

Aus dem Institut für Virologie  
Des Medizinischen Zentrums für Hygiene und Mikrobiologie  
Der Philipps-Universität Marburg  
Leiter: Professor Dr. H.-D. Klenk

Das Tumorsuppressorprotein p53 –  
Rolle bei der  
Induktion von Apoptose  
und  
bei der Replikation von Adenoviren

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Humanmedizin  
(Dr. med.)

dem  
Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Philipp Koch  
aus Münster / Westfalen

Marburg / Lahn 2003

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg  
am 23.04.2003.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Professor Dr. Gerhard Aumüller

Referent: PD Dr. Matthias Dobbstein

Koreffferent: Professor Dr. Martin Eilers

2. Koreffferent: Professor Dr. Rainer Renkawitz

## **Kurzhalt**

<b><u>1</u></b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b><u>1</u></b>
1.1	TUMORSUPPRESSORPROTEINE IN DER REGULATION DES ZELLYKLUS	1
1.2	ADENOVIREN	12
<b><u>2</u></b>	<b><u>MATERIAL</u></b>	<b><u>20</u></b>
2.1	CHEMIKALIEN, GERÄTE	20
2.2	MEDIEN	25
2.3	PUFFER	26
2.4	ANTI-KÖRPER	30
2.5	ENZYME	31
2.6	KITS	32
2.7	VIREN UND EURARYONTENZELLEN	33
2.8	BAKTERIEN	34
2.9	PLASMIDE UND VEKTOREN	34
2.10	OLIGONUKLEOTIDE	35
2.11	IMAGE-KONE	35
<b><u>3</u></b>	<b><u>METHODEN</u></b>	<b><u>37</u></b>
3.1	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	37
3.2	PROTEINCHEMISCHE UND IMMUNOLOGISCHE METHODEN	45
3.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	52
<b><u>4</u></b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b><u>82</u></b>
4.1	CHARAKTERISIERUNG DER PROLIN-REICHEN DOMÄNE DES P53 PROTEINS	82

---

<b>4.2 IDENTIFIZIERUNG WEITERER P53-RESPONSIVER GENE, DIE DURCH P53, ABER NICHT DURCH P53<math>\Delta</math>62-91 INDUZIERT WERDEN</b>	<b>86</b>
<b>4.3 DER EINFLUSS DES P53-STATUS EINER ZELLE AUF DIE ADENOVIRUS-REPLIKATION</b>	<b>103</b>
<b><u>5 DISKUSSION</u></b>	<b><u>112</u></b>
<b>5.1 DIE PROLIN-REICHE DOMÄNE VON P53 KOOPERIERT MIT DER DNA-BINDENDEN DOMÄNE BEI DER INTERAKTION MIT DEM <i>PIG3</i>-PROMOTOR UND DER AKTIVIERUNG VON TRANSKRIPTION</b>	<b>112</b>
<b>5.2 UNTERSCHIEDLICHE AKTIVIERUNG BEKANNTER UND NEUER P53-RESPONSIVER GENE DURCH P53 UND P53<math>\Delta</math>62-91 IN EINEM AUF DIE EXPRESSION DURCH REKOMBINANTE ADENOVIREN BERUHENDEN SYSTEMS</b>	<b>115</b>
<b>5.3 DIE ELIMINATION VON P53 IST NICHT GRUNDLAGE EINER EFFIZIENTEN VIRUSREPLIKATION DES ADENOVIRUS TYP 5</b>	<b>120</b>
<b><u>6 ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b><u>124</u></b>
<b><u>7 ABSTRACT</u></b>	<b><u>126</u></b>
<b><u>8 ANHANG</u></b>	<b><u>128</u></b>
<b>8.1 ABKÜRZUNGEN</b>	<b>128</b>
<b>8.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>129</b>
<b><u>9 LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>131</u></b>

## Inhalt

<b>1</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>TUMORSUPPRESSORPROTEINE IN DER REGULATION DES ZELLZYKLUS</b>	<b>1</b>
1.1.1	DIE PHASEN DES ZELLZYKLUS UND IHRE REGULATION	3
1.1.2	DER PROGRAMMIERTE ZELLTOD (APOPTOSE) UND DER ZELLUNTERGANG (NEKROSE)	4
1.1.3	DAS TUMORSUPPRESSORGENPRODUKT P53 UND SEINE FUNKTION IN DER ZELLE	4
1.1.4	P53 ALS TRANSKRIPTIONSFAKTOR	6
1.1.5	P53-VERMITTELTE APOPTOSE	8
1.1.6	STRUKTUR VON P53	8
1.1.7	EIGENSCHAFTEN DER PROLIN-REICHEN DOMÄNE	10
1.1.8	P53-HOMOLOGE	11
<b>1.2</b>	<b>ADENOVIREN</b>	<b>12</b>
1.2.1	EINTEILUNG DER ADENOVIREN UND GENOMAUFBAU	12
1.2.2	PHASEN DER ADENOVIRUS-REPLIKATION UND ONKOGENESE	13
1.2.3	INTERAKTION DER PROTEINE DES ADENOVIRUS TYP 5 MIT P53, ABER NICHT MIT DEM P53-HOMOLOGEN P73	15
1.2.4	DIE CHIMÄRE P53MT(24-28)	15
1.2.5	DIE ADENOVIRUSVARIANTE DL1520/ ONYX 015 UND IHRE KLINISCHE RELEVANZ	16
1.2.6	MÖGLICHE ANSÄTZE ZUR IDENTIFIZIERUNG DER ROLLE VON P53 BEI DER ADENOVIRUSREPLIKATION	18
<b>2</b>	<b><u>MATERIAL</u></b>	<b>20</b>
<b>2.1</b>	<b>CHEMIKALIEN, GERÄTE</b>	<b>20</b>
<b>2.2</b>	<b>MEDIEN</b>	<b>25</b>
2.2.1	MEDIEN ZUR KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN	25
2.2.2	MEDIEN ZUR KULTIVIERUNG VON ZELLEN	26

---

<b>2.3</b>	<b>PUFFER</b>	<b>26</b>
<b>2.4</b>	<b>ANTIKÖRPER</b>	<b>30</b>
<b>2.5</b>	<b>ENZYME</b>	<b>31</b>
2.5.1	POLYMERASEN	31
2.5.2	RESTRIKTIONSENZYME DER FIRMA NEW ENGLAND LAB	31
<b>2.6</b>	<b>KITS</b>	<b>32</b>
<b>2.7</b>	<b>VIREN UND EURARYONTENZELLEN</b>	<b>33</b>
2.7.1	ADENOVIREN	33
2.7.2	EUKARYONTENZELLEN	34
<b>2.8</b>	<b>BAKTERIEN</b>	<b>34</b>
<b>2.9</b>	<b>PLASMIDE UND VEKTOREN</b>	<b>34</b>
<b>2.10</b>	<b>OLIGONUKLEOTIDE</b>	<b>35</b>
<b>2.11</b>	<b>IMAGE-KONE</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>ZELLBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>37</b>
3.1.1	KULTIVIEREN VON ZELLEN	37
3.1.2	EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN	38
3.1.3	TRANSIENTE TRANSFEKTION VON ZELLEN MIT FUGENE	39
3.1.4	TRANSIENTE TRANSFEKTION MIT LIPOFECTAMIN PLUS	39
3.1.5	HERSTELLUNG CHEMISCH KOMPETENTER BAKTERIENZELLEN	40
3.1.6	TRANSFORMATION KOMPETENTER <i>E. COLI</i> -BAKTERIEN	41
3.1.7	INFEKTION VON ZELLEN MIT ADENOVIREN	42
3.1.8	TITRATION VON VIREN	43
3.1.9	REPLIKATIONSASSAY VON ADENOVIREN	44
<b>3.2</b>	<b>PROTEINCHEMISCHE UND IMMUNOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>45</b>
3.2.1	WESTERN-BLOT ANALYSE	45
3.2.2	IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG (INDIREKT)	49
3.2.3	TUNEL-METHODE ZUR DETEKTION VON APOPTOSE (TdT-MEDIATED X-dUTP NICK END LABELLING)	51
<b>3.3</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>52</b>

---

3.3.1	PLASMID-PRÄPARATION IN KLEINEM MAßSTAB (MINIPRÄPARATION)	52
3.3.2	PLASMID-PRÄPARATION IM GROßEN MAßSTAB (MAXI-PRÄPARATION)	53
3.3.3	AMPLIFIKATION VON DNA DURCH PCR	54
3.3.4	PCR-KOLNIERUNG	56
3.3.5	REINIGUNG VON PCR-FRAGMENTEN	56
3.3.6	RESTRIKTIONSVERDAU VON DNA ZUM AUFFINDEN RICHTIGER KLONE (KONTROLLVERDAU)	57
3.3.7	PRÄPARATIVER RESTRIKTIONSVERDAU VON DNA ZUR ISOLIERUNG GROßER MENGEN EINES GESCHNITTENEN DNA- FRAGMENTS	58
3.3.8	DEPHOSPHORYLIERUNG MIT ALKALISCHER PHOSPHATASE	58
3.3.9	ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON DNA-FRAGMENTEN IM AGAROSEGEL	59
3.3.10	ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN	60
3.3.11	LIGATION VON DNA	60
3.3.12	FÄLLEN VON DNA	61
3.3.13	GERICHTETE MUTAGENESE (QUICKCHANGE)	62
3.3.14	SEQUENZIEREN VON DNA	63
3.3.15	HERSTELLUNG EINES SEQUENZIERGELES	65
3.3.16	PRÄPARATION VON DNA AUS VIREN (QIAMP DNA MINI KIT)	66
3.3.17	LUCIFERASE-ASSAY	66
3.3.18	ISOLIERUNG VON RNA MIT TRIZOL	68
3.3.19	DNASE BEHANDLUNG	69
3.3.20	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG DER RNA	70
3.3.21	NORTHERN-BLOT ANALYSE	70
3.3.22	HERSTELLUNG VON SONDEN AUS IMAGE-KLONEN	74
3.3.23	HERSTELLUNG REKOMBINANTER ADENOVIREN MIT DEM ADEASY-SYSTEM	74
3.3.24	CLONTECH CDNA-ARRAYS	78
<b>4</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b>82</b>

<b>4.1</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG DER PROLIN-REICHEN DOMÄNE DES P53-PROTEINS</b>	<b>82</b>
------------	---	-----------

---

4.1.1	DIE PROLIN-REICHE DOMÄNE DES P53-HOMOLOGEN P73 $\beta$ HAT KEINE FUNKTION BEI DER AKTIVIERUNG DES <i>PIG3</i> -PROMOTORS	82
4.1.2	DIE PROLIN-REICHE REGION VON P73 $\beta$ KANN DIE FUNKTION DER PROLIN-REICHEN REGION VON P53 NICHT ERSETZTEN	83
4.1.3	MUTATIONEN IN DER ZENTRALEN DOMÄNE VON P53 FÜHREN ZU FUNKTIONELLEN DEFEKTEN WIE BEI P53 $\Delta$ 62-91	84
4.1.4	DIE P53 MUTANTE M246I IST WIE P53 $\Delta$ 62-91 NICHT MEHR IN DER LAGE APOPTOSE ZU INDUZIEREN	85
<b>4.2</b>	<b>IDENTIFIZIERUNG WEITERER P53-RESPONSIVER GENE, DIE DURCH P53, ABER NICHT DURCH P53<math>\Delta</math>62-91 INDUZIERT WERDEN</b>	<b>86</b>
4.2.1	ERSTELLUNG VON REKOMBINANTEN ADENOVIREN ZUR EXPRESSION VON P53, P53 $\Delta$ 62-91 UND GFP („GREEN FLUORESCENT PROTEIN“)	87
4.2.2	DIE REKOMBINANTEN ADENOVIREN EXPRIEMEN P53 BZW. P53 $\Delta$ 62-91 IN P53-NEGATIVEN ZELLEN	88
4.2.3	DIE DURCH DIE REKOMBINANTEN ADENOVIREN ADP53 UND ADP53 $\Delta$ 62-91 EXPRIEMTEN PROTEINE AKTIVIEREN DIE RESPONSIVEN PROMOTOREN VON <i>MDM2</i> UND <i>PIG3</i>	90
4.2.4	DEUTLICHE INDUKTION VON <i>P21/WAF1</i> -RNA DURCH INFEKTION MIT REKOMBINANTEN ADENOVIRUSKONSTRUKTEN	91
4.2.5	NACHWEIS DER M-RNA VON P53 UND DEN BEKANNTEN P53-RESPONSIVEN GENEN <i>P21/WAF1</i> UND <i>PIG3</i>	93
4.2.6	HYBRIDIDIERUNG VON CDNA-ARRAYS (CLONTECH).	95
4.2.7	AUSWERTUNG DER ARRAYS.	98
4.2.8	BETRACHTUNG DER AUSGEWÄHLTEN VON P53 UND P53 $\Delta$ 62-91 IM CDNA-ARRAY DIFFERENTIELL INDUZIERTEN GENE IN NORTHERN-BLOT ANALYSEN.	101
4.2.9	KONTROLLE DER ERGEBNISSE DER NORTHERN-BLOT ANALYSEN VON ERCC1 MIT UNTERSCHIEDLICHEN SONDEN.	103
<b>4.3</b>	<b>DER EINFLUSS DES P53-STATUS EINER ZELLE AUF DIE ADENOVIRUS-REPLIKATION</b>	<b>103</b>
4.3.1	HERSTELLUNG EINES REKOMBINANTEN ADENOVIRUS ADP53MT24-28 MIT DEM ADEASY SYSTEM	104



---

4.3.2	DAS VOM REKOMBINANTEN ADENOVIRUS EXPRIMIERTES P53 <sup>MT24-28</sup> IST TRANSKRIPTIONELL AKTIV UND WIRD NICHT VOM WILDTYP-ADENOVIRUS WTD DESTABILISIERT	105
4.3.3	DER P53-STATUS HAT KEINEN EINFLUSS AUF DIE REPLIKATION VON WILDTYP-ADENOVIRUS WTD	107
4.3.4	P53 UND P53 <sup>MT24-28</sup> ZEIGEN KEINEN EINFLUSS AUF DIE REPLIKATION VON DL1520/ONYX 015	108
4.3.5	SOWOHL H1299-ZELLEN ALS AUCH HUVECS EXPRIMIEREN DEN MDM2-REGULATOR P14ARF.	110
<b>5</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>112</b>
5.1	DIE PROLIN-REICHE DOMÄNE VON P53 KOOPERIERT MIT DER DNA-BINDENDEN DOMÄNE BEI DER INTERAKTION MIT DEM <i>PIG3</i> -PROMOTOR UND DER AKTIVIERUNG VON TRANSKRIPTION	112
5.2	UNTERSCHIEDLICHE AKTIVIERUNG BEKANNTER UND NEUER P53-RESPONSIVER GENE DURCH P53 UND P53 $\Delta$ 62-91 IN EINEM AUF DIE EXPRESSION DURCH REKOMBINANTE ADENOVIREN BERUHENDEN SYSTEMS	115
5.3	DIE ELIMINATION VON P53 IST NICHT GRUNDLAGE EINER EFFIZIENTEN VIRUSREPLIKATION DES ADENOVIRUS TYP 5	120
<b>6</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b>124</b>
<b>7</b>	<b><u>ABSTRACT</u></b>	<b>126</b>
<b>8</b>	<b><u>ANHANG</u></b>	<b>128</b>
8.1	ABKÜRZUNGEN	128
8.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	129
<b>9</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b>131</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Tumorsuppressorproteine in der Regulation des Zellzyklus

Die Regulation des Zellwachstums erfolgt durch das Zusammenwirken verschiedener zellulärer Faktoren. Bei der Untersuchung dieser Regulationsmechanismen stand zunächst die Funktion der Produkte von sogenannten Onkogenen – entsprechend als Onkoproteine bezeichnet – im Mittelpunkt. Onkogene können bei Überexpression oder Mutation das Zellwachstum stimulieren, und dies kann die maligne Entartung der Zelle zur Folge haben. Dieses Konzept ist auch heute noch weitestgehend gültig, es bedarf jedoch einiger wichtiger Ergänzungen. So wurden neben den Onkogenen, welche das Zellwachstum stimulieren, auch Faktoren in den Zellen gefunden, welche die Zellproliferation bremsen. Werden diese wachstumsverlangsamenden Faktoren nicht mehr in ausreichender Menge oder in durch Mutationen entstandener, falsch gefalteter Form produziert, so kann ebenfalls maligne Entartung die Folge sein. Man spricht deshalb auch von Tumorsuppressorgenen und entsprechend von Tumorsuppressorproteinen (Hinds and Weinberg, 1994; Knudson, 1993).

Heute unterscheidet man insgesamt sechs wichtige Mechanismen bei der Entstehung maligner Tumoren (Hanahan and Weinberg, 2000). Diese sind außer der bereits beschriebenen Veränderungen der Zellwachstumsregulation die Fähigkeit zur Invasion von Gewebe und Metastasierung, die Fähigkeit zur unlimitierten Vermehrung, die pro-angiogenetische Funktion und die Fähigkeit, Sensoren und Effektoren der Apoptose zu beeinflussen (Abbildung 1.1). Bei den meisten der heute bekannten Tumoren können funktionelle Veränderungen aus jeder dieser Gruppe nachgewiesen werden, auch wenn die individuellen Strategien im Einzelfall sehr unterschiedlich sein können.

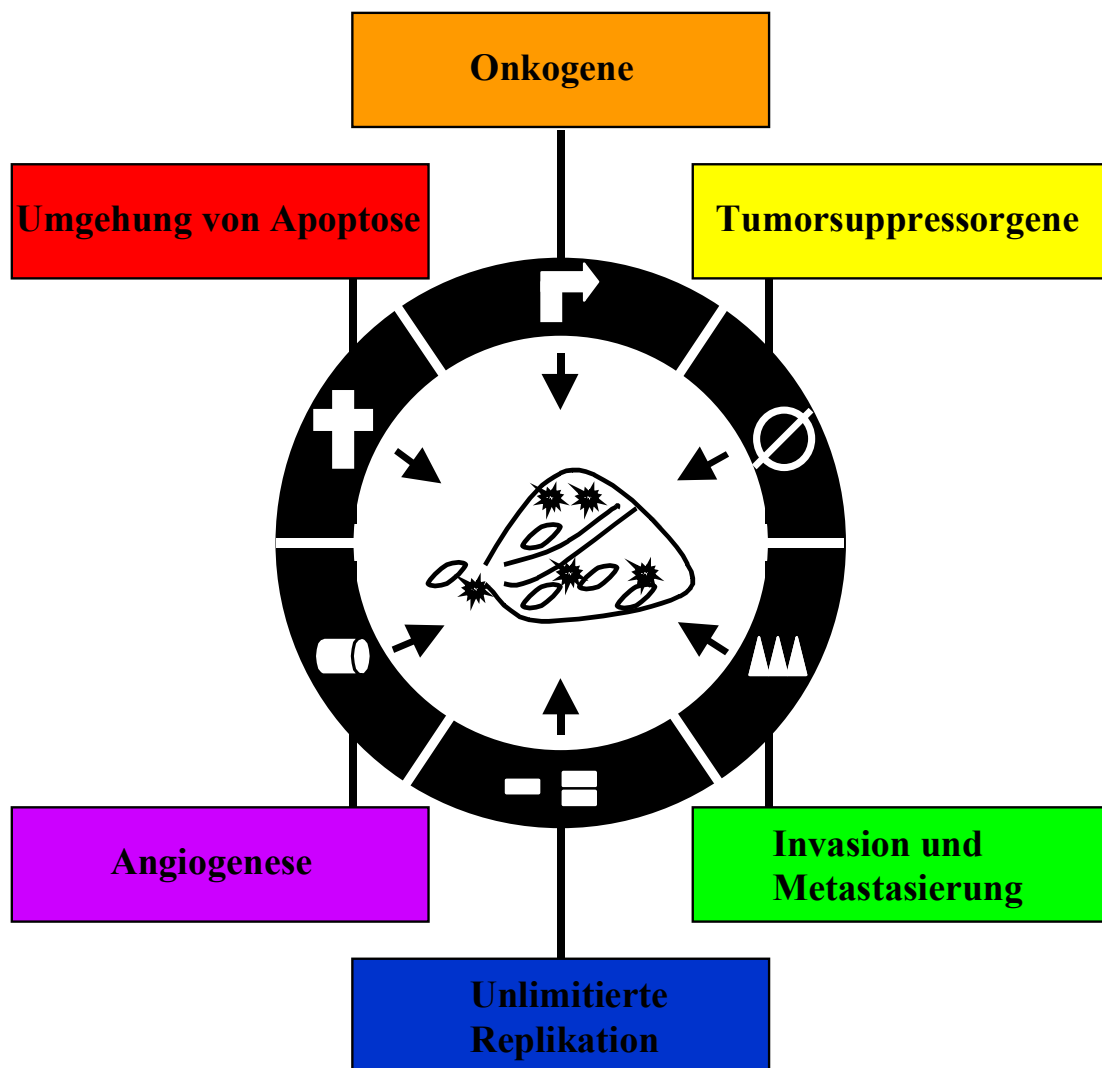


Abbildung 1.1: Mechanismen bei der Entstehung von malignen Tumoren (Hanahan and Weinberg, 2000).

### 1.1.1 Die Phasen des Zellzyklus und ihre Regulation

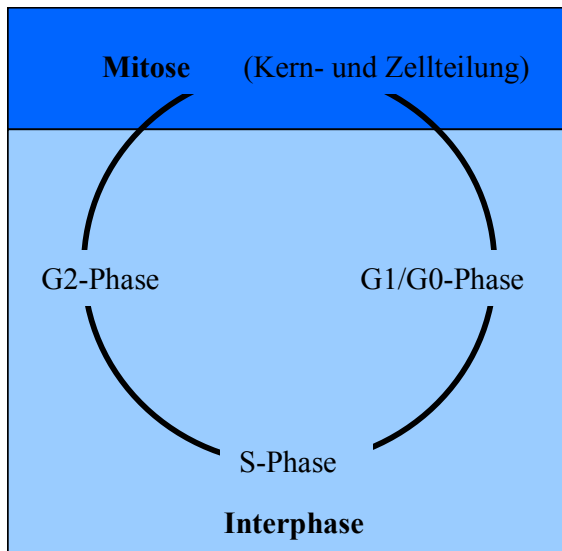


Abbildung 1.2: Phasen des Mitosezyklus.

Die Proliferation der Zellen folgt einem geordneten Ablauf von Ereignissen, den man als Zellzyklus bezeichnet. Man unterscheidet hierbei die Phasen G<sub>0</sub>/ G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> und M. G<sub>0</sub> bezeichnet den Zustand der ruhenden, nicht proliferierenden Zelle. In der Phase G<sub>1</sub> weisen die Zellen einen DNA-Gehalt von 2n auf. Die S-Phase ist die Phase der Replikation. Hier wird der DNA-Gehalt der Zelle verdoppelt, so dass in der darauffolgenden G<sub>2</sub>-Phase ein DNA-

Gehalt von 4n vorliegt. Während der M-Phase erfolgt die Teilung der Zelle (Mitose), in der das Erbgut gleichmäßig auf beide Tochterzellen verteilt wird, so dass die Zellen in der sich anschließenden G<sub>1</sub> Phase wieder den DNA-Gehalt von 2n besitzen. Von besonderer Bedeutung ist der Übergang von der G<sub>1</sub>-Phase in die S-Phase. Hier ist ein direkter Angriffspunkt für viele Onkoproteine und Tumorsuppressorgene. Sowohl Proteine der Rb-Familie (pRb, p130, p170)(Rb = Retinoblastom), als auch p53, können den Übergang des Zellzyklus in die S-Phase verhindern (Funk *et al.*, 1997; Levine, 1997). Während p53 selbst als Transkriptionsfaktor wirkt, regulieren die Rb-Proteine die Aktivität der E2F-Familie, die ihrerseits Transkriptionsfaktoren sind, und wirken so indirekt auf Transkription (Bagchi *et al.*, 1991; Kaelin *et al.*, 1992; Shirodkar *et al.*, 1992).

### 1.1.2 Der programmierte Zelltod (Apoptose) und der Zelluntergang (Nekrose)

Die Nekrose (metabolischer Zelltod) ist ein pathologischer Prozess, der durch irreparable Schädigung der Zelle durch physikalischen oder chemischen Stress ausgelöst wird. Es kommt hier zum frühen Verlust der Membranintegrität. Nekrotische Prozesse entstehen *in vivo* zum Beispiel bei Durchblutungsstörungen oder metabolischen Mangelsituationen und gehen häufig mit einer inflammatorischen Begleitreaktion einher.

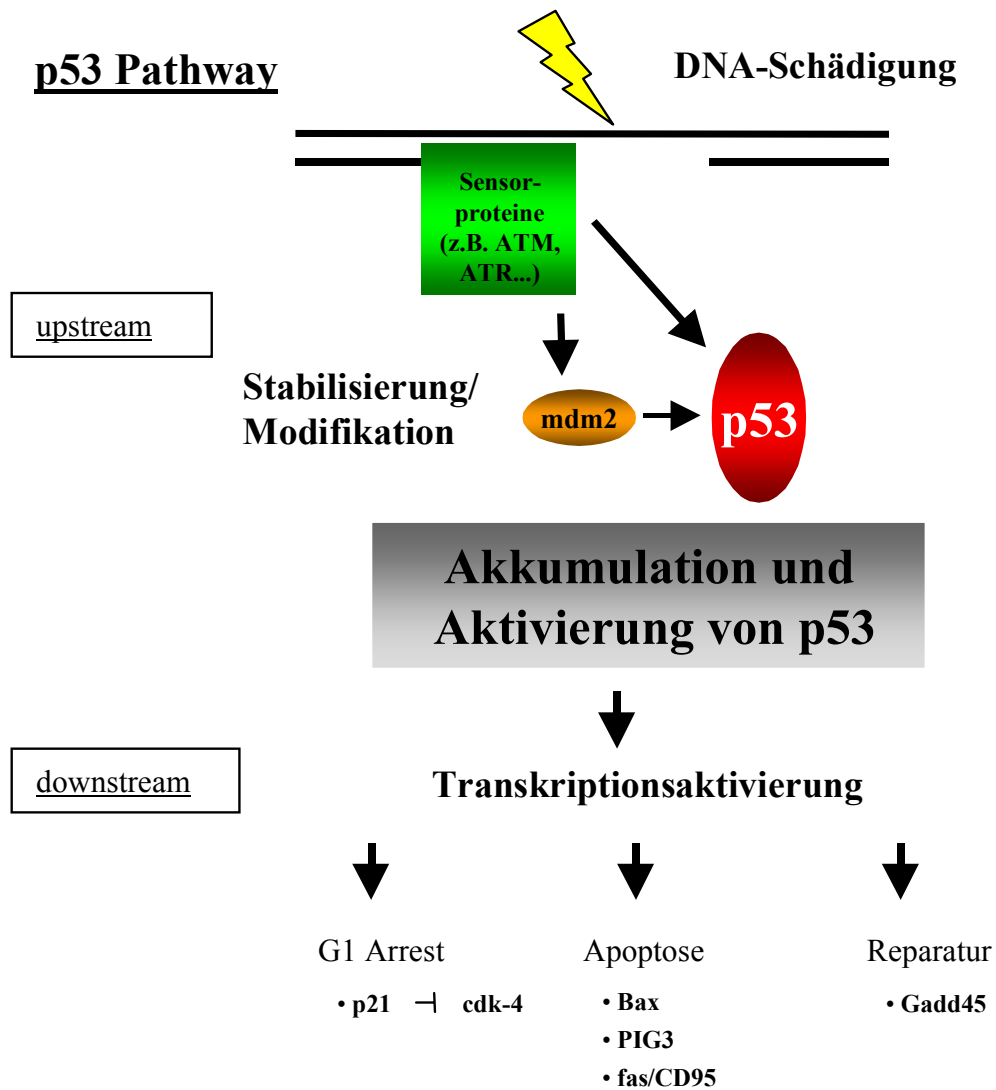
Die Apoptose (programmierter Zelltod) ist dagegen ein physiologischer Prozess, bei dem unerwünschte und nutzlos gewordene Zellen aus dem Organismus entfernt werden. Hierbei kommt es erst zu einem späteren Zeitpunkt zu einem Verlust der Membranintegrität (sekundäre Nekrose). Charakteristische morphologische und biochemische Merkmale apoptotischer Zellen beinhalten die Aggregation des Chromatins und die Aufteilung des Zellkerns und des Zytoplasmas in membrangebundene Vesikel (apoptotic bodies), welche Ribosomen, Mitochondrien und Zellkernbestandteile enthalten. Im Organismus fehlt häufig die entzündliche Begleitreaktion, die man bei der Nekrose findet, da die apoptotischen Einschlusskörper schnell phagozytiert und abgebaut werden. Die Funktion der Apoptose liegt unter anderem in der normalen Gewebserneuerung, der Selektion im Immunsystem (T-Lymphozyten des Thymus), dem Untergang von Geweben in der Entwicklung und der Beseitigung von Zellen als Reaktion auf DNA-Schädigung, Hypoxie oder virale Infekte.

### 1.1.3 Das Tumorsuppressorgenprodukt p53 und seine Funktion in der Zelle

1979 wurde erstmals das mit dem SV 40-T-Antigen assoziierte Protein p53 in SV-40 transformierten Zellen beschrieben. Das *p53*-Gen ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 17(17p12) kartiert, einem der häufigsten Abschnitte mit *loss of heterozygosity* bei einer Reihe verschiedener Tumoren. Die Tatsache, dass *p53* in über 50% aller menschlichen Tumoren mutiert und somit nicht mehr funktionstüchtig ist,

unterstreicht dessen zentrale Funktion in der Onkogenese. Inzwischen bestehen große Datensätze mit über 50 verschiedenen Zelltypen, die Mutationen des *p53* tragen (Hollstein *et al.*, 1994; Hollstein *et al.*, 1991). Meist besteht die Mutation von *p53* nur im Austausch eines einzigen Basenpaars (entsprechend einer einzigen Aminosäure im *p53*-Protein). Hierdurch verliert *p53* seine eigentliche Funktion und gewinnt zum Teil die Funktion eines Onkogens, welches seinerseits zur Tumorgenese beiträgt (Dittmer *et al.*, 1993; Vousden, 2000). *p53* unterliegt einem negativen Rückkopplungsmechanismus mit dem vom ihm induzierten Gen *mdm2*. Dieser Rückkopplungsmechanismus, durch den das *mdm2*-Protein die Expression von Wildtyp-*p53* reguliert, funktioniert bei mutiertem *p53* nicht mehr. Es kommt zu Akkumulation von mutiertem *p53* in den Zellen.

*p53* übernimmt in der Zelle die Funktion eines Sensors für Schäden der zellulären DNA (genotoxischer Stress), wie sie zum Beispiel durch ultraviolette Strahlen oder auch durch Chemotherapeutika hervorgerufen werden (Lowe *et al.*, 1993; Symonds *et al.*, 1994). Hier interagiert *p53* mit weiteren Proteinen, die DNA-Schäden erkennen, wie zum Beispiel mit dem bei der Erbkrankheit *Ataxia telangiectasia* mutierten ATM-Protein. So kommt es zum Beispiel nach Aktivierung des ATM-Proteins zur Phosphorylierung des *p53*-Antagonisten *mdm2*, welcher so in seiner Aktivität verändert wird. (Ashcroft *et al.*, 2000; Kastan *et al.*, 1992; Khosravi *et al.*, 1999). Eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von *p53* kann zweierlei verschiedene Auswirkungen haben. Zum einen bleiben die betroffenen Zellen in der G1 oder G2 Phase des Zellzyklus stehen, um eine Reparatur der Schäden zu ermöglichen. Ist dieses nicht möglich, so kommt es zur Induktion von Apoptose, um eine weitere Vermehrung der Zellen mit genetischen Defekten zu verhindern (Abbildung 1.3).



**Abbildung 1.3: Der p53-Pathway.** Kommt es zu einer Schädigung der DNA, wird p53 unmittelbar oder mittelbar durch Sensorproteine (z.B. ATM, ATG) aktiviert. Es kommt zur Akkumulation und Aktivierung von p53 in der Zelle. Seine Funktion vermittelt p53 durch Aktivierung p53-responsiver Gene. Diese Gene sind spezifisch und entsprechen den einzelnen Funktionen von p53 im Organismus (G1-Arrest, Apoptose und/oder Reparatur).

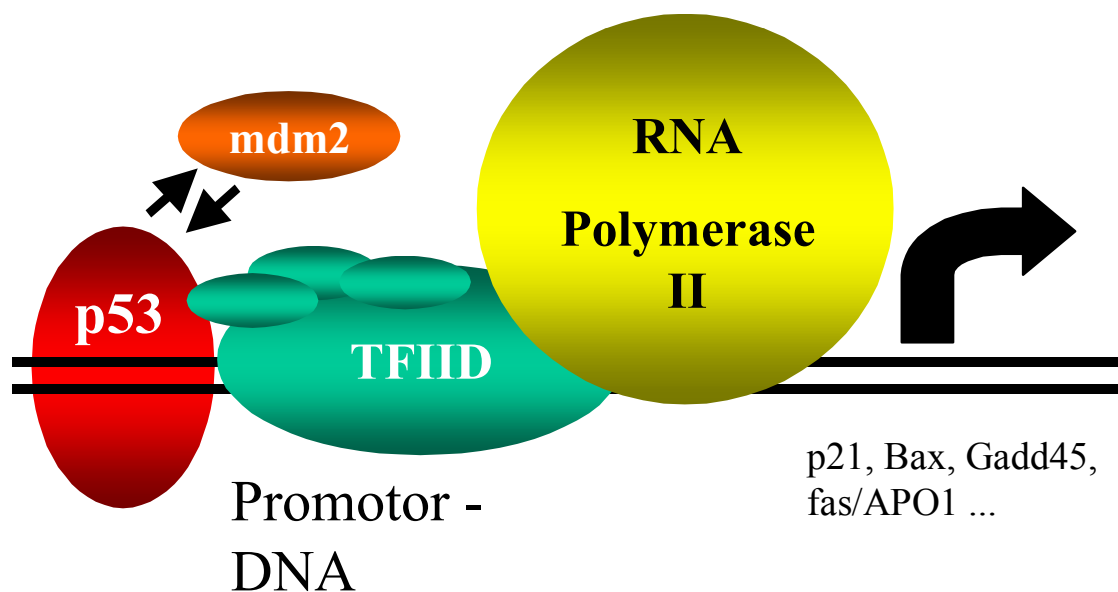
### 1.1.4 p53 als Transkriptionsfaktor

Den größten Teil seiner Funktionen vermittelt p53 offenbar dadurch, dass es als Transkriptionsfaktor die Expression verschiedener Gene beeinflusst (Pietenpol *et al.*,



1994; Yew and Berk, 1992). Dies geschieht dadurch, dass p53 mit dem zentralen Teil des Proteins ein spezifisches Element in der DNA verschiedener Promotoren erkennt und an diese bindet. Die Tetramerisierung von p53-Molekülen ermöglicht dabei eine kooperative Bindung an die DNA. Anschließend kann p53 Faktoren der Transkriptions-Initiation an den Promotor herantitrieren (z.B. TFIID) und die Transkription der entsprechenden Gene wird aktiviert. Inzwischen sind eine Reihe von Genen bekannt, die von p53 induziert werden (Levine, 1997; Vogelstein *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2000). In die Klasse der apoptose-induzierenden Gene gehören *fas*, *PIG3*, *bax*, *NOXA*, und *DR5/ Killer*. Zur Zellzyklusregulation gehören *p21/ WAF1/ Cip1* (Inhibitor der CDK4) und *Reprimo*. p53 induziert jedoch auch Gene, die möglicherweise eine Funktion bei der DNA-Reparatur haben, wie das *GADD45* (Abbildung 1.4).

## p53 - transkriptionelle Regulation



**Abbildung 1.4: p53 als Transkriptionsfaktor.** p53 bindet innerhalb von Promotorbereichen an die DNA und rekrutiert den Transkriptionsinitiationskomplex an den Promotor. Der Transkriptionsinitiationskomplex TFIID besteht aus mehreren Proteinen; hierzu gehören u. a. das TATA-bindene Protein und TBP-assoziierte Faktoren (TAF). p53 bindet mit seiner N-terminalen Domäne an diese TAF-Untereinheiten des Komplexes. Der TFIID-Transkriptionsinitiationskomplex titriert seinerseits die RNA-Polymerase II an die DNA, so dass die Transkription p53-responsiver Gene initiiert werden kann. Ein responsives Gen ist das Regulatorprotein mdm2, welches p53 in einer negativen Feedback-Schleife kontrolliert.

### 1.1.5 p53-vermittelte Apoptose

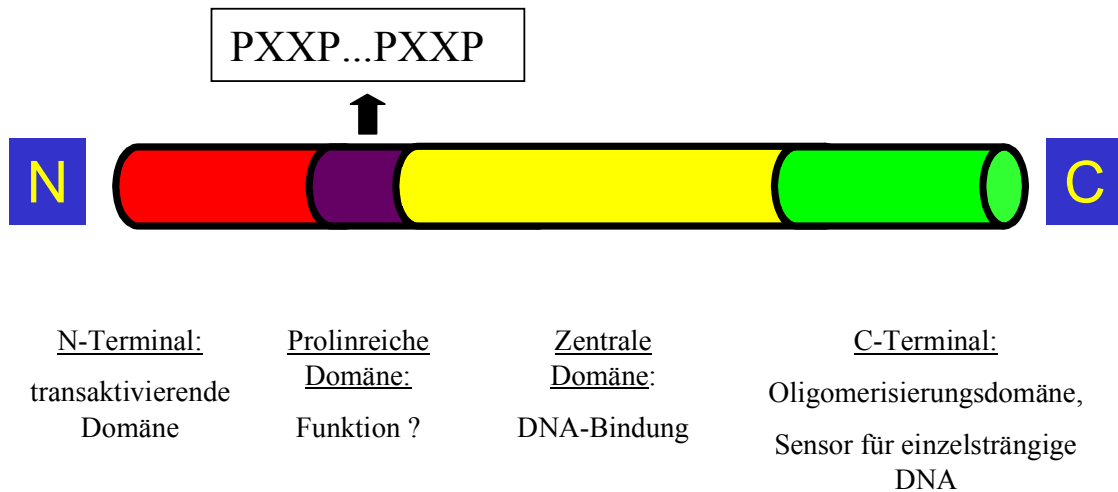
Es gibt mehrere Modelle für die p53-vermittelte Apoptose. Dementsprechend sind auch mehrere p53-responsive Gene bekannt, die vermutlich Apoptose induzieren. Ein solches Modell basiert auf der Tatsache, dass Gene der PIG-Klasse (PIG = p53 induced gene) die intrazelluläre Ansammlung von sogenannten ROS (ROS = reactive oxygen species) katalysieren, welche als freie Radikale die Zelle schädigen und Apoptose auslösen könnten (Polyak *et al.*, 1997). Ebenso wird aber auch der fas-Rezeptor von p53 induziert (Muller *et al.*, 1998). Hier kann es durch Bindung des fas-Liganden oder durch Polymerisierung der Rezeptoren zur Induktion von Apoptose kommen, wobei Caspasen aktiviert werden. Weitere bekannte p53-responsive Apoptose-Induktoren sind bax, DR5/ Killer oder IGF-BP3. Das bax-Protein perforiert mitochondriale Membranen und induziert Apoptose durch die Freisetzung von Zytochrom C. Es gibt aber inzwischen auch Hinweise, dass es transkriptions-unabhängige Wege geben könnte, mit denen p53 Apoptose vermittelt. So gehen zum Beispiel HeLa-Zellen in Apoptose, wenn man die Aminosäuren 1-214 von p53 exprimiert. Dieses Konstrukt ist aber weder in der Lage, an DNA zu binden, noch kann es Transkription aktivieren (Haupt *et al.*, 1995). Ähnlich verhält sich p53, wenn man die Aminosäuren an den Stellen 22 und 23 der Transaktivierungsdomäne mutiert (Lin *et al.*, 1995). Dieses weist auf eine Funktion von p53 hin, die über direkte Protein-Protein Interaktionen funktionieren könnte.

