



Bundesministerium
für Umwelt, Naturschutz
und Reaktorsicherheit

SCHRIFTENREIHE REAKTORSICHERHEIT UND STRAHLENSCHUTZ

**DER ZUSAMMENHANG VON STRAHLENINDUZIERTEM
ZELLTOD (APOPTOSE) UND DEM PROTEKTIVEN
G2/M ARREST IN MENSCHLICHEN ZELLEN**

BMU - 2006-679



WIR STEuern UM AUF ERNEUERBARE ENERGIEN

BMU – 2006-679

**„Der Zusammenhang von strahleninduziertem
Zelltod (Apoptose) und dem protektiven G2/M Arrest
in menschlichen Zellen“**

Dr. Irene Dornreiter

**Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie an
der Universität Hamburg**

IMPRESSUM

Dieser Band enthält einen Abschlussbericht über ein vom Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) gefördertes Vorhaben. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das BMU übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter. Der Eigentümer behält sich alle Rechte an der weiteren Nutzung oder Vervielfältigung des Berichts vor.

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der des BMU übereinstimmen.

Herausgeber:

Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit

Referat RS I 2

Postfach 12 06 29

53048 Bonn

ISSN 1612-6386

Erscheinungsjahr: 2006

Kurzfassung

Zum ersten Mal konnte gezeigt werden, dass die Erzeugung von DNA Doppelstrangbrüchen (DSBs) am G1/S-Übergang, also unmittelbar vor Beginn der DNA Replikation, sowohl den intra-S als auch den G2-Kontrollpunkt aktivieren. Die sequenzielle Aktivierung dieser Kontrollpunkte ermöglicht einerseits über den nicht-homologen Reparaturmechanismus (NHEJ) die Reparatur der geschädigten DNA noch vor dem Beginn der DNA Replikation und andererseits nach Verdoppelung des Chromosomensatzes den akkurateren Reparaturweg über die homologe Rekombination (HDR). Dieser Befund erklärt auch, warum Zellen, deren DNA außerhalb der G2-Phase geschädigt wird, zusätzlich den G2-Kontrollpunkt aktivieren.

Während der ATM-vermittelte intra-S-Kontrollpunkt abhängig von der transkriptionellen Aktivität von $\Delta p53$, eine kürzlich entdeckte p53-Spleißvariante, ist, erfolgt die Aktivierung des G2-Kontrollpunkts über den p53/ $\Delta p53$ -unabhängigen ATM/ATR-vermittelten Signalweg. Die schadeninduzierte ATM/ATR-Phosphorylierungskaskade bewirkt die Inhibition der Cdk1-aktivierenden Phosphatase Cdc25C und folglich die Inhibition des Mitose-fördernden Faktors Cyclin B-Cdk1. Weitere Untersuchungen zeigten, dass bei letalen Schäden die Überführung des temporären G2-Kontrollpunkts in einen terminierenden G2-Arrest bzw. G2-„Exit“ abhängig vom p53 Status der geschädigten Zelle ist. In wtp53 Zellen beinhaltet der p53-abhängige G2-Arrest die Komplexierung des p53-induzierten Cdk-Inhibitors p21 mit der phosphorylierten Cyclin B-Cdk1, sowie die p53-abhängige Inhibition der Transaktivierung von *Cyclin B* und *Cdk1*. Weitere Untersuchungen zeigten, dass in schwer geschädigten wtp53 Zellen der Verlust von funktionellem wtp53 nicht nur zum Abbruch des induzierten G2-Arrestes sondern auch zur Entkopplung von S-Phase und Mitose, wie die Entstehung von polyploiden Zellen zeigt, führt. Anzunehmen ist, dass die koordinierte Aktivität von p53 und $\Delta p53$ einen substanziellen Einfluss auf die zelluläre Reaktion nach DNA Schädigung hat, und der p53/ $\Delta p53$ Status von großer Bedeutung für den Ausgang der zellulären Schadensreaktion ist.

Abstract

For the first time investigations revealed that induction of double strand breaks (DSBs) at the G1/S-transition, a cell cycle position prior to the onset of DNA replication, activates the intra-S- and G2-checkpoint. The sequential activation of the checkpoints first enables the non-homologous end joining repair mechanism (NHEJ), which allows quick repair of damaged DNA before DNA replication is initiated, and second the more accurate homologous recombination repair mechanism (HDR) after the genome is duplicated. HDR may play a

dominant role in the repair of DNA DSBs, however this role depends on duplicated chromosomes and accordingly on the cell cycle phase. Thus, the results explain why the G2-checkpoint is always activated when cells are damaged in G1, G1/S or early S. While the ATM-mediated intra-S-checkpoint depends on the transcriptionally active $\Delta p53$, a recently discovered p53-splice variant, activation of the ATM/ATR-mediated G2-checkpoint is independent of functional p53 and $\Delta p53$. The damage induced ATM/ATR-phosphorylation cascade leads to inhibition of the Cdk1-activating phosphatase Cdc25C and consequently to inhibition of the mitosis promoting factor cyclin B-Cdk1. Additional experiments demonstrated that lethal damage converts the temporary G2-checkpoint into a permanent G2-arrest, also termed G2-exit, which depends on the *p53* status of the damaged cell. In *wtp53* cells, the G2-exit is mediated by complex formation of phosphorylated cyclin B-Cdk1 with the p53-induced Cdk-inhibitor p21 and the p53-dependent inhibition of *cyclin B* and *Cdk1* transcription. Furthermore, in severely damaged *wtp53* cells, loss of functional *wtp53* results in abrogation of the G2-arrest and additionally promotes uncoupling of S-phase and mitosis, as demonstrated by the formation of polyploid cells. Hence, it appears that the coordinated activity of p53 and $\Delta p53$ is essential for the cellular reaction provoked by DNA damage and thus determines the faith of the damaged cell.

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Übergeordnete Zielsetzung	7
2.	Einzelzielsetzung	8
2.1	Induktion des G2-Kontrollpunkts (2Gy)	8
2.2	Induktion der Apoptose (10 Gy)	9
3.	Stand der Forschung	11
3.1	Signalwege in der zellulären Antwort auf DNA Schäden	11
3.2	Der Tumorsuppressor p53	13
3.3	Biologische Aktivität von p53	15
4.	Wissenschaftliche Methoden	28
4.1	Zellkultur	28
4.1.1	Kultivierung von adhärenent wachsenden Zellen	28
4.1.2	Kultivierung von Suspensionszellen	29
4.1.3	Auftauen und Einfrieren von Zellen	29
4.1.4	Herstellung induzierbarer TO-CV-1 Zelllinien	30
4.3	Zellzyklussynchronisation	31
4.3.1	Gegenstromzentrifugation (Elutriation)	31
4.3.2	Isoleucinentzug	31
4.4	Bestrahlung von Zellen	32
4.5	Herstellung von Zellsedimenten	32
4.5.1	Suspensionskultur	32
4.5.2	Adhärenente Zellen	32
4.6	Zellbiologische Methoden	32
4.6.1	Bestimmung der Viabilität	32
4.6.2	Zellzyklus-Analyse mittels Durchfluscytometrie (FACS)	33
4.6.3	TUNEL-Methode	34

4.6.4	Chromatin-Immunpräzipitation-PCR (ChIP-PCR)	35
4.6.4.1	Zellkernpräparation und Zelllyse	35
4.6.4.2	Präzipitation	35
4.6.4.3	Elution der Immunkomplexe und Freisetzung der DNA	37
4.6.4.4	Phenol/Chloroform Extraktion und DNA-Präzipitation	37
4.6.4.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen	37
4.6.4.6	Neutrale Agarosegelelektrophorese (Sambroock <i>et al.</i> , 1989)	38
4.6.5	Comet-Analyse	38
4.6.6	[³ H]-Thymidin Einbau	40
4.7	Proteinanalytische Methoden	40
4.7.1	Gesamtzellextrakt (Lysat)	40
4.7.2	Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	41
4.7.3	Immunpräzipitation von Proteinen aus Gesamtzellextrakten	41
4.7.4	„Target-bound“-Histon-Kinaseaktivitätstest	42
4.7.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli <i>et al.</i> , 1970)	43
4.7.6	Nachweis von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen	44
4.7.6.1	Coomassiefärbung	44
4.7.6.2	Nachweis von Proteinen durch Autoradiographie	44
4.7.6.3	Western Blot (WB) und immunologische Detektion	45
5.	Ergebnisse	49
5.1	Geringe Strahlenschäden beeinträchtigen das Zellwachstum nicht, während schwere Strahlenschäden Apoptose induzieren	50
5.2	Aktivierung des G2-Kontrollpunkts ist unabhängig von der Position der Zelle im Zellzyklus zum Zeitpunkt der Bestrahlung	53
5.3	Wtp53 Zellen, die am G1/S-Übergang geschädigt werden, attenuieren sowohl die S- als auch die G2-Phasen Progression unabhängig von der Schwere des Schadens	56
5.4	Wtp53 Zellen, die am G1/S-Übergang geschädigt werden, aktivieren unabhängig von der Schwere des Schadens sowohl den ATM- als auch den ATR-induzierten Kontrollpunkt	60

5.5	Wtp53 und $\Delta p53$ zeigen differenzielle Transaktivierungsaktivität, die in Abhängigkeit der Schwere des Schadens reguliert wird	66
5.6	Regulation der Cyclin-abhängigen Kinase Aktivität in Abhängigkeit des Schadensausmaß und des $p53$ Status der geschädigten Zellen	73
5.7	Der Ausgang der Schadensreaktion bei letaler Schädigung wird durch den $p53$ Status determiniert	81
5.8	In wtp53 Zellen sind Entkopplung der Reparatur- und Replikationsereignisse $\Delta p53$ -abhängig während die Eliminierungsprozesse abhängig von funktionellem $p53$ sind	88
6.	Diskussion	94
6.1	Selektivität der Schadensreaktion in Abhängigkeit der differenziellen Transaktivierungsaktivität von $p53$ und $\Delta p53$	95
6.2	Der protektive G2-Arrest	100
7.	Literatur	106

1. Übergeordnete Zielsetzung

Die Weitergabe der Erbinformation erfordert zur Erhaltung der genomischen Integrität Kontrollmechanismen, die einerseits die Reparatur geschädigter DNA und andererseits die Eliminierung (Apoptose) von irreparablen bzw. schwer geschädigten Zellen ermöglichen. DNA Schäden erfolgen durch eine Vielzahl genotoxischer Umwelteinflüsse (z.B. UV-, γ -Strahlung, Chemikalien) aber auch bakterielle und virale Infektionen verursachen Veränderungen im Erbgut, die unerkannt zur Destabilisierung der genomischen Integrität führen. Bruchstellen in der DNA sind potentiell rekombinogen und ermöglichen Chromosomensegment Translokationen, Deletionen oder Amplifikationen in Zellen, die gerade den Zellzyklus durchlaufen. Deshalb erlauben defekte Kontrollmechanismen sowie fehlerhafte Reparaturvorgänge die Manifestation von Mutationen, die wiederum ein unkontrolliertes Zellwachstum und darüber hinaus die Gefährdung der Existenz eines vielzelligen Organismus begünstigen.

