K., Antonsson, B., Martinou, J.C. (1999): Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J. Cell Biol.* **144**, 891-901
36. Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X. (2000): Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42
37. Dulic, V., Kaufmann, W.K., Wilson, S.J., Tlsty, T.D., Lees, E., Harper, J.W., Elledge, S.J., Reed, S.I. (1994): p53-dependent inhibition of cyclin-dependent kinase activities in human fibroblasts during radiation-induced G1 arrest. *Cell* **76**, 1013-1023
38. Dutta, A., Ruppert, S.M., Aster, J.C., Winchester, E. (1993): Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. *Nature* **365**, 79-82
39. Earnshaw, W.C., Martins, L.M., Kaufmann, S.H. (1999): Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 383-424
40. El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1993): WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-825
41. El-Deiry, W.S. (2003): The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. *Oncogene* **22**, 7486-7495
42. Eliyahu, D., Goldfinger, N., Pinhasi-Kimhi, O., Shaulsky, G., Skurnik, Y., Arai, N., Rotter, V., Oren, M. (1988). Meth A fibrosarcoma cells express two transforming mutant p53 species. *Oncogene* **3** (3): 313-21
43. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S. (1998): A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* **391**, 43-50
44. Esposti, M.D., Dive, C. (2003): Mitochondrial membrane permeabilisation by bax/bad. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 455-461
45. Fang, L., Igarashi, M., Leung, J., Sugrue, M.M., Lee, S.W., Aaronson, S.A. (1999): p21Waf1/Cip1/sdi1 induces permanent growth arrest with markers of replicative senescence in human tumor cells lacking functional p53. *Oncogene* **18**, 2789-2797
46. Fei, P., El-Deiry, W.S. (2003): p53 and radiation response. *Oncogene* **22**, 5774-5783
47. Fortin, A., Cregan, S.P., MacLaurin, J.G., Kushwaha, N., Hickman, E.S., Thompson, C.S., Hakim, A., Albert, P.R., Cecconi, F., Helin, K., Park, D.S., Slack, R.S. (2001): APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death. *J. Cell. Biol.* **155**, 207-216
48. Fridman, J.S., Lowe, S.W. (2003): Control of apoptosis by p53. *Oncogene* **22**, 9030-9040
49. Fritsche, M., Haessler, C., Brandner, G. (1993): Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* **8**, 307-318

50. Gaiddon, C., Moorthy, N.C., Prives, C. (1999): Ref-1 regulates the transactivation and pro-apoptotic functions of p53 in vivo. *EMBO J.* **18**, 5609-5621
51. Gannon, J. V., Greaves, R., Iggo, R., and Lane, D. P. (1990): Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J.* **9**, 1595-1602
52. Gao, C., Tsuchida, N. (1999): Activation of caspases in p53-induced transactivation-independent apoptosis. *Jpn. J. Cancer Res.* **90**, 180-187
53. Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., Parks, W.P. (1973): In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **51(5)**, 1417-1423
54. Ginsberg, D., Mechta, F., Yaniv, M., Oren, M. (1991a): Wild-type p53 can downmodulate the activity of various promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9979-9983
55. Ginsberg, D., Michael-Michalovitz, D., Ginsberg, D., Oren, M. (1991b): Induction of growth arrest by a temperature-sensitive p53 mutant is correlated with increased nuclear localization and decreased stability of the protein. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 582-585
56. Gudkov, A. J., Komarova, E.A. (2003): The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 117-129
57. Hahn, W.C., Weinberg, R.A. (2002): Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 331-341
58. Hainaut, P., Hollstein, M. (2000): p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv. Cancer Res.* **77**, 81-137
59. Haldar, S., Negrini, M., Monne, M., Sabbioni, S., Croce, C.M. (1994): Downregulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res.* **54**, 3131-3135
60. Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, M., Keyomarsi, K., Elledge, S.J. (1993): The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816
61. Hartwell, L.H., Kastan, M.B. (1994): Cell cycle control and cancer. *Science* **266**, 1821-1828
62. Harvey, D. M., Levine, A. J. (1991): p53 alteration is a common event in the spontaneous immortalization of primary BALB/c murine embryo fibroblasts. *Genes Dev* **5**, 2375-85
63. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., Oren, M. (1997): Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296-299
64. Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Vousden, K.H., Oren, M. (1995): Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev.* **9**, 2170-2183
65. Hegde, R., Srinivasula, S.M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A.S., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S. (2002) : Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J. Biol. Chem.* **277**, 432-438
66. Heinrichs, S., Deppert, W. (2003): Apoptosis or growth arrest: modulation of the cellular response to p53 by proliferative signals. *Oncogene* **22**, 555-571