### 1.1.6 Struktur von p53

p53 ist ein 393 Aminosäuren umfassendes Protein, welches sich in 4 funktionelle Domänen unterteilen lässt (Abbildung 1.5). Die ersten 61 Aminosäuren bilden den N-Terminus, welcher die transkriptions-aktivierende Domäne enthält. Hier wurden insbesondere die Aminosäuren F19, L22 und W23 als die für die Transaktivierung essentiellen identifiziert (Lin *et al.*, 1995). Diese Aminosäuren binden an TAF<sub>II</sub>70 und TAF<sub>II</sub>31, welche Untereinheiten des TFIIDs sind (Lu and Levine, 1995; Thut *et al.*,

1995). Die sequenz-spezifische DNA-bindende Domäne von p53 befindet sich zwischen Aminosäuren 102 und 292. Diese zentrale Domäne vermittelt durch seine spezielle Faltung die Bindung an die DNA p53-responsiver Gene. Hier gibt es zwei Arten von Mutationen, welche die Interaktion dieser Domäne mit der DNA stören. Punktmutationen, wie in den Aminosäuren R248 und R273, sind die am häufigsten gefundenen Mutationen des *p53*-Gens. Aus ihnen resultieren Defekte in der Bindung mit der DNA des p53-responsiven Elementes und somit die Unfähigkeit als Transkriptionsfaktor zu funktionieren. Eine weitere Klasse von p53-Mutationen verändern p53 in seiner Struktur. Auch diese Mutationen führen zu einem funktionslosen p53-Protein. Die C-terminale Domäne von p53, von Aminosäure 294 bis 393, vermittelt die Oligomerisierung des Proteins und die Bindung an einzelsträngige DNA und somit möglicherweise die Sensor-Funktion des Proteins (Lee *et al.*, 1995). Sowohl N- als auch C-Terminus des p53-Proteins unterliegen posttranslationalen Modifikationen, wie zum Beispiel Phosphorylierung (Meek, 1998) und Acetylierung (Gu and Roeder, 1997), welche Einfluss auf die Funktion von p53 haben. Zusätzlich gibt es eine weitere Domäne (Aminosäuren 62-91), welche wegen ihres hohen Gehalts an Prolin deskriptiv die prolin-reiche Domäne genannt wird. Es ist noch unklar, ob diese Domäne eine eigene Funktion beinhaltet. Basierend auf dem sich wiederholenden Motiv Prolin-X-X-Prolin könnte es sich um eine SH<sub>3</sub>-Bindungsstelle handeln. Diese SH<sub>3</sub>-Motive werden oft auf Signal-Transduktions-Faktoren gefunden (Ruaro *et al.*, 1997; Sakamuro *et al.*, 1997; Walker and Levine, 1996).

## Das Tumorsuppressorprotein p53

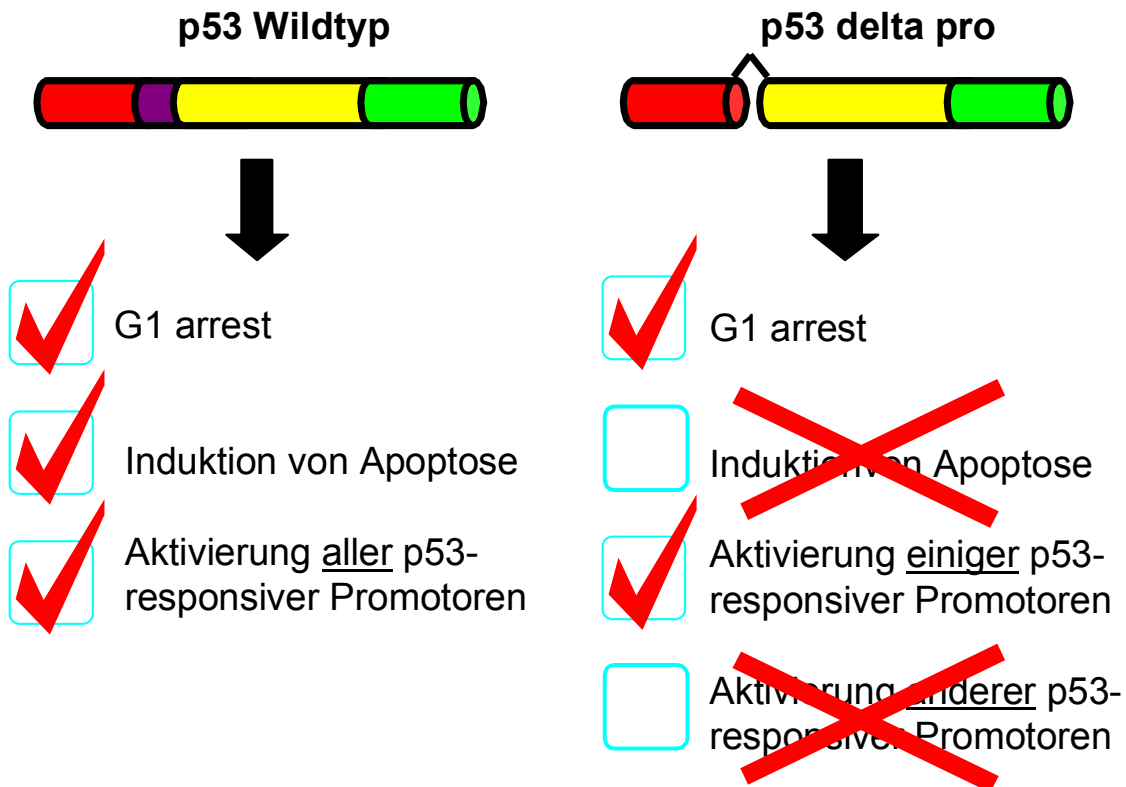


**Abbildung 1.5: Struktur des Tumorsuppressorproteins p53.** p53 ist ein 393 Aminosäuren großes Protein, bei dem 4 Domänen unterschieden werden können. Neben der N-terminalen transaktivierenden, der zentralen DNA-bindenden und der C-terminalen Oligomerisierungs- und Sensordomäne, gibt es noch eine 4. Domäne, die durch ihren hohen Gehalt an Prolinen auffällt. Die Funktion dieser Domäne ist nicht endgültig geklärt.

### 1.1.7 Eigenschaften der prolin-reichen Domäne

Um die Funktion der prolin-reichen Domäne zu klären, wurde eine Mutante betrachtet, bei der diese Domäne (AS 62-91) deletiert ist (p53 $\Delta$ 62-91). Diese Mutante ist wie Wildtyp-p53 weiterhin in der Lage, die Zellen in der G1-Phase zu arretieren, ihr fehlt aber die Funktion der Apoptoseinduktion (Sakamuro *et al.*, 1997; Walker and Levine, 1996). Die Unfähigkeit, Apoptose zu induzieren, korreliert mit einem selektiven Defekt bei der Transaktivierung p53-responsiver Promotoren (Abbildung 1.6). Während der *mdm2*-Promotor und der *p21/ Waf1*-Promotor sowohl von Wildtyp-p53, als auch von p53 $\Delta$ 62-91 gleich gut aktiviert wird, ist die Mutante nicht in der Lage, einen transient transfizierten *PIG3*-Promotor (Venot *et al.*, 1998) und die Expression von endogenen *PIG3*, *PIG6* und *PIG11* (PIG = „p53 induced gene“) zu aktivieren (Zhu *et al.*, 1999).

Diese Korrelation unterstützt auch die Annahme, dass die PIGs Mediatoren der p53-vermittelten Apoptose sind.



**Abbildung 1.6: Eigenschaften der Deletionsmutante p53 $\Delta$ 61-92.** Obwohl p53 $\Delta$ 61-92 den G1-Arrest mit gleicher Effizienz induziert wie Wildtyp-p53, ist diese Mutante nicht mehr in der Lage, die Funktion der Apoptoseinduktion auszuüben. Dieser Funktionsdefizit spiegelt sich auf Promotorebene wieder. Obwohl p53 $\Delta$ 61-92 viele bekannte p53-responsive Promotoren gleich gut aktiviert, gibt es auch Promotoren, die von p53 $\Delta$ 61-92 nicht mehr aktiviert werden.

### 1.1.8 p53-Homologe

Seit einiger Zeit sind in Säugetierzellen Genprodukte bekannt, die starke Homologie mit p53 aufweisen. Als erstes Homolog wurde p73 (Kaghad *et al.*, 1997) beschrieben, welches auf dem kurzen Arm des Chromosoms 1 (1p36) lokalisiert ist. Von einer der alternativen Splice-Formen dieses Homologs, p73 $\beta$  genannt, ist bekannt, dass es p53-

responsive Promotoren mit im Vergleich zu p53 gleicher oder sogar besserer Effizienz aktiviert (Jost *et al.*, 1997; Kaghad *et al.*, 1997). Auch p73 besitzt eine prolin-reiche Region in analoger Position zum p53-Protein (Yang *et al.*, 1998).

## 1.2 Adenoviren

### 1.2.1 Einteilung der Adenoviren und Genomaufbau

Es sind heute über 40 verschiedene Adenovirustypen bekannt (Tabelle 1.7). Adenoviren sind 80-110 nm große, nicht membranumhüllte DNA-Viren. Ihre Capside sind ikosaedrisch aufgebaut. Das aus doppelsträngiger, linearer DNA bestehende Adenovirusgenom umfasst, je nach Typ, 36.000 – 38.000 Basenpaare und besteht aus 5 kodierenden Bereichen, von denen 4 in der frühen Phase der Infektion exprimiert werden (E1-E4). Die viralen Strukturproteine (L1) werden dann in einer späteren Phase exprimiert (Chow *et al.*, 1977; Shenk, 1996). Adenoviren verursachen hauptsächlich Erkrankungen der Atemwege, des Gastrointestinaltraktes und der Bindehäute des Auges. Bereits 1962 zeigten J.J. Tretin und Mitarbeiter, dass das humane Adenovirus Typ 12 bei Nagetieren maligne Tumorerkrankungen hervorrufen kann. Eine Evidenz, dass Adenoviren auch bei Menschen onkogenes Potential haben, liegt nicht vor.

<u>Subtypus</u>	<u>Virustypen</u>	<u>Zielorgane</u>	<u>Onkogenes Potential in Nagetieren</u>
<b>A</b>	<b>12,18,31</b>	<b>Gastrointestinaltrakt</b>	<b>hoch</b>
<b>B</b>	<b>3,7,11,14 16,21,34,35</b>	<b>Lunge,Pharynx, Bindehaut</b>	<b>mäßig</b>
<b>C</b>	<b>1,2,5,6</b>	<b>Pharynx</b>	<b>sehr niedrig</b>
<b>D</b>	<b>8.9.11.13.15 17,19,20,22-30, 32,33,36-39, 42-47</b>	<b>Bindehaut</b>	<b>sehr niedrig</b>
<b>E</b>	<b>4</b>	<b>Respirationstrakt</b>	<b>sehr niedrig</b>
<b>F</b>	<b>40,41</b>	<b>Gastrointestinaltrakt</b>	<b>sehr niedrig</b>

Tabelle 1.7: Einteilung der Mastadenoviren (nach Shenk).

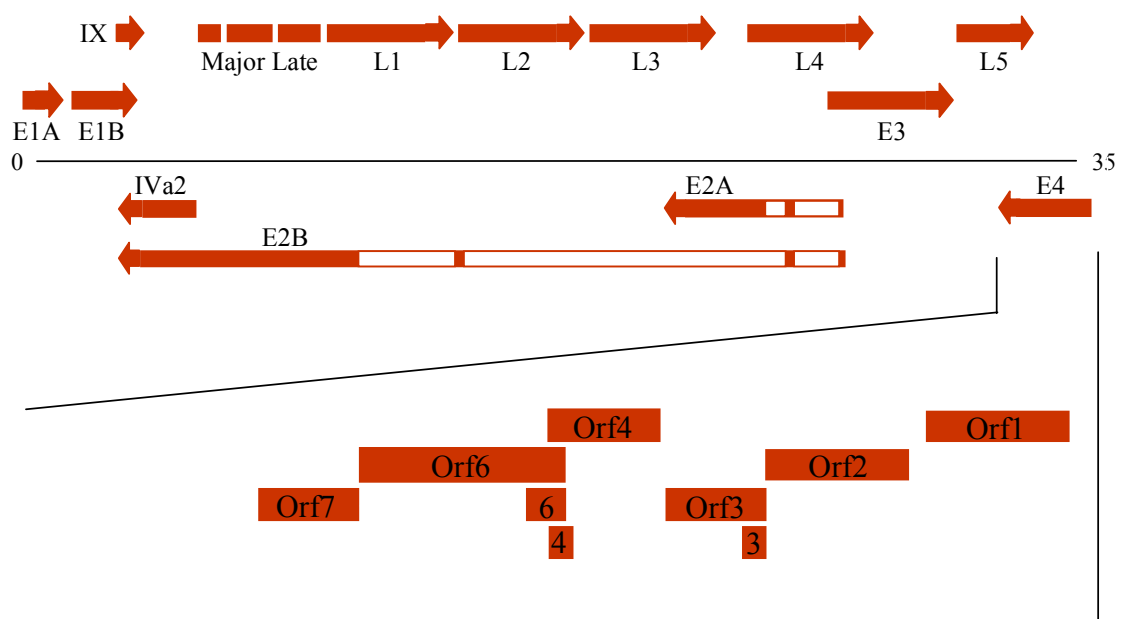
### 1.2.2 Phasen der Adenovirus-Replikation und Onkogenese

Die Adenovirusinfektion kann in zwei Phasen eingeteilt werden. Als die frühe Phase bezeichnet man die Zeit vor Beginn der viralen DNA-Synthese; als späte Phase entsprechend die Zeit nach Beginn der viralen DNA-Synthese. Die viralen Proteine werden analog dazu frühe (E1-E4) und späte (L1) Proteine genannt (Abbildung 1.8).

Die E1-Proteine stellen die Gruppe der sehr früh exprimierten Proteine (*immediate early genes*) dar. Es wurde beschrieben, dass diese Proteine für die onkogene Transformation in Nagetieren verantwortlichen sind. Das E1A-Protein bindet an den zellulären Tumorsuppressor pRb (Retinoblastom-Protein) und verhindert dessen Interaktion mit den Proteinen der E2F-Familie. E2F ist nun in der Lage, Transkription zu aktivieren und

es kommt zum Übergang der Zellen aus der Ruhephase (G0/G1) in die Synthesephase (S) (Jones, 1992). Das E1B-55kDa Protein interagiert dagegen mit dem zellulären Tumorsuppressorprotein p53 (Sarnow *et al.*, 1982a; Sarnow *et al.*, 1982b). Es bindet an p53 und relokalisiert es aus dem Zellkern ins Zytoplasma, wo es degradiert wird. Somit kann p53 seine Funktionen des Zell-Zyklus-Arrest und der Apoptose-Induktion nicht mehr wahrnehmen.

Analog hierzu gibt es weitere Proteine von Tumorigenen mit gleicher Funktion. So haben die Proteine E6 und E7 des Humanen Papilloma Virus und das große T-Antigen des SV 40 ähnliche Funktionsmechanismen.



**Abbildung 1.8: Organisation des Adenovirusgenoms.** Früh in der Infektion wird als erstes die E1-Region transkribiert, wodurch die E1A- und E1B-Proteine entstehen. Insbesondere E1A ermöglicht dann die Aktivierung weiterer früher Promotoren (E2- E4) und somit die Expression der zugehörigen Genprodukte. Die E4-RNA wird dabei in entgegengesetzter Richtung zur E1-RNA abgelesen. Durch Spleißen entstehen aus der E4-Vorläufer-mRNA sieben verschiedene mRNA-Moleküle, welche in ebenso viele Proteine translatiert werden. Nachdem das Virusgenom repliziert worden ist, wird die späte Region (L) transkribiert, und durch differentielles Spleißen entstehen fünf verschiedene Genprodukte (L1-L5).

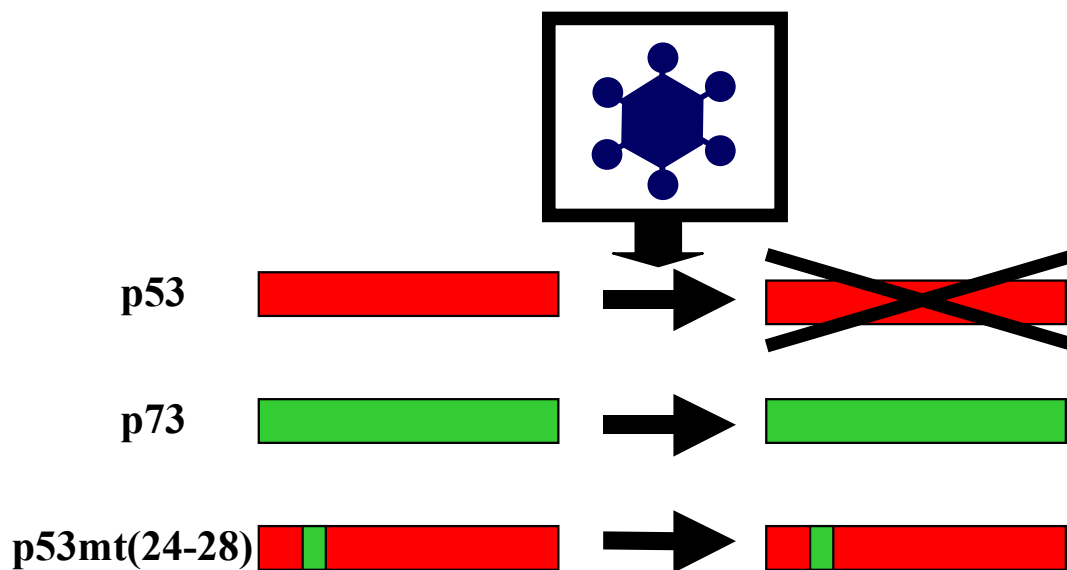


### **1.2.3 Interaktion der Proteine des Adenovirus Typ 5 mit p53, aber nicht mit dem p53-Homologen p73**

Das Adenovirus Typ 5 exprimiert regulatorische Proteine, welche auf die Aktivität und Stabilität von p53 einwirken. E1B-55kD bindet an den N-Terminus von p53 und inhibiert dessen transaktivierende Funktion. Es trägt so zur malignen Zelltransformation bei (Sarnow *et al.*, 1982a; Sarnow *et al.*, 1982b; Yew and Berk, 1992; Yew *et al.*, 1994). Das adenovirale Protein E4orf6 (E4-34 kD) ist ebenso in der Lage, p53 zu regulieren (Dobner *et al.*, 1996). Es bildet mit E1B-55kD einen Komplex, in dem beide Proteine kooperieren. Das Resultat ist die Elimination von p53 aus den mit Adenovirus Typ 5 infizierten Zellen. Dagegen ist das Homolog p73 kein Zielprotein von E1B-55kD und dessen Komplex mit E4orf6. Die Stabilität von p73 in infizierten Zellen bleibt somit unverändert (Kaelin, 1998; Querido *et al.*, 1997; Roth *et al.*, 1998).

### **1.2.4 Die Chimäre p53mt(24-28)**

Auf der Grundlage dieser Beobachtungen wurde eine Chimäre von p53 konstruiert, bei der 5 Aminosäuren an den Positionen 24 - 28 durch die entsprechenden Aminosäuren des Homologs p73 ersetzt wurden. Diese Chimäre mit dem Namen p53mt(24-28) ist weiterhin in der Lage, p53-responsive Promotoren zu aktivieren, wird aber nicht nachweisbar von der Infektion mit dem Adenovirus Typ 5 beeinflusst (Roth *et al.*, 1998) (Abbildung 1.9).

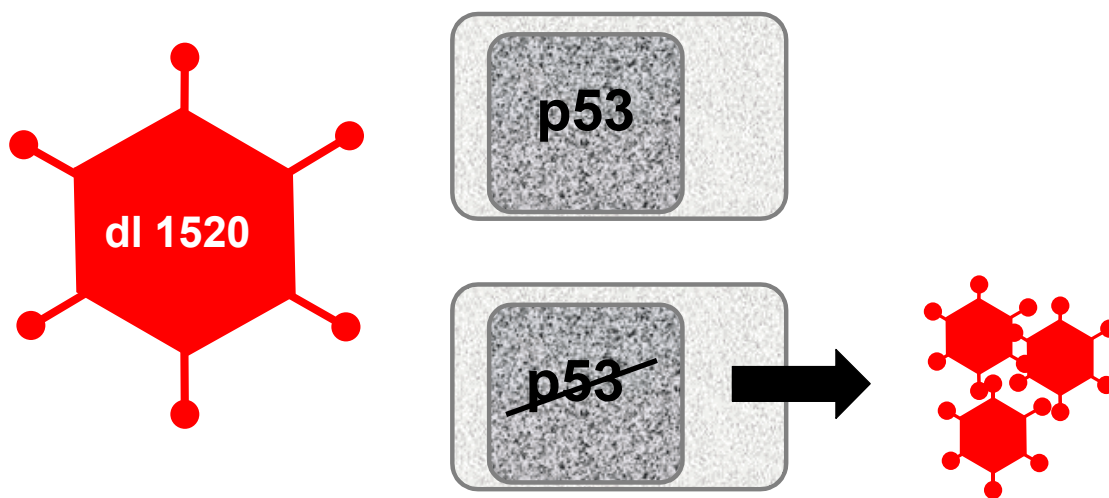


**Abbildung 1.9: Die Chimäre p53mt(24-28) wird durch eine Adenovirusinfektion nicht beeinflusst**  
 Während p53 durch die adenoviralen Proteine gebunden und degradiert wird, wird das Homolog p73 nicht beeinflusst. Eine Chimäre von p53, bei dem die AS 24- 28 durch die des Homologen p73 ersetzt sind, bleibt bei einer Infektion ebenfalls stabil.

### 1.2.5 Die Adenovirusvariante dl1520/ ONYX 015 und ihre klinische Relevanz

Obwohl inzwischen gesichert ist, dass die Proteine des Adenovirus und einiger anderer sogenannter „small DNA“-Tumoviren gezielt p53 beeinflussen und destabilisieren (Shenk, 1996), gibt es doch noch wenig Information darüber, in wie weit sich dieses auf die Virusreplikation auswirkt. Es ist nach wie vor unklar, ob die Destabilisierung von p53 einen Vorteil für den Virusreplikationszyklus herbeiführt. Die Induktion von Apoptose oder das Anhalten des Zellzyklus sind mögliche Einflüsse auf die Virusreplikation in Abwesenheit der Antagonisten des p53 (Bischoff *et al.*, 1996; Kim and McCormick, 1996). Das adenovirale Protein E1B-55KD bindet p53 und degradiert es in Zusammenarbeit mit weiteren Proteinen. Aus dieser Beobachtung heraus entstand die Hypothese, dass sich ein Adenovirus, bei dem diese Region deletiert ist (dl1520/ ONYX 015) (Barker and Berk, 1987; Bischoff *et al.*, 1996), schlechter in p53-Wildtyp exprimierenden Zellen repliziert. In Zellen mit mutiertem oder fehlendem p53 (Bischoff

*et al.*, 1996) repliziert sich dieses Virus jedoch wie Wildtyp-Adenovirus (Abbildung 1.10). Diese Hypothese wurde durch erste Replikationsassays unterstützt, welche in C33A-Zellen (Zelllinie eines humanen Zervixkarzinoms mit mutierten p53) und p53-positiven U2OS-Zellen (Zelllinie eines humanen Osteosarkoms) durchgeführt wurden (Bischoff *et al.*, 1996; Heise *et al.*, 1997).



**Abbildung 1.10:** Das dl1520/ ONYX 015-Virus vermehrt sich selektiv in p53-defizienten Zellen.

Im Tiermodell zeigte sich dl1520/ ONYX 015 wirksam bei der Behandlung von Tumoren mit mutiertem p53, nicht aber bei intaktem p53. Die Erfolge ließen sich auch in Studien der Phase I und II am Menschen nachvollziehen (Heise *et al.*, 2000a; Heise *et al.*, 1999a; Heise *et al.*, 1999b; Kirn *et al.*, 1998). In Kombination von dl1520 /ONYX 015 mit weiteren Chemotherapeutika zeigten sich bessere Tumorreduktionsraten als beim alleinigen Einsatz von Chemotherapeutika bei Geschwüren im Hals- Nasen-Ohrenbereich (Khuri *et al.*, 2000; Nemunaitis *et al.*, 2000). Publikationen der letzten Monate stellen dieses Konzept jedoch zunehmend in Frage. Eine Anzahl von Arbeitsgruppen zeigte, dass es keine eindeutige Korrelation des p53-Status einer Zelle

mit der Adenovirusreplikation gibt (Goodrum and Ornelles, 1998; Hall *et al.*, 1998; Harada and Berk, 1999; Rothmann *et al.*, 1998).

Neuere Veröffentlichungen zeigen, dass der Verlust des mdm2- und p53-Regulators p14ARF (Stott *et al.*, 1998) die Replikation von dl1520/ ONYX 015 in der Tumorzelllinie (HCT-116) erleichtert (Ries *et al.*, 2000). Die Autoren spekulierten daraufhin, dass eine selektive Replikation sich nur zeigt, wenn die gesamte p53-Kaskade der Zelle intakt ist. Es bleibt jedoch unklar, ob sich der hier gezeigte Einfluss auf andere Zelllinien übertragen lässt. Der genaue Einfluss von p53 auf die Adenovirus-Replikation konnte somit nicht letztendlich geklärt werden. Die Chancen, die ein Virus, das selektiv Tumorzellen angreift, für die Tumorthherapie bietet, sind allerdings sehr gross und legen weitere Forschung auf diesem Gebiet nahe.

### **1.2.6 Mögliche Ansätze zur Identifizierung der Rolle von p53 bei der Adenovirusreplikation**

Der erste und bereits beschrittene Ansatz zur Identifizierung der Rolle von p53 bei der Adenovirusreplikation ist der, die Replikation eines Wildtyp-Adenovirus mit der eines Adenovirus zu vergleichen, bei dem die E1B-55kD Region deletiert wurde. Das Problem beim Vergleich mit solch einer Mutante ist jedoch, dass E1B-55kD noch zusätzliche Aufgaben bei der Virusreplikation übernimmt, die unabhängig von der Destabilisierung von p53 sind. Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass es modulierend auf den mRNA-Export während der Infektion wirkt, und sich somit indirekt auf die Replikation auswirkt (Babiss *et al.*, 1985; Dobbelstein *et al.*, 1997; Gabler *et al.*, 1998). Des weiteren könnte es auch noch zusätzliche, bis jetzt unbekannt Funktionen wahrnehmen. Ein alternativer Ansatz wäre, eine E1B-55kD-Mutante zu verwenden, die nicht mehr in der Lage ist, an p53 zu binden, alle anderen Funktionen jedoch wahrnimmt. Eine solche Mutante könnte in einem rekombinanten Adenovirus die Rolle der p53-Bindung während der Replikation genau beschreiben. Diese Mutante liegt zur Zeit allerdings noch nicht vor. Erschwert wird die Suche dadurch, dass Mutationen von E1B-55kD sich sehr vielseitig auf die Funktion des Proteins auswirken. Bedingt ist

dieses wahrscheinlich durch Konformationsänderungen innerhalb des Proteins (Kao *et al.*, 1990; Shen *et al.*, 2001; Yew *et al.*, 1990). Daher wählten wir einen dritten Ansatz, um die Rolle von p53 bei der Virusreplikation zu klären. Dieser beinhaltet eine Koinfektion mit verschiedenen adenoviralen Vektoren. Zum einen werden Zellen mit einem Adenovirus infiziert, welches p53wt bzw. p53mt(24-28) exprimiert. Diesem Virus fehlt die E1-Region, es ist somit replikationsdefizient. Mit diesen Viren wird der p53-Status der Zelle vorgegeben. Zum anderen wird mit dem Wildtyp-Adenovirus Typ 5 koinfiziert. Anschließende Replikationsstudien könnten dann den Einfluss der p53-E1B-55kD Interaktion auf die Adenovirusreplikation klären.

## 2 Material

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

### 2.1 Chemikalien, Geräte

Aceton	Riedel-de Haën, Seelze
Acrylamid/Bis 19:1	BioRad, München
Agarose NA	Pharmacia Biotech, Freiburg
Agarose Electrophoresis Grade	Gibco BRL, Paisley, Scotland
Alconox, Detergens	Alconox, Inc., NY, USA
Alkalische Phosphatase	Roche
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, München
Ampicillin (Na-Salz)	Serva, Heidelberg
Aprotinin (Trasylol)	Bayer, Leverkusen
Bacto-Agar	Difco-Lab., Detroit MI, USA
Bioimager Fujifilm Bas-1000	Fuji Photo Film, Japan
Biomax MR	Eastman Kodak, Rochester, NY, USA
BioRad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BioRad, München
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (Rinderserumalbumin)	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	J.T.Baker, Deventer, Netherlands
Chamberslides (Lab-Tek)	Nalge Nunc

---

Chloroform	J.T. Baker, Holland
Ciprobay <sup>®</sup> 200 (Ciprofloxacin)	Bayer, Leverkusen
Crosslinker: UV Stratalinker 2400	Stratagene, Heidelberg
DABCO	Sigma Chemie, Taufkirchen
DAPI	Boehringer, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merk, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merk, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Chemie, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merk, Darmstadt
DNA-Marker (1kB ladder)	Gibco BRL, Karlsruhe
dNTP-Mix	Gibco Brl, Karlsruhe
Desoxycholin (DOC)	Sigma Chemie, Taufkirchen
Dodecylsulfat, Natriumsalz (SDS)	Merk, Darmstadt
Entwickler G153	Eastman Kodak, Rochester, NY, USA
Essigsäure	Merk, Darmstadt
Ethanol	Merk, Darmstadt
Ethidiumbromid, 1% Lösung	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA	Merk, Darmstadt
Fixierer G354	Eastman Kodak, Rochester, NY, USA
Fluro Nuc Module Maxi Sorp (Mikrotiterplatte)	Nalge Nunc International
Fluoprep	bioMerieux, Nürtingen
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert, Zeiss, Wetzlar
Fötiales Kälberserum	PAA Lab. GmbH, Linz, Austria
Formaldehyd	Merk, Darmstadt
Formamid	Merk, Darmstadt
FuGene (Transfektionsreagenz)	Boehringer, Mannheim
Gene Pulser Kürvetten 0,1 cm	BioRad, München
Gewebekulturflaschen	Costar, Cambridge MA, USA Greiner, Frickenhausen Life Technologies

---

Gewebekulturplatten	Costar, Cambridge MA, USA
	Greiner, Frickenhausen
Glucose	Merk, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Merk, Darmstadt
Glycogen	Roche
H <sub>2</sub> O, Rnase-frei	Ambion
Harnstoff	Gibco BRL, Paisley, Scotland
Hybridisierungslösung ULTRAhyb	Ambion
Imaging Platte	Fuji Photo Film, Japan
Isopropanol	Merk, Darmstadt
Jodacetamid	Sigma Chemie, Taufkirchen
Kaliumchlorid (KCl)	Merk, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merk, Darmstadt
Kanülen	Becton Dickinson
Klenow-Fragment	Ambion
Küvetten	Ratiolab, Dreieich
Lachssperma-DNA	Sigma Chemie, Taufkirchen
Lipofectamine Plus (Transfektionsreagenz)	Life Technologies
Luciferase-Lysis Puffer 5x	Promega, Madison, WWI, USA
Magnesiumchlorid	Merk, Darmstadt
Methanol	Merk, Darmstadt
Milchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
MicroSpin™ G-25 Columns	Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA
MOPS	Sigma, Deisenhofen
Nadeln	Becton Dickinson
Natriumacetat	Merk, Darmstadt
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merk, Darmstadt



---

Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merk, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merk, Darmstadt
Nitrocellulose	Schleicher & Schuell
NP-40	Sigma Chemie, Taufkirchen
Nylonmembran	Ambion
Objektträger	Menzel-Gläser
Oligonuklotide (Primer)	MWG Biotech, Ebersberg
Parafilm	American Corp., Greenwich, USA
Paraformaldehyd	Merk, Darmstadt
PCR-Gefäße	Perkin Elmer, Weiterstadt
PCR-Heizblock	geneAmp PCR System 2400
Penicillin	Grünenthal
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pfu-Turbo DNS-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Phenylmethylsulfonamid (PMSF)	Sigma Chemie, Taufkirchen
Photometer	Pharmacia Biotech
Plastikschaber	Greiner, Frickenhausen
Pressure Blotter PosiBlot <sup>®</sup> 30-30	Stratagene, Heidelberg
Promix	Amersham Life Science, Braunschweig
Protein-A-Sepharose	Sigma Chemie, Taufkirchen
Protein-Feriggele	BioRad, München
Protein-Größenstandarts (RPN 756, 800)	Amersham Life Science, Braunschweig
Quarzküvetten (Schichtdicke 10 mm)	Hellma
Restriktionsenzyme	Boehringer, Mannheim New England Biolabs, Schwalbach MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase A (3,5 mg/ml)	Qiagen, Hilden
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merk, Darmstadt

---

SDS-Polyacrylamid-Fertiggele	BioRad, München
Spin-X Centrifuge Tubefilter 0,22 µm	Costar, Coring, NY, USA
Spritzen	B. Braun, Melsungen
Streptomycin Base (Streptothenat)	Grünenthal
Sucrose	Serva, Heidelberg
SuperSignal Ultra	Pierce, Rockford IL, USA
N,N;N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Biorad, München
Tetrazyklin	Sigma, Deisenhofen
Thermomixer	Eppendorf
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Boehringer, Mannheim
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trizol <sup>®</sup> -Reagenz	Gibco BRL, Eggenstein
Trypsin-EDTA	Gibco BRL, Eggenstein
Tween-20	Serva, Heidelberg
Vortex Mixer	Heidolph, neoLab
Whatman-Papier	Schleicher & Schuell
Zell-Zählkammer, Tiefe 0,1 mm	Neubauer
Zentrifugationsgefäße	Beckman, Eppendorf, Falcon, Greiner
Zentrifugen	Präparative Ultrazentrifuge L7-55, Beckman, USA; Mikro 22 R, Hettich Zentrifugen

## 2.2 Medien

### 2.2.1 Medien zur Kultivierung von Bakterien

#### Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)

LB-Medium wird aus einer Fertig-Mischung der Firma Sigma hergestellt. Dazu werden 50g Fertigmischung eingewogen und in einem Liter Wasser aufgelöst. Nach dem Autoklavieren, wird dem Medium steril Antibiotikum zugesetzt.

(200 µg/ ml Ampicillin)

(50 µg/ ml Kanamycin)

#### LB-Agar-Platten

LB-Fertigmischung der Firma Sigma und Bactoagar werden in 500 ml H<sub>2</sub>O dest. aufgelöst. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C wird Antibiotikum zugesetzt und die Platten unter sterilen Bedingungen gegossen.

(200 µg/ ml Ampicillin)

(50 µg/ ml Kanamycin)

## 2.2.2 Medien zur Kultivierung von Zellen

Dulbecco`s MEM (25 mM HEPES)

Gibco BRL, Karlsruhe

Dulbecco`s MEM (25 mM HEPES )<sup>+++</sup> mit folgenden Zusätzen:

- 10 % FCS
- 01 % L-Glutamin
- 01 % Penicillin/Streptomycin 5000IE/ml

Endothelial Cell Growth Medium, Low Serum

PromoCell,

Heidelberg

Supplement Mix

PromoCell,

Heidelberg

(enthält 10 ml FCS; 2 ml ECGS/H; 0,1 ng/ml EGF; 1,0 ng/ml bFGF; 1 µg/ml Hydrocortison; Gentamycin; Amphotericin B) und 10 % FCS

## 2.3 Puffer

PBS<sup>++</sup> (Phosphate Buffered Saline)

8,00 g	NaCl
0,20 g	KCl
1,15 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,10 g	MgCl <sub>2</sub>
0,20 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,13 g	CaCl <sub>2</sub>
ad 1000 ml H <sub>2</sub> O dest	

PBS<sup>def</sup>

8,00 g NaCl  
0,20 g KCl  
1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,20 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O dest.

TE-Puffer

0,242 g Tris  
0,075 g EDTA  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O dest.

50x TAE-Puffer

242,0 g Tris  
057,1 g Avetat (Essigsäure)  
100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O dest.

RIPA-Puffer

10 ml 10 % Triton X-100  
10 ml 10 % DOC  
10 ml 10 % SDS  
2 ml Tris/HCl (pH 8,5)  
3 ml 3 M NaCl  
2 ml 0,5 EDTA  
5 ml Trasylol (100000 KIE/ml)  
185 g Jodacetamid  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O dest.

10x Laufpuffer für Proteingele

10 g        SDS  
30 g        Tris  
144 g       Glycin  
ad 1000 ml H<sub>2</sub>O dest.

6x Laemmli-Puffer (SDS-Sample Puffer)

3,5 ml       1 M Tris pH 6,8  
3,0 ml       Glycerol  
1 g         SDS  
0,93 g       DTT  
1,2 mg       Bromphenolblau  
ad 10 ml H<sub>2</sub>O dest.

Elution Buffer (Qiagen)

10 mM Tris-Cl, pH 8,5

DNA-Probenpuffer

0,25 %       Bromphenolblau (w/v)  
40,00 %       Sucrose (w/v)  
10,00 %       Glycerin (v/v)

Formamid-EDTA-Probenpuffer

Formamid, entionisiert  
25 mM        EDTA pH 8,0  
50 mg/ml     Dextranblau  
im Verhältnis 5:1 Formamid / EDTA, Dextranblau

10x Western-Salts

60,55 g Tris  
288,10 g Glycin  
0,02 % SDS  
pH ad 8,3 mit HCL  
ad 2000 ml mit H<sub>2</sub>O dest.

Western-Blot Transferpuffer

100 ml Western Salts 10x  
150 ml Methanol (15 %)  
750 ml H<sub>2</sub>O dest.

5x Laufpuffer für RNA-Gele

0,1 M MOPS, pH 7,0  
40 mM NaOAc  
5 mM EDTA, pH 8,0

Phosphatpuffer für Crosslinkung vor Northern Blot

1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

beides mischen bis pH 6,8 und mit H<sub>2</sub>O dest. auf 0,2 M bringen

Auftragspuffer für RNA-Gele (Ambion)

Lysis Puffer

50 mM      1 M Tris pH 8,0  
 5 mM      EDTA  
 150 mM     NaCl  
 0,5 %      NP-40  
 ad 1000 ml H<sub>2</sub>O dest.

**2.4 Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Bezugsquelle</b>	<b>Verwendung für</b>
<b><i>Primärantikörper</i></b>			
Anti-p53 (53kDa)	monoklonal, Maus (1801)	Calbiochem, Bad Soden	Western Blot (WB)
Anti-p53 (53kDa)	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz, Berkely	Immunfluoreszenz (IF)
Anti-WAF1 (p21)	monoklonal, Maus	Calbiochem, Bad Soden	WB
Anti-p14ARF	Monoklonal, Maus	Oncogene Reasearch	WB
Anti-Ad5E2A- 72kDa	monoklonal, Maus (B6-6), Hybridomaüberstand	J. Flint, Princeton	IF
Anti-p27	Monoklonal, Maus	Transduction Labs.	WB
Anti-lamin B	Monoklonal, Maus	Zymed	WB
<b><i>Sekundärantikörper</i></b>			
Peroxidase- gekoppelt	Ziege-anti-Maus IgG	Jackson, West Groove, Pennsylvania, USA	WB



Alexa 594 rot	Ziege-anti-Kaninchen IgG	Molecular Probes, OR, USA	IF
Alexa 594 rot	Ziege-anti-Maus IgG	Molecular Probes	IF
Alexa 488 grün	Ziege-anti-Maus IgG	Molecular Probes	IF

## 2.5 Enzyme

### 2.5.1 Polymerasen

Die entsprechenden Reaktionspuffer für die Polymerasen wurden von den Herstellern der jeweiligen Enzyme geliefert.