Der Tumorsuppressor p53 ist als eines dieser Kontrollelemente identifiziert worden, nachdem gezeigt werden konnte, dass bei ca. der Hälfte aller Tumorerkrankungen des Menschen p53 durch Punktmutationen oder Deletionen genetisch verändert ist, wodurch seine Funktion beeinträchtigt bzw. inhibiert wird. Eine zentrale Rolle bei der DNA Schadensantwort übt der Tumorsuppressor p53 dadurch aus, in dem er nach Aktivierung als Reaktion auf Stress unter Anderem die Transaktivierung der Expression von Faktoren bewirkt, die einerseits eine Attenuation der Zellzyklusprogression und andererseits bei irreparablen DNA Schäden den kontrollierten Zelltod (Apoptose) induzieren. Aus diesen gegensätzlichen Reaktionen auf eintreffenden DNA Schaden ergeben sich Fragen nach den molekularen Mechanismen, die in Abhängigkeit der Schwere des DNA Schadens einerseits zur Induktion von Kontrollpunkten und andererseits zur Aktivierung von apoptotischen Vorgängen bzw. wie dies häufig bei Tumorzellen zu beobachten ist, zur Aktivierung des Überlebensmechanismus („clonogenic survival“) mittels Polyploidisierung führen. Gleichmaßen unverstanden bleibt auch die Frage, wie die Koordination der nicht-transkriptionellen mit den auf Transaktivierung beruhenden Aktivitäten von p53 erfolgt und inwieweit erstere überhaupt von Bedeutung für den Ausgang der p53-abhängigen Schadensreaktion sind.

Ziel dieses Projektes ist es, Aufschluss über die molekularen Mechanismen zu erhalten, welche die Entscheidung zwischen diesen konträren Schadensreaktionen bestimmen und somit für die Selektivität der p53-Antwort auf genotoxischen Stress verantwortlich sind.

2. Einzelzielsetzung

Durch Bestrahlung mit ionisierender γ -Strahlung sollten in etablierten humanen bzw. Primaten-Zelllinien, die sich in ihrem *p53* Status unterscheiden, zu definierten Zeiten im Zellzyklus DNA Schäden induziert werden, welche jeweils zu unterschiedlichen Schadensreaktionen der bestrahlten Zellen führen. Ein systematischer Vergleich der *p53*-abhängigen Signale in den verschiedenen bestrahlten Zellen sollte dabei die Identifizierung von Unterschieden ermöglichen, die verantwortlich für die Selektivität der Schadensantwort sein könnten. Insbesondere sollte geklärt werden, ob die Selektivität auf eine differenzielle Transaktivierung pro- bzw. anti-apoptotischer Zielgene von *p53* zurückzuführen ist. In weitergehenden Analysen sollte versucht werden, die molekularen Mechanismen aufzudecken, über die die *p53*-vermittelte Entscheidung zwischen Überleben und Eliminierung getroffen wird. Durch vergleichende Untersuchungen mit Zellen, in denen *p53* durch Mutation verändert ist, sollte darüber hinaus untersucht werden, inwieweit das Fehlen von funktionellem wildtyp *p53* (*wtp53*) bzw. die Expression von mutiertem *p53* (*mutp53*) einen substanziellen Einfluss auf den Ausgang der Schadensantwort hat.

2.1 Induktion des G2-Kontrollpunktes (2Gy)

Säugerzellen verfügen über Zellzyklus Kontrollpunkte an den Übergängen der G1- zur replikativen S-Phase sowie von G2 nach M (Mitose), die durch DNA Schäden aktiviert werden und durch Inhibierung der entsprechenden zellzyklustreibenden Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk) den Übergang in die nachfolgende Zellzyklusphase verhindern können. Die resultierende Attenuation der Zellzyklusprogression bezeichnet man je nach Position im Zellzyklus als G1- bzw. G2-Kontrollpunkt. Darüber hinaus ist ein intra-S-Phasen Kontrollpunkt bekannt, der, ebenfalls schadensaktiviert, die Progression durch die S-Phase unmittelbar vor dem Beginn der DNA Replikation verlangsamt.

Aus Bestrahlungsexperimenten, die mit *wtp53* und *mutp53* Zellen durchgeführt wurden ging hervor, dass nur *wtp53* Zellen alle Zellzyklus Kontrollpunkte aktivieren, dagegen können *mutp53* Zellen nach erfolgter DNA Schädigung lediglich die Progression durch die G2-Phase attenuieren. Allerdings gibt es bei bestimmten *mutp53* Zellen, die als „type II“ bezeichnet werden eine Ausnahme: diese Zellen können, im Unterschied zu „type I“ *mutp53* Zellen, zusätzlich nach der Aktivierung des intra-S-Phasen Kontrollpunkts die replikative S-Phase attenuieren. Hilfreich bei der Aufklärung dieser unterschiedlichen, durch schadeninduzierten zellulären Vorgänge ist zunächst die Identifizierung der Signale, die in bestrahlten *wtp53* sowie „type II“ *mutp53* Zellen zur Attenuation der Phasen Progression und

in bestrahlten wtp53 und mutp53 („type I“ und „type II“) Zellen zur Auslösung des G2-Kontrollpunkts führen. Zur Klärung dieser Vorgänge sollten synchronisierte wtp53 und mutp53 Zellen am G1/S-Übergang mittels γ -Strahlung (2 Gy) geschädigt und im Hinblick auf die Aktivierung des jeweiligen Kontrollpunkts durch Überprüfung der schadeninduzierten Reaktionskaskade untersucht werden. Darüber hinaus sollte festgestellt werden, welche Funktion p53 bei der Attenuation des intra-S-Phasen Kontrollpunkts und bei der Induktion des G2-Kontrollpunkts ausübt. Ein weiteres, für die S-Phasen Attenuation und den G2-Kontrollpunkt wichtiges Kriterium ist die Regulation der Aktivität der zellzyklustreibenden Zyklin-abhängigen Kinasen und Cdc25 Phosphatasen, die durch posttranslationale Modifikation, Proteolyse und Komplexierung mit p53-induzierbaren Genprodukten wie dem Cdk-Inhibitor p21 bzw. dem Adaptorprotein 14-3-3- σ erfolgen kann. Durch vergleichende Untersuchungen mit bestrahlten wtp53 und mutp53 Zellen sollten biochemische Analysen Aufschluss darüber geben, inwieweit der p53 Status Einfluss auf die Regulation dieser zellzyklusregulierenden Enzymaktivitäten nimmt.

2.2 Induktion der Apoptose (10 Gy)

Die Fähigkeit, Zellen durch ein kontrollierte Programm (Apoptose) eliminieren zu können, ist für mehrzellige Organismen in mehrerer Hinsicht von zentraler Bedeutung, so z.B. bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Gewebesubstanzen und -form sowie bei der Immunantwort. Nach schweren irreparablen DNA Schäden schließlich ist der gesteuerte Zelltod die wichtigste Möglichkeit, um die Fixierung von Gendefekten zu verhindern und die genomische Integrität des Gesamtorganismus zu erhalten. Wenngleich Apoptose auch unabhängig von p53 stattfinden kann, gilt die Zelltod-induzierte Aktivität des Tumorsuppressors, die über verschiedene Mechanismen erfolgen kann, als zentral für die Eliminierung potentiell tumorigener Zellen.

Die genauen Mechanismen, über die der Tumorsuppressor p53 nach genotoxischem Stress seine apoptotische Funktion ausführt, sind trotz intensivster Forschung nicht hinreichend verstanden. Bekannt jedoch ist, dass p53 sowohl über die Transaktivierung von pro-apoptotischen Zielgenen und eventuell der Transrepression anti-apoptotischer Gene wie auch über nicht-transkriptionelle Eigenschaften an Initiation und Ablauf des kontrollierten Zelltods beteiligt ist. Da es bislang nicht gelang, die Induktion eines bestimmten Zielgens bzw. eine einzige Aktivität von p53 alleine als zentrales Ereignis der p53-abhängigen Apoptose zu identifizieren, geht man davon aus, dass der von p53 vermittelte Zelltod Resultat der kumulativen Wirkung mehrerer verschiedener pro-apoptotischen Signale ist.

Wtp53 und mutp53 Zellen, die schwer geschädigt werden (10 Gy), gehen trotz Aktivierung der entsprechenden schadeninduzierten Kontrollpunkte in die Apoptose. Die Signale, die zum Abbruch der Zellzyklus Kontrollpunkte und zur Induktion der Apoptose führen, sind bislang nicht vollständig aufgeklärt. Deshalb sollte deren Identifizierung durch biochemische Analysen von wtp53 und mutp53 Zellen, die am G1/S-Übergang bestrahlt werden (10 Gy), erfolgen. In erster Linie sollte festgestellt werden, ob die schadeninduzierte Aktivierung der PIK Kinase ATM (*Ataxia telangiectasia mutiert*) nach erfolgter Bestrahlung am G1/S Übergang und der daraus resultierenden Phosphorylierungskaskade, die zur Aktivierung der intra-S (wtp53, „type II“ mutp53) und G2 („type I“ mutp53) Zellzyklus-Kontrollpunkte führt, auch eine Voraussetzung für die Induktion der apoptotischen Vorgänge ist. Insbesondere sollte geklärt werden, ob die transkriptionelle Aktivität von p53 bei der Induktion der Apoptose überhaupt eine Rolle spielt, da sowohl wtp53 als auch mutp53 Zellen nach schweren DNA Schäden mittels Apoptose zerstört werden.

3. Stand der Forschung

Im Zentrum dieses Projektes steht die Analyse, wie die Signale der p53-abhängigen Reaktionen auf genotoxischen Stress integriert werden und somit die Selektivität der p53-abhängigen Schadensantwort erreicht wird. Hauptziel dabei ist die Identifizierung möglicher Mechanismen, auf denen die Entscheidung zwischen p53-abhängigem G2-Zellzyklusarrest und DNA Reparatur auf der einen Seite bzw. p53-abhängiger Apoptose auf der anderen Seite beruht.