67. Hermannstädter, A. (2003): Epigenetische Regulation der Expression von mutanten p53. *Diplomarbeit, Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg, Fachbereich naturwissenschaftliche Technik.*
68. Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., Tong-Chuan, H., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1997): 14-3-3 σ is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell* **1**, 3-11
69. Horikoshi, N., Usheva, A., Chen, J., Levine, A.J., Weinmann R., Shenk, T. (1995): Two domains of p53 interact with the TATA-binding protein, and the adenovirus 13S E1A protein disrupts the association, relieving p53-mediated transcriptional repression. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 227-234
70. Hsu, Y.-T., Wolter, K.G., Youle, R.J. (1997): Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-xL during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3668-3672
71. Hwang, B.J., Ford, J., Hanawalt, P.C., Chu, G. (1999): Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 424-428
72. Iliakis, G. (1997): Cell cycle regulation in irradiated and nonirradiated cells. *Sem. Oncol.* **24(6)**, 602-615
73. Iliakis, G., Wang, Y., Guan, J., Wang, H. (2003): DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* **22**, 5834-5847
74. Inga, A., Storici, F., Darden, T.A., Resnick, M.A. (2002): Differential transactivation by the p53 transcription factor is highly dependent on p53 level and promoter target sequence. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 8612-8625
75. Jainchill, J.L., Aaronson, S.A., Todaro, G.J. (1969): Murine sarcoma and leukaemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J. Virol.* **4**, 549-553
76. Janus, F., Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Wiesmüller, L., Grosse, F., Deppert, W. (1999): The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cell. Mol. Life. Sci.* **55**, 12-27
77. Jayaraman, L., Prives, C. (1999): Covalent and noncovalent modifiers of the p53 protein. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 76-87
78. Jin, S., Levine A.J. (2001): The p53 functional circuit. *J. Cell Sci.* **114**, 4139-4140
79. Johnston, R.W., Ruefli, A.A., Lowe, S.W. (2002): Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* **108**, 153-164
80. Kastan, M.B., Zhan, Q., el-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B., Fornace, A.J. Jr. (1992): A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* **71**, 587-597
81. Kensler, T.W., Qian, G-S., Chen, J.-G., Groopman, J.D. (2003): Translational strategies for cancer prevention in liver. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 321-329
82. Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257
83. Kit, S., Kurimura, T., Dubbs, D.R. (1969): Transplantable mouse tumor line induced by injection of SV40-transformed mouse kidney cells. *Int. J. Cancer* **4**, 384-392

84. Kitamura, T., Tange, T., Terasawa, T., Chiba, S., Kuwaki, T., Miyagawa, K., Piao, Y.F., Miyazono, K., Urabe, A., Takaku, F. (1989): Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J. Cell Physiol.* **140**, 323-334
85. Kitanaka, C., Namiki, T., Noguchi, K., Mochizuki, T., Kagaya, S., Chi, S., Hayashi, A., Asai, A., Tsujimoto, Y., Kuchino, Y. (1997): Caspase-dependent apoptosis of COS-7 cells induced by Bax overexpression: differential effects of Bcl-2 and Bcl-xL on Bax-induced caspase activation and apoptosis. *Oncogene* **15**, 1763-1772
86. Ko, L.J., Prives, C. (1996): p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* **10**, 1054-1072
87. Kokontis, J.M., Wagner, A.J., O'Leary, M., Liao, S., Hay, N. (2001): A transcriptional activation function of p53 is dispensable for and inhibitory of its apoptotic function. *Oncogene* **20**, 659-668
88. Kroemer, G. (2003): Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 433-435
89. Kubbutat, M.H.G., Jones, S.N., Vousden, K. (1997): Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**, 299-303
90. Kubbutat, M.H.G., Vousden, K. (1998): Keeping an old friend under control: regulation of p53 stability. *Mol. Med. Today* **4**, 250-256
91. Lane, D.P. (1992): p53, guardian of the genome. *Nature* **358**, 15-16
92. Lane, D.P., Crawford, L.V. (1979): T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**, 261-263
93. Lassus, P., Ferlin, M., Piette, J., Hibner, U. (1996): Anti-apoptotic activity of low levels of wild-type p53. *EMBO J.* **15**, 4566-4573
94. Leu, J.I.J., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E., George, D.L. (2004): Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nature Cell Biol.* **6**, 443-450
95. Li, L.Y., Luo, X., Wang, X. (2001): Endonuclease G (EndoG) is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95-99
96. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M. (1997): Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479-489
97. Li, R., Botchan, M.R. (1993): The acidic transcriptional activation domains of VP16 and p53 bind the cellular replication protein A and stimulate in vitro BPV-1 DNA replication. *Cell* **73**, 1207-1221
98. Li, M., Chen, D., Shiloh, A., Luo, J., Nikolaev, A.Y., Qin, J., Gu, W. (2002): Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* **416**, 648-53
99. Li, M., Brooks, C.L., Kon, N., Gu, W. (2004): A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway. *Mol. Cell* **13**, 879-86
100. Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X.D. (1997): DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* **89**, 175-184