-cloned PFU turbo-Polymerase	Stratagene, Heidelberg
-Herculase Enhanced Polymerase Blend	Stratagene, Heidelberg
-Expand Long Template PCR System	Roche
-Advantaq Plus™ DNA Polymerase	Clontech Laboratories
-AmpliTaq DNA-Polymerase, FS	Perkin Elmer, Langen

### 2.5.2 Restriktionsenzyme der Firma New England Lab

Bgl I

Eco R I

Hind III

Kpn I

Not I

Xba I

Xho I

Xma I

## 2.6 Kits

### Qiagen, Hilden

- QIAfilter Plasmid Maxi Kit
- QIAquick Gel Extraction Kit
- QIAprep Spin Miniprep Kit
- QIAquick PCR Purification Kit

### Pierce, Rockford, USA

- SuperSignal West Dura (Luminol/Enhancer; Peroxid-Puffer)

### Perkin Elmer, Langen

- ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit  
Terminationsmix für die Sequenzierreaktion:  
A-Dye Terminator, gekoppelt mit dichloro, R6G=grün  
C-Dye Terminator, gekoppelt mit dichloro, ROX=rot  
G-Dye Terminator, gekoppelt mit dichloro, R110=blau  
T-Dye Terminator, gekoppelt mit dichloro, TAMRA=gelb  
Desoxynukleosidtriphosphate: dGTP, dATP, dCTP, dTTP  
Tris-HCl (pH 9,0)  
MgCl<sub>2</sub>  
Hitzestabile Pyrophosphatase  
AmpliTaq DNA Polymerase, FS

MBI Fermentas, Litauen

- DecaLabel DNA™ Labelling Kit:  
Klenow Fragment, Dekanukleotide im Reaktionspuffer, dNTP-Mix A (minus ATP), -Mix C (minus CTP), dNTP-Mix

Clontech, Heidelberg

- Nucleic Acid QuickSticks

Stratagene, Heidelberg

- QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit

## 2.7 Viren und Eukaryontenzellen

### 2.7.1 Adenoviren

WtD	erhalten von A. Berk
dl1520	erhalten von A. Berk
Adp53	hergestellt mit dem AdEasy System
Adp53Δ62-91	hergestellt mit dem AdEasy System
Adp53mt24-28	hergestellt mit dem AdEasy System

## 2.7.2 Eukaryontenzellen

### Permanente Zelllinien

H1299-Zellen	p53-negative Zelllinie aus einem Lungenkarzinom
U2OS	humane Osteosarkomzellen mit p53wt
HeLa-Zellen	HPV-transformierte humane Zellen eines Zervixkarzinoms
293-Zellen	E1-Region stabil exprimierende humane Nierenzelllinie
911-Zellen	E1-Region stabil exprimierende humane Embryoretinazellen

### Primäre Zellen

HUVECs	Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene
--------	---

## 2.8 Bakterien

<i>Epicurian coli</i> Sure electroporation-competent cells	Stratagene, Heidelberg
<i>Escherichia coli</i> DH10B	Life Technologies
<i>Escherichia coli</i> DH10B ElektroMAX	Life Technologies
<i>Escherichia coli</i> BJ 5183	Vogelstein, Baltimore

## 2.9 Plasmide und Vektoren

pBP100luc	(Roth <i>et al.</i> , 1998)
pBPPIG3luc	(Roth <i>et al.</i> , 2000)
pcDNA3	Life Technologies
pGEM7Zf+	Promega

pRcCMVp21/Waf1	A. Levine, Princeton
pcDNA3ERCC1	Invitrogen
pRcCMVp53	(Lin <i>et al.</i> , 1994)
pRcCMVp53deltapro	(Walker and Levine, 1996)
pcDNA3RACK1	Thorsten Wolf, Marburg
pRcCMVp53mt24-28	(Roth <i>et al.</i> , 1998)
pRcneoBamPIG3	Bert Vogelstein, Baltimore

## 2.10 Oligonukleotide

### p53inp73

p53 $\Delta$ 62-91ClaI:

3'-CTG AAG ACC CAG GTA TCG ATT CTG TCC CTT CCC AG-5'

3'-GAC TTC TGG GTC CAT AGC TAA GAC AGG GAA GGG TC-5'

PCR Prolin-reiche Region p73beta

3'-GCC ATC GAT AAG CTT ATG GAC CAG ATG AGC AGC AGC CGC-5'

3'-GCC ATC GAT GGA GGG GAT GAC AGG CGC CGG-5'

## 2.11 IMAGE-Kone

ERCC2	2166805	(cDNA)IMAGp998A145352
HHR6A	1736062	(cDNA)IMAGp998E234411
HHR23A	2291584	(cDNA) IMAGp998P175676
XRCC 1	2212436	(cDNA) IMAGp998N215470
Fas/ APO1	AA180032 594502	(cDNA) IMAGp998H231438

---

ERCC3	2062013	(cDNA) IMAGp998C065079
GADD45	2161692	(cDNA) IMAGp998L135338
ERCC5	824618	(cDNA) IMAGp998M032037
Ephrin B4 Rez.	245165	(cDNA) IMAGp998M06528

## 3 METHODEN

### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Kultivieren von Zellen

Die adhärenenten Zellen werden in 162/ 182 cm<sup>2</sup> großen Kunststoffflaschen (Greiner/ Costar) kultiviert und in einem Inkubator bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit aufbewahrt. Als Kulturmedium wird Dulbecco`s MEM<sup>+++</sup> (enthält 10 % FCS, Glutamin, Penicillin/ Streptomycin) für alle permanenten Zelllinien und Endothelial Cell Growth Medium für die HUVECs (primäre Zellen) verwendet. Alle für die Zellkultur notwendigen Materialien werden kurz vor Gebrauch auf 37°C erhitzt. Das Passagieren der Zellen erfolgt unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank, um eine Kontamination mit Mikroorganismen zu vermeiden.

#### Passagieren der Zellen

Das Kulturmedium wird abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS<sup>def</sup> gewaschen, um Zelldebris und Ionen (z.B. Ca<sup>++</sup>; Mg<sup>++</sup>) des Mediums zu entfernen. Danach werden die Zellen durch Zugabe von 5 ml Trypsin/ EDTA von der Unterlage abgelöst. EDTA bildet einen Chelatkomplex mit zweiwertigen Ionen (Ca<sup>++</sup>/ Mg<sup>++</sup>) und bindet somit die für die Zell-Zell-Adhäsion wichtigen Calcium-Ionen. Zusätzlich werden die Proteinbrücken mit dem Boden der Zellkulturflaschen durch Trypsin gespalten. Das Trypsin/ EDTA wird durch Zugabe von 15 ml Dulbecco`s MEM<sup>+++</sup> inaktiviert und die Zellen vorsichtig resuspendiert. Je nach Verwendung werden die Zellen dann verdünnt und weiterpassagiert, ausgezählt und ausgesät, beziehungsweise eingefroren. Für weitere Passagen sind Verdünnungen von 1:10 – 1:15 bei permanenten Zellen und 1:5 bei HUVECs (primären Zellen) sinnvoll.

### Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wird mit Hilfe von sogenannten Neubauer-Zählkammern bestimmt. Hierzu werden einige Tropfen der trypsinierten und resuspendierten Zellen zwischen ein Deckglas und die Zählkammer gegeben. Die Zählkammer ist in vier Felder mit je 16 Quadraten unterteilt. Nach Auszählen dieser 64 Quadrate wird der Mittelwert eines 16er-Feldes durch Division der Gesamtzellzahl durch vier ermittelt. Diesen Wert multipliziert man mit  $10^4$  und erhält die Anzahl der Zellen, die in 1 ml Kulturmedium enthalten sind.

### **3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

#### Einfrieren von Zellen

Die Zellen sollten möglichst in einer frühen Passage eingefroren werden, da es mit jeder zusätzlichen Passage zu weiteren Veränderungen in der Zellgenetik kommen kann. Eine 162/ 182 cm<sup>2</sup> Kulturflasche mit konfluentem Zellrasen liefert ca. 2-3 Aliquots. Die Zellen werden gewaschen, abtrypsiniert, in einem 50 ml Zentrifugationsgefäß aufgenommen und bei 800 upm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in einer auf 4°C gekühlten Lösung aus 10% DMSO in FCS gut resuspendiert. Anschließend wird die Zellsuspension aliquotiert (1 ml pro Kryoröhrchen). Um die Zellen möglichst schonend einzufrieren, werden sie langsam auf -70°C heruntergekühlt und dann in flüssigen Stickstoff gelagert.

#### Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wird ein Aliquot aus dem flüssigen Stickstoff entnommen, schnell (z.B. mit den Händen) auf 37°C erwärmt und umgehend in eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturflasche serumhaltiges Medium überführt. Da das sich in den Kryoröhrchen



befindende DMSO toxisch wirkt, wird das Medium gewechselt, sobald sich die Zellen abgesetzt haben

### 3.1.3 Transiente Transfektion von Zellen mit FuGene

Am Tag vor der Transfektion werden 200.000 Zellen in 6-Well-Dishes in einem Volumen von 2 ml oder 50.000 Zellen in Chamber-Slides in einem Volumen von 1 ml ausgesät. Die zu transfizierende DNA-Menge sollte für ein 6-Well-Dish nicht mehr als 1,5 µg und für ein Chamber-Slide nicht mehr als 0,4 µg betragen, da größere Mengen sich negativ auf die Transfektionseffizienz auswirken. Die Plasmide werden in Eppendorfcups pipettiert. Sollten weniger als die optimalen Mengen an Plasmiden transfiziert werden, wird der Rest mit sogenannten Füllvektoren aufgefüllt. Hierzu eignen sich zum Beispiel die Plasmide pGem7 und cDNA3.

Unter sterilen Bedingungen wird nun pro 6-Well-Dish/ Chamber-Slide 100 µl/ 25 µl Medium ohne FCS in ein Eppendorfcup pipettiert und dem ganzen 5 µl/ 1,25 µl FuGene hinzugegeben. Nach 5 Minuten Inkubationszeit wird dieses Gemisch auf die vorbereitete DNA gegeben. Es folgt eine weitere Inkubationszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nun wird das Gemisch dem Medium auf den Zellen zugesetzt und die Zellen bleiben für mindestens 20 Stunden bei 37°C im Brutschrank.

### 3.1.4 Transiente Transfektion mit Lipofectamin plus

Die Zellen werden 24 Stunden vor Transfektion in 6-Well-Dishes (ca. 200.000 Zellen/ Dish) ausgesät und bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das Medium wird abgesaugt und die Zellen werden kurz mit PBS<sup>def</sup> gewaschen. Danach werden die Zellen erneut mit 1 ml Medium ohne FCS überschichtet. 2 µg der zu transfizierenden DNA wird in 150 µl Medium ohne FCS gelöst und es werden 8 µl Plus-Reagenz hinzugegeben. Es folgt eine Inkubation von 15 Minuten. Dann werden 5 µl Lipofectamin mit 150 µl

Medium ohne FCS vermischt und diese Suspension dem DNA-Gemisch zugegeben. Nach weiteren 15 Minuten Inkubationszeit wird diese Probe auf die Zellen gegeben und die Zellen werden weitere 3 Stunden bei 37°C auf einem Kippschüttler inkubiert. Sollten die Zellen schon nach 2 Stunden morphologisch stark angegriffen sein, kann diese Inkubation auch verkürzt werden. Nun werden 1,5 ml Medium und 150 µl FCS hinzugegeben und die Zellen über Nacht im Brutschrank belassen.

### **3.1.5 Herstellung chemisch kompetenter Bakterienzellen**

25 ml LB-Medium werden mit DH 10B-Bakterien angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Aus der Übernachtskultur entnimmt man maximal 1 ml, impft damit 250 ml LB-Medium an und inkubiert erneut auf dem Schüttler bei 37°C. Nun ist es erforderlich alle 60 min die Extinktion dieser Kultur zu bestimmen, um die Log-Phase zu ermitteln. Man entnimmt dafür steril 1 ml und misst die Extinktion bei 590 nm. Liegt die Extinktion bei circa 0,5 inkubiert man die Kultur 10 min auf Eis. Dabei ist unbedingt darauf zu achten, dass die Bakterien immer gut gekühlt aufbewahrt werden. Das Ernten der Bakterien erfolgt durch Zentrifugation bei 5000 upm und 4°C für 5 Minuten. Das Pellet wird in 62,5 ml steriler und gekühlter 0,1 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird die Suspension erneut zentrifugiert (3000 upm, mindestens 5 Minuten). Das Pellet wird in steriler und gekühlter Lösung aus 0,1 M CaCl<sub>2</sub> in Wasser aufgenommen und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend versetzt man die Suspension mit 5 ml Glycerol (80%), aliquotiert die Bakterien und transferiert sie sofort in flüssigen Stickstoff. Die Aufbewahrung der Aliquots erfolgt dann bei -70°C.

### 3.1.6 Transformation kompetenter *E.coli*-Bakterien

Durch Transformation werden Plasmide in Bakterien eingebracht, um sie in ihnen zu vervielfältigen. Die Transformation kann durch Elektroporation oder mit chemisch kompetenten Bakterien erfolgen.

#### Transformation kompetenter *E.coli*-Bakterien durch Elektroporation

Man pipettiert 10 µl elektrokompetente *E.coli* DH 10B und 0,5 - 1 µl DNA (entspricht ca. 100 ng DNA) in Gene-Pulser-Küvetten (0,1 cm) der Firma BioRad. Die Elektroporation erfolgt mit Hilfe des Gene-Pulser-Controller bei 1,6 kV, 200 Ω und 25 µF. Unmittelbar nach der Elektroporation pipettiert man 100 µl LB-Medium zu den Bakterien in die Küvette. Die Bakteriensuspension wird anschließend auf LB-Ampicillin Agarplatten ausplattiert und die Platte bei 37°C über Nacht inkubiert. Wird ein Plasmid mit einer Kanamycin-Resistenz verwendet, wird die Bakteriensuspension vor dem Ausplattieren erst in 1 ml LB-Medium für 1 - 2 Stunden bei 37°C geschüttelt, da die Bakterien die Enzyme der Kanamycin-Resistenz erst transkribieren und translatieren müssen.

#### Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Die Bakterien werden aufgetaut und das zu transformierende Plasmid wird hinzugefügt (10 ng sind ausreichend). Die Mischung wird erst 15 Minuten auf Eis, anschließend 2 Minuten bei 42°C und erneut 1 Minute auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wird anschließend auf LB-Ampicillin Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Besitzen die Plasmide eine Kanamycin-Resistenz, werden die Bakterien nach der Transformation erst 1 - 2 Stunden in 1 ml LB-Medium bei 37°C geschüttelt, bevor sie auf LB-Kanamycin Agarplatten ausplattiert werden.

### 3.1.7 Infektion von Zellen mit Adenoviren

Am Tag vor der Infektion werden die Zellen ausgesät, und zwar je nach Bedarf in Gewebekulturflaschen, 6-Well-Dishes, 24-Well-Dishes oder Chamber-Slides.

-Gewebekulturflaschen:	3.000.000 zur Herstellung hochtitriger Virusstocks
-6-Well-Dish:	150.000 für Western-Blot und Northern-Blot
-24-Well-Dish:	20.000 – 25.000 für Replikationsassay
-Chamber-Slide:	50.000 für Immunfluoreszenz.

Die Virusstocks befinden sich aufgrund der Präparation in einer CsCl-Lösung. Die CsCl-Konzentrationen der Virusinokula eines Versuches werden aneinander angeglichen, um die Vergleichbarkeit mehrerer Ansätze eines Experimentes zu gewährleisten. Beim Einsatz hoher Virusstockvolumina (z.B. 7 µl) bei verhältnismäßig kleinem Mediumvolumen (z.B. 500 µl bei Chamber-Slides) wird evtl. das Entfernen des CsCl des Virusinokulums über eine Reinigungssäule (MicroSpin G-25 Columns) erforderlich, um Zelltod und Kristallbildung zu verhindern.

Vor der Infektion wird das Medium des zu infizierenden Gefäßes abgenommen und durch Medium ohne FCS ersetzt (FCS kann die Virusabsorption behindern). Das Eppendorf-Gefäß mit den zu infizierenden Viren wird noch einmal gut gevortext, und die Viren werden in das Gefäß überführt. Je nach gewünschter MOI („multiplicity of infection“) kann die Erstellung einer Verdünnungsreihe der Viren erforderlich sein. Dieser Schritt garantiert eine höhere Infektionsgenauigkeit, sowie ein Angleichen der Volumina von Virussuspension. Durch mehrmaliges auf- und abpipettieren werden die Viren dann gleichmäßig mit dem Medium vermischt. Danach wird das Gefäß für 3 h auf einem Kippschüttler bei 37°C geschwenkt, um eine gleichmäßige Infektion aller Zellen zu gewährleisten. Bevor das Gefäß über Nacht im Brutschrank inkubiert wird, wird noch das fehlende FCS hinzugegeben. Das Ernten der Zellen und die Probenweiterverarbeitung erfolgen je nach Experiment.

### 3.1.8 Titration von Viren

Am Vortag der Titration werden in Chamber-Slides 30.000 Zellen pro Fach ausgesät. Zur Vereinheitlichung der Virus-Titer wurden hierfür jeweils H1299-Zellen verwendet. Nach 24 Stunden werden die Zellen mit dem Virus in verschiedenen Verdünnungen infiziert (je mit 10 bzw. 20  $\mu\text{l}$  1:10<sup>2</sup>, 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>4</sup> und 1:10<sup>5</sup>). Um eine optimale Verteilung der Viren zu gewährleisten, werden die Chamber-Slides für 3 Stunden auf einen Kippschüttler bei 37°C inkubiert. 18 Stunden später werden die Zellen fixiert und es wird eine Immunfluoreszenz (Abschnitt 3.2.2) gegen das DNA-bindende Protein E2A-72kDA (Frühe-Phase Protein der Adenovirus Replikation) sowie eine DAPI-Färbung (Abschnitt 3.2.2) durchgeführt. Durch Auszählen des Anteils der infizierten Zellen an der Anzahl aller Zellen wird dann der Anteil der infektiösen Einheiten pro Milliliter in dem Stock bestimmt. Zum Auszählen des Virustiters wird eine Verdünnung gewählt, in der ca. 20-30 % der Zellen infiziert sind.

#### Virustiter der verwendeten Viren

Virus	Virustiter
wtD	1,6 x 10 <sup>9</sup> I.U./ml
dl1520	8,5 x 10 <sup>8</sup> I.U./ml
Adp53wt	4,0 x 10 <sup>9</sup> I.U./ml
Adp53p53 $\Delta$ 62-91	1,2 x 10 <sup>9</sup> I.U./ml
Adp53mt24-28	2,2 x 10 <sup>10</sup> I.U./ml
AdGFP	5,5 x 10 <sup>9</sup> I.U./ml

### 3.1.9 Replikationsassay von Adenoviren

Die am Tag zuvor ausgesäten Zellen einer 24-Loch-Gewebekulturplatte werden einmal mit PBS<sup>def</sup> gewaschen und anschließend zur Infektion mit einem Volumen von 250 µl Medium ohne FCS überschichtet. Die gewünschte Menge an Virus wird in äquivalenten Volumina hinzugegeben. Nach dreistündiger Inkubationszeit auf dem Kippschüttler im Brutschrank werden 250 µl Medium mit doppelter Konzentration an FCS hinzugegeben. Bei einer Koinfektion wird ein entsprechendes Virusgemisch gewählt. Werden primäre Zellen (HUVECs) zur Infektion verwendet, wird nach dem Waschen sofort Vollmedium benutzt.

Für Replikationsstudien sind je nach Ansatz Zeiten von 24 – 72 h nach Infektion sinnvoll. Je später der Zeitpunkt gewählt wird, desto effektiver ist die Replikation abgelaufen. Bei einem späteren Ernte-Zeitpunkt sind jedoch mehr Zellen bereits lysiert. Zum Ernten werden die Zellen, die noch am Gefäßboden haften, mit einem Plastischaber im Medium abgeschabt und in ein Eppendorfgefäß transferiert. Nun werden die Zellen 5 Minuten bei 800 upm zentrifugiert und der Überstand wird verworfen. Es folgt ein Wasch-Schritt mit 1 ml PBS<sup>def</sup> (resuspendieren, zentrifugieren bei 800 upm für 5 min, Verwerfen des Überstandes). Die Zellen werden nun in 100 ml PBS<sup>def</sup> resuspendiert und die Zellwände durch dreimaliges „Frieren-Tauen“ aufgebrochen. Die Zelltrümmer werden durch Zentrifugation bei 13.000 upm für 5 min in einer Tischzentrifuge abgetrennt.

Die Viruskonzentration im Überstand wird durch das Titern in der Immunfluoreszenz (Abschnitt 3.1.8) ermittelt. Anhand der Anzahl der vorher ausgesäten Zellen kann nun der Ertrag der Viren pro Zelle berechnet werden.

## 3.2 Proteinchemische und Immunologische Methoden

### 3.2.1 Western-Blot Analyse

Beim der Western-Blot Analyse werden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach dem Molekulargewicht aufgetrennte Proteine zur Immobilisierung auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und anschließend durch spezifische Antikörper nachgewiesen.

#### Ernten der Zellen

Nach erfolgter Transfektion bzw. Infektion der Zellen zur Expression eines Proteins werden die Zellen mit PBS<sup>def</sup> gewaschen, und der Überstand wird verworfen. Für Western-Blot Analysen eignet sich die Proteinmenge, die sich aus einem 6-Well-Dish gewinnen lässt. Anschließend pipettiert man 200 µl RIPA-Puffer pro Well auf die Zellen und erntet die Zellen mit einem Plastischaber. Sollte die Zellen sich bereits von der Unterlage der Gewebekulturflasche abgelöst haben, werden die Zellen bei 800 upm für 5 Minuten pelletiert und das Pellet mit PBS<sup>def</sup> gewaschen. Das Zelllysate wird in Eppendorfcups überführt und mit 50 µl 6x Laemmli-Puffer versetzt. Daran anschließend empfiehlt sich die sofortige Weiterverarbeitung der Proben oder Einfrieren der Proben möglichst in flüssigen Stickstoff und Aufbewahrung bei einer Temperatur von -20°C.

#### Probenweiterverarbeitung

Die Proben werden bei 95°C für 3 Minuten aufgekocht und die Proteine somit denaturiert. Anschließend wird die DNA durch 20 minütiges schnelles Schütteln oder durch sonnikieren geschert und die Probe danach kurz bei 13.000 upm zentrifugiert, um überflüssige Zellfragmente zu entfernen.

### Auftrennung von Proteinen durch SDS-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgt nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) in einer vertikalen Gelapparatur. Unter denaturierenden Bedingungen werden in einem SDS-Polyacrylamidgel Proteine aufgrund ihrer Masse aufgetrennt. Die Proteine werden dazu zunächst unter Zusatz des Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) gelöst, das die nicht kovalenten Wechselwirkungen in Proteinen zerstört. Zur Reduktion der Disulfidbrücken wird DTT zugesetzt. Die SDS-Anionen binden an die Aminosäurereste des denaturierten Proteins, so dass ein SDS Molekül ungefähr zwei Aminosäurereste "besetzt". In diesem Komplex ist also die starke negative Ladung zur Masse des Proteins proportional. In einem zweiphasigen Polyacrylamidgel erfolgt zunächst bei pH 6,8 die Sammlung und bei pH 8,8 die Auftrennung der Proteine nach ihrer Masse. Kleine Proteine wandern schneller durch das Gel als große. Das Gel wird nach folgendem Schema gegossen:

Sammelgel:            3,4 ml.....H<sub>2</sub>O  
                             830 µl.....Acrylamid 30%  
                             630 µl.....1,5 M Tris, pH 6,8  
                             50 µl.....SDS 10%  
                             50 µl.....APS 10%  
                             5 µl.....TEMED

8% Trenngel:         4,6 ml.....H<sub>2</sub>O  
                             2,7 ml.....Acrylamid 30%  
                             2,5 ml.....1,5 Tris, pH 8,8  
                             100 µl.....SDS 10%  
                             100 µl.....APS 10%  
                             6 µl.....TEMED

50 µl der Proben werden in die Kammtaschen des SDS-Polyacrylamidgels aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei einer Stromstärke von 250 mA und einer Spannung von 100 V für circa 90 Minuten. Als Längenstandard für die Elektrophorese werden



vorgefärbte Proteine mit einem Molekulargewicht von 10 - 250 kDa verwendet (Rainbow Marker Fullrange, Amersham, Braunschweig).

#### Blotten der aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose

Der Aufbau des Blots erfolgt auf Plastikhaltern der Firma BioRad. Auf den weißen Plastikhalter legt man zunächst einen mit Transfer-Puffer getränkten Schwamm, dann drei Lagen Whatman-Papier und anschließend die Nitrocellulosefolie. Darauf schichtet man das Polyacrylamidgel und wiederum drei Lagen Whatman-Papier, gefolgt von einem weiteren Schwamm und einem schwarzen Plastikhalter. Wichtig ist, dass alle Schwämme, Papiere und die Nitrocellulose zuvor gut mit Transfer-Puffer getränkt werden und die Schichtung möglichst luftblasenfrei sein sollte (Rollen mit einer Pipette).

Der Blot wird anschließend in die Blot-Kammer eingesetzt, so dass der schwarze Plastikhalter zur negativen Elektrode und der weiße Plastikhalter zur positiven Elektrode zeigt. Geblottet wird bei 35 - 37 Volt und maximaler Stromstärke über Nacht.

#### Immunfärbung des Blots

Die Seite der Nitrocellulose, auf der die Proteine geblottet sind, wird mit einem Bleistift markiert. Die Nitrocellulose wird zunächst mit PBS<sup>++</sup> gespült, um sie von Acrylamidresten zu befreien und um ein Austrocknen zu verhindern.

Anschließend blockt man die Nitrocellulose in Milch-Lösung, bestehend aus PBS<sup>++</sup> mit 5% Magermilchpulver und 0,05 - 0,1% Tween, um freie Bindungsstellen auf der Nitrocellulose abzusättigen. Das Blocken wird in einer Schale auf einem Taumler durchgeführt, damit die Nitrocellulose ausreichend mit Milch-Lösung bedeckt ist. Das Blocken sollte 30 Minuten nicht unterschreiten.

Der 1. Antikörper wird nun je nach zu detektiertem Protein verdünnt und die Folie für 2 Stunden mit dieser Lösung inkubiert. Danach wird die Folie drei mal kurz mit PBS<sup>++</sup>/ Tween gespült und dann 15 Minuten in Milch-Lösung geschwenkt. Dieser Vorgang wird wiederholt und die Folie anschließend noch einmal mit PBS<sup>++</sup>/ Tween gewaschen.

Nun wird die Nitrocellulosefolie mit dem 2. Antikörper (Peroxidase-gekoppelt, 1:1000) für 1 Stunde inkubiert. Es folgen 3 Waschgänge wie oben beschrieben (3x PBS<sup>++</sup>/ Tween; 15 Minuten Milch-Lösung). Am Ende wird der Blot noch mehrmals mit PBS<sup>++</sup> (ohne Tween) gespült.

Das Waschen in PBS<sup>++</sup>/ Tween und Milch-Lösung findet jeweils in einer Schale statt, die man auf einen Taumler bei Raumtemperatur schwenken lässt. Die Antikörper werden in ihrer jeweiligen Verdünnung in Milch-Lösung gemischt und etwa 2 ml dieser Antikörperlösung wird auf Parafilm pipettiert. Danach wird die Nitrozellulose mit der geblotteten (markierten) Seite nach unten auf die Antikörperlösung gelegt.

#### Detektion der markierten Proteine

Zur Detektion mischt man die beiden Komponenten (Luminol/ Enhancer und Peroxidlösung) des SuperSignal Ultra Kits 1:1. Durch die am 2. Antikörper angekoppelte Peroxidase wird ein zyklisches Diacylhydrazid (Luminol) oxidiert und in den angeregten Zustand überführt. Beim anschließenden Übergang in den Grundzustand wird die freiwerdende Energie in Licht umgesetzt, das einen Film schwärzt.

Man legt den Blot auf eine durchsichtige Plastikfolie, pipettiert auf die geblottete Seite der Nitrocellulose die Reagenzlösung und bedeckt dies mit einer zweiten Plastikfolie. Um überschüssige Reagenzlösung und Luftblasen zu entfernen, streicht man die Plastikfolie glatt und verschweißt sie anschließend.

Zur Exposition klebt man den eingeschweißten Blot in eine Filmkassette, legt in der Dunkelkammer einen BioMax Film (Kodak) auf und entwickelt diesen nach der Expositionszeit. Je nach detektierten Protein betragen die Expositionszeiten zwischen 1 Sekunde und 10 Minuten (bei schwacher Expression gegebenenfalls auch länger).

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Quelle</b>	<b>Eingesetzte Verdünnung</b>
<i>Erstantikörper</i>			
Anti-p53-53kDa	monoklonal, Maus (1801)	Calbiochem, Bad Soden	1:300

Anti-WAF1 (p21)	monoklonal, Maus	Calbiochem, Bad Soden	1:300
Anti-p27	Monoklonal, Maus	Transduction Labs.	1:300
Anti-p14/ ARF	Monoklonal, Maus	Oncogene Research	1:200
Anti-laminB	Monoklonal, Maus	Zymed	1:30.000
<b>Zweitantikörper</b>			
Peroxidase-gekoppelt	Ziege-anti-Maus IgG	Jackson, West Groove, Pennsylvania, USA	1:300

### 3.2.2 Immunfluoreszenzfärbung (indirekt)

Zelluläre und virale Antigene können in ihrer intrazellulären Lokalisation durch Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden. Spezifische Antikörper binden an das entsprechende Antigen. Ist der Erstantikörper direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, spricht man von direkter Immunfluoreszenz. Wird der Antigen-Antikörper-Komplex erst durch einen weiteren fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper markiert, so bezeichnet man dies als indirekte Immunfluoreszenz. Durch die indirekte Immunfluoreszenz erhält man in der Regel ein intensiveres Fluoreszenz-Signal, da mehrere sekundäre Antikörper an den Erstantikörper binden können. Im Rahmen meiner Arbeit wurde ausschließlich die Methode der indirekten Immunfluoreszenz angewandt, um die verschiedenen Antigene nachzuweisen.

Die verwendeten Zellen (50.000 pro Chamber-Slide) werden in Chamber-Slides (Objektträger, die durch Kammern in 4 verschiedene Felder aufgeteilt sind) ausgesät und am folgenden Tag mit dem jeweiligen Plasmiden transfiziert bzw. mit Viren infiziert (Abschnitt 3.1.3, 3.1.4, 3.1.7). 18-24 Stunden nach der Transfektion bzw. Infektion werden die Zellen mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und mit einer Lösung aus 4% Formaldehyd in PBS<sup>++</sup> 15 - 20 Minuten lang fixiert. Das Formaldehyd wird anschließend entfernt und die Zellen werden 2x kurz in PBS<sup>++</sup> gewaschen. Zum

Permeabilisieren der Zellwände, so dass die Antikörper ins Zellinnere gelangen können, behandelt man die Zellen 15 - 20 Minuten mit Triton X-100 (0,2% in PBS<sup>++</sup>). Im Anschluss daran wäscht man die Zellen 4x kurz mit PBS<sup>++</sup>. Um freie Bindungsstellen abzusättigen, behandelt man die Zellen mit einer Lösung aus 10% FCS in PBS<sup>++</sup> für mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht.

Das Markieren der Zellen erfolgt bei Raumtemperatur. Die Antikörper werden in entsprechender Menge mit Blocking-Solution (10% FCS in PBS<sup>++</sup>) verdünnt. Pro Well des Chamber-Slides werden mindestens 300 µl Antikörperlösung benötigt. Die Inkubation des 1. Antikörper dauert 1 Stunde. Durch zweimaliges, kurzes Waschen der Zellen entfernt man den Erstantikörper wieder von den Zellen und pipettiert den 2. Antikörper (Fluoreszenz-markiert) auf die Zellen. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten (in Dunkelheit) wäscht man erneut mit PBS<sup>++</sup> (2x kurz, 1x 5 Minuten) und färbt die Zellkerne zusätzlich mit 4',6'Diamidino-2-phenylindol (DAPI) 1:10.000 in PBS<sup>++</sup> für 5 Minuten. Nach der DAPI-Färbung wäscht man die Zellen 4x kurz und zieht den gekammerten Aufsatz von den Objektträger. Die markierten Zellen werden nun mit Fluoprep 0,2%, DABCO) und einem Deckgläschen eingedeckt und lichtgeschützt getrocknet (am besten über Nacht).

<b>Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Quelle</b>	<b>Eingesetzte Verdünnung</b>
<i><b>Erstantikörper</b></i>			
Anti-p53-53kDa	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz	1:300
Anti-Ad5E2A- 72kDa	monoklonal, Maus (B6-6), Hybridomaüberstand	J. Flint, Princeton	1:300
<i><b>Sekundärantikörper</b></i>			
Alexa 488 grün	Ziege-anti-Maus IgG	Molecular Probes, OR, USA	1:500

Alexa 594 rot	Ziege-anti-Maus IgG	Molecular Probes, OR, USA	1:500
Alexa 594 rot	Ziege-anti-Kaninchen IgG	Molecular Probes, OR, USA	1:500

### 3.2.3 TUNEL-Methode zur Detektion von Apoptose (TdT-mediated X-dUTP nick end labelling)

In apoptotischen Zellen kommt es zur Fragmentierung der chromosomalen DNA. Man erhält hierdurch Doppelstrang-DNA, leichte DNA-Fragmente (mono- und oligonukleosomale Fragmente) aber auch Einzelstrangbrüche (nicks). Solche DNA-Strangbrüche können durch eine enzymatische Markierung der freien 3'-OH-Enden mit modifizierten Deoxynucleotiden detektiert werden. Hierzu eignen sich die DNA-Polymerase (Nick-Translation) und die Terminale-Deoxynucleotid-Transferase (Endmarkierung). Die DNA-Polymerase arbeitet nur Templat-abhängig und detektiert auch zufällige Fragmentierung der DNA im Rahmen einer Nekrose. Die Terminale-Deoxynucleotid-Transferase dagegen kann glatte DNA-Enden von Doppelstrangbrüchen Templat-unabhängig markieren. Dieses Verfahren wird als TUNEL-Markierung bezeichnet (TdT-mediated X-dUTP nick end labelling). Es ermöglicht neben der Untersuchung einer homogenen Zellpopulation auch die Analyse einzelner transfizierter oder infizierter Zellen in einer gemischten Zellpopulation.

#### TUNEL-Markierung

50.000 H1299-Zellen werden in einem Chamber-Slide mittels Fugene-Transfektion (Abschnitt 3.1.3) transfiziert oder mit rekombinanten Adenoviren infiziert (Abschnitt 3.1.7). 20-24 Stunden nach Transfektion bzw. Infektion werden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd in PBS<sup>++</sup> für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und dann durch Behandlung mit 70%igem Ethanol bei -20°C für 2 Stunden permeabilisiert. In einer feuchten Kammer werden die Zellen dann mit 150 µl Reaktionslösung bedeckt.

### Reaktionslösung

1x Reaktionspuffer	
2,5mM.....	CoCl <sub>2</sub>
0,1 mM.....	DTT
0,25 U/μl.....	Terminale Transferase
0,01 mM.....	Biotin-16-dUTP

Es wird 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Um ein Austrocknen zu verhindern, werden die Kammern der Chamber-Slides mit Parafilm überdeckt. Nach dreimaligen Waschen mit PBS<sup>++</sup> werden die Zellen einmal mit PBS-BT (0,5% BSA und 0,05% Tween 20 in PBS<sup>++</sup>) gewaschen und dann 20 Minuten mit PBS-BT + 10% FCS inkubiert. Apoptotische Zellen können nun unter der Fluoreszenzmikroskop identifiziert werden.

## **3.3 Molekularbiologische Methoden**

### **3.3.1 Plasmid-Präparation in kleinem Maßstab (Minipräparation)**

Zur Plasmidpräparation wird das QIAprep-Spin-Miniprep-Kit der Firma Quiagen verwendet. Puffer, Säulen und Auffanggefäße sind Bestandteil des Kits.

Zunächst werden 4 ml 2YT- oder LB-Medium mit Antibiotikum (200 μg/ ml) versetzt und mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft. Die Bakterien werden über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. 1,5 ml der Übernachtskultur werden in einem Eppendorfcup bei 13.000 upm 1 Minute abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 250 μl Puffer 1 resuspendiert, mit 250 μl Puffer 2 für 5 Minuten lysiert und mit 350 μl Puffer 3 neutralisiert. Zur Trennung der DNA/ Bakterienwände wird das Lysat bei 4°C und 13.000 upm 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird auf eine Säule pipettiert und 1 Minute bei 13.000 upm zentrifugiert, um die Plasmid-DNA an die Säule zu

binden. Der Durchlauf wird verworfen und die Säule mit 750 µl PE-Puffer (Zentrifugation wie oben) gewaschen. Anschließend ist noch eine weitere Zentrifugation erforderlich, um Pufferreste zu entfernen. Zur Elution der DNA tauscht man das Auffanggefäß gegen ein Eppendorfcup aus, pipettiert 50 µl EB-Puffer auf die Säule und zentrifugiert erneut.

### **3.3.2 Plasmid-Präparation im großen Maßstab (Maxi-Präparation)**

Zur Maxi-Präparation wird das Maxiprep-Kit der Firma Quiagen verwendet. Puffer, Säulen und Auffanggefäße sind Bestandteil des Kits. Zunächst ist es erforderlich, 250 ml 2YT- oder LB-Medium mit Antibiotikum und einer Bakterienkolonie anzupflanzen und die Kultur über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler zu inkubieren. Diese Übernachtskultur wird in einem 250 ml Zentrifugegefäß mit Rotor JA-7,5 oder JA-10 bei 6000 upm und 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert. (900 µl dieser Übernachtskultur werden mit 150 µl Glycerol (80 %) versetzt und in einem Eppendorfcup bei -70°C als Glycerolkultur aufbewahrt. Von dieser Glycerolkultur können direkt Maxi- oder Mini-Präparationen angeimpft werden). Das Bakterienpellet wird mit 10 ml Puffer 1 resuspendiert, mit 10 ml Puffer 2 für 5 Minuten lysiert und mit 10 ml Puffer P3 neutralisiert. Anschließend gibt man die Bakteriensuspension auf einen Maxiprep-Filter und inkubiert die Suspension 10 Minuten lang. Während dieser Inkubationszeit äquilibriert man die Maxi-Prep Säulen mit 10 ml QBT-Puffer. Die Bakteriensuspension wird dann durch den Filter gepresst und ist nun frei von Zellwandfragmenten und Proteinen und kann direkt auf die Säule gegeben werden. Nach Durchfluss des Bakterienlysates wird die Säule 2x mit 30 ml QC-Puffer gewaschen. Die Elution der DNA erfolgt mit 15 ml QF-Puffer. Durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol wird die DNA gefällt. Das Pelletieren der DNA geschieht durch Zentrifugation bei 15.000 upm bei 4°C für 40 Minuten. Der Überstand wird verworfen und das DNA-Pellet wird mit 5 ml Ethanol (70 %) gewaschen. Nach abschließender Zentrifugation bei 15.000 upm für 15 Minuten wird das DNA-Pellet getrocknet und in 500- 1000 µl EB-Puffer resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt photometrisch.