3.1 Signalwege in der zellulären Antwort auf DNA Schäden

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

Die Art des Schadens wird dadurch bestimmt, wie und durch welches Agens der Schaden induziert wurde. So führt Bestrahlung mit ultravioletem (UV) Licht zu Photodimeren und Modifikation von Basen (Thoma, 1999), während ionisierende Strahlung überwiegend Doppelstrangbrüche verursacht (Übersichtsartikel: Fei und El-Deiry, 2003; Iliakis *et al.*, 2003). Chemikalien führen zur Vernetzung der DNA mit Proteinen, Basenmodifikation oder -abspaltung und Strangbrüchen oder verändert durch Einlagerung die Topologie der DNA. Die Erkennung und Behebung der verschiedenen Schadensarten geschieht über zahlreiche miteinander vernetzte Signalwege, an denen eine Vielzahl spezifischer Komponenten beteiligt sind (Übersichtsartikel: Cline und Hanawalt, 2003). Dabei ermöglichen die schadenaktivierten Signalwege zwei gegensätzliche, zelluläre Reaktionen, die vom Ausmaß des Schadens und genetischem Hintergrund bestimmt werden:

1. Der Schaden ist reparabel und die genomische Integrität kann durch Reparaturprozesse wiederhergestellt werden. In diesem Fall wird durch Aktivierung der Zellzyklus Kontrollpunkte eine temporäre Verzögerung der Zellteilung induziert, um durch Reparatur eine Amplifikation des Schadens zu verhindern.
2. Das Ausmaß des Schadens ist so groß, dass eine vollständige Reparatur nicht möglich ist. Um die genomische Integrität des Gesamtorganismus sicherzustellen, wird die geschädigte Zelle in diesem Fall durch Apoptose eliminiert bzw. Durch einen terminalen Wachstumsarrest dauerhaft von weiteren Zellteilungen, durch die

Mutationen und chromosomale Aberrationen auf Tochterzellen weitergegeben werden könnten, ausgeschlossen.

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

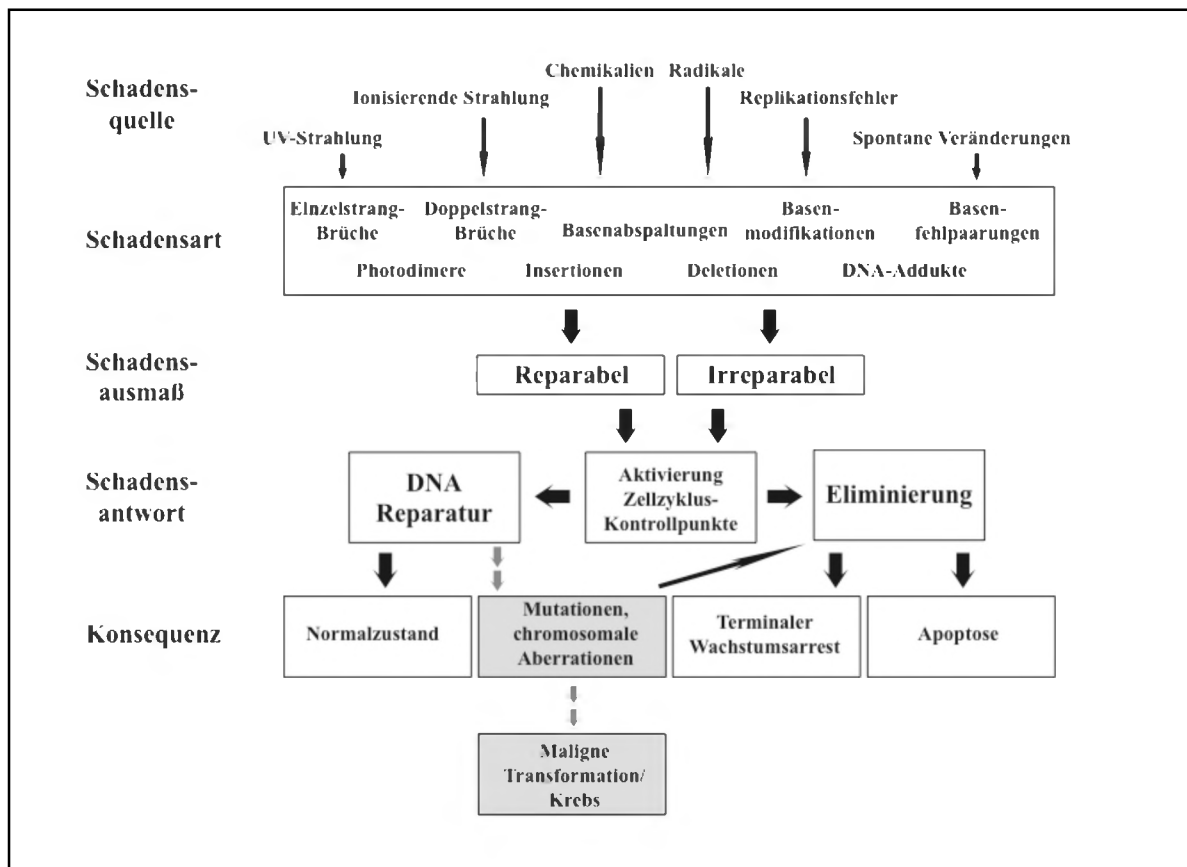


Abb. 3-1: Die zelluläre Antwort auf genotoxischen Stress. Verschiedene Schadensquellen induzieren verschieden Arten von DNA Schäden. Je nach Ausmaß des Schadens wird das Schicksal der geschädigten Zelle durch die entsprechende Schadensantwort bestimmt. Eine vorübergehende Aktivierung der Zellzyklus Kontrollpunkte verbunden mit DNA Reparatur beseitigt die Schäden, und die Zelle wird nach Beenden der Schadensantwort wieder in den Normalzustand versetzt. Bei irreparablen Schäden werden Eliminierungsprogramme, wie Apoptose oder terminaler Wachstumsarrest aktiviert. Werden irreparabel geschädigte Zellen nicht eliminiert oder erfolgt die Reparatur nur unvollständig oder fehlerhaft, manifestieren sich Mutationen und chromosomale Aberrationen im Genom, die zu einer malignen Transformation und Krebs führen können.

3.2 Der Tumorsuppressor p53

Wichtige Erkenntnisse in die Signalwege der zellulären Schadensantwort wurden anhand von Zellen mit einem Phänotyp gewonnen, der mit einem Krankheitsbild und Defekten in der Schadensantwort in Zusammenhang gebracht werden konnte. Neben relativ seltenen Krankheiten, die auf eine begrenzte Anzahl von veränderten Genen zurückgeführt werden konnten (Übersichtsartikel: Shiloh, 2003; Andrea und Grompe, 2003), stellen die Krebserkrankungen die zahlenmäßig größte und, in Hinblick auf die genetischen Veränderungen, die heterogenste Gruppe dar. Trotz Heterogenität von Krebszellen bezüglich ihrer genetischen Defekte gibt es einige Gene, die auffallend häufig in ihrer Funktionalität betroffen sind und somit von besonderem Interesse für die Krebsforschung sind. Zu ihnen gehört das Tumorsuppressorgen *p53*, das in 50-60% aller menschlichen Tumore Mutationen aufweist oder dessen Genprodukt durch virale Proteine inaktiviert ist (Hainaut und Hollstein, 2000) (**Abb. 3-2**).

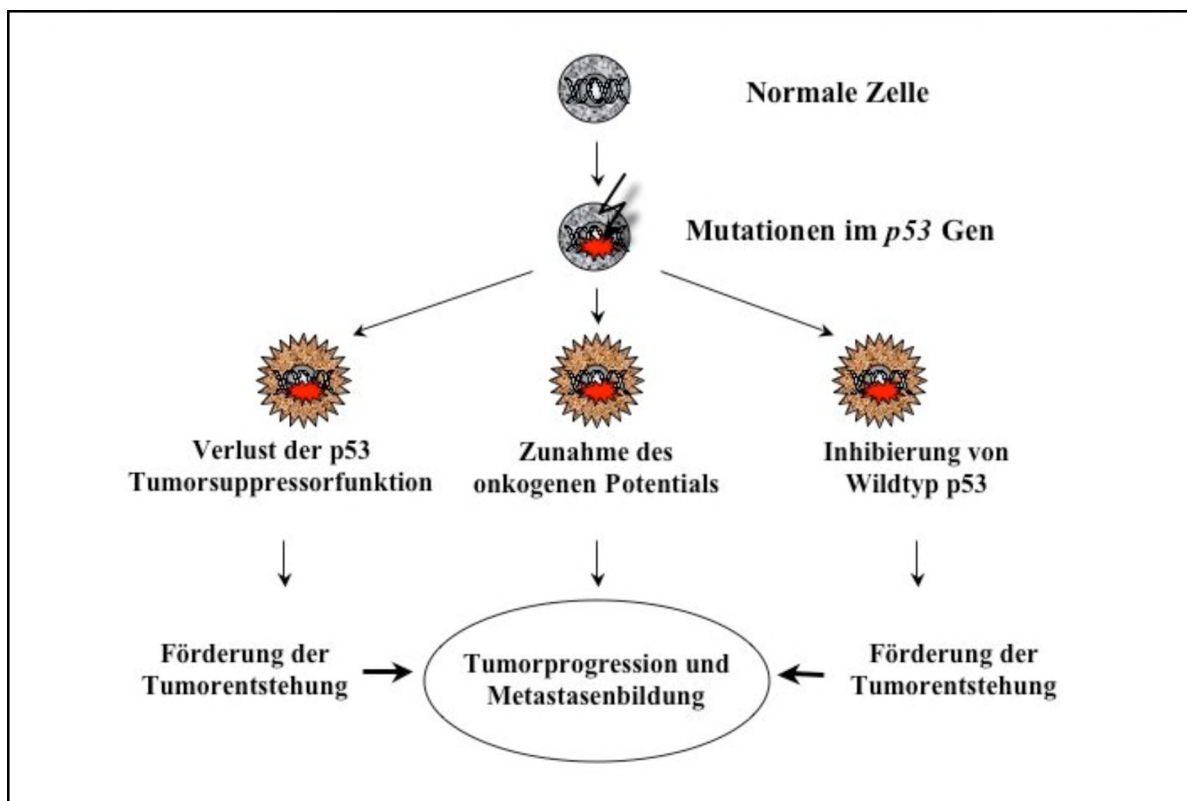


Abb. 3-2: Auswirkungen von Mutationen im p53 Gen.