101. Lu, H., Levine, A.J. (1995): Human TAF31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5154-5158
102. Lundberg, A.S., Weinberg, R.A. (1999): Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur. J. Cancer* **35(4)**, 531-539
103. Makin, G., Hickman, J.A. (2000): Apoptosis and cancer chemotherapy. *Cell Tissue Res.* **301**, 143-152
104. Marchenko, N.D., Zaika, A., Moll, U.M. (2000): Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. *J. Biol. Chem.* **275(21)**, 16202-16212
105. Martinez, J., Georgoff, I., Martinez, J., Levine, A.J. (1991): Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature-sensitive p53 protein. *Genes Dev.* **5**, 151-159
106. McKay, B.C., Ljungman, M., Rainbow, A.J. (1999): Potential roles for p53 in nucleotide excision repair. *Carcinogenesis* **20(8)**, 1389-1396
107. Melchior, F., Hengst, L. (2002): SUMO-1 and p53. *Cell Cycle* **1**, 233-234
108. Michalovitz, D., Eliyahu, D., Oren, M. (1990): Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53. *Cell* **62**, 671-680
109. Mietz, J.A., Unger, T., Huibregtse, J.M., Howley, P.M. (1992): The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *EMBO J.* **11**, 5013-5020
110. Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., Moll, U.M. (2003): p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell* **11**, 577-590
111. Milner, J., Cook, A.C. (1986): The cellular tumour antigen p53: evidence for transformation-related, immunological variants of p53. *Virology* **154**, 21-30
112. Milner, J., Medcalf, E.A., Cook, A.C. (1991): Tumor suppressor p53: Analysis of wild-type and mutant p53 complexes. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 12-19
113. Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M., Reed, J.C. (1994): Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Nucleic Acid Res.* **29**, 4530-4540
114. Miyashita, T., Reed, J.C. (1995): Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293-299
115. Moll, U.M., Zaika, A. (2001): Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS Lett.* **493**, 65-69
116. Moroni, M.C., Hickman, E.S., Denchi, E.L., Caprara, G., Colli, E., Cecconi, F., Muller, H., Helin, K. (2001): Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat. Cell Biol.* **3**, 552-558
117. Mummenbrauer, T., Janus, F., Müller, B., Wiesmüller, L., Deppert, W., Grosse, F. (1996): p53 protein exhibits 3'-to-5' exonuclease activity. *Cell* **85**, 1089-1099
118. Muzio, M., Chinnayan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., Dixit, V.M. (1998): FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signalling complex. *Cell* **85**, 817-827
119. Nakano, K., Balint, E., Ashcroft, M., Vousden, K.H. (2000): A ribonucleotide reductase gene is a transcriptional target of p53 and p73. *Oncogene* **19**, 4283-4289