### Konzentrationsbestimmung

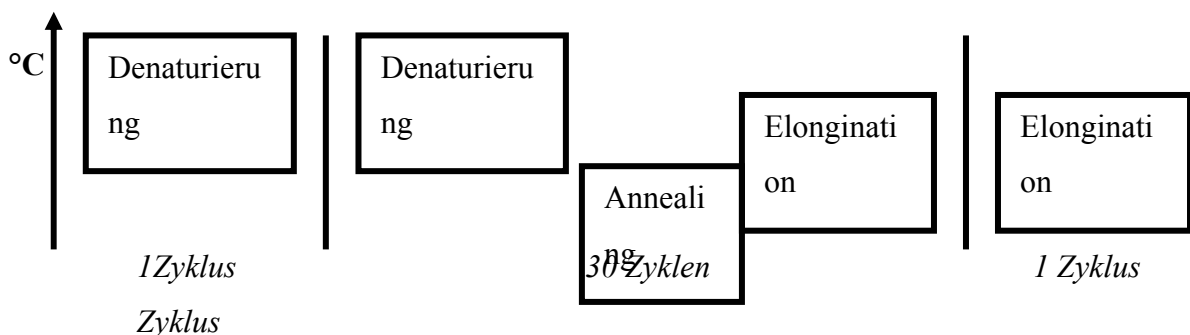
4 µl Maxipräparation werden mit 400 µl H<sub>2</sub>O dest. verdünnt und die Extinktion bei 260 nm bestimmt. Die Extinktion wird mit dem Faktor 5 multipliziert und man erhält auf diese Weise die Konzentration in µg/ µl.

Anmerkung: Das Waschen der Maxi-Präparations-Säulen erfolgt nicht durch Zentrifugation, sondern ausschließlich durch Gravitationskraft.

### 3.3.3 Amplifikation von DNA durch PCR

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) handelt es sich um eine Methode zur enzymatischen Amplifizierung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind (Saiki *et al.*, 1985; Salki *et al.*, 1988). Damit gelingt der Nachweis kleinster Mengen spezifischer DNA-Sequenzen. Des weiteren ist es möglich, mittels geeigneter Primer gezielt Mutationen oder Restriktionsschnittstellen einzufügen. Die PCR beruht auf folgendem Prinzip:

Nach einer ersten Phase des Denaturierens der DNA bei hoher Temperatur (>90°C), folgt in der zweiten Phase (Amplifikation) eine Wiederholung von Denaturieren der Doppelstränge, Anlagerung (Annealing) der Primer an die DNA und Synthese des komplementären Stranges (Elongination).





### Durchführung der PCR (Polymerase-Chain-Reaction)

Die PCR-Reaktionen wurden in dem programmierbaren Heizblock "geneAmp PCR System 2400" und mit speziellen PCR-Gefäßen (Fa. Perkin Elmer, Weiterstadt) ausgeführt.

### Reaktionsansatz

10 µl.....PCR-Puffer 10x  
1 µl.....dNTP-Mix (20mM)  
1 µl.....Primer sense (50 ng)  
1 µl.....Primer antisense (50 ng)  
X µl.....DNA-Template (50 ng)  
1 µl.....PFU-turbo-Polymerase  
ad 100 µl H<sub>2</sub>O dest.

Das PCR-Gerät wird folgendermaßen programmiert:

Denaturierung vor dem ersten Zyklus	94°C	5 min
Denaturierung.....	94°C.....	30 sek
Primeranlagerung.....	60°C.....	5 sek
DNA-Synthese.....	72°C.....	2 min
( 30 Zyklen)		
DNA-Synthese.....	72°C.....	7 min

### 3.3.4 PCR-Klonierung

Bei einer PCR-Klonierung verfährt man wie zuvor beschrieben (Abschnitt 3.3.3). Man generiert sich das DNA-Fragment jedoch mit Hilfe der folgenden PCR-Reaktion:

10 µl.....10x PCR-Puffer  
1 µl.....dNTPs (20 mM)  
50 ng.....DNA-Template  
50 ng.....Primer sense  
50 ng.....Primer antisense  
1,5 µl.....Enzym  
ad 100 µl mit H<sub>2</sub>O dest.

Programmierung der PCR Maschine:

Denaturieren.....5 min.....94°C  
  
Denaturieren.....30 sec.....94°C  
Annealing.....15 sec.....60°C  
Synthese.....2,5 min.....72°C  
(30 Zyklen)  
  
Synthese.....7 min.....72°C

### 3.3.5 Reinigung von PCR-Fragmenten

Zur Reinigung der PCR-Fragmente wird das QIAquick-PCR-Purification-Kit der Firma Qiagen, Hilden verwendet. Puffer, Säulen und Auffanggefäße sind Bestandteil des Kits.

Zu einem Volumen PCR-Produkt werden zusätzlich fünf Volumina QIAquick PB-Puffer hinzugefügt und gemischt. Diesen Ansatz pipettiert man auf eine Reinigungssäule, die in ein Auffanggefäß gesteckt wird, und zentrifugiert ihn bei 13.000 upm 1 Minute lang, um die DNA an die Säule zu binden und die restliche PCR-Reagenzien zu entfernen. Der Durchlauf wird verworfen und die Säule mit 750 µl PE-Puffer gewaschen (Zentrifugation wie zuvor). Der Durchlauf wird erneut verworfen und die Säule nochmals bei 13.000 upm 1 Minute lang zentrifugiert, um die verbliebene Flüssigkeit zu entfernen. Die Säule wird dann in ein Eppendorfgefäß überführt und durch Zugabe von 50 µl EB-Puffer auf die Säule und nochmalige Zentrifugation (siehe oben) wird die gebundene DNA eluiert.

### **3.3.6 Restriktionsverdau von DNA zum Auffinden richtiger Klone (Kontrollverdau)**

Über eine enzymatische Reaktion werden bei diesem Verfahren einzelne Abschnitte aus einem Plasmid herausgeschnitten und auf einem Kontrollgel betrachtet.

#### Reaktionsansatz

7 µl.....Minipräparations-DNA  
1 µl.....10x Restriktionsenzym-puffer  
1 µl.....Restriktionsendonuklease  
(1 µl.....10x BSA je nach Enzym erforderlich)

Die Inkubation erfolgt bei den jeweiligen Temperaturen des Enzyms. Anschließend pipettiert man 2 µl 6x DNA-Probenpuffer zu den Proben und trägt sie auf ein Agarosegel mit Ethidiumbromid auf. Unter UV-Licht und im Vergleich zu dem Größenstandard lassen sich die korrekten Klone auffinden.

### 3.3.7 Präparativer Restriktionsverdau von DNA zur Isolierung großer Mengen eines geschnittenen DNA- Fragments

Größere Mengen von geschnittener DNA werden zur Klonierung von Expressionskonstrukten benötigt. Die Präparation kann dabei entweder aus einem Plasmid, das die gewünschte Sequenz enthält, oder aus einem zuvor durch PCR amplifizierten DNA-Fragment erfolgen.

Folgende Komponenten werden zu einem Reaktionsansatz zusammenpipettiert:

2-10 µg.....ds-DNA  
5 µl.....Reaktionspuffer 10x passend zu dem jeweiligen Enzym  
5 µl.....Reaktionsendonuklease  
( 5 µl.....BSA 10x, falls erforderlich )  
ad 50 µl.....H<sub>2</sub>O dest.

Die Inkubationszeit beträgt 1 h bei dem jeweiligen Temperaturoptimum des Enzyms (meist 37°C)

### 3.3.8 Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase

Eine Dephosphorylierung ist bei Vektoren notwendig, die für eine Klonierung eingesetzt werden sollen. Durch Alkalische Phosphatase werden bei geschnittenen DNA-Fragmenten die endständigen Phosphate entfernt, so dass eine Re-Ligation des Vektors selbst verhindert wird. Das einzuklonierende Fragment liefert dann das Phosphat welches für die Knüpfung der Phosphordiesterbindungen notwendig ist.

### Reaktionsansatz

50 µl.....bereits geschnittene DNA (Restriktionsverdau, Abschnitt 3.3.7)  
2,5 µl.....Alkalische Phosphatase  
5 µl.....Reaktionspuffer  
ad 50 µl H<sub>2</sub>O dest.

Inkubation des Ansatzes bei 37°C für mindestens 30 Minuten.

### **3.3.9 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel**

Die Trennung der DNA-Fragmente verschiedener Länge erfolgt dabei durch eine Agarose-Gelelektrophorese. Eine effektive Trennung der Fragmente hängt dabei von der Molekülgröße, der angelegten Spannung und der Agarosekonzentration ab. Es werden Agarosekonzentrationen von 0.5 – 2 % verwendet.

Sichtbar gemacht werden die Nukleinsäuren durch die Substanz Ethidiumbromid, welche in die DNA interkaliert und durch UV-Licht im interkalierten Zustand zur Fluoreszenz angeregt wird. Als Faustregel (Sambrook *et al.*, 1989) lässt man das Gel bei einer Spannung von nicht mehr als 5 V x cm<sup>-1</sup> Elektrodenabstand laufen, um ein Erwärmen und eine Diffusion der DNA gering zu halten. Dies ist besonders bei präparativen Gelen der Fall; bei analytischen Gelen können im Extremfall bis zu 12 V x cm<sup>-1</sup> angelegt werden.

Die Agarose wird in 1x TAE-Puffer aufgekocht, mit 0,25 µg/ ml Ethidiumbromid versetzt und als Horizontalgel mit gestrecktem Gelkamm gegossen. Die Gelkammer wird mit 1x TAE-Laufpuffer gefüllt. Die Proben werden vor dem Auftragen mit 6x DNA-Probenpuffer versetzt. Zur Kontrolle der DNA-Fragmentgröße wird die 1kb-ladder (Gibco BRL) als Marker eingesetzt. Nach elektrophoretische Auftrennung bei 80-100 Volt für eine Stunde wird das Ergebnis unter UV-Licht betrachtet und mit einer Polaroid-Kamera dokumentiert.

### 3.3.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten wird mit dem QIAquick-Gel-Extraction-Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die verwendeten Puffer sind im Kit enthalten. Das gewünschte DNA-Fragment wird mit einem Skalpell unter langwelligen UV Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und gewogen. Ein Volumen Agarosegel wird anschließend mit drei Volumina QX1-Puffer versetzt (100 mg Agarose entspricht dabei 100 µl Gelvolumen). Während einer Inkubation von 10 Minuten bei 50°C unter leichtem Schütteln löst sich das Gel auf. Anschließend fügt man diesem Ansatz ein Gelvolumen Isopropanol hinzu, mischt gut und belädt eine Gelextraktionssäule mit der Probe. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 13.000 upm ist die DNA an die Säulenmatrix gebunden und der Durchsatz wird verworfen. Die Säule wird dann mit 750 µl PE-Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 13.000 upm, 1 Minute). Um Restflüssigkeit zu entfernen, wird die Säule erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Im Anschluss daran tauscht man das Auffanggefäß gegen ein Eppendorfcup aus und eluiert die DNA mit 50 µl EB-Puffer durch Zentrifugation bei 13.000 upm für 2 Minuten.

### 3.3.11 Ligation von DNA

Für die Ligation wurde der Vektor mit Restriktionsendonukleasen linearisiert, dephosphoryliert und aus dem Agarosegel extrahiert (Abschnitte 3.3.7 – 3.3.10); gleiches gilt für das einzuklonierende DNA-Fragment, jedoch wird hier nicht dephosphoryliert. Fragment und Vektor werden nun mit Hilfe der DNA-Ligase (T4-DNA-Ligase aus dem Bakteriophagen T4) ligiert. Dieses Enzym katalysiert die Knüpfung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppe doppelsträngiger DNA.

### Reaktionsansatz

2 µl.....	10x Ligase Puffer
3 µl.....	Vektor-DNA (ca. 0,3 µg)
15 µl.....	Insert-DNA (ca. 1,5 µg)
2 µl.....	T4-DNA-Ligase

Die Inkubation des Ansatzes erfolgt entweder bei Raumtemperatur für mindestens 30 Minuten oder über Nacht bei 16°C. Die entstandenen Klone werden daraufhin in einem Restriktionsverdau geschnitten und das Resultat auf einem Agarosegel kontrolliert (Abschnitte 3.3.6, 3.3.9).

### **3.3.12 Fällen von DNA**

Das Fällen der DNA dient der Reinigung und der Entfernung von Reaktionspuffer und Bestandteilen des Ligationsansatzes.

### Ansatz

20 µl.....	Ligationsansatz
0,5 µl.....	Glycogen (20 mg/ml)
2 µl.....	Natriumacetat (3 M; pH 4,6) entspricht 1/10 des DNA Volumens
50 µl.....	Ethanol 100% (entspricht der 2,5 fachen Menge des DNA Volumens)

Der Ansatz wird bei 4°C für 30 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 250 µl Ethanol 70% gewaschen (Zentrifugation bei 13.000 upm für 15 Minuten). Der Überstand wird erneut verworfen und das Pellet getrocknet, um es anschließend in 10 µl EB-Puffer (Bestandteil der Quiagen Kits für PCR und Gel Reinigung) aufzunehmen.

### 3.3.13 Gerichtete Mutagenese (QuickChange)

Bei der QuickChange-Methode handelt es sich um ein Verfahren zum Austausch einer begrenzten Anzahl von Nukleotiden oder zum Einfügen von Deletionen (Nelson and McClelland, 1992). Es wird eine geringe Menge eines Plasmids als Matrize eingesetzt. Das gesamte ungeschnittene Plasmid wird mit einem Primerpaar amplifiziert, welches die gewünschte Mutation und eine Restriktionsschnittstelle trägt. Es werden zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide eingesetzt. Nach Amplifikation kann das Ausgangsplasmid, welches keine Mutation trägt, durch Verdau mit dem Enzym DpnI entfernt werden. Dpn I schneidet seine Erkennungssequenz nur in methylierter Form. Zu dieser Methylierung kommt es in bakteriellen Systemen. Da das Ausgangsplasmid in Bakterien vermehrt worden ist, ist die Erkennungssequenz in ihm methyliert. Aufgrund der Häufigkeit der DpnI-Erkennungssequenz, wird das Ausgangsplasmid praktisch vollständig abgebaut. Die in der PCR-Reaktion amplifizierte DNA dagegen trägt nicht-methylierte DpnI-Erkennungssequenzen und kann folglich nicht geschnitten werden. Diese DNA wird dann in elektrokompetente *E.coli* transformiert (Abschnitt 3.1.6) und die erhaltenen Klone zunächst im Restriktionsverdau analysiert und dann durch Sequenzierung bestätigt.

#### Reaktionsansatz

1x.....	Reaktionspuffer
50 ng.....	Template-DNA
125 ng.....	Primer hin
125 ng.....	Primer rück
2 mM.....	dNTPs
1 µl.....	Pfu Turbo-Polymerase



### PCR-Protokoll

95°C	30 sec	
95°C	30 sec	
55°C	1 min	(20 Zyklen)
68°C	12 min	
4°C		

Nach Zugabe von 2 µl DpnI wird der Ansatz für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wird anschließend einer Ethanol-fällung (Abschnitt 3.3.12) unterzogen und das erhaltene DNA-Pellet in 5 µl Wasser aufgenommen (kein EB Puffer, da Ionen bei Elektroporation stören). 0,5 µl der DNA werden in elektrokompetente *E.coli* transformiert (Abschnitt 3.1.6) und auf eine Ampicillin Agar-Platte ausgestrichen. Richtige Klone werden durch ein Kontrollgel identifiziert.

#### **3.3.14 Sequenzieren von DNA**

Die verwendete Methode der DNA-Sequenzierung beruht auf der in vitro-Synthese von DNA (Sanger *et al.*, 1977). Anstelle der radioaktiv markierten Nukleotide werden die Didesoxyribonukleosidtriphosphatmoleküle kovalent mit fluoreszierenden Farbstoffen (dRhodamine) verbunden. Auf diese Weise erhält jede Base einen anderen Farbstoff. Die Kettenverlängerungsreaktion wird in einem Reaktionsgefäß durchgeführt, das alle vier unterschiedlich fluoreszierenden Didesoxy-Analoga enthält.

Es wird das ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) verwendet. Zur Synthese der DNA wird die AmpliTaq DNA-Polymerase FS eingesetzt. Diese Polymerase baut im Gegensatz zur Taq Polymerase verstärkt auch Didesoxynukleotide ein.

Zur Sequenzierung wird doppelsträngige DNA eingesetzt, die im Rahmen einer Synthesereaktion denaturiert wird und als Matrix (Template) dienen kann. Mit Hilfe geeigneter Oligonukleotide, die zu einem Teil des Templates komplementär sind und

mit diesem hybridisieren, erfolgt durch die AmpliTaq DNA Polymerase FS in Gegenwart aller vier Didesoxynukleosidtriphosphate (dd NTPs) die Polymerisation der zum Template komplementären Sequenz. Während der Synthesereaktion kommt es durch den Einbau der dd NTPs zu statistisch verteilten Abbrüchen der Komplementärstrangsynthese. Da die dd NTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (dRhodamine) markiert sind, kann bei diesem System die Sequenzierreaktion in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Folgende Komponenten werden für einen Sequenzieransatz benötigt:

Terminator-Mix.....4 µl  
Primer.....50 ng  
Template.....0,5- 1 µg  
ad 20 µl mit H<sub>2</sub>O dest.

Der Ansatz wird durch eine Sequenzierungs-PCR amplifiziert:

Denaturieren.....2 min.....96°C

Denaturieren.....10 sec.....96°C

Annealing..... 5 sec.....50°C

Synthese..... 4 min.....60°C

(25 Zyklen)

Danach Aufbewahrung bei 4°C

Die Sequenzierprobe wird nun gefällt (Abschnitt 3.3.12) und das Pellet in 4 µl Formamid/ EDTA Probenpuffer aufgenommen. Vor dem Auftragen der Proben auf das Sequenziergel wird die DNA für 3 Minuten bei 95°C denaturiert und auf Eis gestellt.

Es wird anschließend 1,5 µl der Probe auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Kurz bevor die DNA-Fragmente aus dem Gel

herauslaufen, wird ihre Fluoreszenz mit Hilfe eines Lasers detektiert und die DNA-Sequenz mit einer speziellen Software ausgewertet.

### 3.3.15 Herstellung eines Sequenziergels

Die Glasplatten der Gelapparatur müssen zunächst mit dem Detergenz Alconox, H<sub>2</sub>O dest. und Isopropanol gereinigt werden. Nach dem Trocknen wird die Gelapparatur zusammengebaut. Die Gellösung wird dann zwischen die Glasplatten gegossen und der Haifischkamm umgekehrt eingesetzt. Das Gel polymerisiert mindestens 2 Stunden.

#### Sequenziergel

21,0 g.....	Harnstoff
8,4 ml.....	Acrylamidlösung (30 %)
6,0 ml.....	10x TBE
20,0 ml.....	H <sub>2</sub> O dest.
0,5 g.....	Amberlite

Der Ansatz wird mit einem Magnetrührer 20 min gerührt und anschließend filtriert. Danach werden 6 ml 10x TBE-Puffer zugegeben. Durch Zugabe von 20 µl TEMED und 350 µl APS-Lösung (10 %) polymerisiert das Gel. Nach der Polymerisation wird das Gel in die Gelapparatur eingebaut und die Pufferkammern werden mit Laufpuffer (1x TBE) gefüllt. Zunächst wird nur jede zweite Tasche mit 1,5 µl der Probe beladen und ein Pre-Run des Gels gestartet. Nach 10 Minuten wird der Lauf unterbrochen und es werden die restlichen Taschen gefüllt. Das Gel läuft circa 8 Stunden. Die Auswertung erfolgt über eine spezielle Software.

### 3.3.16 Präparation von DNA aus Viren (QIAmp DNA Mini Kit)

Zur Präparation von DNA aus Viren wird das QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen) benutzt. Puffer, Säulen und Auffanggefäße sind Bestandteil des Kits. Vor der Präparation wird ein Wasserbad auf 56°C erhitzt. Zu einer Probe von 200 µl Virus in PBS<sup>++</sup> (20 µl Viruslysat + 180 µl PBS<sup>++</sup>) werden 20 µl Protease und 200 µl Puffer AL zugegeben. Der Reaktionsansatz wird 15 Sekunden gevortext und 10 Minuten bei 56°C inkubiert. Es werden nun 200 µl Ethanol 100% hinzugegeben, und der Reaktionsansatz wird in ein QIAmp Spin Column pipettiert. Nach Zentrifugation von 1 Minute bei 8000 upm wird der Durchfluss verworfen und 500 µl Puffer AW1 hinzugegeben. Es wird erneut zentrifugiert (siehe oben), und man gibt 500 µl Puffer AW2 auf die Säule. Jetzt wird 3 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Durchfluss wird erneut verworfen und die Säule in eine neues Eppendorfgefäß gestellt. Nach Zugabe von 200 µl Puffer AE wird eine Minute gewartet und dann wird die DNA durch 1 minütige Zentrifugation bei 8000 upm in das Eppendorfgefäß eluiert.

### 3.3.17 Luciferase-Assay

Bei dem Luciferase-Assay handelt es sich um einen Reporter-Assay, in dem die Aktivierung eines Promotors durch verschiedene Proteine betrachtet wird. In dem verwendeten Reporterkonstrukt ist hinter dem spezifischen Promotor die Information für die Luciferase enthalten. Luciferase ist ein Protein aus einer Meeresquallenart, welches nach Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge fluoresziert. Das Maß dieser Anregung kann mit einem Luminometer gemessen werden und ist proportional zur Expression der Luciferase und somit zur Aktivierung des spezifischen Promotors. Das Aktivator-Protein kann ein in der Zelle natürlich vorhandenes Protein sein. Es können aber auch Aktivator-Proteine durch Ko-Transfektion mit dem Reporter oder durch Expression durch einen Virus verwendet werden.

### Ernten der transfizierten Zellen

Die Zellen werden üblicherweise 18 - 24 h nach Transfektion bzw. Infektion geerntet. Zum Ernten der Zellen, saugt man zunächst das Medium ab und wäscht die Zellen zweimal mit PBS<sup>def</sup>. Anschließend pipettiert man 150 µl Luciferase-Lysispuffer (1:5 verdünnt in H<sub>2</sub>O dest.) pro Well auf die Zellen. Nach 15 Minuten Inkubationszeit auf dem Schüttler werden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst, das Zelllysate in Eppendorfcups überführt und 5 Minuten bei 13.000 upm abzentrifugiert. Der Überstand wird in neue Eppendorfcups überführt, und das Pellet (Zelltrümmer und Kerne) wird verworfen. Anschließend bestimmt man die Proteinmenge des Zelllysateüberstandes.

### Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung geschieht mittels Bradford-Test. 5 µl des Zelllysateüberstandes werden in Plastikkuvetten (1 ml) pipettiert und mit 1 ml des Proteinbestimmungsreagenz (BioRad), welches zuvor 1:5 mit H<sub>2</sub>O dest. verdünnt wurde, gemischt. Anschließend bestimmt man die Extinktion der Proben bei 595 nm.

### Bestimmung der Luciferaseaktivität mit dem Luminometer (Institut für Immunologie)

Nach der Proteinbestimmung normiert man die Proben folgendermaßen:

$$\text{Probe X} = \frac{\text{niedrigste Extinktion}}{\text{Extinktion der Probe X}} \times 20 = \text{einzusetzendes Volumen in } \mu\text{l}$$

Die jeweiligen, normierten Proben werden in Mikrotiterplatten pipettiert, und das fehlende Volumen wird mit Luciferase-Lysispuffer (1:5) aufgefüllt. Als Referenz dient Luciferase-Lysispuffer (1:5), gegen den die Luciferaseaktivität der Proben abgeglichen wird. Die Luciferaseaktivität wird mit Hilfe eines Luminometers (Institut für Immunologie) bestimmt. Zur Messung wird Luciferase-Reagenz benötigt, welche im Luciferase-Kit mitgeliefert wird. Man mischt das Luciferase-Reagenz mit 10 ml des mitgelieferten Puffers, schüttelt die Lösung und überführt sie in ein 15 ml Bluecup,

welches lichtgeschützt mit Aluminiumfolie umwickelt wird. Das Luciferase-Reagenz kann nun zur Messung verwendet und anschließend bei einer Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt werden. Bevor die Mikrotiterplatte in das Luminometer eingebracht wird, ist es nötig, die Injektionsschläuche für das Reagenz mit  $\text{H}_2\text{O}$  dest. durchzuspülen. Die Messung der Chemoluminizenzen am Luminometer erfolgt halbautomatisch, und die dabei entstehenden Messwerte werden elektronisch weiterverarbeitet und digitalisiert.

### 3.3.18 Isolierung von RNA mit Trizol

Zur Isolierung von RNA aus Zellen wird das Medium über den Zellen abgenommen und die Zellen kurz mit  $\text{PBS}^{\text{def}}$  gespült. Danach werden die Zellen mit Trizol überschichtet. Wie bei allen Arbeiten mit RNA ist das Tragen von Handschuhen sehr wichtig.

#### Mengen an Trizol

6-Well-Dish	1 ml
kleine Kulturflasche	3 ml
große Kulturflasche	6 ml

Die Zellen werden für 5 - 10 min inkubiert. Danach wird mit einer Pipette das Trizol mehrmals auf- und abpipettiert. Es werden nun Eppendorf-Gefäße mit je 1 ml Trizol-Zell-Gemisch gefüllt. In das Eppendorf-Gefäß werden nun 200  $\mu\text{l}$  Chloroform zugegeben und das Gemisch wird 15 Sekunden gevortext. Nach 3 minütiger Lagerung bei Raumtemperatur wird das Gemisch 15 Minuten bei 12.000 upm und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Es bilden sich zwei Phasen, wobei die RNA in der oberen, wässrigen Phase gelöst ist. Diese wird abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Es werden dann 500  $\mu\text{l}$  Isopropanol hinzugegeben und das Eppendorf-Gefäß wird 10 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Die RNA fällt in dieser Zeit aus und wird anschließend pelletiert, indem das Eppendorf Gefäß 15 Minuten mit 12.000 upm bei

4°C zentrifugiert wird. Danach wird der Überstand verworfen und die RNA mit 80 prozentigen Ethanol kurz gewaschen. Die getrocknete RNA wird dann in RNase-freien Wasser oder EB-Puffer aufgenommen. Die Menge sollte so gewählt werden, dass Konzentrationen von 1- 2 µg/ µl entstehen.

### **3.3.19 DNase Behandlung**

Die RNA kann zusätzlich mit DNase behandelt werden, um eine besonders reine, von genomischen Rückständen befreite RNA zu erhalten. Hierzu werden 500 µl RNA (Konzentration ca. 1 mg/ ml) mit 100 µl 10 x DNase I Puffer, 50 µl DNase I und 350 µl Wasser versetzt. Nach kurzem Mixen wird das Gemisch 1 Stunde bei 37°C inkubiert, und die Reaktion wird mit 100 µl Terminations-Mix gestoppt.

Das Gemisch wird nun auf zwei Eppendorf Gefäße zu je 550 µl verteilt und es werden 500 µl Phenol und 300 µl Chloroform hinzugegeben. Nach kurzem Vortexen werden die beiden Phasen durch 10 minütige Zentrifugation bei 14.000 upm und 4°C getrennt und die obere Phase in ein frisches Eppendorf Gefäß überführt. In einem zweiten Reinigungsschritt werden nun 550 µl Chloroform hinzugegeben, das Gemisch gevortext und erneut bei 14.000 upm und 4°C 10 Minuten zentrifugiert. Die obere Schicht wird erneut vorsichtig abgetrennt und es werden 50 µl 2 M NaOAc und 1,5 ml Ethanol (95%) hinzugegeben (optional noch 20 µg Glycogen). Das Gemisch wird 10 Minuten auf Eis inkubiert und 15 Minuten bei 14.000 upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet vorsichtig mit Ethanol (80%) gespült. Nach dem Trocknen wird die RNA in ca. 200 µl RNase freies Wasser oder EB-Puffer aufgenommen und bei -70°C gelagert.

### 3.3.20 Konzentrationsbestimmung der RNA

Nukleinsäuren bestehen zu einem großen Teil aus aromatischen Ringsystemen, die Licht einer Wellenlänge von 260 nm absorbieren. Die Absorption einer nukleinsäurehaltigen Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm ist deshalb proportional zu der Nukleinsäurekonzentration. Eine  $OD_{260}$  ( $OD$ =optische Dichte) von 1 entspricht ca. einer dsDNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und einer RNA-Konzentration von 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Durch Bestimmung der Absorption einer Nukleinsäure-Lösung bei 260 nm lässt sich also deren Konzentration wie folgt berechnen:

$$OD_{260 \text{ nm}} \times \text{Verdünnung} \times \text{Faktor} \times 1000^{-1} = \text{Nukleinsäuregehalt } (\mu\text{g}/\mu\text{l})$$

Oligonukleotide	Faktor 20
Einzelsträngige RNA	Faktor 40
Doppelsträngige DNA	Faktor 50

### 3.3.21 Northern-Blot Analyse

Beim Northern-Blot wird eine markierte DNA mit auf positive Nylonmembran geblotteter RNA hybridisiert. Zur Markierung wird  $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  benutzt.  $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  eignet sich besonders zur Detektion kleiner RNA-Mengen, da hybridisiertes  $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  wegen seiner hohen Strahlungintensivität schon in geringen Mengen gemessen werden kann.

Es werden hierzu 10 - 15  $\mu\text{g}$  Proben-RNA (hierzu wird die Total-RNA benutzt; diese enthält folglich auch die ribosomale RNA) in einem Volumen von 10  $\mu\text{l}$  mit 15,5  $\mu\text{l}$  Reaktionslösung versetzt und der Ansatz wird 15 min bei 65°C aufgekocht.



### Reaktionslösung

2 µl.....5x Laufpuffer  
3,5 µl.....Formaldehyd (37%)  
10 µl.....Formamid

Nachdem der Ansatz kurz in Eis abgekühlt ist, werden zusätzlich 2 µl Ambion Auftragungspuffer hinzugegeben. Die so vorbereitete RNA wird bei einer Spannung von 80 Volt in einem RNA-Agarosegel für 1 - 2 Stunden aufgetrennt. Will man eine feinere Auftrennung der RNA erreichen muss man das Gel bei niedriger Spannung entsprechend länger laufen lassen.

### RNA-Agarosegel

Es werden 0,45 g Agarose in 23,3 ml H<sub>2</sub>O dest. aufgekocht und dem Ansatz nach abkühlen auf circa 60°C weitere 6 ml 5x Laufpuffer und 1 ml Formaldehyd (37 %) hinzugegeben. Das Gel wird mit einer Pipette gegossen. (Alle für die Northernblot Analyse verwendeten Apparaturen werden vorher mit Ethanol und/ oder RNA-Zap (Ambion) behandelt, um RNase-Freiheit zu gewährleisten)

Die Laufkammer wird erst bis zum Rand des Gels mit 1x Laufpuffer gefüllt und die Taschen mit dem vorbereiteten RNA Ansatz geladen. Nun wird eine Spannung angelegt und die RNA läuft in das Gel ein. Erst jetzt wird das gesamte Gel mit 1x Laufpuffer überschichtet.

### Blotten und Cross-Linken der RNA

Zum Blotten der RNA auf positiv geladene Nylonmembran (Ambion) wird der Posiblot der Firma Stratagene verwendet. Der Blot wird nach Anleitung zusammengebaut, und die RNA wird mit 10x SSC als Transferpuffer für 2 Stunden bei einem Druck von 70 mbar geblottet.

Die Nylonmembran wird danach kurz in Phosphatpuffer gewaschen und mit dem Strata-Linker cross-gelinkt, um die Bindung der RNA an die Membran zu verstärken. Es folgt eine Prähybridisierung von mindestens 2 Stunden in 7,5 ml Ultra-Hyb Hybridisierungslösung (Ambion) der 200 - 500 µg Lachssperma-DNA als Kompetitor zugegeben wird (DNA vorher 10 Minuten bei 95°C aufkochen).

#### Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung der DNA Sonden erfolgt mit dem DecaLabel DNA Labelling Kit (MBI Fermentas). Als Templat für die Sonden können Abschnitte des Genes von größer 200 Basenpaaren oder auch die gesamte Sequenz benutzt werden. Sollte kein Templat zur Verfügung sein, kann man diese über eine Suche in der IMAGE-Datei des Deutschen Humanen Genom Projekts erhalten (Abschnitt 3.3.21). Folgende Sequenzen standen als „volle Länge“-Sonden zur Verfügung. Die Sonden wurden mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdaut und über eine Gelelektrophorese gereinigt (Abschnitte 3.3.7, 3.3.9, 3.3.10).

Plamid: \_\_\_\_\_ Restriktionsenzyme:

PRcCMVp21	Not I, Bgl II
PRcCMVp53	Xba I, Hind III
pcDNA3Rack1	Xma I, Kpn I
pCMVneoBamPIG3	Xho I, Eco RI
pcDNA3ERCC1	Xba I, Eco RI

Es werden folgende Komponenten zusammenpipettiert.

100 ng.....	Sonden DNA
10 µl.....	Dekanukleotide (zufällige Nuklotidsequenzen, die als Primer dienen)
29 µl.....	H2O dest.
40 µl.....	Ansatz

Der Ansatz wird 10 Minuten bei 95°C aufgeköcht (die DNA wird denaturiert) und dann 3 Minuten auf Eis gekühlt. Es werden dann hinzugegeben:

3 µl.....Mix.C  
6 µl.....[α32P]dCTP  
1 µl.....Klenow exo- Fragment

Die Reaktion wird für 5 Minuten bei 37°C durchgeführt. Dann werden noch einmal 4 µl dNTP-Mix hinzugegeben und die Reaktion weitere 5 Minuten bei 37°C vervollständigt. Es folgt der Abbruch der Ca<sup>++</sup>-abhängigen Reaktion mit 1 µl 0,5M EDTA.

Um die markierten Sonden von nicht inkorporierter Radioaktivität zu befreien, werden sie mit Sepadex G-25 Spinn Säulen gereinigt. Hierzu wird bei den Säulen der Boden abgebrochen und der Deckel wird leicht geöffnet. Die überflüssige Elutions-Flüssigkeit wird durch 2 minütige Zentrifugation bei 3000 upm entfernt. Die Probe wird nun auf die Säule gegeben und die markierte Sonde durch eine weitere Zentrifugation (2 Minuten; 3000 upm) in einem frischen Eppendorfgesäß aufgefangen. Die nicht eingebaute Radioaktivität verfängt sich in den feinen Poren der Säule und es kann mit einem Geiger Müller Zähler abgeschätzt werden ob die Markierungs-Reaktion erfolgreich war (etwa 50% der Radioaktivität muss im Durchfluss sein).

Die gereinigte Sonde wird nun noch einmal **10 Minuten bei 95°C aufgeköcht**, um Sekundärstrukturen zu lösen und wird dann in das Hybridisierungsröhrchen dem Hybridisierungspuffer zugegeben.

#### Hybridisierung der DNA-Sonden mit den Nylonmembran-Folien

Die Hybridisierung erfolgt über Nacht im 42°C warmen Dreh-Ofen.

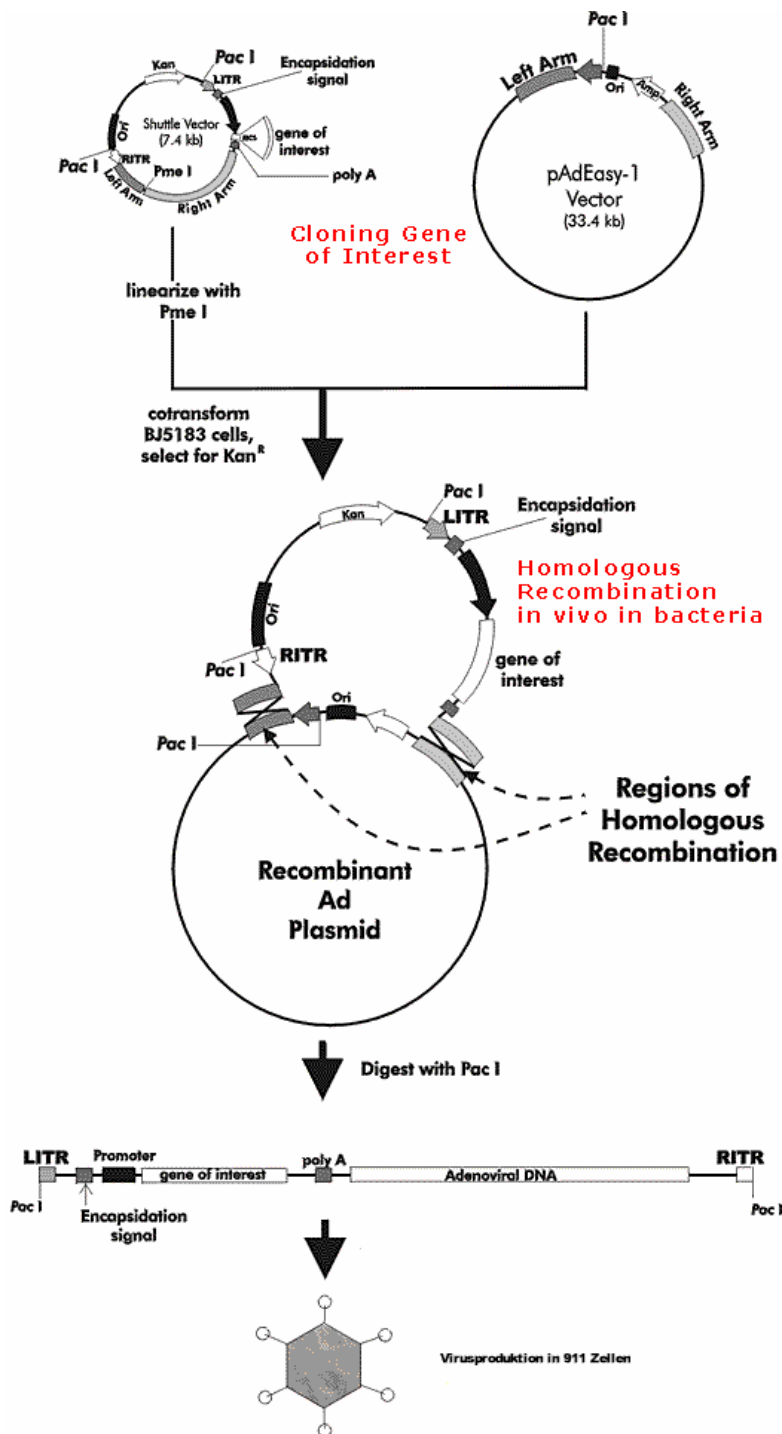
Am nächsten Tag wird der Blot 2x 5 Minuten mit Waschlösung I (2x SSC; 0,1% SDS) und 2x 15 Minuten mit Waschlösung II (0,1x SSC; 0,1% SDS) gereinigt und dann wird ein Film oder eine Phosphorimager-Platte mit den radioaktiven Blots exponiert. Nach 6 Stunden bis 4 Tagen kann das Ergebnis ausgewertet werden.

### 3.3.22 Herstellung von Sonden aus IMAGE-Klonen

Um Sonden für Northern-Blot Analysen von Genen zu erstellen, von denen nicht die gesamte Sequenz zur Verfügung stand, wurden diese Gensequenzen über eine „BLAST“-Suche mit der IMAGE-Datei des deutschen „Human Genome Project“ verglichen. Die entsprechenden Plasmidklone werden vom RZPD erhalten und die Sequenzen als Sonden herausgeschnitten. IMAGE-Klone sind Plasmide, bei denen über den Poly-A-Schwanz der m-RNA großflächig Gene hybridisiert und in die IMAGE-Datei aufgenommen wurden, ohne diese Gene genauer zu charakterisieren. Die IMAGE-Klone erhalten meist nur einen Teil der gesamten Gensequenz; es können jedoch Abschnitte von 200-400 Basenpaaren als Sonden verwendet werden. Die verwendeten IMAGE-Klone sind im Abschnitt 2.10 aufgelistet.

### 3.3.23 Herstellung rekombinanter Adenoviren mit dem AdEasy-System

Mit dem AdEasy-System (He *et al.*, 1998) ist es möglich relativ einfach rekombinante Adenoviren herzustellen, welche zusätzlich das GFP („green fluorescent protein“) und ein weiteres gewünschtes Protein exprimieren. Dafür wird das zu exprimierende Gen („gene of interest“) in einen Shuttle-Vektor (pShuttleVector) kloniert und dieser mit einem das adenovirale Genom (ohne die E1-Region) tragenden Vektor (pAdEasy-1Vector) in *E.coli* Stamm BJ5813 kotransformiert. Die Expressionskassette für das GFP ist dabei schon auf dem Shuttle-Vektor vorhanden. Das Resultat ist ein infektiöses, aber in normalen Zellen nicht mehr replikationsfähiges rekombinantes Virus, welches in den infizierten Zellen GFP und das „gene of interest“ exprimiert.



**Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Adeasy-Systems.** Das zu exprimierende Gen („gene of interest“) wird im ersten Schritt in einen Shuttlevektor kloniert. Das erhaltene Plasmid wird mit Pme I liniarisiert und mit dem adenoviralen Background-Plasmid Adeasy I in *E.coli* BJ5183 kotransformiert. Rekombinante Plasmide werden über eine Kanamycin-Resistenz selektiert und dann erneut liniarisiert und in 293 bzw. 911 Zellen transfiziert, in welchen das Virus sich vermehrt. (Graphik aus der Beschreibung der AdEasy-Systems der Firma Clontech, Internetseite: .....)

### Generation von Rekombinanten Klonen in Bakterienzellen

Das Gen, welches von den rekombinanten Adenoviren exprimiert werden soll („gene of interest“) wird in einen Shuttle-Vektor (pShuttleVector) kloniert. Hierzu steht eine „Poly-Restriction-Site“ zur Verfügung. Zusätzlich finden sich auf diesem Shuttle-Vektor Sequenzen, welche homolog sind zu Sequenzen auf dem Adeasy-1-Vektor (pAdEasy-1Vector). Der Adeasy-1-Vektor enthält das adenovirale Genom ohne die E1-Region. Die E1-Region ist eine wichtige Region bei der Replikation des Adenovirus. Das Fehlen der E1-Region stellt somit sicher, dass die entstehenden rekombinanten Viren sich nicht in normalen Zellen replizieren können. Die in meiner Arbeit verwendeten Gene p53, p53 $\Delta$ 62-91 und p53mt24-28 befanden sich dabei im Hintergrund des Plasmids pRcCMV. Die Plasmide und der Shuttle-Vektor wurden jeweils mit den Restriktionsendonukleasen Xba I und Hind III verdaut und die das „gene of interest“ tragenden Fragmente mit dem Shuttle-Vektor ligiert (Abschnitt 3.3.6 – 3.3.11). Für die Herstellung des GFP exprimierenden Adenovirus AdGFP entfiel dieser Schritt.

Der Shuttle-Vektor mit dem zusätzlichen Genabschnitt (pShuttleVectorGOI) und der pAdEasy-1-Vektor werden nun mit dem Restriktionsenzym Pme I linearisiert, welches beide Vektoren zwischen ihren homologen Sequenzen schneidet. Die Fragmente werden wie in Abschnitt 3.3.5 gereinigt und in einen Stamm elektrokompetenter *E.coli* BJ5183 kotransformiert. Hier kommt es zur homologen Rekombination der beiden Plasmide an den überlappenden Sequenzen. Die Kotransformation mittels Elektroporation findet in 2.0 mm Küvetten bei 2.500V, 200 Ohm und 25 $\mu$ FD in einem Bio-Rad Gene-Pulser statt. Das Transformationmix wird danach in 500  $\mu$ l LB-Medium resuspendiert und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wird das Medium auf 4 - 5 LB-Kanamycin Agarplatten verteilt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank belassen.

Nun werden die 10 - 20 kleinsten Kolonien (es handelt sich um ein sehr großes Plasmid, somit haben die Kolonien einen Wachstumsnachteil und wachsen sehr langsam) gepickt und in 2 ml LB-Medium welches 25  $\mu$ l Kanamycin enthält für 10 - 15 Stunden bei 37°C geschwenkt und vermehrt. Die erhaltenen Plasmide werden mit Pac I verdaut, welches die überflüssige Kanamycinresistenz herauschneidet und dann auf einem Gel

betrachtet. Richtige Klone enthalten außer dem großen Fragment von ca. 30 kD noch ein kleines Fragment von ca. 3 – 4,5 kD. Ein solcher Klon wird dann Ethanol präzipitiert und mit LipofectaminPlus (Abschnitt 3.1.4) in 911- oder 293-Zellen transfiziert.

#### Produktion von Viren in 911- oder 293-Zellen

Sowohl 911- als auch 293-Zellen sind Zellen, welche die E1A- und die E1B-Region des Adenovirus stabil exprimieren. In ihnen kann somit der rekombinante Virus, welchem die E1-Region fehlt, sich trotzdem vermehren und expandiert werden. Dazu sollten ca.  $2 \cdot 10^6$  Zellen in eine T-25 Flasche ausgesät und über Nacht bei 37°C belassen werden. Die Zellen in der Flasche sollten zu 50%- 70% konfluent sein. In den Zellen kommt es dann zur Expression der viralen Proteine und zur Vermehrung der sich daraus formenden Viren. Die gelungene Transfektion und die beginnende Virusproduktion können über die Expression des GFP unter dem Fluoreszenzmikroskop verfolgt werden. Nach 7- 10 Tagen werden die noch auf dem Boden haftenden Zellen mit einem Schaber steril entfernt und die Zellen mit dem Medium in ein 50 ml Falcon-Tube überführt. Die Zellen werden nun zentrifugiert und kurz mit sterilen PBS<sup>def</sup> gewaschen. Danach werden die Zellwände durch 4 maliges Frieren-Tauen aufgebrochen und die Zelltrümmer kurz herunterzentrifugiert. Dieser Überstand kann nun wiederum auf mehrere T-25 Flaschen bzw. später auf T-75 Flaschen expandiert werden.

#### Präparation eines hochtitrigen Virus-Stocks

911- oder 293-Zellen werden in T-75 Flaschen ausgesät, so dass sie an nächsten Tag zu etwa 90% konfluent sind (ca.  $10^7$  Zellen). Um einen suffizienten Virustiter zu erhalten reichen normalerweise 10 – 15 T-75 Flaschen. Die Zellen werden dann mit einer MOI (multiplicity of infection) von 5 bis 10 pro Zelle infiziert. Nach ca. 3 - 4 Tagen haben sich fast alle Zellen vom Untergrund gelöst und schwimmen in der Flasche. Restliche Zellen werden mit einem sterilen Schaber vom Untergrund gelöst. Die Zellen werden mit dem Medium in 50 ml Falcon-Tubes gegeben und kurz abzentrifugiert. Danach wird das Pellet 2 mal kurz mit PBS<sup>def</sup> gespült und erneut runterzentrifugiert. Das Pellet wird

dann pro Falcon-Tube mit 400 - 500  $\mu\text{l}$  sterilen PBS<sup>def</sup> resuspendiert und die Zellwände durch 3 maliges Frieren-Tauen aufgeknackt. Danach werden die Zelltrümmer kurz herunterzentrifugiert und der Überstand mit den Viren in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die Virussuspensionen werden vereint und der Titer der Viren wird bestimmt.

#### Aufreinigung und Konzentrierung von Adenoviren im CsCl-Gradienten

Will man die Viren noch weiter konzentrieren und von überflüssigen Zelltrümmern befreien, kann man die Viren mit Hilfe eines CsCl-Gradienten anreichern. Etwa 10 bis 15 große Kulturflaschen ergeben einen entsprechend hohen Titer. Man wiegt dazu 4,4 g CsCl in ein 50 ml Falcon-Tube und gibt die Virussuspension hinzu. Das Volumen wird aus 10 ml aufgefüllt und in ein 12 ml Polyallomer-Gefäß für einen SW41-Rotor der Ultrazentrifuge überführt. Das Gemisch wird mit 2 ml Mineralöl überschichtet und gut ausgewogen. Danach wird das Röhrchen für 24 h bei 10°C und 32.000 upm zentrifugiert. Die Viren reichern sich in einer schmalen Bande ca. 1 cm unter dem Öl an. Diese Bande kann nun mit einer dünnen Spritze abgenommen werden. Gelagert werden die Viren vorzugsweise bei -20°C.

#### **3.3.24 Clontech cDNA-Arrays**

Ein cDNA-Array bietet die Möglichkeit zur quantitativen Analyse vieler m-RNA-Spezies in einer Probe. Hierzu wird aus einer Zellpopulation die mRNA isoliert und mit Hilfe des Enzyms Reverse-Transkriptase zu cDNA umgeschrieben und dabei radioaktiv markiert. Die markierte Probe wird dann mit einem Array hybridisiert, auf der viele Sonden (im Falle des „Clontech cDNA Array for Human“ 588 gut beschriebene Gene) in gleicher quantitativen Menge aufgeblottet sind. Die Auswertung durch den Phosphoimager erlaubt dann eine Aussage über die Menge der in der Probe enthaltenen mRNA und somit über die Aktivität der Transkription dieser Gene.



Aus einem Gewebe wird die Total-RNA (Abschnitt 3.3.17) isoliert und restliche DNA durch eine Behandlung mit DNaseI (Abschnitt 3.3.18) entfernt. Nun muss ein Reaktions-Master-Mix für die anschließende Synthese der cDNA zusammengestellt werden. Sämtliche Puffer und Enzyme sind dabei Bestandteil des Kits.

#### Master-Mix (für 3 Ansätze)

5 x Reaction Buffer	(4,4 $\mu$ l)	(17,6 $\mu$ l)
10 x dNTP Mix (ohne ATP)	(2,0 $\mu$ l)	(8 $\mu$ l)
[ $\alpha^{32}$ P]dATP	(5,0 $\mu$ l)	(20 $\mu$ l)
DTT (100mM)	(1 $\mu$ l)	(4 $\mu$ l)
MMLV Reverse Transkriptase	(2 $\mu$ l)	(8 $\mu$ l)
Total	(14,4 $\mu$ l)	(57,6 $\mu$ l)

Eine PCR Maschine folgendermaßen programmiert:

2 min 70°C --- 64 min 49°C

Es werden nun 10  $\mu$ g Total-RNA (mit H<sub>2</sub>O auf 7  $\mu$ l auffüllen) mit 1  $\mu$ l 10 CDS-Primer Mix gemixt. Dieses ist ein spezieller Primermix, welcher gezielt die Messenger-RNA binden soll, da diese bei Total-RNA noch nicht von der ribosomalen RNA isoliert wurde. Die RNA und die Primer werden nun 2 min auf 70°C inkubiert und dann 4 min auf 49°C gestellt. Bei dieser Temperatur kommt es zur Bindung der Primer an die RNA. Dem auf 49°C vorgewärmten Master-Mix werden 14  $\mu$ l pro Probe entnommen und dem Reaktionsgemisch zugegeben. Die Probe wird nun 30 min bei 49°C inkubiert. Es kommt zur Hybridisierung der cDNA an die Primer, wobei radioaktiv markiertes Adenin in die cDNA eingebaut wird. Nun wird noch 1  $\mu$ l Superscript II RT hinzugegeben und das Reaktionsgemisch wird für weitere 30 min bei 49°C inkubiert. Dann wird die Ca<sup>++</sup>-abhängige Hybridisierungsreaktion mit 2  $\mu$ l Termination-Mix (25mM EDTA) gestoppt.

### Reinigung der cDNA über eine Gelfiltration

Die nicht inkorporierte Radioaktivität wird durch spezielle Säulen aus den Proben gefiltert. Die Säulen werden 1 Stunde zuvor auf Raumtemperatur erwärmt. Der Boden der Säulen wird abgebrochen und der Deckel entfernt. Es wird gewartet, bis die Flüssigkeit in der Säule durch Schwerkraft durchgelaufen ist. Dann wird die Probe auf die Mitte der Säule gegeben. Es werden erst 40 µl H<sub>2</sub>O, dann 250 µl H<sub>2</sub>O durch die Säule durchlaufen gelassen. Nun werden 6 mal 100 µl H<sub>2</sub>O auf die Säulen gegeben und die einzelnen Fraktionen in 6 verschiedenen Eppendorf-Gefäßen gesammelt. Mit einem Geiger-Müller Counter kann nun die Radioaktivität in den einzelnen Proben gemessen werden. Die gelabelte cDNA befindet sich hauptsächlich in den Proben 2 und 3. Die nicht inkorporierte Restradioaktivität in den Proben 5 und 6.

### Hybridisierung der cDNA mit den Arrays

Zuerst wird eine Prähybridisierungslösung vorbereitet. Dazu werden 7,5 ml ExpressHyb (Clontech) auf 68°C erhitzt und es werden 0,5 mg gescherte Lachs-Hoden DNA, welche zuvor 5 Minuten bei 95°C aufgekocht wurde, als Kompetitor zugegeben. Die Membran wird 2 min in auf 85°C erhitzter 0,5% SDS Lösung aufgeweicht und dann in das Hybridisierungsröhrchen gegeben. Das Röhrchen wird mit H<sub>2</sub>O durchgespült und dann die Prähybridisierungslösung zugegeben. Die Prähybridisierung sollte mindestens 3 Stunden bei 68°C erfolgen. Nun werden die Fraktionen 2 und 3 aus der Gelfiltration zusammen mit 1/ 10 10 x Denaturing-Solution gemischt. Das Gemisch wird 20 Minuten bei 68°C inkubiert und es werden 5 µl C(t-1) DNA, einem weiteren Kompetitor der den Hintergrund beim Hybridisieren minimieren soll, hinzugegeben. Weiter werden noch 225 µl eines 2 x Neutralisationspuffers (1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; PH 7,0) zugegeben und alles zusammen bei 68°C für 10 Minuten inkubiert. Die Hybridisierung läuft über Nacht.

### Waschen des Auswertung der Arrays

Das Waschen erfolgt wie bei einer Membran eines Northern-Blots (Abschnitt 3.3.20). Die gewaschene Membran wird feucht und luftdicht verpackt und auf eine

Phosphoimager Platte gelegt. Nach 6 - 48 h kann die Platte dann am Computer ausgewertet werden.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Charakterisierung der prolin-reichen Domäne des p53-Proteins

#### 4.1.1 Die prolin-reiche Domäne des p53-Homologen p73 $\beta$ hat keine Funktion bei der Aktivierung des *PIG3*-Promotors

p73 $\beta$  ist wie p53 in der Lage, viele der p53-responsiven Promotoren zu aktivieren (Jost *et al.*, 1997; Kaghad *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1998). So werden zum Beispiel der *mdm2*-Promotor und der *PIG3*-Promotor durch beide Proteine nahezu gleich stark aktiviert. Das p73 $\beta$ -Protein besitzt wie p53 eine prolin-reiche Domäne an analoger Position. Hier findet man 8 Proline und zweimal das Motiv PXXP (Kaghad *et al.*, 1997).

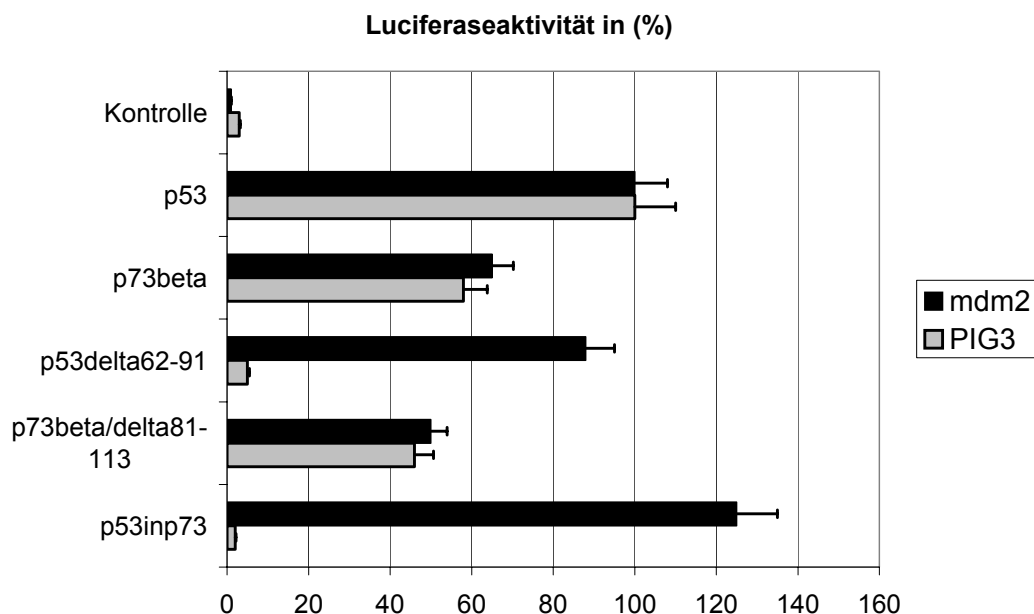
p53 : 62-EAPRMPEAAPPVAPAPAAPTPAAPAPAPSWPLSSSVSPSQ-100

p73 $\beta$ : 74-QMSSRAASASPYTPEHAASVPTHSPYAQPSSTFDTMSPAPVIP-116

Die prolin-reiche Domäne bei p53 ist notwendig, um bestimmte Promotoren zu aktivieren (Venot *et al.*, 1998). Daher stellte sich die Frage, ob die im p73 $\beta$ -Protein ebenfalls vorhandene prolin-reiche Domäne die gleiche Funktion besitzt. Um dieses zu prüfen, wurde eine Mutante des p73 $\beta$  Proteins hergestellt (p73 $\beta$  $\Delta$ 81-113), bei der die prolin-reiche Region in den zu p53 $\Delta$ 62-91 homologen Bereich deletiert wurde. Die Fähigkeit dieser Mutante, den *mdm2*- und den *PIG3*-Promotor zu aktivieren, wurde im Luciferase-Assay überprüft. Überraschenderweise war diese Mutante immer noch in der Lage, den *PIG3*-Promotor zu aktivieren, obwohl dieser Promotor von p53 $\Delta$ 62-91 nicht mehr aktiviert wird (Abbildung 4.1). Es scheint also keine generelle Notwendigkeit einer prolin-reichen Domäne für die Aktivierung des *PIG3*-Promotors zu bestehen.

#### 4.1.2 Die prolin-reiche Region von p73 $\beta$ kann die Funktion der prolin-reichen Region von p53 nicht ersetzen

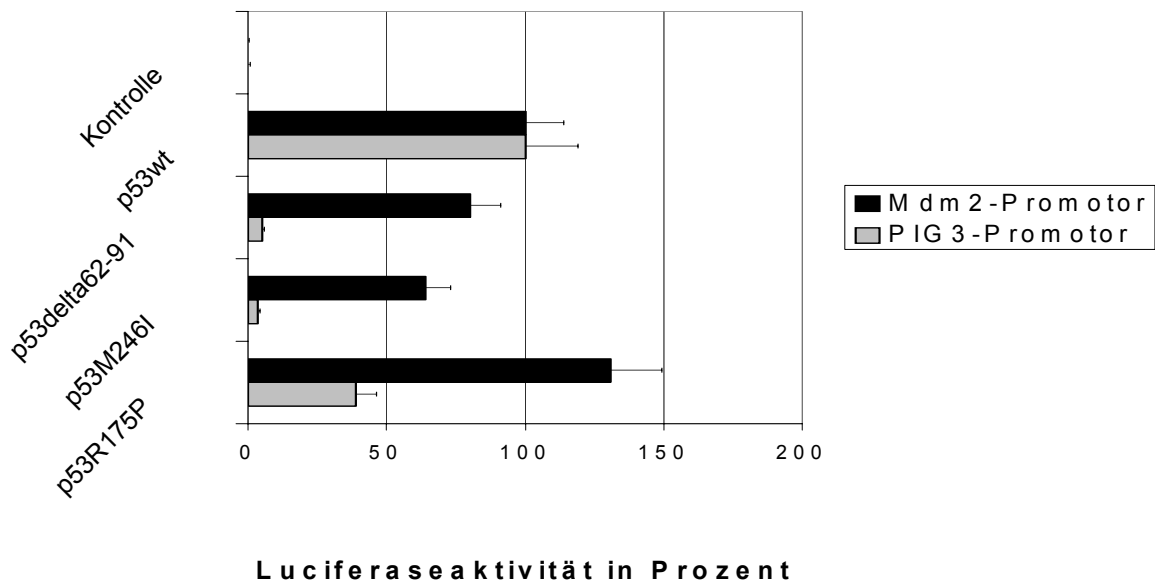
Als nächstes stellte sich die Frage, ob die prolin-reiche Region vom p73 $\beta$  die Funktionen der prolin-reichen Region von p53 übernehmen kann. Mit Hilfe der gerichteten Mutagenese (QuickChange) wurde hierzu eine zusätzliche Cla I-Restriktionsschnittstelle in p53 $\Delta$ 62-91 eingefügt. Danach wurde die Region AS 72-117 von p73 $\beta$  mit einer PCR amplifiziert und an analoger Stelle in p53 $\Delta$ 62-91 kloniert (p53inp73). Die Aktivierung des *mdm2*- und *PIG3*-Promotors wurde wiederum im Luciferase-Assay überprüft. Auch die Chimäre p53inp73 war jedoch nicht in der Lage, den *PIG3*-Promotor zu aktivieren (Abbildung 4.1). Die Prolin-reiche Domäne von p73 $\beta$  kann die Funktion der Prolin-reichen Domäne von p53 also nicht übernehmen.



**Abbildung 4.1: Aktivierung der Promotoren von *mdm2* und *PIG3* durch p53, p73 $\beta$  und Chimären.** Es wurden H1299-Zellen mit jeweils 1,3  $\mu$ g Plasmid-DNA (Vektor: pRcCMV, Invitrogen) und 0,2  $\mu$ g Reporter-DNA (Expression von Luciferase unter *mdm2*-Promoter bzw. *PIG3*-Promotor) kotransfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen in Lysis-Puffer geerntet und nach Normierung auf den Proteingehalt die Aktivität der Luciferase im Luminometer gemessen. Die gemessenen Werte bei der Induktion durch p53 wurden dabei gleich 100 % gesetzt und die weiteren entsprechend normiert. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden jeweils aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

### 4.1.3 Mutationen in der zentralen Domäne von p53 führen zu funktionellen Defekten wie bei p53 $\Delta$ 62-91

Auch wenn die Untersuchungen der Mutante p53 $\Delta$ 62-91 neue Erkenntnisse über die Funktion von p53 erbracht hat, blieb unklar, ob solche Mutationen auch in der Natur (z.B. bei der Entwicklung von Tumoren) von Relevanz sind. Betrachtet man p53-Mutationen in Tumoren, so finden sich nur wenige mit Veränderungen in der prolinreichen Domäne. Veränderungen in dieser Region scheinen also nicht von besonders großer Bedeutung bei der Entstehung von Tumoren zu sein. Wenn die prolin-reiche Domäne jedoch einen indirekten Einfluss auf die zentrale Domäne hat, könnten Veränderungen der zentralen Domäne den selben funktionellen Defekt zeigen wie p53 $\Delta$ 62-91. Die Aktivierung des *mdm2*- und des *PIG3*-Promotors durch verschiedene p53-Mutanten mit Veränderungen in der zentralen Domäne wurde deshalb im Luciferase-Assay getestet. Dabei fanden sich zwei aus Tumoren bekannte Mutationen des p53-Proteins (p53M246I, p53R175P) mit einem ähnlichen funktionellen Defekt wie p53 $\Delta$ 62-91. p53R175P zeigte dabei nur einen partiellen Defekt bei der Aktivierung des *PIG3*-Promotors, während p53M246I den *PIG3*-Promotor kaum noch aktivierte (Abbildung 4.2). Es gibt also Mutationen von p53 in der zentralen Domäne, die das gleiche Aktivierungsmuster bewirken, wie p53 $\Delta$ 62-91.

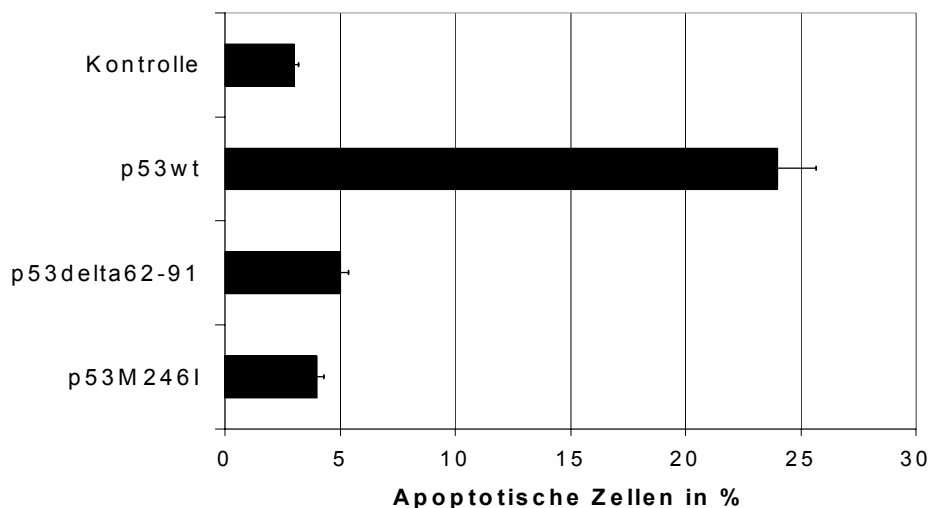


**Abbildung 4.2: Aktivierung des *mdm2*-Promotors und des *PIG3*-Promotors durch p53 und Mutanten.** Der experimentelle Ansatz entspricht dem Ansatz aus Abbildung 4.1.

#### 4.1.4 Die p53 Mutante M246I ist wie p53 $\Delta$ 62-91 nicht mehr in der Lage Apoptose zu induzieren

Die Mutante p53M246I zeigt, wie p53 $\Delta$ 62-91, einen Defekt bei der Aktivierung des *PIG3*-Promotors. Von p53 $\Delta$ 62-91 ist des weiteren beschrieben, dass es, wird es in Zellen überexprimiert, nicht wie p53 Apoptose induziert (Sakamuro *et al.*, 1997; Walker and Levine, 1996). Es stellte sich somit die Frage, ob auch p53M246I diese Funktion verloren hat. Zur Klärung dieser Frage wurden p53-negative H1299-Zellen transient mit Konstrukten zur Expression von p53wt, p53 $\Delta$ 62-91 und p53M246I transfiziert. Nach 72 Stunden wurde der Grad der Apoptose-Induktion bei den in der Immunfluoreszenz anti-p53 positiven und somit erfolgreich transfizierten Zellen durch DNA-Markierung (TUNEL = TdT-mediated X-dUTP nick end labelling) verglichen. Hierbei wurde durch p53 $\Delta$ 62-91, aber auch durch die Mutante p53M246I, deutlich weniger Apoptose induziert, als durch Wildtyp-p53 (Abbildung 4.3). In unserer Arbeitsgruppe zeigte Ana Contente zusätzlich, dass sowohl p53 $\Delta$ 62-91 als auch

p53M246I wesentlich weniger effizient an die DNA p53-responsiver Promotoren binden, als Wildtyp-p53. Die Mutante p53M246I zeigt somit einen dem p53 $\Delta$ 62-91 sehr ähnlichen Phänotyp.



**Abbildung 4.3: Induktion von Apoptose durch p53 und Mutanten.** H1299 Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für p53 und gezeigte Mutanten transfiziert (1.5  $\mu$ g DNA). 72 h nach Transfektion wurden apoptotische Zellen mit DNA-Markierung (TUNEL) detektiert. Gleichzeitig wurden die transfizierten Zellen mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Die Graphik zeigt die TUNEL-positiven und p53-positiven Zellen in Prozent der p53-positiven Zellen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus jeweils drei unabhängigen Experimenten ermittelt.

#### 4.2 Identifizierung weiterer p53-responsiver Gene, die durch p53, aber nicht durch p53 $\Delta$ 62-91 induziert werden

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die prolin-reiche Domäne notwendig ist, um den *PIG3*-Promotor zu aktivieren, und dass mit der Aktivierung dieses Gens die Apoptoseinduktion korreliert (Venot *et al.*, 1998). Ebenso haben wir gezeigt, dass es in einigen Tumoren Mutanten von p53 gibt, die sich phänotypisch wie p53 $\Delta$ 62-91 verhalten (Roth *et al.*, 2000). Ziel der weiteren Untersuchungen war nun, weitere p53-



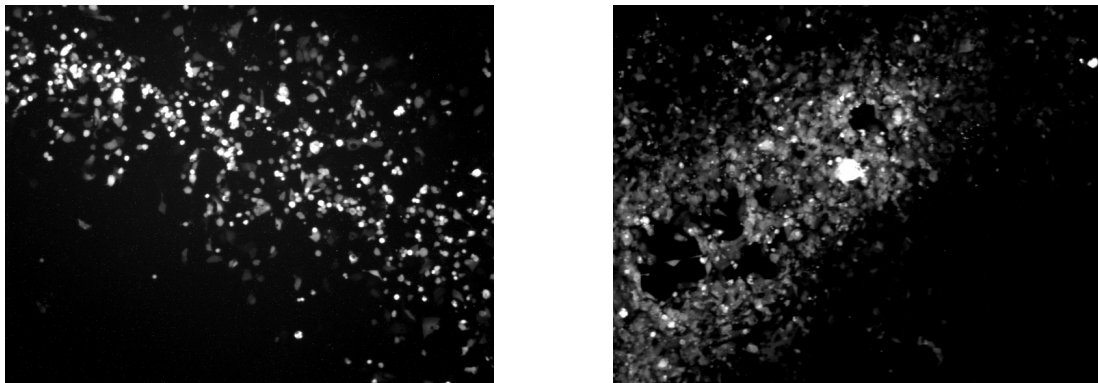
induzierte Gene zu finden, welche sich hinsichtlich ihrer Induzierbarkeit verhalten wie *PIG3*, und deren Funktion bei der Induktion von Apoptose zu klären.

#### **4.2.1 Erstellung von rekombinanten Adenoviren zur Expression von p53, p53 $\Delta$ 62-91 und GFP („green fluorescent protein“)**

Um die Induktion p53-responsiver Gene genau betrachten zu können, musste erst ein System etabliert werden, welches im selben Hintergrund (z.B. p53-negative H1299 Zellen) eine uniforme und effektive Expression von p53 bzw. p53 $\Delta$ 62-91 gewährleistete. Dieses System sollte in der Effektivität der p53-Expression deutlich über der einer Transfektion liegen. So konnte gewährleistet werden, dass schwach regulierte Gene, die durch ein auf Transfektion beruhendes System mit der nur begrenzten Transfektionseffizienz nicht erkannt werden könnten, identifiziert wurden. Hierzu wurde das kürzlich beschriebene Adeasy-System (He *et al.*, 1998) zur Herstellung rekombinanter Adenoviren verwendet (Abschnitt 3.3.23). Ziel war es, mit rekombinanten Adenoviren in p53-negativen H1299-Zellen kontrolliert p53 bzw. p53 $\Delta$ 62-91 und als Kontrolle GFP („green fluorescent protein“) zu exprimieren.

Das jeweilig vom rekombinanten Adenovirus zu exprimierende Gen („gene of interest“) wurde hierzu in den Shuttle-Vektor (pShuttleVector) kloniert und dieser mit einem das adenovirale Genom (mit Ausnahme der E1-Region) tragenden Vektor (pAdEassy-1 Vector) in *E.coli* Stamm BJ5813 Bakterien-Zellen kotransformiert. In den BJ5813-Zellen kam es zur homologen Rekombination beider Vektoren an überlappenden Genabschnitten, und es entstand ein rekombinantes Plasmid (Recombinant Ad Plasmid). Nach Verdau dieser Plasmid-DNA mit Pac I entstand ein Konstrukt, welches das gesamte adenovirale Genom ohne die E1-Region, die Information für GFP und das zu exprimierenden Gene („gene of interest“) unter Kontrolle eines *CMV*-Promotors trug. Dieses Konstrukt wurde dann in Zellen transfiziert, welche die E1-Region des Adenovirus stabil exprimieren (293- bzw. 911-Zellen). In diesen Zellen sind die rekombinanten Viren in der Lage, sich zu replizieren. Die Effizienz der Transfektion

bzw. der adenoviralen Replikation konnte durch die Expression des GFP unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert werden (Abbildung 4.4). In den erfolgreich transfizierten Zellen kam es zur Replikation der Viren und anschließend zur Lyse der Zelle. Es kam zur Freisetzung der Viren und Infektion der benachbarten Zellen. Dieses stellte sich im Fluoreszenzmikroskop als typische „Viruskometen“ dar. Durch weitere Vermehrung der Viren in entsprechenden Zellen und anschließender Ankonzentrierung und Reinigung entstanden hochtitrige Virusstocks (Adp53, Ad p53 $\Delta$ 62-91 und AdGFP) für weitere Experimente.

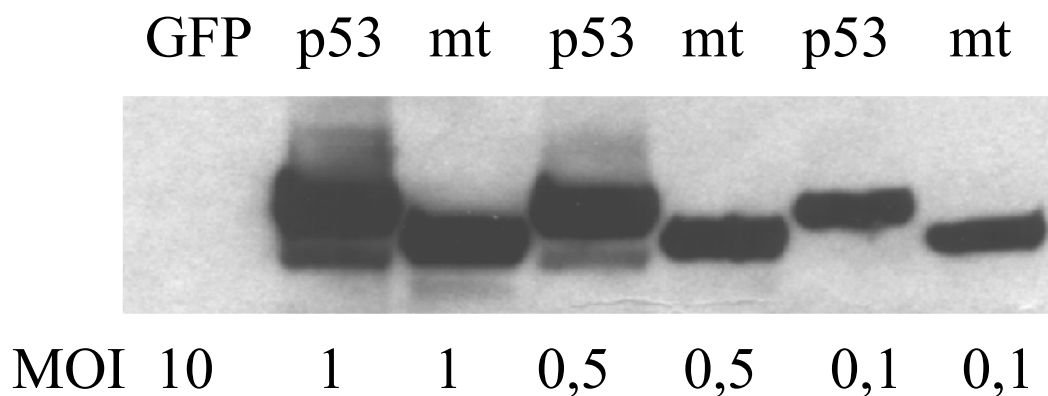


**Abbildung 4.4: Infizierte Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop („Viruskometen“).** Infizierte Zellen lassen sich unter dem Fluoreszenzmikroskop durch die Expression des GFPs nachweisen. Das Virus vermehrt sich in den Zellen. Es kommt zur Lyse der Zelle; die freigesetzten Viren breiten sich „kometenartig“ aus und infizieren die Nachbarzellen.

#### **4.2.2 Die rekombinanten Adenoviren exprimieren p53 bzw. p53 $\Delta$ 62-91 in p53-negativen Zellen**

Bei der Replikation der rekombinanten Adenoviren wurde bereits die Expression von GFP unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachten. Nun musste gezeigt werden, dass diese Viren in einem p53-negativen Hintergrund (H1299-Zellen), p53 bzw. p53 $\Delta$ 62-91

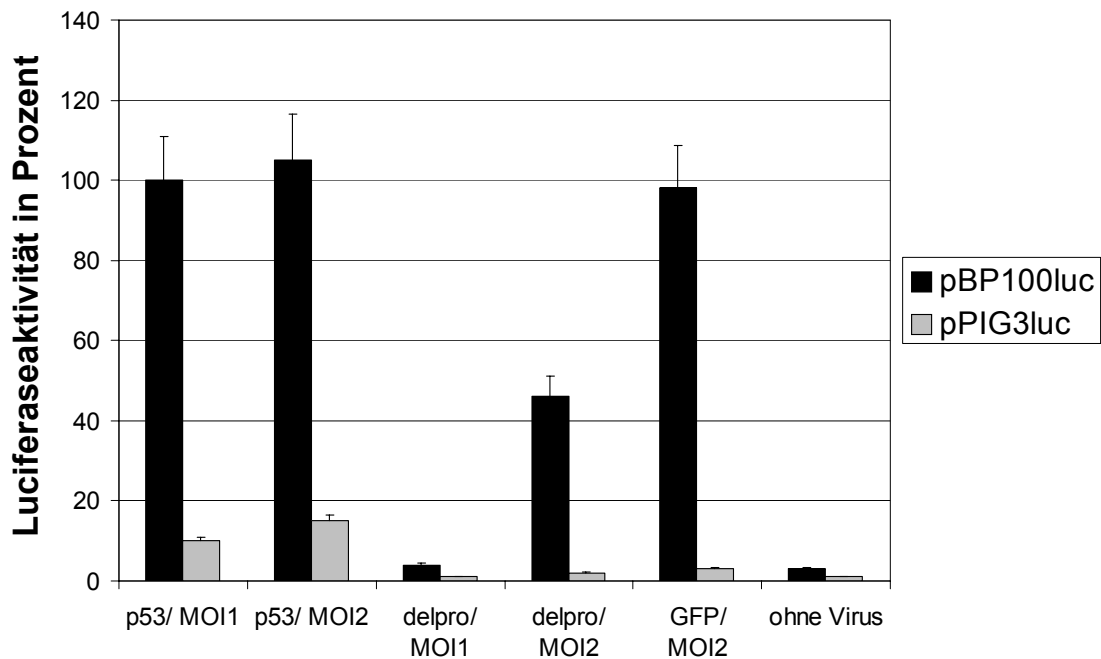
exprimieren, und dass diese Proteinlevel bei gleichen Mengen an eingesetztem Virus (MOI=“multiplicity of infection“) äquivalent sind. Hierzu wurden H1299-Zellen mit verschiedenen MOI der rekombinanten Viren infiziert und die erhaltenen Proteinmengen im Western-Blot mit einem Antikörper gegen p53 bestimmt und verglichen (Abbildung 4.5). Die detektierten Proteinmengen zeigen, dass mit den rekombinanten Adenoviren ein System geschaffen wurde, in dem nun kontrollierte und gleiche Mengen von p53 und p53 $\Delta$ 62-91 exprimiert werden konnten. Im Vergleich zeigte sich auch bei einer Infektion der Zellen mit dem GFP-Kontrollvirus mit einer MOI von 10 kein nachweisbares p53.



**Abbildung 4.5: Die Expression von p53 und p53 $\Delta$ 62-91 bei verschiedenen MOI von Adp53, Adp53 $\Delta$ 62-91 und AdGFP in H1299-Zellen.** Gleiche Menge von p53-negativen H1299-Zellen wurden mit verschiedenen MOI der rekombinanten Viren infiziert. 24 h nach Infektion wurden die Zellen lysiert und die denaturierten Proteine in der Gelelektrophorese getrennt. Die Proteinlevel von p53 und p53 $\Delta$ 62-91 wurden in einer Western-Blot Analyse zum Nachweis von p53 verglichen.

### **4.2.3 Die durch die rekombinanten Adenoviren Adp53 und Adp53Δ62-91 exprimierten Proteine aktivieren die responsiven Promotoren von *mdm2* und *PIG3***

Nun war es also möglich, über die Infektion mit den rekombinanten Adenoviren gleiche Mengen von p53 und p53Δ62-91 in einem p53-negativen Hintergrund (H1299-Zellen) zu exprimieren. Die erhaltenen Proteine (p53 und p53Δ62-91) mussten als nächstes auf ihre Funktion bei der Induktion p53-responsiver Gene getestet werden. Hierzu wurden gleiche Mengen H1299-Zellen mit äquivalenter Menge der rekombinanten Viren infiziert und die Aktivierung der p53-responsiven Promotoren von *mdm2* und *PIG3* in einem Luciferase-Reporter-Assay verglichen. Infizierte Zellen wurden hierzu gleichzeitig mit entsprechenden Reporter-Konstrukten transfiziert. Wie in Abbildung 4.6 ersichtlich, kam es zu einer deutlichen Aktivierung des *mdm2*-Promotors durch p53 und p53Δ62-91, während der *PIG3*-Promotor nur durch p53wt aktiviert wurde. Bei einer Infektion mit dem GFP-Kontrollvirus kam es zu keiner detektierbaren Aktivierung der responsiven Promotoren. Es zeigt sich zusätzlich, dass ab einer MOI von 2 der *mdm2*-Promotor sowohl von p53, als auch von p53Δ62-91 maximal induziert ist. Die durch die rekombinanten Adenoviren exprimierten Gene sind also transkriptionell aktiv und in der Lage, p53-responsive Promotoren zu aktivieren.