Das humane *p53* Gen kodiert ein 393 Aminosäure großes Protein, das seine biologische Funktionalität als Tetramer entfaltet (Übersichtsartikel: Ko und Prives, 1996; Albrechtsen *et al.*, 1999; Vousden und Lu, 2002; Oren, 2003). Die meisten der *p53*-vermittelten zellulären Prozesse beruhen auf der transkriptionellen Aktivität des Tumorsuppressors, der die Expression einer großen Zahl von Zielgenen induziert. Andere Gene werden von *p53*

möglicherweise reprimiert (Zhao *et al.*, 2000). Die durch p53 transaktivierten Zielgene können ihrer Funktion entsprechend in Gruppen eingeteilt werden, zu denen zahlenmäßig und in ihrer Bedeutung innerhalb der p53-vermittelten Signalwege am besten charakterisiert folgende zwei Gruppen gehören: Gruppe I beinhaltet Gene, die Zellzyklusarreste einleiten, wie *p21*, *14-3-3 σ* oder *gadd45*, während Gruppe II Gene enthält, deren Produkte zur Induktion des programmierten Zelltods führen, wie *Bax*, *PIG-3*, *NOXA*, *PUMA* sowie *Fas/APO-1* und *KILLER/DR5*.

Neben der Aktivität eines Transkriptionsfaktors wurden Protein-Protein-Interaktionen von p53 mit einer Vielzahl von zellulären und viralen Proteinen beschrieben, über die der Tumorsuppressor transaktivierungsunabhängig zelluläre Prozesse beeinflusst (Übersichtsartikel: Ko und Prives, 1996; Janus *et al.*, 1999). Zu den Bindungspartnern von p53 zählen auch Faktoren der Replikation wie RPA und DNA Polymerase α -Primase (Dutta *et al.*, 1993; Li und Botchan, 1993; Abramova *et al.*, 1997; Kühn *et al.*, 1999; Wolter, 2001; Melle und Nasheuer, 2002; Chemnitz, 2003; Dornreiter unveröffentlichte Daten). Faktoren des Reparatursystems wie CSB, Ref-1 und DNA Polymerase β (Wang *et al.*, 1995; Gaiddon *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2001) sowie Apoptose regulierende Proteine wie Bcl-2 und Bcl-xl (Mihara *et al.*, 2003). Essenziell für die transaktivierende Wirkung von p53 ist die Rekrutierung von basalen Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel TFIID, TBP und TAF 31 (Xiao *et al.*, 1994; Horikoshi *et al.*, 1995; Lu und Levine, 1995), die ebenfalls durch Protein-Protein Interaktion vermittelt wird.

In einer normalen Zelle liegt p53 als Protein mit kurzer Halbwertszeit in sehr geringen Mengen als „latentes“ Protein vor, dessen Funktionalität weitgehend unklar ist. Durch Stress-Signale, wie Bestrahlung mit UV-Licht oder ionisierender Strahlung, zahlreiche chemotherapeutische Chemikalien, erhöhte Mengen von reaktiven Sauerstoffverbindungen, Infektion mit Viren, Aktivierung von Onkogenen, Hypoxie oder Depletion von Nukleotiden wird der Tumorsuppressor stabilisiert (Jin und Levine, 2001). Die resultierenden großen Mengen von p53 akkumulieren überwiegend im Zellkern (Fritsche *et al.*, 1993) und induzieren die Transaktivierung der p53-abhängigen Zielgene, deren Produkte folglich Zellzyklusarrest bzw. Apoptose einleiten. Voraussetzung für Stabilisierung und Aktivierung sowie eine Regulation der vielfältigen biologischen Aktivitäten des Tumorsuppressors scheint die Modifikation von p53 durch Phosphorylierung, Acetylierung, Ribosylierung, O-Glycosylierung oder Sumoylierung zu sein (Übersichtsartikel: Jayaraman und Prives, 1999; Appella und Anderson, 2000; Melchior und Hengst, 2002). Eine besondere Rolle in der Aktivierung haben dabei die durch DNA Schaden induzierten Phosphoinositid 3-Kinase-

verwandten Kinasen (PIKK) ATM (*Ataxia telangiectasia mutiert*) und ATR (ATM- und Rad3-verwandtes Protein) sowie die durch ATM bzw. ATR aktivierten „checkpoint“ Kinasen Chk2 und Chk1 (Bartek und Lukas, 2001). Diese durch Schaden aktivierten Kinasen phosphorylieren p53 am Serinrest 15 direkt und durch die „checkpoint“ Kinasen Chk2 bzw. Chk1 am Serinrest 20 indirekt und bewirken, dass einerseits für den proteolytischen Abbau von p53 notwendige Bindung der Ubiquitinligase Mdm2 verhindert wird und andererseits die transkriptionelle Eigenschaft des Tumorsuppressors aktiviert wird (Übersichtsartikel: Abraham, 2001; Shiloh, 2003).

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

3.3 Biologische Aktivitäten von p53

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

Einfluss auf Zellzyklus und Reparatur

Die Vermehrung eukaryontischer Zellen durch Teilung kann durch das Modell des vierphasigen Zellzyklus beschrieben werden (Übersichtsartikel: Iliakis, 1997; Lundberg und Weinberg, 1999). Darin werden die Phasen der replikativen DNA Synthese Aktivität (S-Phase) sowie der mitotischen Zellteilung (M-Phase) durch zwei „gap“-Phasen (G1- sowie G2-Phase)

voneinander getrennt, in denen ein Größenwachstum sowie die Vorbereitung der nachfolgenden Zellzyklusphase erfolgt. Ruhende, das heißt nicht proliferierende Zellen befinden sich im sogenannten G₀-Stadium.

Der Eintritt in den Zellzyklus wie auch die Progression durch die verschiedenen Phasen erfolgt durch ubiquitäre Zyklin-abhängige Protein Kinasen (Cdk), die sich aus einer katalytischen Serin/Threonin-Kinase Untereinheit und einer regulatorischen Untereinheit, dem Cyclin, zusammensetzen (Nigg, 1995). In höheren Eukaryonten bilden sich zellzyklusabhängig verschiedene Cdk-Komplexe, die sich in ihrer Aktivität und Substratspezifität voneinander unterscheiden (Horton und Templeton, 1997) (**Abb. 3-3**).

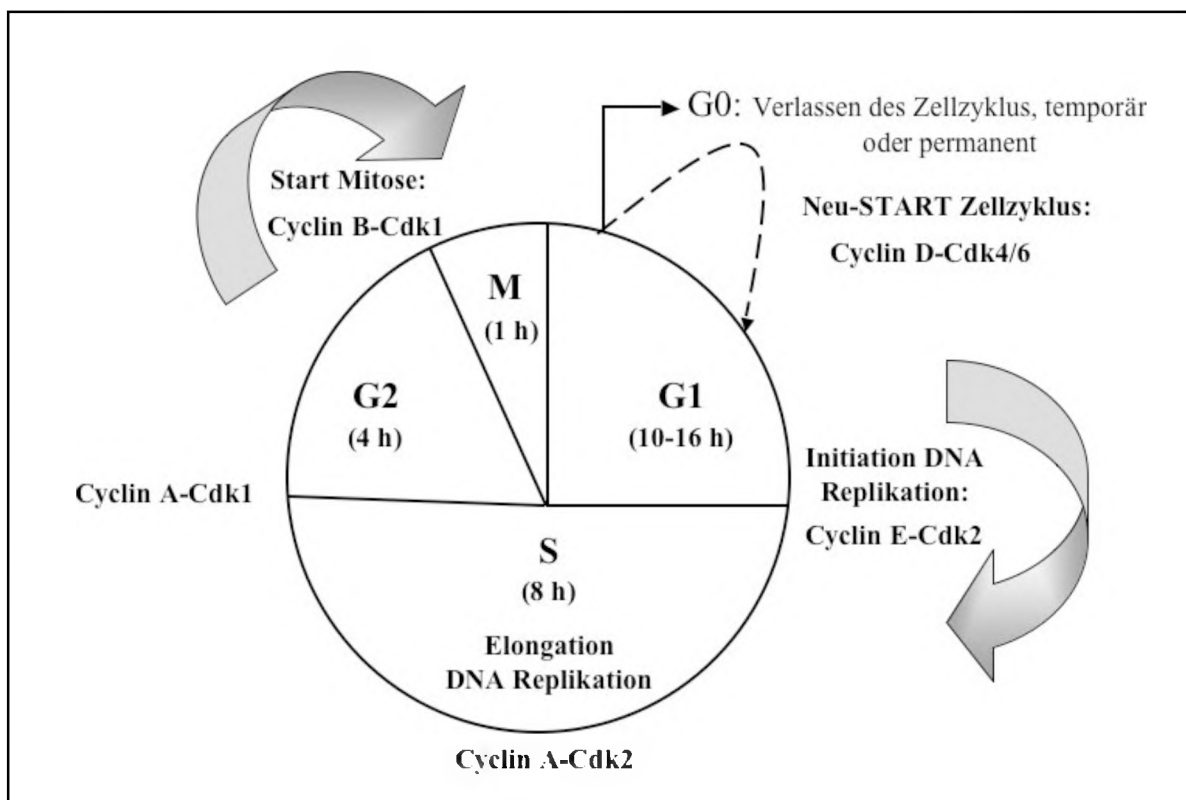


Abb. 3-3: Der Zellzyklus. Der Zellzyklus stellt ein Modell zur Beschreibung der Prozesse während des Zellwachstums dar. Er ist in vier Abschnitte, untergliedert: 1. in die G₁-Phase, in der die Vorbereitung für die DNA Replikation stattfinden; 2. in die S-Phase, in der die DNA dupliziert wird; 3. in die anschließende G₂-Phase, in der die Integrität des Genoms kontrolliert und die Zellteilung vorbereitet wird; 4. in die abschließende mitotische (M) Phase, in der das duplizierte Genom gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt wird. Vor Beginn der nächsten G₁-Phase können die Zellen den Zellzyklus verlassen und in die sog. Ruhephase G₀ eintreten, in der sie durch Differenzierung aus dem Zellzyklus entfernt werden. Die Regulation der Zellzyklus Progression erfolgt durch die Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdks). Verschiedene Cycline assoziieren zu definierten Zeiten im Zellzyklus mit verschiedenen Kinaseuntereinheiten, wodurch ein Netzwerk aus Kinaseaktivitäten entsteht, das durch kontrollierte Phosphorylierung von Zielproteinen den Verlauf des Zellzyklus reguliert.

Neben der kontrollierten Assoziation von Cyclinen und Cdks wird die Aktivität der zellzyklusregulierenden Kinasen außerdem durch aktivierende und inhibierende

Phosphorylierungen sowie durch Interaktion mit Cdk-Inhibitoren (CKIs) wie p16, p21 oder p27 reguliert (Nigg, 1995; Obaya und Sedivy, 2002). Insgesamt ergibt sich so ein hocheffektives Regulationssystem zur Steuerung des Zellwachstums.