120. Nakano, K., Vousden, K.H. (2001): PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell* **7**, 683-694
121. Nomura, M., Shimizu, S., Ito, T., Narita, M., Matsuda, H., Tsujimoto, Y. (1999): Apoptotic cytosol facilitates Bax translocation to mitochondria that involves cytosolic factor regulated by Bcl-2. *Cancer Res.* **59**, 5542-5548
122. Norbury, C.J., Zivrotovsky, B. (2004): DNA damage induced apoptosis. *Oncogene* **23**, 2797-2808
123. Nyberg, K.A., Michelson, R.J., Putnam, C.W., Weinert, T.A. (2002): Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu. Rev. Genet.* **36**, 617-656
124. Oberosler, P., Hloch, P., Ramsperger, U., Stahl, H. (1993): p53-catalyzed annealing of complementary single stranded nucleic acids. *EMBO J.* **12**, 2389-2396
125. Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Remoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., Tanaka, N. (2000): Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* **288**, 1053-1058
126. Ogryzko, V.V., Wong, P., Howard, B.H. (1997): WAF1 retards S-Phase progression primarily by inhibition of cyclin-dependent kinases. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4877-4882
127. Ohki, R., Nemoto, J., Murasawa, H., Oda, E., Inazawa, J., Tanaka, N., Taniguchi, T. (2000): Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *J. Biol. Chem.* **275**, 22627-22630
128. Oren, M. (2003): Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Diff.* **10**, 431-442
129. Orrenius, S., Zivrotovsky, B., Nicotera, P. (2003): Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**, 552-565
130. 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., Radinsky, R. (1995): Wild-type human p53 and a temperature sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 3032-3040
131. Passalaris, T.M., Benanti, J.A., Gewin, L., Kiyone, T., Galloway, D.A. (1999): The G(2) checkpoint is maintained by redundant pathways. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5872-5881
132. Pastorino, J.G., Chen, S.T., Tafani, M., Snyder, J.W., Farber, J.L. (1998): The overexpression of bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* **273**, 7770-7775
133. Paulovich, A.G., Toczyski, D.P., Hartwell, L.H. (1997): When checkpoints fail. *Cell* **88**, 315-321
134. Pelizon, C., d'Adda di Fagagna, F., Farrace, L., Laskey, R.A. (2002): Human replication protein cdc6 is selectively cleaved by caspase 3 during apoptosis. *EMBO Rep.* **3**(8), 780-784
135. Picksley, S.M., Lane, D.P. (1993): The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop – a paradigm for the regulation of growth control by p53? *Bioassays* **15**, 689-690
136. Pingoud, A., Urbanke, C. (1997): Arbeitsmethoden der Biochemie. *De Gruyter*, Berlin.
137. te Poele, R.H., Okorokov, A.L., Jardine, L., Cummings, J., Joel, S.P. (2002): DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **62**, 1876-1883

138. Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, B., Vogelstein, B. (1997): A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**, 300-305
139. Robles, A.I., Bemmels, N.A., Foraker, A.B., Harris, C.C. (2001): APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res.* **61**, 6660-6664
140. Ronen, D., Schwartz, D., Teitz, Y., Goldfinger, N., Rotter, V. (1996): Induction of HL-60 cells to undergo apoptosis is determined by high levels of wild-type p53 protein whereas differentiation of the cells is mediated by lower p53 levels. *Cell Growth Diff.* **7**, 21-30
141. Roninson, I.B. (2003): Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res.* **63**, 2705-2715
142. Rubbi, C.P., Milner, J. (2003): p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *EMBO J.* **22(4)**, 975-986
143. Samuel, T., Weber, H.O., Rauch, P., Verdoodt, B., Eppel, J.T., McShea, A., Hermeking, H., Funk, J.O. (2001): The G2/M regulator 14-3-3 σ prevents apoptosis through sequestration of Bax. *J. Biol. Chem.* **276**, 45201-45206
144. Samuel, T., Weber, H.O., Funk, J.O. (2002): Linking DNA damage to cell cycle checkpoints. *Cell Cycle* **1**, 162-168
145. Sandri, M.I., Isaacs, R.J., Ongkeko, W.M., Harris, A.L., Hickson, I.D., Broggin, M., Vikhanskaya, F. (1996): p53 regulates the minimal promoter of the human topoisomerase II α gene. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4464-4470
146. Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Peter, M.E. (1998): Two CD95 (Apo-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* **17**, 1675-1687
147. Schmitz, I., Walczak, H., Krammer, P.H., Peter, M.E. (1999): Differences between CD95 type I and II cells detected with the CD95 ligand. *Cell Death Differ.* **6**, 821-822
148. Schneider, E., Montenarh, M., Wagner, P. (1998): Regulation of CAK kinase activity by p53. *Oncogene* **17**, 2733-2741
149. Schuler, M., Green, D.R. (2001): Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem. Soc. Trans.* **29(6)**, 684-688
150. Schuler, M., Maurer, U., Goldstein, J.C., Breitenbücher, F., Hoffarth, S., Waterhouse, N.J., Green, D.R. (2003): p53 triggers apoptosis in oncogene-expressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial Bax translocation. *Cell Death Differ.* **10**, 451-460
151. Scorrano, L., Korsmeyer, S. (2003): Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 437-444
152. 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** (4): 626-33
153. Segawa, K., Minowa, A., Sugasawa, K., Takano, T., Hanaoka, F. (1993): Abrogation of p53-mediated transactivation by SV40 large T antigen. *Oncogene* **8**, 543-548