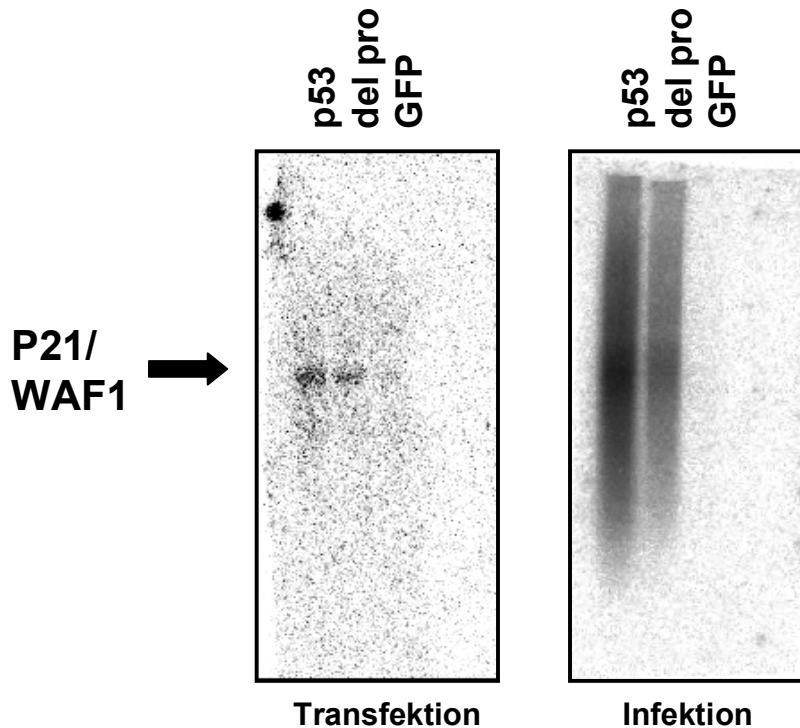
**Abbildung 4.6:** Aktivierung des *mdm2*-Promotors und des *PIG3*-Promotors durch die rekombinanten Viren Adp53, Adp53 $\Delta$ 62-91 und AdGFP mit verschiedenen MOI. Gleiche Mengen an H1299-Zellen wurden mit verschiedenen MOI der rekombinanten Viren Adp53, Adp53 $\Delta$ 62-91 und AdGFP infiziert und gleichzeitig mit 0,2  $\mu$ g Reporter-DNA (Expression von Luciferase unter *mdm2*-Promoter bzw. *PIG3*-Promotor Kontrolle) transfiziert. 24 h nach Infektion wurden die Zellen in Lysis-Puffer geerntet und nach Normierung auf den Proteingehalt die Aktivität der Luciferase im Luminometer gemessen. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden jeweils aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt

#### 4.2.4 Deutliche Induktion von *p21/ WAF1*-RNA durch Infektion mit rekombinanten Adenoviruskonstrukten

Es wurde somit ein System geschaffen, in dem die unterschiedliche Promotoraktivierung von p53 und p53 $\Delta$ 62-91 direkt verglichen werden konnte. Will man dagegen die Induktion von responsiven Genen betrachten, ist eine Möglichkeit, die Mengen an m-RNA (messenger-RNA) zu vergleichen. Dazu musste die RNA der Zellen nach isoliert werden. Hierzu wurden jeweils 4 Millionen p53-negative H1299-Zellen in einer Kulturflasche ausgesät und 24 h später mit den rekombinanten Adenoviren Adp53, Adp53 $\Delta$ 62-91 und AdGFP infiziert (MOI = 10). 24 h nach

Infektion wurden die Zellen geerntet, und die Gesamt-RNA wurde isoliert (Abschnitt 3.3.17). Zu diesem Zeitpunkt ließ sich morphologisch noch keine Apoptose-Induktion durch p53wt bei den Zellen nachweisen, welche wiederum Einfluss auf Mengen der erhaltenen RNA gehabt hätte. Die RNA-Menge wurde photometrisch gemessen.

Mit der aus den mit den rekombinanten Adenoviren infizierten Zellen gewonnene m-RNA, musste nun gezeigt werden, dass sich die m-RNA des bekannten und gut beschriebenen p53-responiven Gens *p21/WAF1* unter den gegebenen Versuchsbedingungen nachweisen ließ. Hierzu wurde die Gesamt-RNA von mit p53 bzw. p53 $\Delta$ 62-91 transfizierten Zellen und mit Adp53 bzw. Adp53 $\Delta$ 62-91 (MOI = 10) infizierten Zellen in einem Agarose-Gel aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran geblottet. In einer Northern-Blot Analyse (Abschnitt 3.3.20) wurde die m-RNA von *p21/WAF1* mit einer [<sup>32</sup>P]dCTP radioaktiv markierten Sonde detektiert und die Menge mit einem Phosphoimager quantifiziert. Die erhaltenen m-RNA Mengen nach Transfektion bzw. Infektion sind in Abbildung 4.7 graphisch dargestellt. Es zeigte sich, dass nach Infektion mit einer MOI von 10 mit den rekombinanten Adenoviren Adp53 und Adp53 $\Delta$ 62-91 deutlich mehr *p21/WAF1* m-RNA induziert werden konnte, als durch Transfektion möglich war. Ein solches System konnte nun auch schwach induzierte Gene besser identifizieren, als durch Transfektion möglich gewesen wäre.



**Abbildung 4.7:** Darstellung der Aktivierung von *p21/ WAF1*-m-RNA in H1299-Zellen nach Transfektion und nach Infektion in einer Northern-Blot Analyse. Total-RNA von mit Adp53, Adp53 $\Delta$ 62-91 und AdGFP infizierten und mit 1,5  $\mu$ g p53, p53 $\Delta$ 62-91 und GFP in einer Fugene-Transfektion transfizierten Zellen wurden in einem Agarose-Gel aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran gebロットet. Die m-RNA von *p21/ WAF1* wurde mit einer radioaktiv markierten Sonde detektiert und die Menge des radioaktiven Signals mit einem Phosphoimager bestimmt.

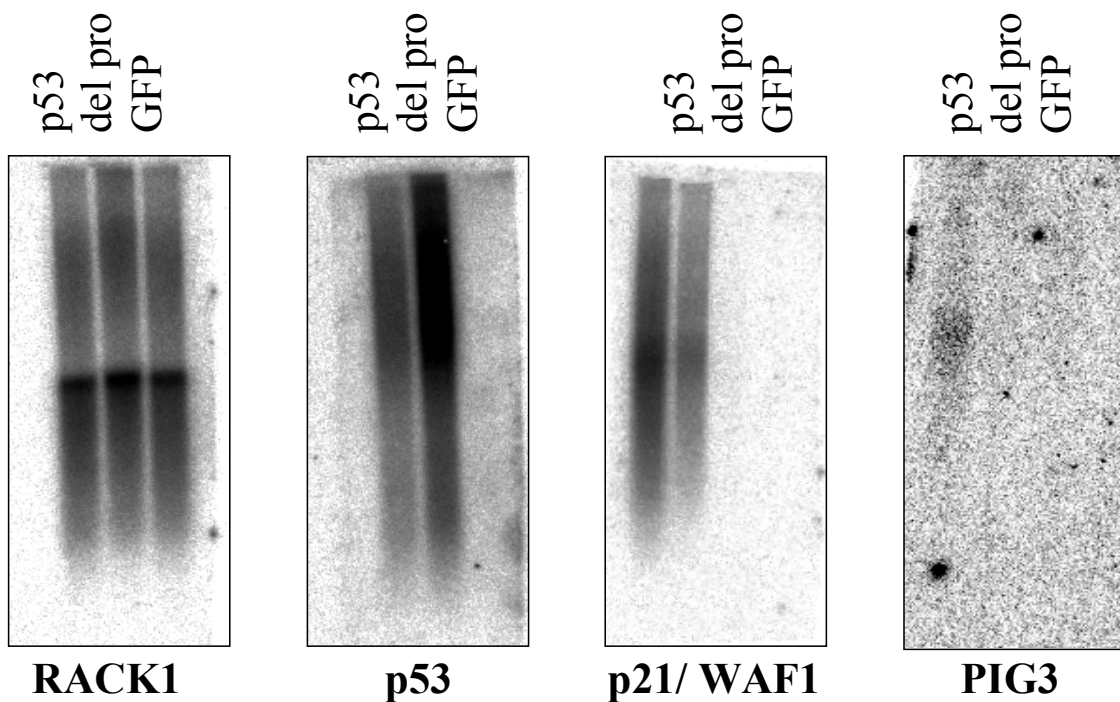
#### 4.2.5 Nachweis der m-RNA von p53 und den bekannten p53-responsiven Genen *p21/ WAF1* und *PIG3*

Die von den rekombinanten Adenoviren exprimierten p53-Varianten induzieren also effizient die m-RNA des p53-responsiven Genes *p21/ WAF1*. Als nächstes wurde die Frage geklärt, ob mit der m-RNA die in der Literatur beschriebenen Induktionsmuster der bekannten und gut charakterisierten p53-responsiven Gene *p21/ WAF1* und *PIG3* reproduziert werden konnten (Zhu *et al.*, 1999). Dazu wurden aus einer DNA-

Bibliothek (IMAGE-Datenbank) DNA-Sonden hergestellt von *p53*, *p21/ WAF1*, *PIG3* und zur Kontrolle *RACK1*, einem zellulären Gen, welches universell exprimiert und nicht von p53 beeinflusst wird. Die Gesamt-RNA der infizierten Zellen wurde über ein Agarose-Gel aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran geblottet. Die verschiedenen DNA-Sonden wurden radioaktiv markiert und die Menge der m-RNA der entsprechenden Gene mit einer Northern-Blot Analyse quantifiziert. Die detektierten Mengen an m-RNA sind in Abbildung 4.8 graphisch dargestellt. Man erkennt, dass gleiche Mengen RNA in die einzelnen Geltaschen geladen wurde, (quantitativ gleichwertige Signale bei der Kontrolle mit einer Sonde gegen *RACK1*). Obwohl es nach Infektion zur Detektion gleicher Mengen an Protein kam (Abbildung 4.5), scheinen die mit Adp53 $\Delta$ 62-91 infizierten Zellen deutlich größere Mengen der p53-Mutante zu transkribieren, als Zellen, die mit dem entsprechenden p53wt-Virus infiziert wurden. Bei Betrachtung der Transkriptions-Induktion von *p21/ WAF1* und *PIG3* zeigen sich dagegen die in der Literatur beschriebenen Aktivierungsmuster (Zhu *et al.*, 1999). *p21/ WAF1* wird sowohl durch p53, als auch durch p53 $\Delta$ 62-91 aktiviert, wobei die Aktivierung durch p53 etwa doppelt so stark ist. Betrachtet man die Aktivierung der *PIG3*-Transkription, so wird dieses Gen nur von p53, nicht aber von p53 $\Delta$ 62-91 aktiviert. In den mit AdGFP infizierten Kontrollen ließ sich jeweils kein Signal nachweisen.

Das benutzte System war also in der Lage, bekannte Ergebnisse zu reproduzieren, und war somit geeignet, weitere Gene zu identifizieren, welche sich in ihrem Transaktivierungsmuster verhalten wie *PIG3*.





**Abbildung 4.8 : Northern-Blot Analyse mit bekannten p53-responsiven Genen.** 10 $\mu$ g Gesamt-RNA der mit den rekombinanten Adenoviren infizierten Zellen wurden über einem Agarose-Gel aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran geblottet. Die RNA wurde dann mit radioaktiv markierten DNA-Sonden bekannter und gut charakterisierter p53-responsiver Gene hybridisiert und die Intensität des radioaktiven Signals mit einem Phosphoimager quantifiziert. Zur Kontrolle dient das zelluläre Gen *RACK1*, welches nicht von der p53 Expression beeinflusst wird.

#### 4.2.6 Hybridisierung von cDNA-Arrays (Clontech).

Um nun viele Gene auf ihr Transaktivierungsmuster hin zu untersuchen, wurden cDNA-Arrays (Clontech Atlas Human Cancer cDNA Expression Arrays) hybridisiert. Bei den verwendeten cDNA-Arrays handelte es sich um Hybridisierungsfolien, auf denen 588 verschiedene, gut charakterisierte Gene jeweils paarweise aufgeblottet waren, welche direkt oder indirekt an maligner Transformation beteiligt sein können. Mit Hilfe einer Positionsfolie konnten die jeweiligen Gene zugeordnet werden. Jedes Gen war dabei 2

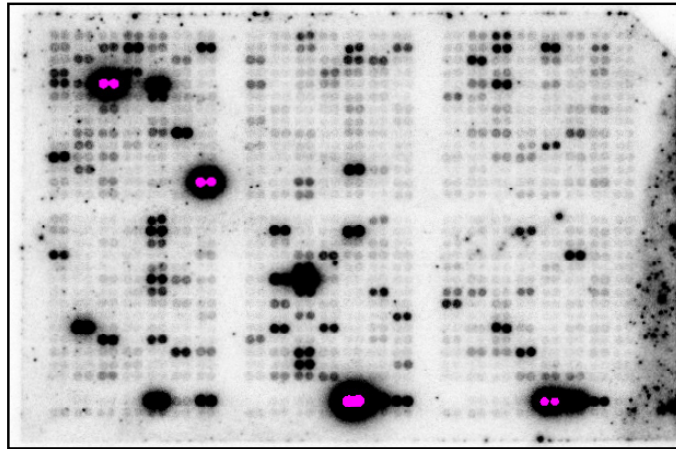
mal nebeneinander geblottet, um so eventuelle Artefakte erkennen zu können. Es handelte sich um Gene aus folgenden Gruppen:

Zellzyklus- und Wachstumsregulatoren  
Intermediär-Filament Marker  
Apoptose  
Onkogene und Tumorsuppressorgene  
DNA Reparatur, Rekombination, Reaktion auf Schäden  
Entwicklung Regulatoren  
Rezeptoren  
Zell Adhäsion, Bewegung, Invasion  
Angiogenese Regulation  
Invasion Regulatoren  
Rho Familie, GTPasen und deren Regulatoren  
Zell-Zell Interaktion  
Wachstumsfaktoren und Zytokine  
sogenannte „Housekeeping Genes“ als Postivkontrollen  
Negativkontrollen

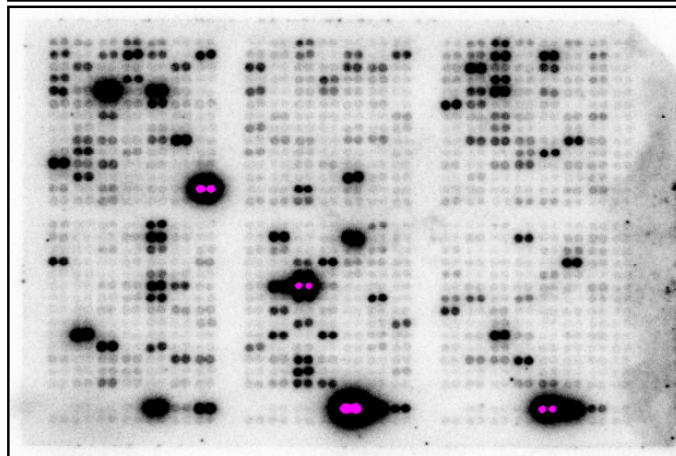
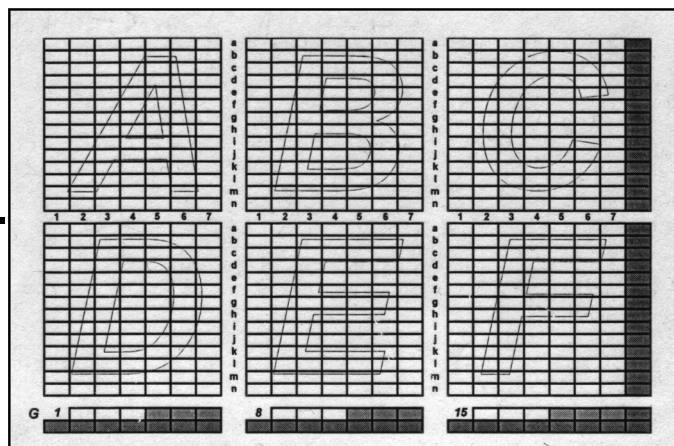
Eine genaue Auflistung aller getesteten Gene des Atlas Human Cancer Expression Arrays findet sich auf der Internetseite: [atlas.clontech.com](http://atlas.clontech.com)

RNA-Proben der mit den rekombinanten Adenoviren infizierten Zellen wurden mit dem Enzym „reverse Transkriptase“ in cDNA umgeschrieben und bei diesem Schritt gleichzeitig mit [ $^{32}\text{P}$ ]dATP markiert. Die radioaktiven Proben wurden dann mit den cDNA-Array-Folien hybridisiert. Die entstandenen radioaktiven Signalintensitäten wurden durch einen Phosphoimager gemessen. Das Ergebnis beim Vergleich p53 gegen p53 $\Delta$ 62-91 ist in Abbildung 4.9 dargestellt.

p53



p53Δ62-91

Positions-  
folie

**Abbildung 4.9:** Vergleich der Clontech cDNA Atlas Arrays von p53 gegen p53Δ62-91. 10 µg RNA wurden revers transkribiert und gleichzeitig radioaktiv markiert. Die entstandene cDNA wurde mittels Gelfiltration gereinigt und über Nacht mit der Array-Folie hybridisiert. Die Menge an hybridisierter cDNA wurde mit einem Phosphorimager quantifiziert. Da p53 Transkriptionsaktivator ist, zeigen die Zelle nach Expression von p53 bzw. der Mutante p53Δ62-91 ein jeweils eigenes Aktivierungsmuster, welches über die Hybridisierung mit einem c-DNA Array verglichen werden kann.

#### 4.2.7 Auswertung der Arrays.

Die Identifizierung der Gene erfolgte mit der Hilfe einer Positionsfolie nach einem bestimmten Raster. Die gesamte Folie ist in die sechs Felder A-F aufgeteilt. Jedes Feld wird nun wiederum in die Spalten 1- 7 und die Zeilen a- n aufgeteilt. So ließ sich jedes Gen auf der Folie mit einem Code genau identifizieren. Die Intensität des Signals ist dabei direkt proportional zum Grad der Aktivierung. Abbildung 4.10 zeigt ein Auswertungsbeispiel für die Aktivierung der Gene *p21/WAF1* und *PIG3*. Wie im Northern-Blot beschrieben (Abbildung 4.8) zeigte sich eine circa doppelt so starke Aktivierung von *p21/WAF1* durch p53 wie durch p53 $\Delta$ 62-91. Bei der durch mit AdGFP-Virus infizierten Zellen gewonnenen RNA ließ sich kein Signal für *p21/WAF1* nachweisen (Daten nicht dargestellt). Eine Induktion des *PIG3*-Gens war dagegen nur bei den durch Adp53 infizierten Zellen nachweisbar, nicht aber bei mit Adp53 $\Delta$ 62-91 oder AdGFP infizierten Zellen. Dies entspricht den Ergebnissen anderer Gruppen (Venot *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1999).

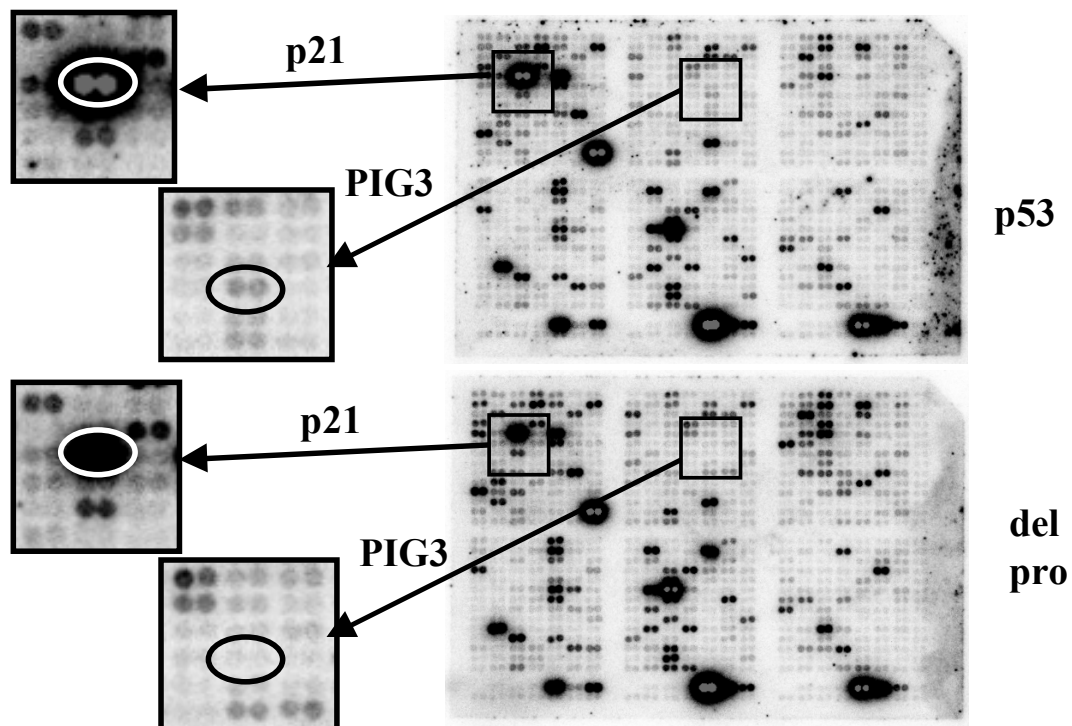


Abbildung 4.10: Auswertungsbeispiel des Arrays anhand von *p21/Waf1* und *PIG3*.

Nun konnte die Intensität der den einzelnen Genen entsprechenden Signale mit einem Phosphoimager gemessen und verglichen werden. Von den gemessenen Intensitäten musste dann die Hintergrundaktivität, welche sich auch in den Negativproben mit bakterieller DNA fand, abgezogen werden. Die Tabelle 4.11 zeigt alle Gene, bei denen sich ein klarer Unterschied fand.

Position	p53	delta pro	Ratio		Gen
A3c	60	37	1,6:1,0		Cyclin G2
A3e	<b>4000</b>	<b>2000</b>	<b>2,0:1,0</b>		<b>p21/WAF1</b>
A5e	1320	765	1,7:1,0		PCNA Cyclin
A2j	81	138	1,0:1,7		Cyclin B
A7l	220	380	1,0:1,7		Zytokeratin 8
A7n	470	260	1,8:1,0		Desmin
<b>B4a</b>	<b>22</b>	<b>14</b>	<b>1,6:1,0</b>		<b>fas/ APO 1</b>

<b>B1c</b>	<b>68</b>	<b>118</b>	<b>1,0:1,7</b>	<b>bax</b>
<b>B5g</b>	<b>42</b>	<b>4</b>	<b>10,5:1,0</b>	<b>PIG3</b>
B7g	11	31	1,0:2,8	SKY
<b>B6i</b>	<b>9</b>	<b>45</b>	<b>1,0:5,0</b>	<b>p53</b>
B4n	5	17	1,0:3,4	TFAR 15
C1b	15	35	1,0:2,3	ATM
C2b	35	75	1,0:2,1	ERCC 2
C3b	185	320	1,0:1,7	SOD
C2c	162	415	1,0:2,6	XRCC 1
C2d	15	55	1,0:3,7	ERCC 5
C3d	50	200	1,0:4,0	HHR6A
C2e	65	120	1,0:1,8	GADD 153
C1f	65	200	1,0:3,0	ERCC 1
<b>C2f</b>	<b>30</b>	<b>90</b>	<b>1,0:3,0</b>	<b>GADD 45</b>
C3h	20	70	1,0:3,5	notch N
C4i	13	56	1,0:4,3	FZD 3
E5a	13	50	1,0:3,8	rho-reli
E7m	60	25	2,4:1,0	Ephrin Rez 4
F3j	230	370	1,0:1,7	EGR-I

**Tabelle 4.12: Die Tabelle zeigt eine Auflistung aller gefundenen relevanten Unterschiede.** Die bereits bekannten p53-responsiven Gene sind hervorgehoben. Von den gemessenen Werten wurde die Hintergrundaktivität, welche sich aus den Negativkontrollen mit bakterieller DNA ergab, abgezogen.

Die Auswertung des Arrays zeigte zum einen weitere bekannte p53-responsive Gene (*bax*, *GADD 45*). Zuvor veröffentlichte Ergebnisse über diese Gene und ihr Verhalten bei p53 $\Delta$ 62-91 ließen sich gut nachvollziehen (Zhu *et al.*, 1999). Das am besten charakterisierte p53-responsive Gen, *p21 /WAF1* (Position A3e), zeigt auch hier die deutlichste Aktivierung durch p53 und p53 $\Delta$ 62-91. Es fällt auf, dass sich außer *PIG3* kein Gen zeigt, welches eindeutig das gleiche Aktivierungsmuster mit einem Aktivierungsverhältnis von über 10:1 zeigt. Für die weitere Betrachtung wurden die Gene *fas/ APO1*, *ERCC1*, *ERCC2*, *ERCC5*, *GADD45*, *GADD153*, *HHR6A*, *XRCC1* und der *Ephrin B4* Rezeptor ausgewählt.

#### 4.2.8 Betrachtung der ausgewählten von p53 und p53 $\Delta$ 62-91 im cDNA-Array differentiell induzierten Gene in Northern-Blot Analysen.

Bei der Hybridisierung der Clontech cDNA-Arrays mit den Proben, welche aus den mit den rekombinanten Adenoviren infizierten Zellen gewonnen wurden, zeigten sich einige Gene mit differentieller Expression. Es wurden einige Gene ausgewählt, deren Induktion nun verifiziert und des weiteren betrachtet werden sollten. Die differentielle Genexpression der ausgewählten Gene durch p53 und p53 $\Delta$ 62-91 musste nun in Northern-Blot Analysen auf ihre Reproduzierbarkeit hin überprüft werden. Hierzu wurden aus einer DNA-Bibliothek (IMAGE-Clone-library) Klone, welche Sequenzen der entsprechenden Gene tragen, gesucht und diese Sequenzen (200-400 Basenpaare) durch Restriktionsverdau und Reinigung isoliert. Diese Sequenzen wurden dann radioaktiv mit [ $^{32}$ P]dCTP markiert und konnten als Sonden zur Hybridisierung in weiteren Northern-Blot Analysen verwendet werden. Jeweils 10  $\mu$ g der aus den mit den rekombinanten Adenoviren infizierten Zellen gewonnenen Gesamt-RNA wurde dazu auf einem Agarose-Gel aufgetrennt, auf eine Nylon-Membran geblottet und mit den jeweiligen radioaktiven Sonden hybridisiert. Die Menge der hybridisierten RNA wurde mit dem Phosphoimager quantifiziert. Abbildung 4.13 zeigt die erhaltenen Hybridisierungsmuster.

Man erkennt, dass das *fas/ APO1*-Gen ein p53-responsives Gen ist. Es ist in der Kontrolle kaum detektierbar (Muller *et al.*, 1998). Ebenso bestätigt sich die im Array gesehene leicht schwächere Aktivierung durch p53 $\Delta$ 62-91. Auch zeigt sich, dass der *Ephrin Typ 4 Rezeptor* p53-responsiv ist. Er wurde von p53 $\Delta$ 62-91 nicht über Hintergrund aktiviert und ist somit ein Gen, welches sich möglicherweise verhält, wie *PIG3*. Bei *GADD 45* erkennt man das bereits beschriebene Aktivierungsmuster (Zhu *et al.*, 1999). Auch hier bestätigte sich die im Array gesehene Mehraktivierung durch p53 $\Delta$ 62-91. Ein im Array unterschiedliches Expressionsmuster der Gene *ERCC1*, *ERCC2*, *ERCC5* und *XRCC1* ließ sich dagegen im Northern-Blot nicht bestätigen. Nur bei dem Gen *HHR23A* zeigt sich ein mit dem Array übereinstimmendes Aktivierungsmuster.

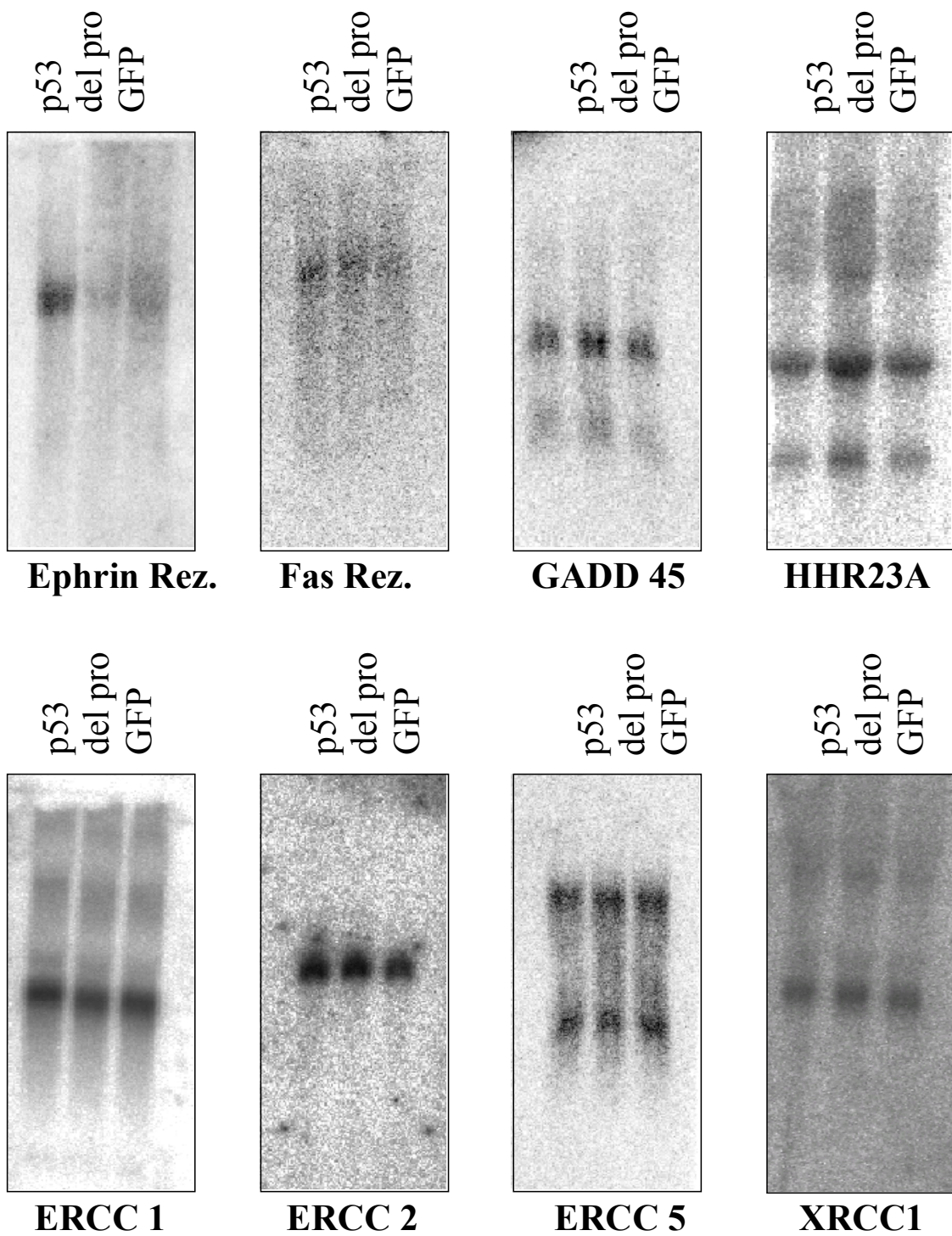


Abbildung 4.13: Northern-Blot Analysen mit auf dem cDNA-Array differentiell exprimierten Genen. Der experimentelle Aufbau entsprach dem in Abbildung 4.8 beschriebenen Aufbau.



#### **4.2.9 Kontrolle der Ergebnisse der Northern-Blot Analysen von ERCC1 mit unterschiedlichen Sonden.**

Bei der Hybridisierung der Clontech c-DNA-Arrays zeigte sich ein unterschiedliches Expressionsmuster für einige Gene des Nucleotid Excision Repairs (*ERCC1*, *ERCC2*, *ERCC5*) für p53 und p53 $\Delta$ 62-91. Diese wurden im Array von p53 $\Delta$ 62-91 stärker aktiviert als von p53wt. Diese Ergebnisse ließen sich in Northern-Blot Analysen jedoch nicht bestätigen. Um zu verhindern, dass die durch die IMAGE Klone vorgegebene Basensequenz zu einer Fehlhybridisierung oder zusätzlichen Hybridisierung einer anderen Splicevariante führte und somit ein eventuell positives Ergebnis überdeckte, wurden für das Gen *ERCC1* alternative Sonden gesucht. Dieses gelang zum einen durch die Verwendung einer Sonde, die das gesamte Gen beinhaltete. Hierzu wurde aus dem Plasmid pcDNA3.1/ ERCC1 die vollständige Gensequenz herausgeschnitten und als Sonde benutzt. Zusätzlich wurde durch PCR mit diesem Plasmid als Templat genau die Sonde gewonnen, welche auch von der Firma Clontech für die Arrays verwendet wurde. Auch eine Hybridisierung mit diesen Sonden zeigte jedoch eine gleiche Aktivierung von *ERCC1* durch p53 und p53 $\Delta$ 62-91 in Northern-Blot Analysen (Ergebnisse nicht dargestellt). Es scheint also falsch-positive Ergebnisse im Array zu geben, die sich in Northern-Blot Analysen nicht reproduzieren lassen.

#### **4.3 Der Einfluss des p53-Status einer Zelle auf die Adenovirus-Replikation**

Das Adenovirus exprimiert, wie auch viele andere Viren aus der Gruppe der „Kleinen DNA Tumoviren“, ein frühes Protein (E1B-55kD), welches p53 bindet und destabilisiert. Zudem gab es viele Berichte, dass ein Virus, welches dieses Protein nicht mehr exprimiert (dl1520/ ONYX-015), sich selektiv in Tumorzellen mit mutiertem oder fehlendem p53 repliziert. Diese selektive Replikation ist in Abhängigkeit vom p53-Status

einer Zelle ließ sich in nachfolgenden Untersuchungen jedoch nicht bestätigen (Goodrum and Ornelles, 1998; Hall *et al.*, 1998; Harada and Berk, 1999; Rothmann *et al.*, 1998). Trotzdem wird dieses Virus heute, nach mehreren erfolgreichen Anwendungen in experimentellen Ansätzen, in Phase III Studien in der Tumorthherapie verwendet (Heise *et al.*, 2000a; Heise *et al.*, 2000c; Heise *et al.*, 1999a; Heise *et al.*, 1999b; Khuri *et al.*, 2000; Kirn *et al.*, 1998; Nemunaitis *et al.*, 2000). Ein Modell zur letztendlichen Klärung der Abhängigkeit der adenoviralen Replikation vom p53-Status einer Zelle wurde allerdings noch nicht beschrieben.

In einer früheren Veröffentlichung aus unserer Arbeitsgruppe wurde berichtet, dass p53 durch eine Mutation gegen die adenovirale Destabilisierung resistent gemacht werden kann, ohne dass seine transkriptionelle Aktivität beeinflusst wird (Roth *et al.*, 1998). Dieses wurde erreicht, indem man die Aminosäuren an den Positionen 24-28 durch die homologen Sequenzen von p73 ersetzt (p53mt24-28). p73 wird im Gegensatz zu p53 nicht an E1B-55kD des Adenovirus gebunden und somit nicht von den adenoviralen Onkoproteinen destabilisiert (Roth *et al.*, 1998). Betrachtet man also die adenovirale Replikation in einem Hintergrund mit dieser funktionell aktiven, aber nicht vom Adenovirus destabilisierten p53-Mutante und vergleicht dieses mit der adenoviralen Replikation in einem p53wt-Hintergrund, kann man so den Einfluss des p53-Status einer Zelle auf die adenovirale Replikation klären.

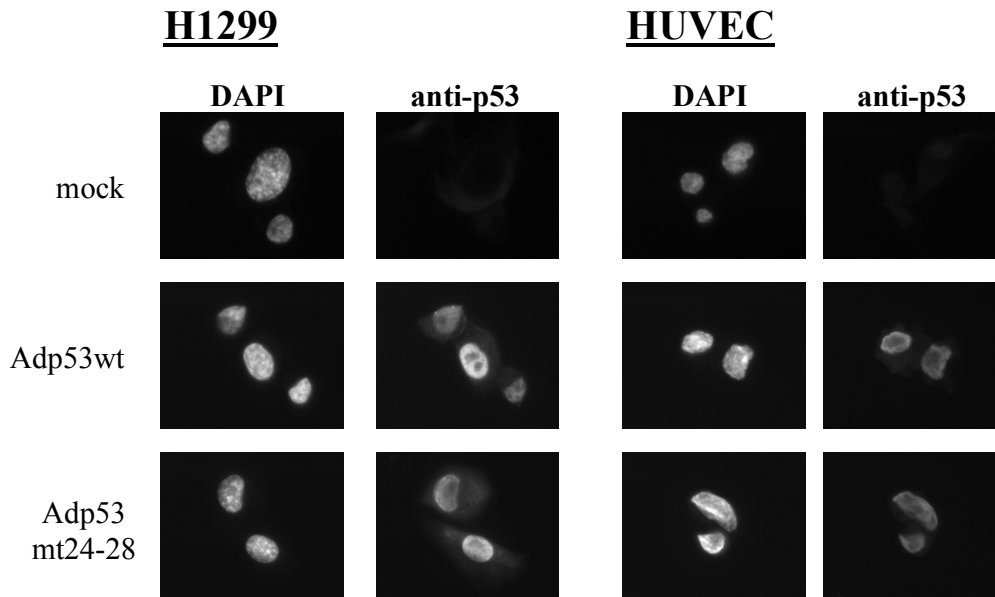
#### **4.3.1 Herstellung eines rekombinanten Adenovirus Adp53mt24-28 mit dem Adeasy System**

Ziel der weiteren Arbeit war nun, im selben Hintergrund (H1299 p53<sup>-/-</sup>, HUVEC p53<sup>+/+</sup>) den p53-Status der Zelle gezielt zu beeinflussen. In solchen Zellen sollte dann ein Vergleich der Replikationseffizienz des Adenovirus, Antwort über den Einfluss des p53-Status auf die adenovirale Replikation geben. Wie schon in Abschnitt 4.2 gezeigt, eignet sich zur kontrollierten Expression eines Proteins die Infektion der Zellen mit rekombinanten Adenoviren, welche zusätzlich dieses Protein exprimieren. Aus diesem Grund wurde auch für die p53-Mutante p53mt24-28 ein rekombinantes Adenovirus mit

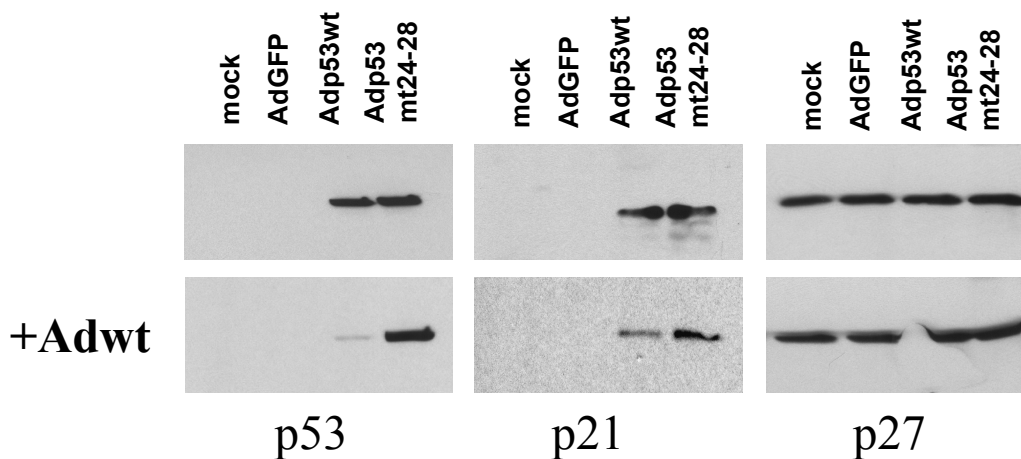
dem Adeasy-System hergestellt (He *et al.*, 1998). Der Ansatz zur Herstellung des rekombinanten Adenovirus Adp53mt24-28 entspricht dem Ansatz aus Abschnitt 4.2.1.