Die Erkennung von DNA Schäden gehört zu den Phänomenen, die eine Attenuation des Zellzyklus in Hinblick auf die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität erforderlich macht. Eukaryontische Zellen aktivieren als Antwort auf einen DNA Schaden eine Vielzahl von Mechanismen, die die Zellzyklusprogression unterbrechen, um so mehr Zeit für die Reparatur des geschädigten Genoms zu gewinnen. Diese Mechanismen sind Kontrollpunkte, die während drei verschiedenen Zellzyklusphasen aktiviert werden können. Einer dieser drei Kontrollpunkte befindet sich in der G1-Phase (G1-Kontrollpunkt oder START), ein weiterer arbeitet am G1/S-Übergang (intra-S-Phase Kontrollpunkt) und ein dritter liegt in der G2-Phase (G2-Kontrollpunkt). Nach dem Durchlaufen eines Kontrollpunktes kann erst wieder am nächsten Kontrollpunkt die Progression der Zellen durch den Zellzyklus angehalten bzw. attenuiert werden (Zhou und Elledge, 2000). Der Tumorsuppressor p53 ist an der Induktion von Zellzyklus-Kontrollpunkten in G1 und G2 über verschiedene, durch ihn transaktivierte und reprimierte Zielgene sowie über Protein-Protein Interaktionen beteiligt. Am klarsten erwiesen hinsichtlich einer physiologischen Relevanz bei der Auslösung eines p53-vermittelten Wachstumsarrests ist der Beitrag der p53-abhängigen Zielgene *p21*, *14-3-3 σ* und *Gadd45* (El-Deiry et al., 1993; Hermeking et al., 1997; Kastan et al., 1992). Durch genotoxischen Stress aktiviert, induziert p53 unter anderem die Expression dieser drei Faktoren, die auf unterschiedliche Weise in die Zellzyklus-Regulation eingreifen.

Nach Schädigung der DNA wird während der frühen G1-Phase die Progression durch den Zellzyklus auf zweierlei Art und Weise unterbrochen. In einer sehr schnellen und p53-unabhängigen Schadensantwort erfolgt die Freisetzung des Zyklin-abhängigen Kinase-Inhibitors p21 aus den Zyklin D-Cdk4 Komplexen. Parallel dazu findet in einem langsameren Schritt die Stabilisierung und Aktivierung von p53 statt, der letztendlich zur p53-abhängigen Transaktivierung von p21 führt. Bei diesem Schritt wird p53 zuerst von verschiedenen schadensspezifischen Kinasen phosphoryliert zu denen die PIK Kinasen ATM und ATR sowie die durch ATR/ATM aktivierten „checkpoint“ Kinasen Chk1 und Chk2 zählen. Diese schadeninduzierte Phosphorylierung von p53 an den Serinresten 15 und 20 bewirkt, dass einerseits die für den proteolytischen Abbau von p53 notwendige Bindung der Ubiquitinligase Mdm2 verhindert wird (Bartek und Lukas, 2001; Abraham, 2001) und andererseits die transkriptionelle Eigenschaft des Tumorsuppressors aktiviert wird. Die aus den Zyklin D-Cdk4-Komplexen sehr schnell freigesetzten und die in einem langsameren p53-abhängigen

Schritt erzeugt p21 Moleküle binden und inhibieren die für die Progression durch die G1-Phase essenzielle Zyklin E-Cdk2 Aktivität. Konsequenterweise wird der Übergang von der G1- in die replikative S-Phase inhibiert und somit die Duplikation von geschädigter DNA unterbunden (Bartek und Lukas, 2001) (**Abb. 3-4**).

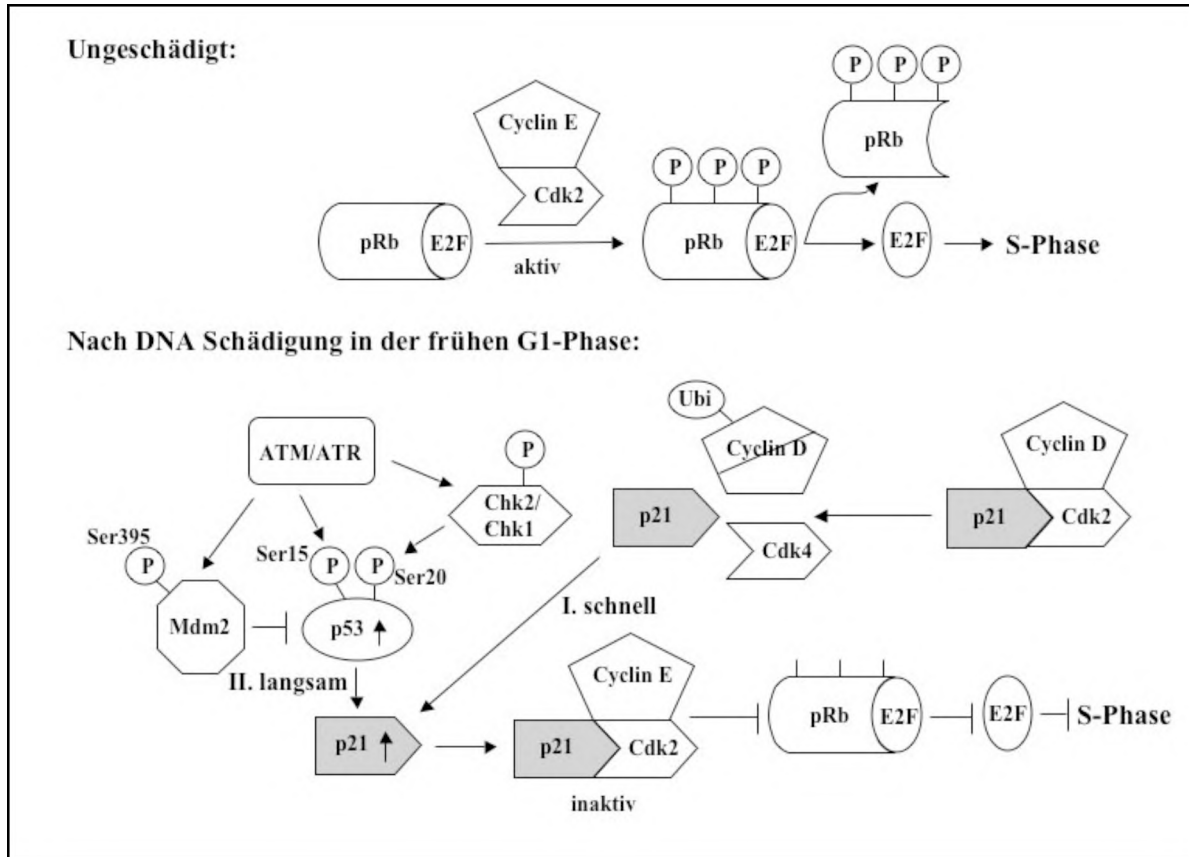


Abb. 3-4: Aktivierung des G1-Kontrollpunkts. Während der G1-Phase ist Rb hypophosphoryliert und interagiert mit Proteinen der Transkriptionsfaktorfamilie E2F. Rb wird am G1/S Übergang durch Cyclin E-Cdk2 phosphoryliert, wodurch die Bindungsaktivität zu E2F aufgehoben wird. Freies E2F transaktiviert S-Phasen-spezifische Gene. Nach Schädigung der DNA in der frühen G1-Phase wird der Cdk-Inhibitor p21 sehr schnell aus Cyclin D-Cdk4 Komplexen freigesetzt. Zusätzlich erfolgt durch ATM/ATR- und Chk1/Chk2-abhängige Phosphorylierung von p53 und Mdm2 die Stabilisierung des Transaktivators p53 und ermöglicht die p53-abhängige Induktion von p21. Der Cdk-Inhibitor inhibiert durch direkte Interaktion die Aktivität von Cyclin E-Cdk2, wodurch die Phosphorylierung von Rb und folglich die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F unterbunden wird. Die Progression des Zellzyklus wird gestoppt und die Zellen arretieren in der G1-Phase.

Während der replikativen S-Phase ist das Gefährdungspotential durch eintreffenden DNA Schaden besonders groß. Zum einen liegt die DNA in Teilbereichen aufgewunden und sogar einzelsträngig vor und zum anderen werden durch Replikationsvorgänge *per se* schon DNA Schäden induziert. Das Eintreffen zusätzlicher exogener DNA Schäden hat während der S-Phase somit ein beträchtlich höheres Gefährdungspotential als während anderer Phasen im

Zellzyklus. Dies gilt umso mehr, als exogen hervorgerufene Mutationen oder andere Schäden durch eine aktive Replikationsmaschinerie amplifiziert und fixiert werden können. Es scheint daher unmittelbar plausibel, dass Zellen über Schutzmechanismen verfügen, die bei exogen zugeführten DNA Schäden die Replikationsaktivität vorübergehend inhibieren. Bis vor kurzem wurde noch angenommen, dass Zellen, die sich in der replikativen Phase befinden, nicht arretieren bzw. attenuieren können. Jedoch ist in der Tat eine solche, als S-Phasen bzw. intra-S-Phasen Kontrollpunkt bezeichnete Schadensantwort als Folge von UV- oder ionisierender Strahlung beobachtet worden. Die physiologische Relevanz dieser Schadensantwort, die eine temporäre Inhibition der DNA Synthese Aktivität zur Folge hat, ergab sich aus dem Befund, dass bei Patienten mit der genetisch bedingten Krankheit *Ataxia telangiectasia mutiert* auch bei sehr hoher DNA Schädigung kein Replikationsarrest auslösbar ist und folglich bei diesen Patienten auf Grund einer erhöhten Mutationsrate die Tumorentstehung signifikant erhöht ist. In Zellen, die zu Beginn der frühen replikativen S-Phase geschädigt werden, erfolgt innerhalb kürzester Zeit die Aktivierung des p53-unabhängigen ATM/ATR-vermittelten intra-S-Phasen Kontrollpunkts. Dieser Kontrollpunkt beinhaltet bei ionisierender Bestrahlung die sequentielle Aktivierung der Kinasen ATM und Chk2 bzw. bei UV-Bestrahlung die sequentielle Aktivierung der Kinasen ATR und Chk1 (Zhou *et al.*, 2002; Bartek und Lukas, 2001). Die mittels ATR bzw. ATM aktivierten Chk1/Chk2-Kinasen phosphorylieren die G1/S-Phase spezifische Phosphatase Cdc25A und veranlassen somit die schnelle Degradation dieser Zyklin E-Cdk2-aktivierenden Phosphatase. Inaktives Zyklin E-Cdk2 unterbricht einerseits die G1/S-Phasen Progression und andererseits unterbindet es auch die Rekrutierung des DNA Polymerase α -Primase Ladungsfaktors Cdc45 an den lizenzierten Replikationsursprung und folglich die Initiation der bidirektionalen DNA Replikation (Bartek und Lukas, 2001) (**Abb. 3-5**). Die schadeninduzierte Aktivierung des ATM/ATR-vermittelten intra-S-Phasen Kontrollpunkts führt demnach nicht nur zur Attenuation der S-Phasen Progression und Inhibition der DNA Replikation sondern ermöglicht auch die Reparatur des geschädigten Genoms vor dem Eintritt der Zelle in die nächste Zellzyklusphase.