154. Seluanov, A., Gorbunova, V., Falcovitz, A., Sigal, A., Milyavsky, M., Zurer, I., Shohat, G., Goldfinger, N., Rotter, V. (2001): Change of death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1552-1564
155. Shay, J.W., Roninson, I.B. (2004): Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene* **23**, 2919-2933
156. Sheppard, H.M., Corneillie, S.I., Espiritu, C., Gatti, A., Liu, X. (1999): New insights into the mechanism of inhibition of p53 by simian virus 40 large T antigen. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2746-2753
157. Shiloh, Y. (2003): ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 155-168
158. Shmueli, A., Oren, M. (2004): Regulation of p53 by Mdm2: fate is the numbers. *Mol. Cell* **13**, 4-5
159. Smith, M.L., Chen, I.T., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C.Y., Gilmer, T.M., Kastan, M.B., O'Connor, P.M., Fornace, A.J.Jr. (1994): Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* **266**, 1376-1380
160. Smith, M.L., Chen, I.-T., Zhan, Q., O'Connor, P.M., Fornace, A.J. Jr. (1995): Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. *Oncogene* **10**, 1053-1059
161. Smith, M.L., Ford, J.M., Holander, M.C., Bortnick, R.A., Amundson, S.A., Seo, Y.R., Deng, C.X., Hanawalt, P.C., Fornace, A.J. Jr. (2000): p53-mediated DNA repair-responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3705-3714
162. Smith, M.L., Seo, Y.R. (2002): p53 regulation of DNA excision repair pathways. *Mutagenesis* **17**, 149-156
163. Soussi, T., Bérout, C. (2001): Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 233-240
164. Srinivasula, S.M., Hedge, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R.A., Robbins, P.D., Fernandes-Alnemri, T., Huang, Z., Alnemri, E.S. (2001): A conserved XIAP-interacting motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* **410**, 112-116
165. Stambolic, V., MacPherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., Jang, Y., Benchimol, S., Mak, T.W. (2001): Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol. Cell* **8**, 317-325
166. Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Constantini, P., Loeffler, M., Larochette, M., Goodlett, D.R., Aebbersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., Kroemer, G. (1999): Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **397**, 441-446
167. Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y., Nakamura, Y. (2000): A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* **404**, 42-49
168. Taylor, W.R., DePrimo, S.E., Agarwal, A., Agarwal, M.L., Schonthal, A.H., Katula, K.S., Stark, G.R. (1999): Mechanisms of G2 arrest in response to overexpression of p53. *Mol. Biol. Cell* **10**, 3607-3622