#### **4.3.2 Das vom rekombinanten Adenovirus exprimierte p53mt24-28 ist transkriptionell aktiv und wird nicht vom Wildtyp-Adenovirus WtD destabilisiert**

In unserer Arbeitsgruppe wurde dann von Jennifer Gatfield gezeigt, dass es nach Infektion von H1299-Zellen (p53 -/-) und Humanen Nabelschnurvenen Endothelzellen (HUVECs) (p53 +/+) mit Adp53 und Adp53mt24-28 zu in der Immunfluoreszenz und im Western-Blot gut detektierbaren Mengen an p53 in den Zellen kam (Abbildung 4.16). Ebenso konnte sie in Northern-Blot Analysen (Daten nicht gezeigt) und Western-Blot Analysen (Abbildung 4.17) zeigen, dass sowohl p53 als auch p53mt24-28 das p53-responsive Gen *p21/WAF1* aktivieren. Wurden diese Zellen nun zusätzlich mit dem Wildtyp-Adenovirus WtD (Barker and Berk, 1987) infiziert, kam es zur raschen Destabilisierung des p53 in den Adp53 infizierten Zellen durch die vom Wildtyp-Adenovirus exprimierten Proteine E1B-55kD und E4orf6. Auf die Stabilität der Mutante p53mt24-28 hatte die Infektion mit dem Wildtyp-Adenovirus dagegen keinen Einfluss (Abbildung 4.17).



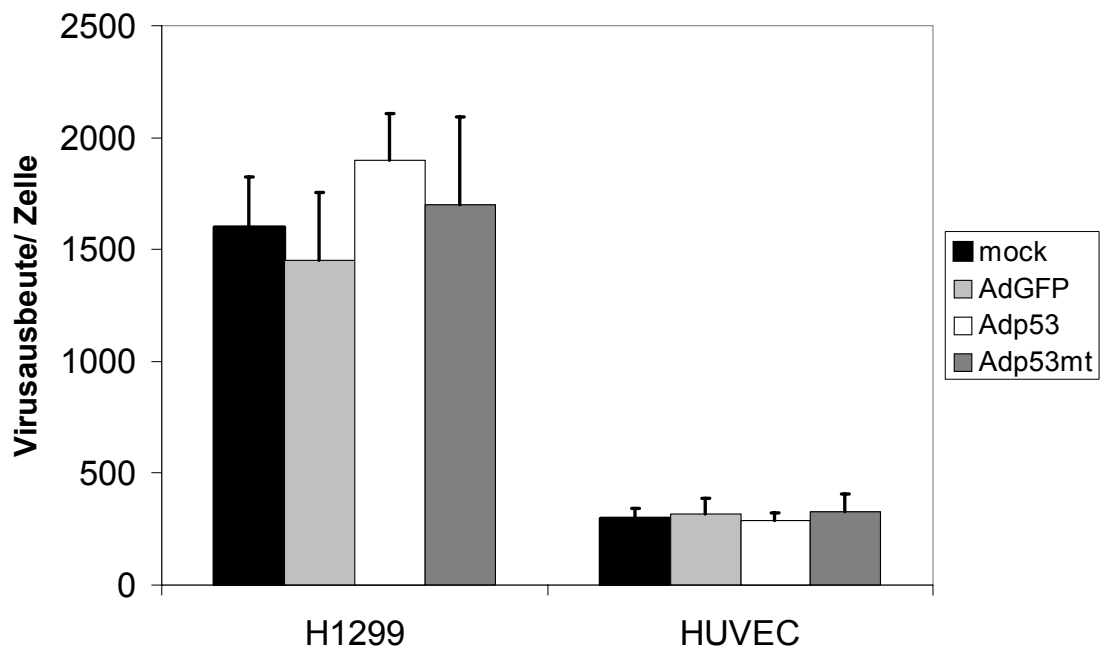
**Abbildung 4.16: Expression von p53 durch virale Vektoren.** H1299 und HUVEC Zellen wurden einmal mit Adp53 und einmal mit Adp53mt24-28 infiziert. 24 h nach Infektion wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen p53 gefärbt. Zusätzlich wurden die Kerne durch Färbung mit DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) sichtbar gemacht. (Aus der Arbeit von Jennifer Gatfield)



**Abbildung 4.17: p53 Level und Aktivität nach Adenovirus Infektion.** H1299 Zellen werden mit den verschiedenen rekombinanten Adenoviren infiziert und die Mengen an p53, p21/WAF1 und p27 einmal vor und einmal nach Koinfektion mit dem WildtypD Virus durch Western-Blot Analysen bestimmt. (Aus der Arbeit von Jennifer Gatfield)

### 4.3.3 Der p53-Status hat keinen Einfluss auf die Replikation von Wildtyp-Adenovirus WtD

Mit den rekombinanten Adenoviren Adp53 und Adp53mt24-28 konnte nun im gleichen Hintergrund der p53-Status der Zelle kontrolliert werden. Die exprimierten p53-Varianten waren funktionell aktiv bei der Induktion des p53-responsiven Gens *p21/WAF1*. Es konnte ebenfalls bestätigt werden, dass die p53-Mutante p53mt24-28 nicht vom Wildtyp-Adenovirus WtD destabilisiert wurde. Mit welcher Effizienz repliziert sich der Wildtyp-Adenovirus WtD nun in Anwesenheit von p53wt und der stabilen Mutante p53mt24-28 in dem selben Zellhintergrund? Dieses wurde durch eine Koinfektion mit Wildtyp-Adenovirus WtD und den die p53-Varianten exprimierenden rekombinanten Adenoviren getestet. Hierzu wurden H1299-Zellen (p53 -/-) und die humanen Nabelschnurvenen-Zellen HUVEC (p53 +/+) mit den rekombinanten Adenoviren Adp53 und Adp53mt24-28 infiziert und somit der p53-Status vorgegeben. H1299-Zellen wurden mit einer MOI von 10, HUVECs mit einer MOI von 30 infiziert. Vorversuche haben gezeigt, dass bei diesen MOI alle Zellen deutliche Mengen an p53 bzw. p53mt24-28 exprimieren. Bei den HUVECs musste eine drei mal höhere MOI gewählt werden, um entsprechende Mengen an Protein zu erhalten (Daten nicht gezeigt). Diese Zellen wurden gleichzeitig mit einer MOI von 1 (H1299) bzw. einer MOI von 3 (HUVEC) mit WtD-Virus koinfiziert und die Zellen 48h nach Koinfektion geerntet und die Menge der erhaltenen Viren getitert. Die Virusausbeute je Zelle ist in Abbildung 4.18 graphisch dargestellt. Trotz des nach der Koinfektion stabilen und aktiven p53mt24-28 zeigt sich kein Effizienzverlust der Virusreplikation von WtD in den verschiedenen Zelllinien. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied der erhaltenen Virusmengen im Hintergrund von p53, p53mt24-28, GFP bzw. ohne Koinfektion. Der p53-Status der Zelle scheint somit keinen Einfluss auf die Replikation von WtD zu haben. Auch bei einer zeitlichen Verschiebung der Koinfektion von 12h zeigt sich kein Unterschied im Replikationsverhalten von WtD (Daten nicht gezeigt).

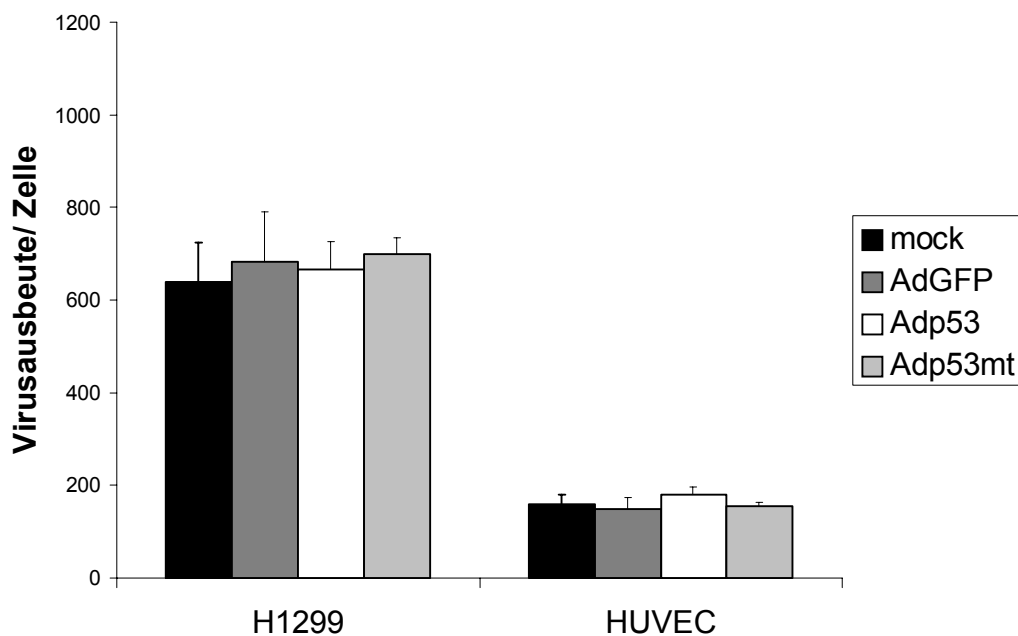


**Abbildung 4.18: Einfluss von p53 auf die Replikation von WtD-Adenovirus.** Gleiche Mengen an H1299-Zellen (p53 -/-) und HUVECs (p53 +/+) wurden mit einer MOI von 1 bzw. 3 mit WtD-Adenovirus und gleichzeitig mit einer MOI von 10 bzw. 30 mit den rekombinanten Adenoviren Adp53, Adp53mt24-28 und AdGFP koinfiziert. 48 h nach Infektion wurden die Zellen lysiert und die Virustiter bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus jeweils drei unabhängigen Versuchsreihen bestimmt.

#### 4.3.4 p53 und p53mt24-28 zeigen keinen Einfluß auf die Replikation von dl1520/ONYX 015

Zusätzlich sollte geklärt werden, ob p53 bzw. p53mt24-28 einen Einfluss auf die Replikation von dl1520/ ONYX 015 haben. Bei diesem Virus ist das Protein E1B-55kD deletiert. Es kann nicht an p53 binden und dieses destabilisieren. Dazu wurden H1299-Zellen (p53 -/-) und HUVECs (p53 +/+) mit den rekombinanten Viren Adp53, Adp53mt24-28 bzw. AdGFP (MOI=10 bzw. MOI=30) und zusätzlich mit dl1520/ ONYX 015 (MOI = 1 bzw. MOI = 3) infiziert. 48 h nach Infektion wurden die Zellen geerntet, lysiert und die Menge der erhaltenen Viren getitert. Die erhaltenen

Virusmengen von dl-1520/ ONYX 015 sind in Abbildung 4.19 graphisch dargestellt. Auch auf die Effizienz der Replikation von dl1520/ ONYX 015 scheint der p53-Status der Zelle keinen Einfluss zu haben. Die erhaltenen Virusmengen pro Zelle in Anwesenheit von p53wt und der stabilen Mutante p53mt24-28 sind etwa gleich groß und entsprechen der Replikationseffizienz von dl1520/ ONYX 015 ohne Koinfektion. In diesem Versuchsansatz hatte der p53-Status einer Zelle also weder einen Einfluss auf die Replikation des Wildtyp-Adenovirus WtD, noch auf dl1520/ ONYX 015.

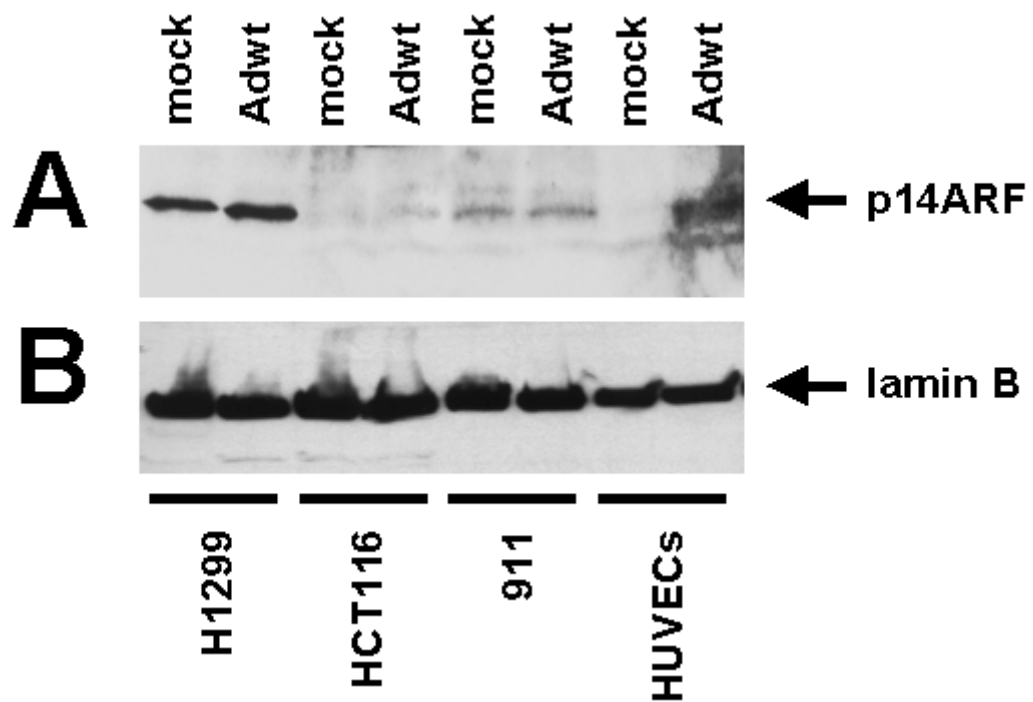


**Abbildung 4.19: Einfluss von p53 auf die Replikation von dl1520/ ONYX 015.** Gleiche Mengen an H1299-Zellen (p53 -/-) und HUVECs (p53 +/+) wurden mit einer MOI von 1 bzw. 3 mit dl1520/ ONYX 015 und gleichzeitig mit einer MOI von 10 bzw. 30 mit den rekombinanten Adenoviren Adp53, Adp53mt24-28 und AdGFP koinfiziert. 48 h nach Infektion wurden die Zellen lysiert und die Virustiter bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus jeweils drei unabhängigen Versuchsreihen bestimmt.

#### **4.3.5 Sowohl H1299-Zellen als auch HUVECs exprimieren den mdm2-Regulator p14ARF.**

Vor kurzem wurde berichtet, dass dl1520/ ONYX 015 sich nur dann weniger effizient als in Tumorzellen repliziert, wenn Zellen nicht nur funktionstüchtiges p53, sondern auch ausreichende Mengen p14ARF exprimieren (Ries *et al.*, 2000). Nach dieser Darstellung arbeiten beide Tumorsuppressorproteine synergistisch bei der Repression der Adenovirusreplikation. Man weiß, dass das adenovirale Protein E1A in einer infizierten Zelle p14ARF induziert (de Stanchina *et al.*, 1998). Die Expression von p14ARF wurde deshalb in den verwendeten Tumorzelllinien H1299, HUVEC und 911 untersucht. Die Zelllinien wurden hierzu einmal vor und 24h nach Infektion mit dem Wildtyp-Adenovirus WtD geerntet, und p14ARF wurde mittels Western-Blot Analysen bestimmt. Als Negativkontrolle dienten HCT116-Zellen, von denen beschrieben ist, dass sie kein detektierbares p14ARF enthalten (Ries *et al.*, 2000). Abbildung 4.20 zeigt, dass sowohl H1299-Zellen als auch 911-Zellen schon vor der Infektion mit dem Wildtyp-Adenovirus WtD p14ARF exprimieren. In HUVECs kann ARF durch die Adenovirus-Infektion induziert werden. Dieser Befund zeigt, dass auch p53 und p14ARF gemeinsam nicht in der Lage sind, die Virusreplikation zu behindern.





**Abbildung 4.20: Expression von p14ARF in mit Adenovirus infizierten Zellen.** H1299-Zellen, 911-Zellen, HUVECs und HCT116-Zellen wurden mit dem Wildtyp-Adenovirus WtD infiziert und die Menge an p14ARF einmal vor, einmal 24 h nach Infektion in Western-Blot Analysen betrachtet (Graphik aus der Arbeit von Urs Hobom).

## 5 Diskussion

### 5.1 Die prolin-reiche Domäne von p53 kooperiert mit der DNA-bindenden Domäne bei der Interaktion mit dem *PIG3*-Promotor und der Aktivierung von Transkription

Durch die Deletion der prolin-reichen Domäne von p73 $\beta$  und durch Reporter-Assay Studien dieser Deletionsmutante (p73 $\beta$  $\Delta$ 81-113) konnte gezeigt werden, dass p73 $\beta$  den *PIG3*-Promotor auch ohne die Anwesenheit einer prolin-reichen Domäne aktiviert. Zusätzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe durch eine Mutation in der zentralen Domäne von p53 (p53 $\Delta$ proN239Y) der Verlust der prolin-reichen Domäne zumindest zum Teil kompensiert werden (Roth *et al.*, 2000). Dieses legt nahe, dass die prolin-reiche Domäne von p53 keine in der Evolution konservierte und in sich autonome Funktion besitzt, sondern die Interaktion der zentralen Domäne des p53-Proteins mit der DNA des p53-responsiven Elements beeinflusst. Es gibt zusätzlich Mutationen in der zentralen Domäne (z.B. p53M246I), welche einen ähnlichen Phänotyp zeigen wie p53 $\Delta$ 62-91. Die Tatsache, dass Mutanten wie p53M246I auch in Tumoren zu finden sind, spricht dafür, dass der Phänotyp von p53 $\Delta$ 62-91 sehr wohl eine klinische Relevanz bei der Onkogenese besitzt und nicht nur einem im Labor konstruiertem Artefakt entspricht.

In früheren Veröffentlichungen wurde berichtet, dass p53 und p53 $\Delta$ 62-91 den *mdm2*-Promotor mit gleicher Effektivität binden, der *PIG3*-Promotor (zumindest wenn in Säugerzellen exprimiert) jedoch von p53 $\Delta$ 62-91 schlechter gebunden wird (Venot *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu konnte von Ana Contente in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass sowohl p53 $\Delta$ 62-91, als auch p53M246I den *mdm2*- und den *PIG3*-Promotor mit niedrigerer Effizienz binden als Wildtyp-p53. Diese unterschiedlichen Ergebnisse können dadurch zustande kommen, dass in der anderen Studie deutlich

größere Mengen p53 bzw. dessen Mutanten verwendet wurden. Auch wir konnten zeigen, dass p53 $\Delta$ 62-91, wird es in entsprechend großen Mengen angeboten, eine ähnliche Bindungseffizienz wie Wildtyp-p53 zeigt (Daten von Ana Contente). Hieraus kann man vermuten, dass durch den Verlust der prolin-reichen Domäne eine p53-Variante entsteht, die prinzipiell die gleichen Eigenschaften wie p53wt besitzt. Es müssen jedoch sehr viel größere Mengen der Mutante exprimiert werden, um die gleichen DNA-Bindungseigenschaften und die gleichen Aktivierungsmuster zu erhalten.

Wenn nun aber p53 $\Delta$ 62-91 und p53M246I generell schlechter an DNA binden, warum zeigt sich der Funktionsdefekt dieser Mutanten nur bei der Aktivierung des *PIG3*-Promotors, nicht aber bei der Aktivierung des *mdm2*- oder des *p21/ Waf1*-Promotors? Eine Vermutung ist, dass es sich hier um einen Schwelleneffekt handelt. Erst wenn p53 seinen Promotor mit einer bestimmten Effizienz bindet, kommt es zur Transaktivierung der responsiven Gene. Wird diese Schwelle überschritten, verstärken größere Mengen an Protein den Effekt nicht mehr signifikant. Diesem Modell entsprechend, überschreiten sowohl p53, p53 $\Delta$ 62-91 als auch p53M246I diese Schwelle bei der Aktivierung des *p21/ Waf1*- und des *mdm2*-Promotors. Die exprimierte Proteinmenge reicht jedoch nicht aus, um den wesentlich schlechter bindenden *PIG3*-Promotor durch p53 $\Delta$ 62-91 oder p53M246I zu aktivieren. Ein ähnlicher Mengeneffekt zeigt sich auch bei der Aktivierung des *mdm2*-Promotors im Luciferase-Assay (Abbildung 4.7). Erst ab einer bestimmten Menge von exprimiertem p53 $\Delta$ 62-91 kommt es zur vollständigen Aktivierungsaktivität des Luciferase-Reporters. Auch physiologisch würde ein solches Prinzip sehr viel Sinn ergeben. p21 ist der wichtigste Effektor des Zellzyklus-Arrest. Kommt es zu einer geringgradigen Schädigung der Zelle, folgt eine mäßige Aktivierung von p53. Die Folge ist das Verbleiben der Zelle im der G1- bzw. G2-Phase. Nur bei starker Schädigung der Zelle und starker Aktivierung von p53 wird *PIG3* aktiviert und somit die Apoptose der Zelle eingeleitet. Analog zu dieser These wurde auch schon früher berichtet, dass geringe Mengen von p53 den Zellzyklus-Arrest induzieren während große Mengen von p53 zu Apoptose führen (Chen *et al.*, 1996b).

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass die prolin-reiche Domäne die zentrale Domäne bei der Bindung an die DNA des p53-responsiven Elementes unterstützt. Das Vorkommen des Motivs PXXP gab Anlass zu der Spekulation, es könnte sich um eine SH<sub>3</sub>-bindende Domäne handeln (Ruaro *et al.*, 1997; Walker and Levine, 1996). Diese Möglichkeit kann mit den hier gezeigten Ergebnissen weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

Eine einfachere Erklärung für die Funktion der prolin-reichen Domäne ist der direkte Effekt auf die Konformation der zentralen Domäne des p53-Proteins bei zwei benachbarten Proteinen. Da p53 aktiv als Tetramer vorliegt, ergeben sich Möglichkeiten für eine solche räumliche Beziehung. Passend zu diesem Modell ist die Beobachtung, dass p53 $\Delta$ 62-91 die p53-vermittelte *PIG3*-Aktivierung in tansdominanter Weise beeinflusst (schon ein Molekül p53 $\Delta$ 62-91 innerhalb des Tetramers zeigt dessen Phänotyp. *PIG3* wird nicht mehr aktiviert.). Letztendlich kann diese Frage nur geklärt werden, wenn man die dreidimensionale Struktur beider Domänen und die Struktur des p53-Tetramers kennen würde. Bis jetzt konnte allerdings nur die zentrale Domäne des p53-Proteins in kristalliner Struktur geklärt werden (Cho *et al.*, 1994).

Warum aber benötigt p73 $\beta$  keine prolin-reiche Domäne zwischen der N-terminalen und der zentralen Domäne, um den *PIG3*-Promotor zu aktivieren? Vielleicht kann p73 $\beta$  die *PIG3*-DNA ohne den zusätzlichen Effekt einer weiteren, unterstützenden Proteinregion binden. In der Tat scheint p73 $\beta$  die *PIG3*-DNA effektiver zu binden als p53 (Daten von Ana Contente). Alternativ könnte eine weitere prolin-reiche Domäne des p73 $\beta$ -Proteins die Aufgaben der eliminierten Elemente AS 81- 113 übernehmen. So wurde die Interaktion einer prolin-reichen Domäne im C-Terminus des p73 $\beta$  mit der c-abl-Kinase gezeigt, welches zur Aktivierung der pro-apoptotischen Funktion des p73 $\beta$  durch Phosphorylierung führte (Agami *et al.*, 1999). Eine ähnliche prolin-reiche Domäne im C-Terminus des p53 findet sich jedoch nicht und die beschriebenen Interaktionen von p53 mit c-abl scheinen indirekter Natur zu sein (White and Prives, 1999).

Betrachtet man Mutationen des p53-Proteins in Tumoren, so fällt auf, dass nur sehr wenige Mutationen in der prolin-reichen Domäne liegen. Selbst Mutationen, welche einen Phänotyp wie p53 $\Delta$ 62-91 zeigen, liegen in der zentralen Domäne des p53 (z.B. p53M246I). Wahrscheinlich verändern Punktmutationen die Funktion der prolin-reichen Domäne nicht so nachhaltig, dass es zu maligner Transformation der Zellen kommt. Die zufällige Deletion der gesamten Domäne, oder zumindest großer Teile ist dagegen ein sehr unwahrscheinliches Ereignis. Warum prädisponieren aber auch Mutationen mit dem Phänotyp von p53 $\Delta$ 62-91 (wie p53M246I) zu maligner Entartung, obwohl diese die Funktion des Zellzyklus-Arrest nicht beeinflussen? Man könnte spekulieren, dass gerade dieses einen Mechanismus zur Entstehung von malignen Wachstum beinhaltet. Kommt es zur DNA-Schädigung, die von der Zelle nicht zu reparieren ist, geht diese normalerweise in Apoptose. Bei einem Verlust genau dieser Funktion verbleibt die Zelle jedoch in der G1-Phase und es kommt zur teilweisen Reparatur der Schädigung. Von den verbleibenden Defekten kommt es dann zur Selektion von Mutationen, welche Proliferation und Wachstum begünstigen und somit zur Selektion von teildefizienten Mutanten wie p53M246I.

## **5.2 Unterschiedliche Aktivierung bekannter und neuer p53-responsiver Gene durch p53 und p53 $\Delta$ 62-91 in einem auf die Expression durch rekombinante Adenoviren beruhenden Systems**

p53 ist in über 50 % aller humanen Tumoren mutiert und somit der wahrscheinlich wichtigste Tumorsuppressor der Zelle. p53 selbst ist ein Transkriptionsfaktor und vermittelt seine Funktion zum größten Teil über die Aktivierung p53-responsiver Gene. Es ist somit eine zentrale Steuereinheit für Wachstum, Proliferation und Überleben der Zelle (Levine, 1997). Auch werden immer neue p53-induzierte oder p53-supprimierte Gene gefunden (Yu *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2000), so dass wahrscheinlich noch nicht alle Funktionen des p53-Proteins in ihrer Vollständigkeit erfasst sind. Um die Funktion von p53 und dessen Bedeutung genau zu verstehen, ist es nicht nur sinnvoll die p53-

induzierten Gene weitestgehend zu kennen, sondern auch deren Funktion in der Zelle zu identifizieren. Eine besonders gute Möglichkeit dieses zu tun besteht darin, die unterschiedliche Genaktivierung von p53-Mutanten zu betrachten, welche bestimmte Teilfunktionen nicht mehr erfüllen. Ein Beispiel hierfür ist die Mutante p53 $\Delta$ 62-91. Von ihr ist sowohl ein partieller Funktionsverlust bei der Induktion von Apoptose (Sakamuro *et al.*, 1997; Walker and Levine, 1996) als auch ein selektives Defizit bei der Induktion bestimmter p53-responsiver Promotoren beschrieben (Venot *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1999). p53 $\Delta$ 62-91 kann im Gegensatz zu p53<sup>wt</sup> nicht mehr effizient Apoptose induzieren. Somit sind alle p53-responsiven Gene, die durch diese Mutante nicht mehr aktiviert werden können, zumindest verdächtig, bei der p53 vermittelten Apoptose von Relevanz zu sein. Eine Identifizierung genau dieser Gene ist daher sinnvoll.

Ein Problem beim Vergleich von Induktionsmustern verschiedener p53-Mutanten besteht darin, Zellpopulationen zu betrachten, die sich möglichst nur durch genau dieses eine Gen unterscheiden. Will man nur p53-responsive Gene identifizieren, eignen sich Temperatur- oder Chemotherapeutika-induzierte Systeme (Yu *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2000), bei denen p53 einmal inaktiv, einmal aktiv vorliegt. Um jedoch die Induktionsmuster von p53 mit denen einer Mutante zu vergleichen, müsste man zum Beispiel eine Zelllinie herstellen, welche die Mutante stabil exprimiert. Niemand kann jedoch sicher sagen, zu welchen weiteren Veränderungen es bei der Herstellung einer solchen Zelllinie kommt.

Ein anderer Ansatz, p53 bzw. eine Mutante in dem gleichen Hintergrund auf kontrollierte Art und Weise zu exprimieren, bietet die Infektion mit einem rekombinanten Adenovirus. Mit dem vor einiger Zeit beschriebenen Adeasy-System (He *et al.*, 1998), lassen sich rekombinante Adenoviren herstellen, welche zusätzlich ein gewünschtes Gen („gene of interest“) exprimieren. Die Analysen dieser Studie zeigen, dass man diese Viren so kontrolliert einsetzen kann, dass exakte Mengen an p53- bzw. p53 $\Delta$ 62-91-Protein in den infizierten Zellen translatiert werden. Als Kontrolle dient nicht eine uninfizierte Zellpopulation, sondern eine Population, die mit einem Kontrollvirus (AdGFP) infiziert wird. Genaktivierungen, die durch die Infektion selbst

auftreten, werden dadurch nicht als Unterschiede dargestellt. Das System ist so auch auf andere p53-Mutanten übertragbar und wurde nach der hier durchgeführten Etablierung auch auf p53M246I und auf p53mt273 (eine Mutante, welche in Verdacht steht, einen „gain of funktion“ zu besitzen und selber als Onkogen zu wirken) von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe erweitert.

Von vielen Virus-Proteinen ist eine Interaktion mit dem p53-Protein beschrieben. So weiß man, dass das Protein E1B-55kD das p53-Protein bindet und destabilisiert. (Sarnow *et al.*, 1984; Sarnow *et al.*, 1982b) Die in dieser Studie verwendeten rekombinanten Adenoviren besitzen jedoch keine E1-Region (He *et al.*, 1998). Es kommt somit zu keiner Interaktion der Viren mit den von ihnen exprimierten p53-Varianten. Da die verwendeten rekombinanten Adenoviren dadurch auch ihre Replikationsfähigkeit in den meisten Zellen verloren haben, ist die gezielte Expression von gewünschten Proteinmengen in infizierten Zellen möglich.

Mit dem „Atlas Human Cancer cDNA Expression Arrays“ wurde ein System gewählt, mit dem in einem einzigen Versuch 588 verschiedene Gene auf ihre differentielle Induzierbarkeit überprüft werden konnten. Bei den unterschiedlichen zur Verfügung stehenden Systemen, bot dieses zwei wesentliche Vorteile. Zum einen gab es eine Selektion von Genen, welche im Zusammenhang mit der Onkogenese stehen können. Zum anderen handelt es sich um besonders gut charakterisierte Gene. Häufig kommt es somit bei Untersuchungen mit der Array- oder Chip-Technik zur Identifizierung von neuen, differentiell exprimierten oder induzierten Genen, von denen keinerlei Funktion bekannt ist. Dann ist es sehr viel schwieriger, anschließende funktionelle Untersuchungen durchzuführen.

Bei der Bestätigung der Ergebnisse des cDNA-Arrays in Northern-Blot Analysen konnten unterschiedliche Phänomene dargestellt werden. Zum einen ist es möglich, in der Literatur beschriebene Expressionsmuster mit dem Array abzubilden (Venot *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1999). Das System ist also geeignet, unterschiedliche Genaktivierung durch p53-Varianten zu vergleichen. So konnte unter den 588 untersuchten Genen mit dem *Ephrin Typ 4 Rezeptor* ein Gen identifiziert werden, welches von p53 induziert

wird (wie dann auch von Yu *et al.*, 1999 veröffentlicht) und dessen unterschiedliches Expressionsmuster bei p53 $\Delta$ 62-91 sich in der Northern-Blot Analyse bestätigte. Die genaue Funktion dieses Rezeptors ist allerdings nicht bekannt. Er wird zu den membranständigen Tyrosin-Kinasen gezählt (Schmucker and Zipursky, 2001) und in Zusammenhang mit Onkogenese sowie Angiogenese gebracht (Takai *et al.*, 2001). Welchen Einfluss der *Ephrin Typ 4 Rezeptor* bei der Induktion von Apoptose in Zellkultur haben kann, bleibt vorerst unklar. Auch gibt es kein Konstrukt zur Überprüfung der Promotoraktivierung vom *Ephrin Typ 4 Rezeptor* durch p53 oder p53 $\Delta$ 62-91. Dieses kann daran liegen, dass es nicht gelungen ist, den Promoter dieses Genes zu amplifizieren. Betrachtet man die Sequenz des *Ephrin Typ 4 Rezeptor*-Promotors, so kann man eine komplizierte Tertiärstruktur durch Aneinanderlagerung komplementärer Basen in der Promotorsequenz vermuten. Auch eigene Versuche, diesen Promotor zu amplifizieren, blieben erfolglos (unveröffentlichte Beobachtungen).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen auch, dass das *fas/ APO1*-Gen von p53 und p53 $\Delta$ 62-91 unterschiedlich stark aktiviert wird. Dieses Gen ist bekanntermaßen p53-responsiv und direkt an der Induktion von Apoptose beteiligt (Muller *et al.*, 1998). Kommt es zur Bindung des *fas*-Liganden an den exprimierten Rezeptor, so wird in der Zelle eine Kaskade in Gang gesetzt, welche über die Caspase 3 und weitere Enzyme Apoptose induziert. Fraglich bleibt, ob ein Aktivierungsunterschied von 1,6 zu 1 den funktionellen Verlust bei der Induktion von Apoptose erklärt. Sieht man die Induktion von Apoptose jedoch als multifaktorielles Geschehen, so kann dieses zumindest ein Faktor in diesem Modell sein.

Allerdings scheint es bei der Auswertung von Expression mit Hilfe eines cDNA-Arrays auch zu falsch-positiven Ergebnissen zu kommen. So konnte die im Array gesehene unterschiedliche Expression des *ERCC1*, *ERCC2* und *ERCC5* in Northern-Blot Analysen nicht bestätigt werden. Zustande kommen können solche Unterschiede zum Beispiel durch Ungenauigkeiten bei der Erstellung der Arrays. Nur mit der Durchführung einer größeren Menge von Array-Hybridisierungen und deren Vergleich könnten solche zufälligen Fehler aufgezeigt und vermieden werden. Inzwischen ist die



Array- und Chiptechnik deutlich weiterentwickelt und eine Ausweitung solcher Analysen auf eine größere Anzahl von möglichen p53-responsiven Genen praktikabel geworden. In unserer Arbeitsgruppe werden daher derzeit auf diesem System beruhend Gene hinsichtlich differentieller Expression in größeren Ansätzen getestet, wobei zufällige, falsch-positive Ergebnisse vermieden werden sollen. Seit das gesamte menschliche Genom sequenziert ist (McPherson *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001) und tägliche neue Gene in ihrer Funktion beschrieben werden, bieten sich für den Einsatz eines solchen Systems immer neue Verwendungsmöglichkeiten.

Es ließ sich in diesen Untersuchungen nicht letztendlich klären, ob es sich bei der Induktion von Genen aus der Gruppe der „DNA Damage Response“-Gene und besonders bei denen des „Nucleotide Excision Repairs“ durch p53 $\Delta$ 62-91 um ein falsch-positives Ergebnis handelte, oder ob sich die Ergebnisse nur in Northern-Blot Analysen nicht bestätigen ließen. Ein Zusammenhang von p53 mit der zellinternen Reparaturmaschinerie wurde in der Vergangenheit immer wieder vermutet (Vogelstein *et al.*, 2000), konnten aber direkt noch nicht nachgewiesen werden. Aus physiologischer Sicht erscheint eine Induktion solcher Gene nach dem Anhalten der Zelle in G1- bzw. G2 allerdings sehr sinnvoll. Eine deutliche Induktion solcher Gene bei einer p53-Mutante, bei denen alle Zellen sich im G1-Arrest befinden, weil diese keine Apoptose mehr induziert, ist durchaus möglich und sollte auch in der Zukunft mit in die Betrachtungen einbezogen werden. Auch wurde schon gezeigt, dass p53 an TFIIH bindet (Wang *et al.*, 1995). TFIIH besteht aus den zwei Helikasen ERCC2 und ERCC3, welche Faktoren des „Nucleotide Excision Repairs“ sind. Aus diesen Beobachtungen wurde bereits damals vermutet, dass p53 den „Nucleotide Excision Repair“ zumindest moduliert (Levine, 1997; Wang *et al.*, 1995).

Ein Nachteil bei der Auswertung des Arrays ist, dass man anhand des Aktivierungsmusters nicht sagen kann, ob diese Gene direkt von p53 aktiviert werden, oder ob sie weiter „downstream“ in der Aktivierungskaskade liegen. Eine genaue Aussage darüber können nur nachfolgende Promotorstudien liefern.

Insgesamt ist mit dieser Studie die Etablierung eines Systems gelungen, mit dem in Zukunft nicht nur p53 gegen p53 $\Delta$ 62-91, sondern auch p53 gegen andere Mutanten mit Funktionsunterschieden zu p53 hinsichtlich verschiedener Expressionsmuster untersucht werden können. Dieses Verfahren kann ohne Mehraufwand auf andere Arrays oder Chip-Techniken erweitert werden. Mit dem *Ephrin Typ 4 Rezeptor* wurde ein Gen mit unterschiedlichem Expressionsmuster bei dem Vergleich p53 gegen p53 $\Delta$ 62-91 gefunden. Auch wurde ein unterschiedliches Expressionsmuster für die meisten anderen der 588 getesteten Gene weitestgehend ausgeschlossen.

### **5.3 Die Elimination von p53 ist nicht Grundlage einer effizienten Virusreplikation des Adenovirus Typ 5**

Seit einiger Zeit gibt es Berichte über eine selektive Replikation des Adenovirus dl1520/ ONYX 015 in Tumorzellen ohne p53 bzw. mit mutierten p53 (Bischoff *et al.*, 1996; Kirn and McCormick, 1996). Bei diesem Effekt zeigt sich zumindest in den aus einem Kolon-Karzinom stammenden HCT116 Zellen eine Abhängigkeit von der Expression des *mdm2*-Regulators p14ARF (Ries *et al.*, 2000). Die vermutete Korrelation der Virusreplikation mit dem p53-Status einer Zelle konnte jedoch in darauffolgenden Arbeiten nicht bestätigt werden (Goodrum and Ornelles, 1998; Hall *et al.*, 1998; Harada and Berk, 1999; Rothmann *et al.*, 1998). Zwar gab es Zellen, in denen der dl1520/ ONYX 015-Virus nicht effizient replizierte. Diese Zellen zeigten jedoch keine Übereinstimmung bezüglich ihres p53-Status. Es besteht aber die Möglichkeit, dass einige Zellen, die den Adenovirus dl1520/ ONYX 015 effizient replizieren, obwohl ein intaktes p53 vorhanden ist, wirklich ein fehlendes oder nicht funktionelles p14ARF aufweisen. Dieses würde bedeuten, dass p53 die Replikation dieses Virus nur unterdrückt, wenn der gesamte p53-„pathway“ in funktioneller Form vorliegt. Dagegen sprechen jedoch die Ergebnisse in dieser Studie, bei denen primäre Zellen aus der Nabelvene eines Menschen (HUVECs) bzw. Tumorzellen, bei denen nachgewiesenerweise p14ARF exprimiert wird (H1299, 911), verwendet wurden. Im

Gegensatz zu transformierten Tumorzelllinien gibt es bei den primären Zellen (HUVEC) keine Selektion zu Änderungen in der Zell-Wachstums-Kontrolle. Ebenso besitzen diese Zellen einen intakten „pathway“ zur p53-vermittelten Transkription (Grillari *et al.*, 2000). Auch in diesen Zellen zeigt sich jedoch keine Abhängigkeit der Virusreplikation vom p53-Status, woraus folgt, dass aktives p53 die Virusreplikation nicht unterdrückt.