Zellen, die nach Beendigung der DNA Replikation geschädigt werden, aktivieren den G2-Kontrollpunkt, der ebenfalls durch die ATM/Chk2- bzw. ATR/Chk1-Kinasen ausgelöst wird. ATR-aktiviertes Chk1 und ATM-aktiviertes Chk2 phosphorylieren die Protein-Phosphatase Cdc25C an Serin 216, wodurch die enzymatische Aktivität von Cdc25C sehr schnell inhibiert wird (Abraham, 2001). In einer verhältnismäßig langsamen, aber nachhaltigen Reaktion bindet das p53-transaktivierte Protein 14-3-3 σ an phosphoryliertes

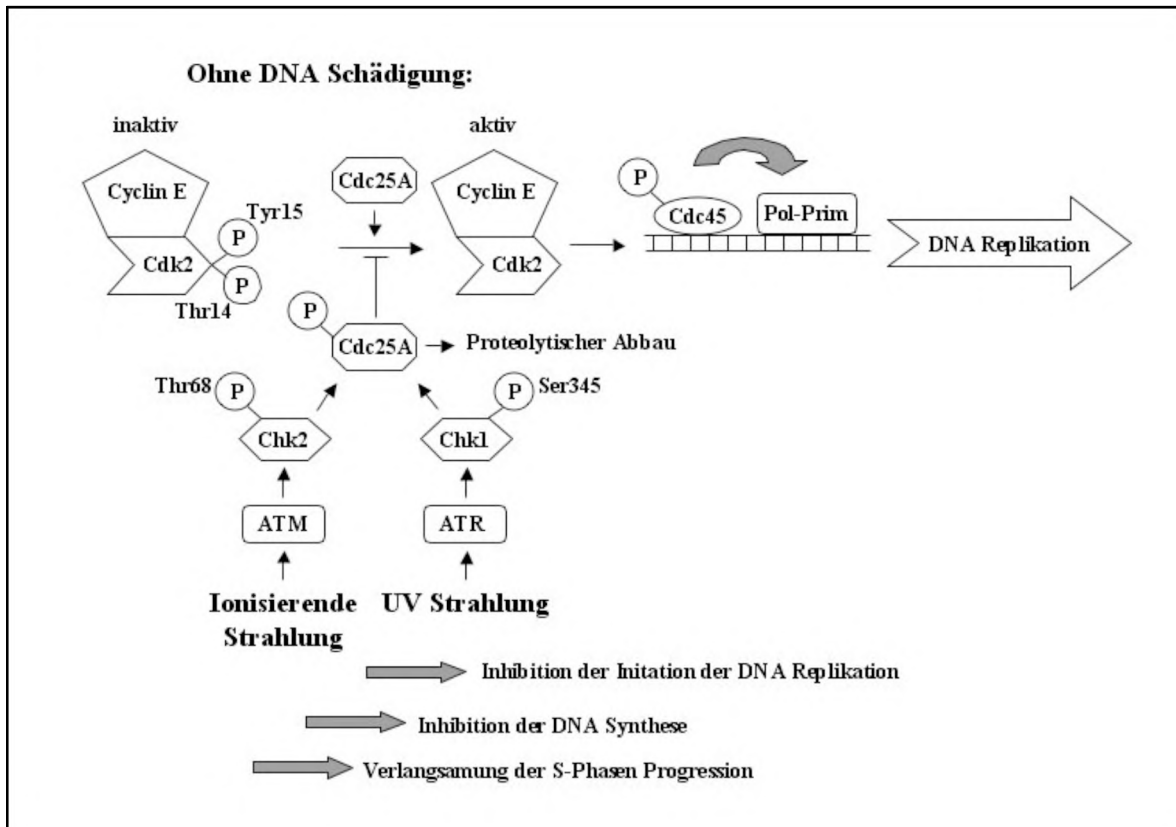


Abb. 3-5: Der intra-S-Phasen Kontrollpunkt. Am Übergang von der G1- in die S-Phase wird der Cyclin E-Cdk2 Komplex aus seiner phosphorylierten, inaktiven Form durch Cdc25A-katalysierte Dephosphorylierung der Kinaseuntereinheit in die aktive Form konvertiert. Nach Schädigung der DNA am G1/S Übergang führt die ATM/ATR-vermittelte Aktivierung von Chk2/Chk1 zur Phosphorylierung der Phosphatase Cdc25A, die anschließend durch die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse abgebaut wird. Konsequenterweise bleibt Cyclin E-Cdk2 im inaktiven Zustand, wodurch die Rekrutierung des Polymerase α -Primase Ladungsfaktors Cdc45 in den Replikationsursprung unterbunden und die Initiation der DNA Replikation inhibiert wird.

Cdc25C und bewirkt die Sequestrierung der Phosphatase im Zytoplasma (Abraham, 2001; Peng *et al.*, 1997; Hermeking *et al.*, 1997). Phosphorylierung und zytoplasmatische Sequestrierung von Cdc25C verschiebt das enzymatische Gleichgewicht zwischen der Wee-Kinase-katalysierten Phosphorylierung und der Cdc25C-katalysierten Dephosphorylierung der kernständigen Cdk1 in Richtung inhibitorische Phosphorylierung. Konsequenterweise bleibt die G2-Phase spezifische Cdk1-Untereinheit des MPF („mitosis promoting factor“) länger inhibitorisch phosphoryliert und der Eintritt der Zelle in die mitotische Phase verzögert sich (**Abb. 3-6**). Der Übertritt in die Mitose wird auch von *Gadd45*, einem weiteren von p53 transaktivierten Zielgen, unterbunden (Wang *et al.*, 1999). Seine Wirkung übt das *Gadd45* Protein vermutlich durch direkte Wechselwirkung mit Cdk1 aus (Zhan *et al.*, 1999). Durch diese Interaktion bewirkt *Gadd45* eine Dissoziation des Cyclin B1-Cdk1 Komplex und

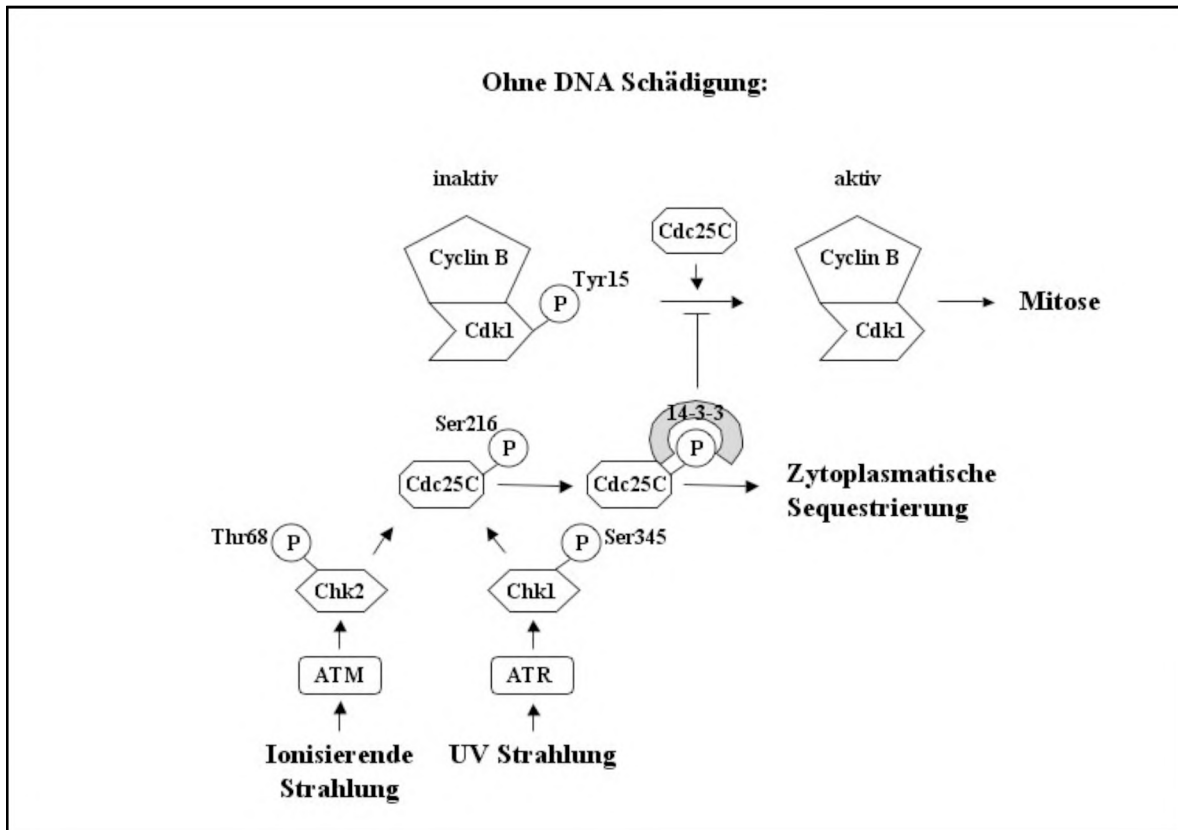


Abb. 3-6: Der G2/M Kontrollpunkt. In der G2-Phase erfolgt die Aktivierung der M-Phasen Kinase Cyclin B-Cdk1 durch Cdc25C-katalysierte Dephosphorylierung der Kinaseuntereinheit an Tyrosin-15. Nach erfolgter DNA Schädigung in der G1-, S- oder frühen G2-Phase führt die ATM/ATR-vermittelten Phosphorylierungskaskade zur Phosphorylierung von Cdc25C. Die Phosphorylierung bewirkt zum Einem die Inhibition der Phosphatase Aktivität und zum anderen bindet 14.3.3 σ an phosphoryliertes Cdc25C. Der daraus resultierende Proteinkomplex wird im Zytoplasma sequestriert und der kernständige Cyclin B-Cdk1 Komplex bleibt inhibitorisch phosphoryliert, wodurch die Progression in die Mitose unterbunden wird.

inaktiviert auf diese Weise die den G2/M Übergang katalysierende Kinase (Zhan *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999). Neben der Transaktivierung von Genen, deren Produkte dann die Zellzyklus Progression inhibieren, gibt es zunehmende Hinweise, dass p53 auch durch Repression proliferationsstimulierende Faktoren zu einem Wachstumsarrest beiträgt. (Taylor und Stark, 2001). Wenngleich die Wirkungsmechanismen der p53 induzierten Repression weitgehend unklar sind, zeigen verschiedene Studien eine Repression der Promotoren von *cdk1* und *Cyclin B1*, die nur in Zellen mit funktionellem wildtyp p53 (wtp53) zu beobachten ist (Azzam *et al.*, 1997; Taylor *et al.*, 1999; Passalaris *et al.*, 1999; Taylor und Stark, 2001). Unabhängig davon könnte p53 durch Repression von *Topoisomerase II* zu einem p53-vermittelten G2-Arrest beitragen (Sandri *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1997; Clifford *et al.*, 2003). Zusätzlich zu Transaktivierung oder Transrepression wurde auch eine direkte Protein-Protein Interaktion von p53 als möglicher Mechanismus für einen p53 vermittelten Wachstumsarrest

beschrieben. So inhibiert p53 durch Bindung an die Cdk-aktivierende Kinase CAK deren Aktivität, die wiederum für die Aktivierung von Cyclin A-Cdk2/Cdk1 und Cyclin B-Cdk1 erforderlich ist (Schneider *et al.*, 1998; Taylor und Stark, 2001).