169. Taylor, W.R., Stark, G.R. (2001): Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* **20**, 1803-1815
170. Therrien, J-P., Drouin, R., Baril, C., Drobetsky, E.A. (1999): Human cells compromised for p53 function exhibit defective global and transcription-coupled repair, whereas cells compromised for pRb function are defective only in global repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 15038-15043
171. Thoma, T. (1999): Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair. *EMBO J.* **18**, 6585-6598
172. Thornberry, N., Lazebnik, Y. (1998): Caspases: Enemies within. *Science* **281**, 1312-1316
173. Tsujimoto, Y. (2003): Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J. Cell.Physiol.* **195**, 158-167
174. Utrera, R., Collavin, L., Lazarevic, D., Delia, D., Schneider, C. (1998): A novel p53-inducible gene coding for a microtubule-localized protein with G2-phase-specific expression. *EMBO J.* **17**, 5015-5025
175. Vaughan, A.T.M., Betti, C.J., Villalobos, M.J. (2002): Surviving apoptosis. *Apoptosis* **7**, 173-177
176. Vogelbaum, M.A., Tong, J.X., Perugu, R., Gutmann, D.H., Rich, K.M. (1999): Overexpression of bax in human glioma cell lines. *J. Neurosurg.* **91**, 483-489
177. Vogt Sionov, R., Haupt, Y. (1999): The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* **18**, 6145-6157
178. Vojtesek, B., Bartek, J., Midgley, C.A., Lane, D.P. (1992): An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J. Immunol. Methods* **151**, 237-244
179. Vousden, K.H. (2000): p53: Death star. *Cell* **103**, 691-694
180. Vousden, K.H. and Lu, X. (2002): Live or let die: The cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 594-604
181. Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D., Stillman, B. (1994): The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**, 574-578
182. Wagner, A.J., Kokontis, J.M., 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 p21. *Genes Dev.* **8**, 2817-2830
183. Waldman, T., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1995): p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res.* **55**, 5187-5190
184. Wang, Q., Zambetti, G.P., Suttle, D.P. (1997): Inhibition of DNA topoisomerase II alpha gene expression by p53 tumor suppressor. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 389-397
185. Wang, X. (2001): The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* **15**, 2922-2933
186. Wang, X.W., Yeh, H., Schaeffer, R., Roy, R., Moncollin, V., Egly, J.M., Wang, Z., Friedberg, E.C., Evans, M.K., Taffe, B.G., Bohr, V.A., Weeda, G., Hoeijmakers, J.H.J., Forrester, K., Harris, C.C. (1995): p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nat. Genet.* **10**, 188-193

187. Wang, X.W., Zhan, Q., Coursen, J.D., Khan, M.A., Kontny, H.U., Yu, L., Hollander, M.C., O'Connor, P.M., Fornace, A.J. Jr., Harris, C.C. (1999): GADD45 induction of a G2/M cell cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3706-3711
188. Wolter, K.G., Hsu, Y.-T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.-G., Youle, R.J. (1997): Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *J. Cell Biol.* **139**, 1281-1292
189. Wolter, G. (2001): Charakterisierung der Strahlen-induzierten Komplexbildung von DNA Polymerase-Primase alpha mit dem Tumorsuppressorprotein p53. *Dissertation, Universität Hamburg, Fachbereich Medizin*
190. Woo, R.A., Poon, R.Y. (2003): Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. *Cell Cycle* **2**, 316-324
191. Wu, G., Burns, T.F., McDonald, E.R., Jiang, W., Meng, R., Krantz, I.D., Kao, G., Gan, D.D., Zhou, J.Y., Muschel, R., Hamilton, S.R., Spinner, N.B., Markowitz, S., Wu, G., el-Deiry, W.S. (1997): KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat. Genet.* **17**, 141-143
192. Wu, X.W., Bayle, J.H., Olson, D., Levine, A.J. (1993): The p53 mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* **7**, 1126-1132
193. Wyllie, A.H. (1980): Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**, 555-556
194. Xiao, H., Pearson, A., Coulombe, B., Truant, R., Zhang, S., Regier, J.L., Triezenberg, S.J., Reinberg, D., Flores, O., Ingles, C.J., Greenblatt, J. (1994): Binding of basal transcription factor TFIID to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7013-7024
195. Xiong, Y., Hannon, G.J, Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D. (1993): p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701-704
196. Yewdell, J. W., Gannon, J. V. and Lane, D. P. (1986). Monoclonal antibody analysis of p53 expression in normal and transformed cells. *J Virol* **59** (2): 444-52
197. Yu, J., Wang, Z., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Zhang, L. (2003): PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**(4), 1931-1936
198. Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (2001): PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol. Cell* **7**, 673-682
199. Zerrahn, J., Deppert, W., Weidemann, D., Patschinsky, T., Richards, F., Milner, J. (1992): Correlation between the conformational phenotype of p53 and its subcellular location. *Oncogene* **7**, 1371-1381
200. Zhan, Q., Antinore, M.J., Wang, X.W., Carrier, F., Smith, M.L., Harris, C.C., Fornace, A.J. Jr. (1999): Association with cdc2 and inhibition of cdc2/cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein gadd45. *Oncogene* **18**, 2892-2900
201. Zhao, R., Gish, K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffmann, W.H., Tom, E., Mack, D.H., Levine, A.J. (2000): Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev.* **14**, 981-993
202. Zhou, J., Ahn, J., Wilson, S.H., Prives, C. (2001): A role for p53 in base excision repair. *EMBO J.* **20**, 914-923