Es finden sich viele weitere Beispiele von Viren aus der Klasse der sogenannten „small DNA“ Tumolviren, welche zur effizienten Replikation nicht auf die Inaktivierung von p53 angewiesen sind. So zeigt zum Beispiel das E6 Protein der Humanen Papilloma Viren Typ 6 oder Typ 11 im Gegensatz zu den hoch onkogenen Humanen Papilloma Viren Typ 16 oder Typ 18 keine nachweisbare Interaktion mit p53. Dennoch replizieren diese Viren effizient und konnten sich in der Evolution behaupten. Auch scheint p53 die Replikation des SV40 *in vivo* nicht zu beeinflussen (von der Weth and Deppert, 1993).

Andererseits haben viele der sogenannten „small-DNA“ Tumolviren effiziente und in der Evolution hoch konservierte Mechanismen zur Inaktivierung von p53. Es stellt sich also die Frage, warum solche Mechanismen gebildet und über die Zeit beibehalten wurden, wenn p53 keinen Einfluss auf das Überleben und die Effizienz der Replikation der Viren zumindest in Zellkultur hat. Eine Erklärungsmöglichkeit ist, dass die Viren mehrere, in verschiedenen Zelllinien nebeneinander und unterschiedlich stark arbeitende Mechanismen entwickelt haben, um den p53-„pathway“ zu beeinflussen. So wird zum Beispiel das von p53 induzierte und Apoptose-auslösende Gen *bax* von einem weiteren adenoviralen Protein (E1B-19kD) erkannt und destabilisiert (Chen *et al.*, 1996a; Han *et al.*, 1996). Dieses scheint zumindest in einigen Zellen den Ertrag bei der Virusreplikation zu beeinflussen. Des weiteren inhibiert das gut charakterisierte p53-responsive Gen *p21 /WAF1* die Phosphorylierung des pRb (Retinoblastoma) Proteins. Die phosphorylierte, aktive Form ist ebenfalls ein wichtiger Regulator des Zellzyklus. Das adenovirale Protein E1A dagegen bindet und inaktiviert pRb (Vogelstein *et al.*, 2000). Solche zusätzlichen Mechanismen könnten erklären, warum aktives p53 nicht in der Lage ist, die Virusreplikation zu inhibieren. Es müsste daher geklärt werden, ob adenovirale Proteine noch weitere der inzwischen bekannten p53-responsiven Gene

inhibieren. Nur genaue Kenntnisse dieser Inaktivierungswege und deren Ausschaltung durch spezielle Adenovirus-Mutanten könnten dann zu einem Virus führen, welches sich wirklich selektiv in Tumorzellen vermehrt.

Inzwischen gibt es weitere vielversprechende Ansätze, einen tumor-spezifischen Adenovirus zu konstruieren (Alemany *et al.*, 2000). Versucht werden die Integration eines tumor-spezifischen Promotors vor das für die Replikation essentielle *E1A* Gen des Adenovirus (Rodriguez *et al.*, 1997), die Modifikation des E1A Proteins, um zum Beispiel die Bindung an pRb zu beeinflussen (Heise *et al.*, 2000b), die Überexpression des sogenannten „Adenovirus death proteins“ der E3 Region (Doronin *et al.*, 2000), die Überexpression von E4orf4 (Shtrichman *et al.*, 1999), sowie die Modifikation von viralen Oberflächenrezeptoren (Shinoura *et al.*, 1999). Mit diesen Strategien oder mit Kombinationen dieser Ansätze kann in Zukunft die Tumorspezifität der Adenoviren eventuell so gesteigert werden, dass ein systemischer Einsatz sowohl bei Primärtumoren als auch bei Metastasen möglich wird.

Der Einsatz der Adenovirusmutante dl1520/ ONYX 015 als therapeutisches Instrument zur Tumorbekämpfung und dessen Erfolge sowohl in präklinischen (Heise *et al.*, 2000a; Heise *et al.*, 2000c; Heise *et al.*, 1997; Heise *et al.*, 1999a; Heise *et al.*, 1999b; Rogulski *et al.*, 2000; You *et al.*, 2000), als auch in klinischen Studien (Kirn *et al.*, 1998; Kirn and McCormick, 1996; Nemunaitis *et al.*, 2000) zeigen bis zum heutigen Zeitpunkt bemerkenswerte Resultate. Es wird eine selektive Vermehrung in Tumorzellen sowie ein onkolytischer Effekt beschrieben. Die Resultate dieser Untersuchung, ebenso wie vorhergehende Resultate über p53-unabhängige Replikation (Hall *et al.*, 1998; Harada and Berk, 1999; Heise *et al.*, 1997; Rothmann *et al.*, 1998), widersprechen nicht notwendigerweise den klinischen Daten. Sie stellen aber das ursprüngliche Konzept über eine selektive Replikation von dl1520/ ONYX 015 in Tumorzellen in Frage. Das ursprüngliche Konzept (Bischoff *et al.*, 1996) beschrieb den potentiellen Einsatz von dl1520/ ONYX 015 als ein spezifisches therapeutisches Instrument, welches sich selektiv in Zellen ohne, oder mit nicht funktionellem, mutierten p53 vermehrt. In normalen Zellen hingegen sollte die Virusreplikation durch das nicht mehr

destabilisierte p53-Protein verhindert werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen unterstützen dieses Konzept nicht.

Eine andere Möglichkeit ist, dass Adenoviren (so auch der Wildtyp Adenovirus Typ 5) eine natürliche Präferenz für einige Tumorzellen besitzt. Diese Annahme wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass das Adenovirus WtD primäre Zellen 10-100 mal schlechter infiziert als die getesteten Tumorzelllinien (H1299, 911, Hela usw.). Dieses könnte unter anderen mit einer höheren Expression des Coxsackie-Adenovirus Rezeptors (CAR) auf der Zelloberfläche von Tumorzellen zusammenhängen. Zusätzlich hilft der erhöhte Umsatz von Tumorzellen an Bestandteilen, die auch der Virus zur Replikation braucht, wie zum Beispiel Ribonukleinsäuren, bei der effizienteren Replikation. Eine solche „natürliche“ Selektivität des Adenovirus für Tumorgewebe wurde bereits im Jahre 1956 erstmals bei der Behandlung von Cervix-Karzinomen mit Wildtyp-Adenovirus vermutet (Smith *et al.*, 1956). Die Autoren dieser Veröffentlichung injizierten damals bei Patientinnen mit vorgeschrittenem Cervix-Karzinom einen Wildtyp-Adenovirus direkt in den Tumor oder die versorgenden Blutgefäße. Daraufhin beobachteten sie bei einigen Patientinnen einen partiellen Regress. Auch konnten sie das Adenovirus aus dem Tumorgewebe, nicht aber aus dem umliegenden gesunden Gewebe isolieren. Berücksichtigt man die begrenzten Methoden zu dieser Zeit, so scheint doch eine gewisse Selektivität der viralen Zytolyse für Tumorgewebe bestanden zu haben. Das würde bedeuten, dass auch dl1520/ ONYX 015 möglicherweise nur ein attentuiertes Virus ist, welches keine besonderen Mechanismen zur spezifischen Selektivität für Tumorzellen zeigt. Auch könnte die von dem Adenovirus induzierte Immunreaktion in Zusammenarbeit mit der tumorinduzierten Immunreaktion zu einem Regress des Tumors führen. Angesichts vieler neuer Bemühungen und der beträchtlichen klinischen Erfolge des dl1520/ ONYX 015-Virus besteht Hoffnung auf eine Weiterentwicklung des Adenovirus zu einem spezifischen Instrument in der Behandlung von Tumorerkrankungen.

## 6 Zusammenfassung

Das Tumorsuppressorgen p53 gehört zu den zentralen Steuereinheiten von Proliferation und Wachstum in der Zelle. Mutationen und funktioneller Verlust bei diesem Protein ist eng mit der Entstehung maligner Tumoren assoziiert. So kann man in über 50% aller soliden Tumoren Mutationen von p53 nachweisen. Es vermittelt seine Funktion hauptsächlich durch transkriptionelle Aktivierung p53-responsiver Gene. Folge der Aktivierung von p53 ist das Verbleiben der Zelle in der G1- bzw G2-Phase des Zellzyklus und/oder die Induktion von Apoptose. Zusätzlich ist p53 Ziel viraler Onkoproteine. Beispielsweise wird p53 durch die adenoviralen Onkoproteine E1B-55kD und E4orf6 gebunden und destabilisiert. Es ist jedoch unklar, ob die Destabilisierung von p53 sich auf die Effizienz der adenoviralen Replikation positiv auswirkt. Auch ist unbekannt, ob ein Adenovirus ohne das E1B-55kD-Protein (dl 1520/ONYX 015) sich selektiv in Zellen mit mutierten oder fehlenden p53 repliziert und somit ein effektives Werkzeug in der Tumorthherapie darstellt.

Eine p53-Variante, bei der die Prolin-reiche Region deletiert ist (p53delta62-93) , zeigt einen selektiven Funktionsverlust bei der Induktion von Apoptose ebenso wie bei der Aktivierung des p53-responsiven Promotors *PIG3*. Andere p53-responsive Gene werden von dieser p53-Variante mit gleicher Effizienz induziert wie durch Wildtyp-p53. Die in Tumoren vorkommende Mutante von p53, p53M246I zeigt ebenfalls zeigt ebenfalls einen selektiven Defekt bei der Induktion des *PIG3*-Promotor und der Apoptose. Die vorgestellten Resultate legen nahe, dass die Prolin-reiche Region von p53 einen positiven Einfluss auf die DNA-Interaktion des Proteins ausübt.

Es wird des weiteren ein System vorgestellt, um weitere p53-responsive Gene zu identifizieren, die sich in ihrer Aktivierung verhalten wie *PIG3*. Hierzu wurden p53-negative H1299-Zellen mit rekombinanten Adenoviren transduziert, welche zusätzlich p53 oder p53delta62-93 exprimierten. Die von beiden Proteinen differentiell exprimierten Gene wurden mit einem cDNA-Array verglichen. Dabei fand sich ein p53-responsives Gen (*Ephrin-B4-Rezeptor*), welches ein Aktivierungsmuster zeigte wie *PIG3*, und somit einen Kandidaten für die Apoptose-Vermittlung darstellt.

Um die Rolle von p53 bei der adenoviralen Replikation zu klären, wurde eine p53-Mutante, p53mt24-28 hergestellt, die wie p53-Wildtyp p53-responsive Promotoren aktiviert, jedoch nicht mehr durch die adenoviralen Proteine E1B-55kD und E4orf6 destabilisiert wird. Diese Mutante wurde mit einem rekombinanten Adenovirus exprimiert. Überraschenderweise zeigte ein Wildtyp-Adenovirus auch bei starker Überexpression von p53 und p53mt24-28 eine gleich effektive Replikationseffizienz in Tumorzellen und in primären Endothelialzellen, wie in Abwesenheit von p53. Dies legt nahe, dass p53 nicht die Replikation des Adenovirus beeinflusst. Anstatt der Deletion des p53-Anatagonisten E1B-55kD müssen somit alternative Strategien für eine Nutzung von Adenoviren bei der Tumorthherapie entwickelt werden.

## 7 Abstract

The tumor suppressor p53 is a central regulator of proliferation and cell growth. It has become the subject of intensive study ever since it became clear that slightly more than 50% of human cancers contain mutations in this gene. Several types of DNA-damage can activate wildtype-p53. The result is a rapid increase in the level of p53 and activation of p53 as a transcriptional factor. p53 induces two major pathways, cell cycle arrest and/or apoptosis. p53 is also a target of viral oncoproteins. The adenoviral oncoproteins E1B-55kD and E4orf6 inactivate and destabilize p53, thereby contributing to malignant transformation. However, it is unclear whether the elimination of p53 contributes to the efficiency of viral replication. Furthermore, it is controversial whether adenoviruses with a deletion in the E1B55kD-coding region (dl1520/ ONYX 015) might selectively replicate in cells with a mutation or deletion of the *p53* gene and, therefore, represent a tool in cancer therapy.

A p53 protein lacking the proline-rich region (p53delta62-91) induces many p53-responsive genes but not *PIG3*. In parallel, this mutant induces growth arrest but not apoptosis. Some tumor-derived p53-mutants, especially p53M264I, specifically failed to induce the *PIG3* promoter and apoptosis, thus resembling p53delta62-91. These results suggest that the proline-rich domain of p53 affects the ability of the central domain to bind DNA.

Furthermore, an assay was established to identify other p53-responsive genes showing the same activation pattern as *PIG3*. Therefore, p53 (-/-) H1299 cells were transduced by adenoviral vectors to express p53 or p53delta62-91. Differentially activated p53-responsive genes were compared by cDNA-arrays. A p53-responsive gene was identified (*Ephrin-B4-Receptor*) that showed the same pattern of activation as *PIG3*. Therefore, this gene represents a candidate mediator of p53 induced apoptosis.

To address the role of p53 in virus replication, a p53-mutant has been constructed (p53mt24-28). This mutation leaves p53 transcriptionally active but confers complete resistance to inhibition and degradation by adenoviral oncoproteins. This mutant was expressed by an adenoviral vector. Surprisingly, even strong overexpression of p53 or



p53mt24-28 allowed the virus to replicate as efficiently as in the absence of p53 proteins, both in tumor cells and in primary cells. Thus, active p53 does not inhibit the growth of adenovirus. Instead of deleting the p53-antagonist E1B-55kD, alternative strategies should be used to improve the utility of adenoviruses in cancer therapy.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungen

Ad	Adenovirus
BSA	bovines Serumalbumin
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
FCS	fetal calf serum
GFP	Green Fluorescent Protein
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
LB	Luria-Bertani Broth-Medium
MOI	multiplicity of infection
OD	Optische Dichte
PBS <sup>def</sup>	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne Kalzium und Magnesium
PBS <sup>++</sup>	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Kalzium und Magnesium
Pfu	Pyrococcus furiosus
pRb	Retinoblastoma Protein
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
Taq	Thermophilus aquaticus
TUNEL	<u>T</u> dT-mediated X-d <u>U</u> TP <u>n</u> ick <u>e</u> nd <u>l</u> abeling
upm	Umdrehungen pro Minute

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Mechanismen bei der Entstehung von malignen Tumoren.....	2
Abbildung 1.2: Phasen des Mitosezyklus.....	3
Abbildung 1.3: Der p53-Pathway.....	6
Abbildung 1.4: p53 als Transkriptionsfaktor.....	7
Abbildung 1.5: Struktur des Tumorsuppressorproteins p53.....	10
Abbildung 1.6: Eigenschaften der Deletionsmutante p53 $\Delta$ 61-92.....	11
Tabelle 1.7: Einteilung der Mastadenoviren (nach Shenk).....	13
Abbildung 1.8: Organisation des Adenovirusgenoms.....	14
Abbildung 1.9: Die Chimäre p53mt(24-28) wird durch eine Adenovirusinfektion nicht beeinflusst. ....	16
Abbildung 1.10: Das dl1520/ ONYX 015-Virus vermehrt sich selektiv in p53-defizienten Zellen. ....	17
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Adeasy-Systems.....	75
Abbildung 4.1: Aktivierung der Promotoren von <i>mdm2</i> und <i>PIG3</i> durch p53, p73 $\beta$ und Chimären.....	83
Abbildung 4.2: Aktivierung des <i>mdm2</i> -Promotors und des <i>PIG3</i> -Promotors durch p53 und Mutanten.....	85
Abbildung 4.3: Induktion von Apoptose durch p53 und Mutanten.....	86
Abbildung 4.4: Infizierte Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop („Viruskometen“).....	88
Abbildung 4.5 : Die Expression von p53 und p53 $\Delta$ 62-91 bei verschiedenen MOI von Adp53, Adp53 $\Delta$ 62-91 und AdGFP in H1299-Zellen.....	89
Abbildung 4.7: Aktivierung des <i>mdm2</i> -Promotors und des <i>PIG3</i> -Promotors durch die rekombinanten Viren.....	91
Abbildung 4.8: Darstellung der Aktivierung von <i>p21/ WAF1</i> -m-RNA in H1299-Zellen nach Transfektion und nach Infektion in einer Northern-Blot Analyse.....	93
Abbildung 4.8 : Northern-Blot Analyse mit bekannten p53-responsiven Genen.....	95

---

Abbildung 4.9: Vergleich der Clontech cDNA Atlas Arrays von p53 gegen p53 $\Delta$ 62-91.....	97
Abbildung 4.10: Auswertungsbeispiel des Arrays anhand von <i>p21/Waf1</i> und <i>PIG3</i> ....	99
Tabelle 4.12: Die Tabelle zeigt eine Auflistung aller gefundenen relevanten Unterschiede.....	100
Abbildung 4.13: Northern-Blot Analysen mit auf dem cDNA-Array differentiell exprimierten Genen.....	102
Abbildung 4.16: Expression von p53 durch virale Vektoren.....	106
Abbildung 4.17: p53 Level und Aktivität nach Adenovirus Infektion.....	106
Abbildung 4.18: Einfluss von p53 auf die Replikation von WtD-Adenovirus.....	108
Abbildung 4.19: Einfluss von p53 auf die Replikation von dl1520/ ONYX 015.....	109
Abbildung 4.20: Expression von p14ARF in mit Adenovirus infizierten Zellen.....	111

## 9 Literaturverzeichnis

- Agami, R., Blandino, G., Oren, M. and Shaul, Y. (1999) Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature*, **399**, 809-13.
- Aleman, R., Balague, C. and Curiel, D.T. (2000) Replicative adenoviruses for cancer therapy. *Nat Biotechnol*, **18**, 723-7.
- Ashcroft, M., Taya, Y. and Vousden, K.H. (2000) Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Mol Cell Biol*, **20**, 3224-33.
- Babiss, L.E., Ginsberg, H.S. and Darnell Jr., J.E. (1985) Adenovirus E1B proteins are required for accumulation of late viral mRNA and for effects on cellular mRNA translation and transport. *Mol Cell Biol*, **5**, 2552-2558.
- Bagchi, S., Weinmann, R. and Raychaudhuri, P. (1991) The retinoblastoma protein copurifies with E2F-I, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F. *Cell*, **65**, 1063-72.
- Barker, D.D. and Berk, A.J. (1987) Adenovirus proteins from both E1B reading frames are required for transformation of rodent cells by viral infection and DNA transfection. *Virology*, **156**, 107-21.
- Bischoff, J.R., Kirn, D.H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J.A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A. and McCormick, F. (1996) An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science*, **274**, 373-6.
- Chen, G., Branton, P.E., Yang, E., Korsmeyer, S.J. and Shore, G.C. (1996a) Adenovirus E1B 19-kDa death suppressor protein interacts with Bax but not with Bad. *J Biol Chem*, **271**, 24221-5.
- Chen, X., Ko, L.J., Jayaraman, L. and Prives, C. (1996b) p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev*, **10**, 2438-51.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D. and Pavletich, N.P. (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*, **265**, 346-55.

- Chow, L.T., Gelinas, R.E., Broker, T.R. and Roberts, R.J. (1977) An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell*, **12**, 1-8.
- de Stanchina, E., McCurrach, M.E., Zindy, F., Shieh, S.Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A.V., Prives, C., Roussel, M.F., Sherr, C.J. and Lowe, S.W. (1998) E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev*, **12**, 2434-42.
- Dittmer, D., Pati, S., Zambetti, G., Chu, S., Teresky, A.K., Moore, M., Finlay, C. and Levine, A.J. (1993) Gain of function mutations in p53. *Nat Genet*, **4**, 42-6.
- Dobbelstein, M., Roth, J., Kimberly, W.T., Levine, A.J. and Shenk, T. (1997) Nuclear export of the E1B 55-kDa and E4 34-kDa adenoviral oncoproteins mediated by a rev-like signal sequence. *Embo J*, **16**, 4276-4284.
- Dobner, T., Horikoshi, N., Rubenwolf, S. and Shenk, T. (1996) Blockage by adenovirus E4orf6 of transcriptional activation by the p53 tumor suppressor. *Science*, **272**, 1470-1473.
- Doronin, K., Toth, K., Kuppaswamy, M., Ward, P., Tollefson, A.E. and Wold, W.S. (2000) Tumor-specific, replication-competent adenovirus vectors overexpressing the adenovirus death protein. *J Virol*, **74**, 6147-55.
- Funk, J.O., Waga, S., Harry, J.B., Espling, E., Stillman, B. and Galloway, D.A. (1997) Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*, **11**, 2090-100.
- Gabler, S., Schutt, H., Groitl, P., Wolf, H., Shenk, T. and Dobner, T. (1998) E1B 55-kilodalton-associated protein: a cellular protein with RNA-binding activity implicated in nucleocytoplasmic transport of adenovirus and cellular mRNAs. *J Virol*, **72**, 7960-71.
- Goodrum, F.D. and Ornelles, D.A. (1998) p53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *J Virol*, **72**, 9479-90.
- Grillari, J., Hohenwarter, O., Grabherr, R.M. and Katinger, H. (2000) Subtractive hybridization of mRNA from early passage and senescent endothelial cells. *Exp Gerontol*, **35**, 187-97.
- Gu, W. and Roeder, R.G. (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, **90**, 595-606.

- Hall, A.R., Dix, B.R., O'Carroll, S.J. and Braithwaite, A.W. (1998) p53-dependent cell death/apoptosis is required for a productive adenovirus infection. *Nat Med*, **4**, 1068-72.
- Han, J., Sabbatini, P., Perez, D., Rao, L., Modha, D. and White, E. (1996) The E1B 19K protein blocks apoptosis by interacting with and inhibiting the p53-inducible and death-promoting Bax protein. *Genes Dev*, **10**, 461-77.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Harada, J.N. and Berk, A.J. (1999) p53-Independent and -dependent requirements for E1B-55K in adenovirus type 5 replication. *J Virol*, **73**, 5333-44.
- Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Vousden, K.H. and Oren, M. (1995) Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev*, **9**, 2170-83.
- He, T.C., Zhou, S., da Costa, L.T., Yu, J., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 2509-14.
- Heise, C., Ganly, I., Kim, Y.T., Sampson-Johannes, A., Brown, R. and Kim, D. (2000a) Efficacy of a replication-selective adenovirus against ovarian carcinomatosis is dependent on tumor burden, viral replication and p53 status. *Gene Ther*, **7**, 1925-1929.
- Heise, C., Hermiston, T., Johnson, L., Brooks, G., Sampson-Johannes, A., Williams, A., Hawkins, L. and Kim, D. (2000b) An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nat Med*, **6**, 1134-9.
- Heise, C., Lemmon, M. and Kim, D. (2000c) Efficacy with replication-selective adenovirus plus cisplatin-based chemotherapy: dependence on sequencing but not p53 functional status or route of administration. *Clin Cancer Res*, **6**, 4908-4914.
- Heise, C., Sampson-Johannes, A., Williams, A., McCormick, F., Von Hoff, D.D. and Kim, D.H. (1997) ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat Med*, **3**, 639-45.

- Heise, C.C., Williams, A., Olesch, J. and Kirn, D.H. (1999a) Efficacy of a replication-competent adenovirus (ONYX-015) following intratumoral injection: intratumoral spread and distribution effects. *Cancer Gene Ther*, **6**, 499-504.
- Heise, C.C., Williams, A.M., Xue, S., Propst, M. and Kirn, D.H. (1999b) Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficacy. *Cancer Res*, **59**, 2623-8.
- Hinds, P.W. and Weinberg, R.A. (1994) Tumor suppressor genes. *Curr Opin Genet Dev*, **4**, 135-41.
- Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M.S., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R. and Harris, C.C. (1994) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res*, **22**, 3551-5.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C.C. (1991) p53 mutations in human cancers. *Science*, **253**, 49-53.
- Jones, N.C. (1992) Multifunctional products of the adenovirus E1A gene. In Doerfler, W. and Böhm, P. (eds.), *Malignant Transformation by DNA viruses*. VCH, Weinheim, pp. 87-113.
- Jost, C.A., Marin, M.C. and Kaelin, W.G., Jr. (1997) p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature*, **389**, 191-4.
- Kaelin, W.G., Jr. (1998) Another p53 Doppelgänger? *Science*, **281**, 57-8.
- Kaelin, W.G., Jr., Krek, W., Sellers, W.R., DeCaprio, J.A., Ajchenbaum, F., Fuchs, C.S., Chittenden, T., Li, Y., Farnham, P.J., Blunar, M.A. and et al. (1992) Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell*, **70**, 351-64.
- Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J.M., Dumont, X., Ferrara, P., McKeon, F. and Caput, D. (1997) Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*, **90**, 809-19.
- Kao, C.C., Yew, P.R. and Berk, A.J. (1990) Domains required for in vitro association between the cellular p53 and the adenovirus 2 E1B 55K proteins. *Virology*, **179**, 806-14.



- Kastan, M.B., Zhan, Q., el-Deiry, W.S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W.V., Plunkett, B.S., Vogelstein, B. and Fornace, A.J., Jr. (1992) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell*, **71**, 587-97.
- Khosravi, R., Maya, R., Gottlieb, T., Oren, M., Shiloh, Y. and Shkedy, D. (1999) Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14973-7.
- Khuri, F.R., Nemunaitis, J., Ganly, I., Arseneau, J., Tannock, I.F., Romel, L., Gore, M., Ironside, J., MacDougall, R.H., Heise, C., Randlev, B., Gillenwater, A.M., Brusio, P., Kaye, S.B., Hong, W.K. and Kim, D.H. (2000) A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med*, **6**, 879-85.
- Kim, D., Hermiston, T. and McCormick, F. (1998) ONYX-015: clinical data are encouraging. *Nat Med*, **4**, 1341-2.
- Kim, D.H. and McCormick, F. (1996) Replicating viruses as selective cancer therapeutics. *Mol Med Today*, **2**, 519-27.
- Knudson, A.G. (1993) Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 10914-21.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Lee, S., Elenbaas, B., Levine, A. and Griffith, J. (1995) p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell*, **81**, 1013-20.
- Levine, A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, **88**, 323-31.
- Lin, J., Chen, J., Elenbaas, B. and Levine, A.J. (1994) Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein. *Genes Dev*, **8**, 1235-46.

- Lin, J., Teresky, A.K. and Levine, A.J. (1995) Two critical hydrophobic amino acids in the N-terminal domain of the p53 protein are required for the gain of function phenotypes of human p53 mutants. *Oncogene*, **10**, 2387-90.
- Lowe, S.W., Ruley, H.E., Jacks, T. and Housman, D.E. (1993) p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*, **74**, 957-67.
- Lu, H. and Levine, A.J. (1995) Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5154-8.
- McPherson, J.D., Marra, M., Hillier, L., Waterston, R.H., Chinwalla, A., Wallis, J., Sekhon, M., Wylie, K., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Fulton, R., Kucaba, T.A., Wagner-McPherson, C., Barbazuk, W.B., Gregory, S.G., Humphray, S.J., French, L., Evans, R.S., Bethel, G., Whittaker, A., Holden, J.L., McCann, O.T., Dunham, A., Soderlund, C., Scott, C.E., Bentley, D.R., Schuler, G., Chen, H.C., Jang, W., Green, E.D., Idol, J.R., Maduro, V.V., Montgomery, K.T., Lee, E., Miller, A., Emerling, S., Kucherlapati, Gibbs, R., Scherer, S., Gorrell, J.H., Sodergren, E., Clerc-Blankenburg, K., Tabor, P., Naylor, S., Garcia, D., de Jong, P.J., Catanese, J.J., Nowak, N., Osoegawa, K., Qin, S., Rowen, L., Madan, A., Dors, M., Hood, L., Trask, B., Friedman, C., Massa, H., Cheung, V.G., Kirsch, I.R., Reid, T., Yonescu, R., Weissenbach, J., Bruls, T., Heilig, R., Branscomb, E., Olsen, A., Doggett, N., Cheng, J.F., Hawkins, T., Myers, R.M., Shang, J., Ramirez, L., Schmutz, J., Velasquez, O., Dixon, K., Stone, N.E., Cox, D.R., Haussler, D., Kent, W.J., Furey, T., Rogic, S., Kennedy, S., Jones, S., Rosenthal, A., Wen, G., Schilhabel, M., Gloeckner, G., Nyakatura, G., Siebert, R., Schlegelberger, B., Korenberg, J., Chen, X.N., Fujiiyama, A., Hattori, M., Toyoda, A., Yada, T., Park, H.S., Sakaki, Y., Shimizu, N., Asakawa, S., et al. (2001) A physical map of the human genome. *Nature*, **409**, 934-41.
- Meek, D.W. (1998) Multisite phosphorylation and the integration of stress signals at p53. *Cell Signal*, **10**, 159-66.
- Muller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S.L., Galle, P.R., Stremmel, W., Oren, M. and Krammer, P.H. (1998) p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med*, **188**, 2033-45.

- Nelson, M. and McClelland, M. (1992) Site-directed mutagenesis. *Methods Enzymol*, **216**, 279-303.
- Nemunaitis, J., Ganly, I., Khuri, F., Arseneau, J., Kuhn, J., McCarty, T., Landers, S., Maples, P., Romel, L., Randlev, B., Reid, T., Kaye, S. and Kirn, D. (2000) Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer Res*, **60**, 6359-6366.
- Pietenpol, J.A., Tokino, T., Thiagalingam, S., el-Deiry, W.S., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1994) Sequence-specific transcriptional activation is essential for growth suppression by p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1998-2002.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1997) A model for p53-induced apoptosis. *Nature*, **389**, 300-5.
- Querido, E., Marcellus, R.C., Lai, A., Charbonneau, R., Teodoro, J.G., Ketner, G. and Branton, P.E. (1997) Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells. *J Virol*, **71**, 3788-98.
- Ries, S.J., Brandts, C.H., Chung, A.S., Biederer, C.H., Hann, B.C., Lipner, E.M., McCormick, F. and Michael Korn, W. (2000) Loss of p14ARF in tumor cells facilitates replication of the adenovirus mutant dl1520 (ONYX-015). *Nat Med*, **6**, 1128-33.
- Rodriguez, R., Schuur, E.R., Lim, H.Y., Henderson, G.A., Simons, J.W. and Henderson, D.R. (1997) Prostate attenuated replication competent adenovirus (ARCA) CN706: a selective cytotoxic for prostate-specific antigen-positive prostate cancer cells. *Cancer Res*, **57**, 2559-63.
- Rogulski, K.R., Freytag, S.O., Zhang, K., Gilbert, J.D., Paielli, D.L., Kim, J.H., Heise, C.C. and Kirn, D.H. (2000) In vivo antitumor activity of ONYX-015 is influenced by p53 status and is augmented by radiotherapy. *Cancer Res*, **60**, 1193-6.
- Roth, J., Koch, P., Contente, A. and Dobbelstein, M. (2000) Tumor-derived mutations within the DNA-binding domain of p53 that phenotypically resemble the deletion of the proline-rich domain. *Oncogene*, **19**, 1834-1842.

- Roth, J., König, C., Wienzek, S., Weigel, S., Ristea, S. and Dobbstein, M. (1998) Inactivation of p53 but not p73 by adenovirus type 5 E1B 55-kilodalton and E4 34-kilodalton oncoproteins. *J Virol*, **72**, 8510-8516.
- Rothmann, T., Hengstermann, A., Whitaker, N.J., Scheffner, M. and zur Hausen, H. (1998) Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J Virol*, **72**, 9470-8.
- Ruaro, E.M., Collavin, L., Del Sal, G., Haffner, R., Oren, M., Levine, A.J. and Schneider, C. (1997) A proline-rich motif in p53 is required for transactivation-independent growth arrest as induced by Gas1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4675-80.
- Sakamuro, D., Sabbatini, P., White, E. and Prendergast, G.C. (1997) The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene*, **15**, 887-98.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-7.
- Sarnow, P., Hearing, P., Anderson, C.W., Halbert, D.N., Shenk, T. and Levine, A.J. (1984) Adenovirus early region 1B 58,000-dalton tumor antigen is physically associated with an early region 4 25,000-dalton protein in productively infected cells. *J Virol*, **49**, 692-700.
- Sarnow, P., Ho, Y.S., Williams, J. and Levine, A.J. (1982a) Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell*, **28**, 387-94.
- Sarnow, P., Sullivan, C.A. and Levine, A.J. (1982b) A monoclonal antibody detecting the adenovirus type 5-E1b-58Kd tumor antigen: characterization of the E1b-58Kd tumor antigen in adenovirus- infected and -transformed cells. *Virology*, **120**, 510-7.
- Schmucker, D. and Zipursky, S.L. (2001) Signaling downstream of Eph receptors and ephrin ligands. *Cell*, **105**, 701-4.
- Shen, Y., Kitzes, G., Nye, J.A., Fattaey, A. and Hermiston, T. (2001) Analyses of single-amino-acid substitution mutants of adenovirus type 5 e1b-55k protein. *J Virol*, **75**, 4297-307.

- Shenk, T. (1996) Adenoviridae: The viruses and their replication. In Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. (eds.), *Virology*. Lippincott-Raven, Philadelphia, Vol. 2, pp. 2111-2148.
- Shinoura, N., Yoshida, Y., Tsunoda, R., Ohashi, M., Zhang, W., Asai, A., Kirino, T. and Hamada, H. (1999) Highly augmented cytopathic effect of a fiber-mutant E1B-defective adenovirus for gene therapy of gliomas. *Cancer Res*, **59**, 3411-6.
- Shirodkar, S., Ewen, M., DeCaprio, J.A., Morgan, J., Livingston, D.M. and Chittenden, T. (1992) The transcription factor E2F interacts with the retinoblastoma product and a p107-cyclin A complex in a cell cycle-regulated manner. *Cell*, **68**, 157-66.
- Shtrichman, R., Sharf, R., Barr, H., Dobner, T. and Kleinberger, T. (1999) Induction of apoptosis by adenovirus E4orf4 protein is specific to transformed cells and requires an interaction with protein phosphatase 2A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 10080-5.
- Smith, R.R., Huebner, R.J., Rowe, W.P., Schatten, W.E. and Thomas, L.B. (1956) Studies on the use of viruses in the treatment of carcinoma of the cervix. *Cancer*, **9**, 1211-1218.
- Stott, F.J., Bates, S., James, M.C., McConnell, B.B., Starborg, M., Brookes, S., Palmero, I., Ryan, K., Hara, E., Vousden, K.H. and Peters, G. (1998) The alternative product from the human CDKN2A locus, p14<sup>ARF</sup>, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J.*, **17**, 5001-5014.
- Symonds, H., Krall, L., Remington, L., Saenz-Robles, M., Lowe, S., Jacks, T. and Van Dyke, T. (1994) p53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell*, **78**, 703-11.
- Takai, N., Miyazaki, T., Fujisawa, K., Nasu, K. and Miyakawa, I. (2001) Expression of receptor tyrosine kinase EphB4 and its ligand ephrin-B2 is associated with malignant potential in endometrial cancer. *Oncol Rep*, **8**, 567-73.
- Thut, C.J., Chen, J.L., Klemm, R. and Tjian, R. (1995) p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60. *Science*, **267**, 100-4.
- Venot, C., Maratrat, M., Dureau, C., Conseiller, E., Bracco, L. and Debussche, L. (1998) The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *Embo J*, **17**, 4668-79.

- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P., Ballew, R.M., Huson, D.H., Wortman, J.R., Zhang, Q., Kodira, C.D., Zheng, X.H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P.D., Zhang, J., Gabor Miklos, G.L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A.G., Nadeau, J., McKusick, V.A., Zinder, N., Levine, A.J., Roberts, R.J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A.E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T.J., Higgins, M.E., Ji, R.R., Ke, Z., Ketchum, K.A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G.V., Milshina, N., Moore, H.M., Naik, A.K., Narayan, V.A., Neelam, B., Nuskern, D., Rusch, D.B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science*, **291**, 1304-51.
- Vogelstein, B., Lane, D. and Levine, A.J. (2000) Surfing the p53 network. *Nature*, **408**, 307-310.
- von der Weth, A. and Deppert, W. (1993) Wild-type p53 is not a negative regulator of simian virus 40 DNA replication in infected monkey cells. *J Virol*, **67**, 886-93.
- Vousden, K.H. (2000) p53. Death star. *Cell*, **103**, 691-4.
- Walker, K.K. and Levine, A.J. (1996) Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 15335-40.
- Wang, X.W., Yeh, H., Schaeffer, L., Roy, R., Moncollin, V., Egly, J.M., Wang, Z., Freidberg, E.C., Evans, M.K., Taffe, B.G. and et al. (1995) p53 modulation of TFIID-associated nucleotide excision repair activity. *Nat Genet*, **10**, 188-95.
- White, E. and Prives, C. (1999) DNA damage enables p73. *Nature*, **399**, 734-5, 737.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M.D., Dotsch, V., Andrews, N.C., Caput, D. and McKeon, F. (1998) p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes

- multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*, **2**, 305-16.
- Yew, P.R. and Berk, A.J. (1992) Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature*, **357**, 82-5.
- Yew, P.R., Kao, C.C. and Berk, A.J. (1990) Dissection of functional domains in the adenovirus 2 early 1B 55K polypeptide by suppressor-linker insertional mutagenesis. *Virology*, **179**, 795-805.
- Yew, P.R., Liu, X. and Berk, A.J. (1994) Adenovirus E1B oncoprotein tethers a transcriptional repression domain to p53. *Genes Dev*, **8**, 190-202.
- You, L., Yang, C.T. and Jablons, D.M. (2000) ONYX-015 works synergistically with chemotherapy in lung cancer cell lines and primary cultures freshly made from lung cancer patients. *Cancer Res*, **60**, 1009-13.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P.M., Rago, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1999) Identification and classification of p53-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14517-22.
- Zhao, R., Gish, K., Murphy, M., Yin, Y., Notterman, D., Hoffman, W.H., Tom, E., Mack, D.H. and Levine, A.J. (2000) Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev*, **14**, 981-93.
- Zhu, J., Jiang, J., Zhou, W. and Chen, X. (1998) The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res*, **58**, 5061-5.
- Zhu, J., Jiang, J., Zhou, W., Zhu, K. and Chen, X. (1999) Differential regulation of cellular target genes by p53 devoid of the PXXP motifs with impaired apoptotic activity. *Oncogene*, **18**, 2149-55.

## Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die im Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Das Tumorsuppressorprotein p53 – Rolle bei der Induktion von Apoptose und bei der Replikation von Adenoviren“ im Institut für Virologie des Medizinischen Zentrums für Hygiene und Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Professor Dr. H.-D. Klenk mit Unterstützung durch PD Matthias Dobbstein ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde (oder wird) zu Teilen in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

J. Roth, Philipp Koch, A. Contente and M. Dobbstein (2000): Tumor-derived mutations of p53's DNA-binding domain result in a phenotype similar to deletion of the prolin-rich domain. *Oncogene*, **19**,1834-1842

Philipp Koch, J. Gatfield, Christian Löber, Claudia Lenz-Stöppler, Judith Roth and Matthias Dobbstein (2001): Efficient Replication of Adenovirus Despite the Overexpression of Active and Nondegradable p53. *Cancer Research*, **61**, 5941-5947

Judith Roth, Claudia Lenz-Stöppler, Ana Contente, Kristina Löhr, Philipp Koch, Bernard S. and Matthias Dobbstein (2003): Reactivation of mutant p53 by a one-hybrid adaptor protein. *Cancer Research*, **63**, 3904-8.

Philipp Koch, Jennifer Gatfield, Matthias Dobbstein: A role of p53 in adenovirus replikation? (Posterpräsentation), vorgestellt auf der „Jahrestagung für Virologie 2000“ in Wien und auf dem „SALK/EMBL Oncogenes and Growth Control 2000“ meeting in Heidelberg



Judith Roth, Philipp Koch, Ana Contente und Matthias Dobbelstein: Tumor-derived mutations of p53's DNA-binding domain results in a phenotype similar to deletion of the prolin rich domain (Posterpräsentation), vorgestellt auf dem „SALK/EMBL Oncogenes and Growth Control 2000“ meeting in Heidelberg

Marburg, den 28.06.2002

(Philipp Koch)