Neben der unmittelbaren Attenuation der Zellzyklus Progression ist die Funktion der schadeninduzierten Kontrollpunkte eng mit DNA Reparatur gekoppelt. Gemäß gängigen Modellvorstellungen wird die Zeit eines durch genotoxischen Stress verursachten temporären Zellzyklusarrests dafür verwendet, vorhandene DNA Schäden durch Reparatur zu beseitigen. Abgesehen von den bereits beschriebenen Funktionen in der Induktion des Arrests an sich, ist p53 darüber hinaus auch direkt an DNA Reparaturvorgängen beteiligt (Smith *et al.*, 1995; Therrien *et al.*, 1999; Rubbi und Milner, 2003). Die Mechanismen, über die p53 in DNA Reparatur involviert ist, sind nur unvollständig aufgeklärt. Es gibt jedoch gute Hinweise, dass der Tumorsuppressor Reparatur einerseits durch die Transaktivierung von Reparaturfaktoren wie z.B. *DDB2* oder *p53R2* (Hwang *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2000; Nakano *et al.*, 2000) fördert, andererseits auch über transkriptionsunabhängige Mechanismen wie etwa die Interaktion mit weiteren Reparaturfaktoren Einfluss auf die Erkennung und Beseitigung von DNA Schäden ausübt (Übersichtsartikel: Janus *et al.*, 1999; McKay *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2001; Smith und Seo, 2002).

Unabhängig von einem temporären Zellzyklusarrest wurde in einigen Zelllinien nach genotoxischem Stress ein dauerhafter, so genannter irreversibler Wachstumsarrest beobachtet, der auch als „Exit“ bezeichnet wird, beobachtet. Terminal arretierte Zellen weisen eine charakteristische seneszenzähnliche Morphologie auf; sie proliferieren nicht, sterben jedoch auch nicht. Die Induktion eines solchen terminalen Arrests scheint nur unter sehr spezifischen Bedingungen in Abhängigkeit von Zelltyp und Art des schädigenden Agens stattzufinden. So reagieren Fibroblasten auf hohe Dosen ionisierender Strahlung mit einem terminalen Wachstumsarrest, während Zellen des hämatopoetischen Systems nach gleicher Bestrahlung durch Apoptose eliminiert werden (Gudkov und Komarova, 2003). Verschiedene, aus soliden Tumoren gewonnene Zelllinien zeigten einen terminalen Wachstumsarrest nach Behandlung mit chemotherapeutischen Medikamenten (Chang *et al.*, 1999a), was ein wichtiger Hinweis dafür war, dass der terminale Arrest eine wichtige und klinisch relevante Reaktion von Tumoren auf cytotoxische Agenzien darstellt (Übersichtsartikel: Roninson, 2003). Die Mechanismen, die für die Induktion des so genannten „Exits“ aus dem Zellzyklus verantwortlich sind, sind nicht vollständig bekannt. Unklar ist des Weiteren auch, welche Signale einen temporären Arrest in einen permanenten, irreversiblen Wachstumsstopp überführen (Gudkov und Komarova, 2003). Verschiedene Studien zeigen jedoch, dass p53

sowie p21 wichtige Faktoren für die Induktion eines terminalen Wachstumsarrests sind (Chang *et al.*, 1999b; Chang *et al.*, 2001; Gudkov und Komarova, 2003).

Einfluss auf die Apoptose

Die Fähigkeit, Zellen durch ein kontrolliertes Programm eliminieren zu können, ist für mehrzellige Organismen in mehrerer Hinsicht von zentraler Bedeutung, so z.B. bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Gewebesubstanz und -form sowie bei der Immunantwort. Nach schweren irreparablen DNA Schäden schließlich ist der gesteuerte Zelltod die wichtigste Möglichkeit, um die Fixierung von Gendefekten zu verhindern (Übersichtsartikel: Orrenius *et al.*, 2003). Wenngleich Apoptose auch unabhängig von p53 stattfinden kann, gilt die Zelltod-induzierende Aktivität des Tumorsuppressors, die über verschiedene Mechanismen erfolgen kann (siehe unten), als zentral für die Eliminierung potentiell tumorigener Zellen (Vousden, 2000; Moll und Zaika, 2001; Fridman und Lowe, 2003).

Der Prozess des kontrollierten Zelltods ist durch eine klar gegliederte Reihenfolge morphologisch erkennbarer Schritte gekennzeichnet (Kerr *et al.*, 1972). Zunächst kondensieren Zellkern und Zytoplasma, die Zelle verliert an Volumen, und die Zellmembran zeigt Ausstülpungen. Im weiteren Verlauf werden Zellkernmembran und DNA fragmentiert, und die Zelle zerbricht in apoptotische Vesikel. Dies sind Membran-umhüllte Fragmente, die im physiologischen Kontext schnell von umliegenden Zellen oder Makrophagen erkannt und durch Phagozytose beseitigt werden. Wenngleich es auch andere Mechanismen der Apoptose gibt (Übersichtsartikel: Orrenius *et al.*, 2003), erfolgt der Vollzug des kontrollierten Zelltods im Wesentlichen durch die Aktivität spezifischer Proteasen, den sogenannten Caspasen. Diese bewirken die Zerstörung der Zelle durch Spaltung einer Vielzahl von Proteinen (Übersichtsartikel: Thornberry und Lazebnik, 1998; Earnshaw *et al.*, 1999). Unter den Caspase Substraten finden sich für die Zellstruktur essenzielle Faktoren, wie Cytoskelett Proteine und Komponenten der Kern-Lamina, aber auch Proteine, die in DNA Reparatur, Replikation und in der Schadensantwort beteiligt sind (Thornberry und Lazebnik, 1995; Earnshaw *et al.*, 1999; Pelizon *et al.*, 2002). Darüber hinaus aktivieren Caspasen auch Apoptose-spezifische Endonukleasen, die die DNA fragmentieren. Das bekannteste Beispiel hierfür ist die Caspase-aktivierte Desoxyribonuklease CAD, die durch proteolytischen Abbau ihres assoziierten Inhibitors ICAD aktiviert wird (Liu *et al.*, 1997; Enari *et al.*, 1998).

Aktivierung und Ablauf des apoptotischen Programms unterliegen entsprechend ihrem „finalen“ Ausgang einer strikten Kontrolle. Ein Schlüsselereignis dabei ist die Aktivierung der

Caspasen. Caspasen werden als Proenzyme synthetisiert und durch proteolytische Spaltung aktiviert (Thornberry und Lazebnik, 1998; Earnshaw *et al.*, 1999). Von dem ca. einem Dutzend bislang bekannter Caspasen wurden Caspase 3, 6 und 7 als sogenannte Effektor-Caspasen charakterisiert, d.h. sie sind im Wesentlichen für die oben geschilderten morphologischen Veränderungen während der Apoptose verantwortlich. Die Funktion der Initiator-Caspasen 2, 8, 9 und 10 besteht hingegen in der proteolytischen Aktivierung der Effektor-Caspasen (Thornberry und Lazebnik, 1998; Degterev *et al.*, 2003). Soweit bisher bekannt, kann die Aktivierung der Initiator-Caspasen über mindestens zwei verschiedene, voneinander unabhängige Signalwege erfolgen (Übersichtsartikel: Orrenius *et al.*, 2003), die beide vom Tumorsuppressor p53 beeinflusst werden können. Beide Signalwege sind durch sich gegenseitig aktivierende Faktoren verbunden und konvergieren auf der Ebene der Effektor-Caspasen.

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

Entscheidend für die Eliminierung von Zellen nach DNA Schädigung sind die Signalwege der sogenannten intrinsischen Apoptose. Dabei erfolgt die Initialisierung des Eliminierungsprogramms intrazellulär durch die Freisetzung mitochondrialer Moleküle in das Zytoplasma. Dementsprechend wird diese Signalkaskade auch als mitochondrial-vermittelte Apoptose bezeichnet (Übersichtsartikel: Wang, 2001) (**Abb. 3-7**). Gelangt Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytoplasma, bildet es dort zusammen mit Apaf-1 und Procaspase 9 das sogenannte Apoptosom, welches Caspase 9 aktiviert (Li *et al.*, 1997). Aktivierte Caspase 9 wiederum spaltet direkt die Effektor-Procaspase 3 und überführt sie in die aktive Form (Li *et al.*, 1997).