-
203. Zhu, J., Chen, X. (2000): MCG10, a novel p53 target gene that encodes a KH domain RNA-binding protein, is capable of inducing apoptosis and cell cycle arrest in G(2)-M. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 5602-5618
 204. Ziegler, C. (1998): Der Tumorsuppressor p53 als auxiliäres Onkogen in der Simian Virus 40-induzierten Zelltransformation. *Dissertation, Universität Hamburg, Fachbereich Biologie.*
 205. zur Hausen, H. (2001): Oncogenic DNA viruses. *Oncogene* **20**, 7820-7823
 206. zur Hausen, H. (2002): Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 342-350

Anhang

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Daniel Speidel
Geburtsdaten: 20.07.1973 in Bonn
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1979-1983 Evangelische Grundschule Bonn-Friesdorf
1983-1985 Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium Bonn
1985-1992 Werner-Heisenberg-Gymnasium Garching bei München
Abschluß: Abitur

Studium generale

1992-1993 Leibniz Kolleg Tübingen

Zivildienst

1993-1994 Chirurgische Universitätsklinik Tübingen

Studium

1994-2000 Studium der Biochemie an der Universität Hannover
09/1996 Vordiplom
1998 Forschungspraktikum (2 Monate) am Weizmann Institute of Science Rehovot, Israel (Prof. Dr. Varda Rotter)
07/1999 Diplomprüfungen
1999-2000 Diplomarbeit am Heinrich-Pette-Institut Hamburg (Prof. Dr. Wolfgang Deppert):
„Die Replikationsattenuation als wt p53 abhängige S-Phasen spezifische Reaktion auf UV-induzierte DNA-Schäden“
2000-2004 Doktorarbeit am Heinrich-Pette-Institut Hamburg

Stipendien und Auszeichnungen

1997-2000 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
1999 Förderpreis der Stiftung Familie Klee
Seit 2000 Stipendiat von e-fellows.net

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die hier vorgelegte Dissertation selbständig verfaßt habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie zu Hilfsleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Ferner versichere ich, daß die hier vorgelegte Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hamburg, den 28. Juni 2004

Daniel Speidel

Diese Arbeit entstand in der Zeit von Mai 2000 bis Mai 2004 in der Abteilung Tumorvirologie am Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie Hamburg.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Deppert danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung anzufertigen, für die nicht hoch genug zu schätzende Freiheit ein eigenes Projekt entwickeln und verfolgen zu dürfen und nicht zuletzt für seine tatkräftige Unterstützung.

Bei Herrn Prof. Dr. Walter Müller möchte ich mich herzlich für die Betreuung dieses Promotionsvorhabens von Hannover aus bedanken. Es war gleichermaßen unschätzbar wertvoll wie auch beruhigend, ihn als verlässlichen und stets ansprechbaren Berater im Hintergrund zu wissen und als Referenten dieser Arbeit gewinnen zu können. Sein großartiges Engagement für „seine“ Studenten und auch für diese Arbeit gehört zu den positivsten Erfahrungen, die ich in meiner Studenten- und Doktorandenzeit machen konnte.

Allen Kollegen des Heinrich-Pette-Instituts, die mir ein freundliches und fruchtbares Arbeitsumfeld geschaffen und aufrecht erhalten haben, danke ich herzlich.

In besonderer Weise bin ich dankbar für Freundschaft und die große Unterstützung von Rudolph Reimer und Ella Kim. Auch Heike Helmbold, Nina Heinlein, Martina Hintz-Malchow und Heinz Lothar waren wichtige Menschen, die mir geholfen haben schwierige Situationen zu meistern und den Spaß an der Wissenschaft zu behalten.

Ein besonderes Dankeschön geht an Wolfgang Deppert und Martina Hintz-Malchow für das unglaublich rasante Korrekturlesen dieser Arbeit.

...