Die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien und damit die Initialisierung des intrinsischen Apoptose-Signalwegs werden kontrolliert durch die Durchlässigkeit der äußeren Mitochondrienmembran (Kroemer, 2003). Zentrale Regulatoren dabei sind die Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie (Übersichtsartikel: Cory und Adams, 2002;

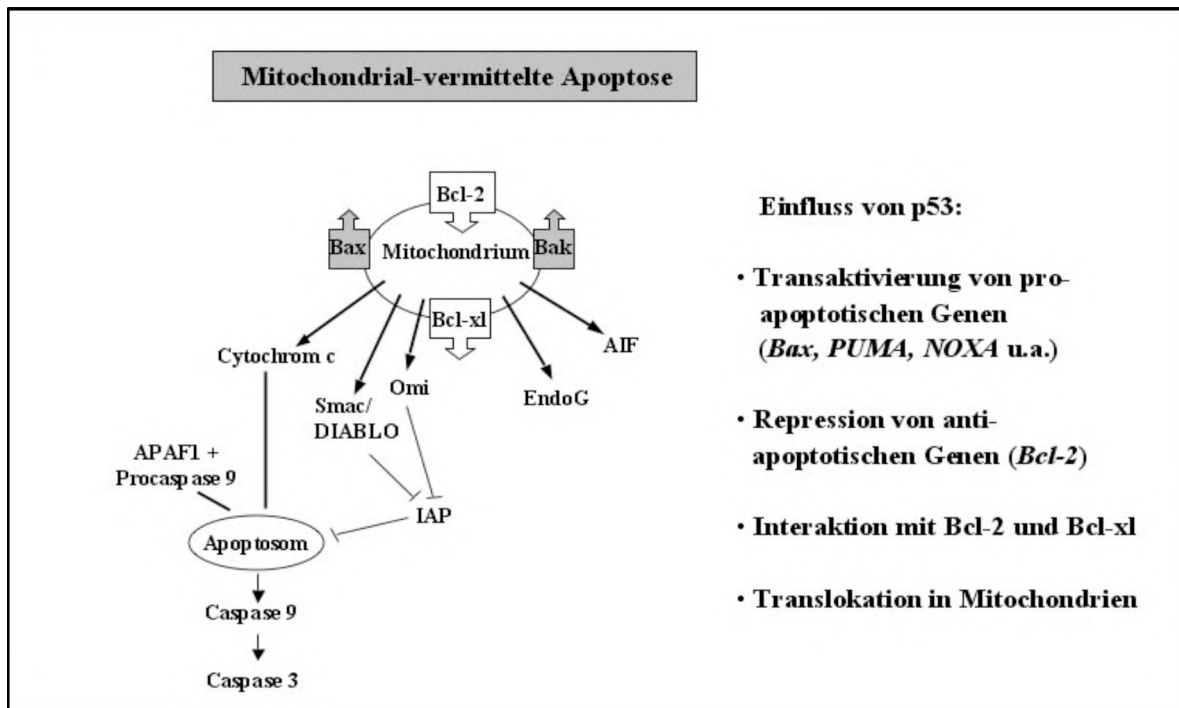


Abb. 3-7: Mitochondrial-vermittelte Apoptose. Die Initialisierung der mitochondrialen Apoptose erfolgt durch die Freilassung mitochondrialer Proteine in das Cytosol. Die Durchlässigkeit der mitochondrialen Apoptose erfolgt durch die Freilassung mitochondrialer Proteine in das Cytosol. Die Durchlässigkeit der mitochondrialen Membran wird durch die pro- und anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie, darunter Bax, Bak, Bcl-2 und Bcl-xl gesteuert. Cytosolisches Cytochrom c bildet zusammen mit APAF1 und Procaspase 9 das Apoptosom, das zur Aktivierung von Caspase 9 und Caspase 3 führt. Smac/DIABLO und Omi begünstigen Apoptose durch Neutralisierung der IAPs („inhibitors of apoptosis proteins“). Die mitochondrialen Faktoren AIF und EndoG sind im Zellkern an der Fragmentierung des Chromatins beteiligt.

Tsujimoto, 2003), die unterteilt werden können in anti- und pro-apoptotische Faktoren. Mitglieder der Bcl-2-Familie sind zum Teil integrale Bestandteile der äußeren Mitochondrienmembran und/oder können dorthin rekrutiert werden. Wenngleich die Signalintegration innerhalb dieser komplexen Proteinfamilie bei weitem nicht vollständig verstanden ist, konnte deutlich gezeigt werden, dass die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak in der Lage sind, durch Homodimerisierung und/oder andere Mechanismen porenartige Kanäle durch die äußere Mitochondrienmembran zu bilden. Die Entstehung dieser Kanäle führt dann zu einer Veränderung des Membranpotentials und einer Freisetzung der oben beschriebenen Apoptose auslösenden Proteine aus dem Mitochondrium in das Zytoplasma (Übersichtsartikel: Degli Esposti und Dive, 2003; Scorrano und Korsmeyer, 2003). Neben der Bildung von Homo- und Heterodimeren wird die Aktivität der Bcl-2 Proteinfamilie durch das Mengenverhältnis von pro- und anti-apoptotischen Faktoren, deren intrazellulärer Lokalisation, durch Modifikation und proteolytische Spaltung beeinflusst (Cory und Adams, 2002; Tsujimoto, 2003).

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

Die Zahl der zumeist über „screening“-Methoden identifizierten p53-Zielgene mit einer pro-apoptotischen Funktion nimmt stetig zu. Darunter finden sich Faktoren der Rezeptor-vermittelten Apoptose, wie die Todesrezeptoren *CD95/Fas/APO-1* (Owen-Schaub *et al.*, 1995) und *KILLER/DR5* (Wu *et al.*, 1997), ebenso wie Komponenten der mitochondrial-vermittelten Apoptose, so z.B. die pro-apoptotischen Bcl-2-Familienmitglieder *Bax* (Miyashita und Reed, 1995), *PUMA* (Nakano und Vousden, 2001; Yu *et al.*, 2001, 2003) und *NOXA* (Oda *et al.*, 2000a) sowie der Apoptosom-Bestandteil *APAF-1* (Moroni *et al.*, 2001; Fortin *et al.*, 2001; Robles *et al.*, 2001). Darüber hinaus wurden weitere p53 abhängige exprimierte Gene wie z.B. *PIG-3* (Polyak *et al.*, 1997), *PTEN* (Stambolic *et al.*, 2001) oder *PERP* (Attardi *et al.*, 2000) entdeckt, von denen eine Beteiligung, nicht jedoch ein eindeutiger Wirkungsmechanismus am apoptotischen Programm belegt werden konnte. Ebenfalls durch „screening“-Methoden ermittelt, gibt es Hinweise, dass p53 die Expression einer Reihe von Genen, darunter auch anti-apoptotische Faktoren wie *Bcl-2*, durch Repression verringert (Ginsberg *et al.*, 1991a; Haldar *et al.*, 1994; Miyashita *et al.*, 1994). Da die Spezifität und molekularen Mechanismen einer solchen Repression durch p53 noch völlig unklar sind, wird über die Bedeutung der Repression im Zuge der Apoptose-Induktion kontrovers diskutiert.

Neben der Induktion von pro-apoptotischen Genen gibt es klare Hinweise auf eine weitere Funktion von p53 bei der Einleitung des kontrollierten Zelltods, die unabhängig von der transkriptionellen Aktivität des Tumorsuppressors ausgeübt wird. So wurde bereits in den frühen 90er Jahren gezeigt, dass p53 abhängige Apoptose auch in Anwesenheit von Inhibitoren der Transkription oder Translation (Caelles *et al.*, 1994; Wagner *et al.*, 1994; Gao und Tsuchida, 1999) oder auch durch Transfektion mit transaktivierungsinaktiven Mutanten von p53 induziert werden kann (Haupt *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996; Kokontis *et al.*, 2001).

Erst neuere Untersuchungen gaben jedoch Aufschluss über potentielle Wirkungsmechanismen der nicht-transkriptionell vermittelten p53 abhängigen Apoptose. So zeigte die Arbeitsgruppe von Ute Moll, dass eine Translokation des Tumorsuppressors in die Mitochondrien der Apoptose Induktion vorangeht (Marchenko *et al.*, 2000). Zusammen mit der beobachteten Interaktion von p53 mit den anti-apoptischen, an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisierten Proteinen Bcl-2 und Bcl-xl durch p53 demonstrieren zwei neue Studien, dass p53 auch direkt und unabhängig von Transkription oder Translation das pro-apoptische Protein Bax aktivieren kann (Chipuk *et al.*, 2003, 2004). Durch direkte Interaktion kann p53 darüber hinaus auch die Aktivierung von Bak vermitteln (Leu *et al.*, 2004). Auch bei der Rezeptor vermittelten Apoptose gibt es Hinweise, dass p53 unabhängig von seiner transkriptionellen Aktivität durch andere Mechanismen zum programmierten Zelltod beiträgt. So wurde gezeigt, dass p53 den Transport von Todesrezeptoren an die äußere Zellmembran beeinflussen kann (Bennett *et al.*, 1998). Dieser Aspekt von p53 bei der Induktion des programmierten Zelltods war jedoch nicht Thema der hier vorgestellten Arbeit und wurde deshalb bei den durchgeführten Untersuchungen nicht berücksichtigt.

Die Vielzahl der von p53 transaktivierten Gene mit jeweils verschiedenen Funktionen sowie die bekannten nicht-transkriptionellen Aktivitäten von p53 machten es bisher unmöglich, das Netzwerk, das nach genotoxischem Stress aktiviert wird und in dessen Zentrum der Tumorsuppressor sitzt, vollständig zu verstehen. Da p53, wie oben beschrieben, nach DNA Schaden sowohl einen temporären Zellzyklusarrest zu definierten Zeiten im Zellzyklus induzieren und damit das Überleben der geschädigten Zelle ermöglichen kann als auch eine Eliminierung durch Apoptose einleiten kann, ist die Frage nach den Mechanismen, welche die Selektivität der p53-abhängigen Schadensantwort in Abhängigkeit des Schadensausmaß bestimmen, eines der zentralen Themen für das Verständnis der biologischen Funktion von p53. Darüber hinaus wird die vollständige Aufklärung der biologischen Funktion von p53 komplizierter durch die Tatsache, dass in Primatenzellen eine neue Spleißvariante von p53 identifiziert wurde, deren differenzielle Transaktivierungsaktivität eine essenzielle Funktion im UV-induzierten intra-S-Phasen Kontrollpunkt ausübt (Rohaly *et al.*, 2005). Die Entdeckung der p53-Isoform $\Delta p53$ erfolgte in derselben Arbeitsgruppe, die hier ihre Arbeit zur Untersuchung des protektiven G2-Arrest vorstellt. Die Identifizierung, biochemische Charakterisierung sowie Aufklärung der Funktion von $\Delta p53$ im intra-S-Phasen Kontrollpunkt wurden bereits publiziert (Rohaly *et al.*, 2005) und sind im Abschlussbericht für BMU StSch4213 im Detail dargestellt.

4. Wissenschaftliche Methoden

4.1. Zellkultur

4.1.1 Kultivierung von adhären wachsenden Zellen

Die adhären wachsenden wildtyp *p53* (wtp53) Zelllinien CV-1 und AT5 wurden in Gewebekulturschalen bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) mit 5% Fötalem Kälberserum (FCS) kultiviert. Die mutanten *p53* (mutp53) Zelllinie SW480 wurde analog in RPMI-Medium mit 5% FCS kultiviert. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90% 1:3 bis maximal 1:8 umgesetzt. Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsinlösung 5 min bei 37°C bis zum sichtbaren Ablösen der Zellen inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in vorgelegtem Medium suspendiert und anschließend auf neue Gewebekulturschalen verteilt.

Zelllinien:

AT5	humane Fibroblastenzellen mit einer Deletion im AT-Gen (<i>Ataxia Telangiectasia</i> -Gen), (Telatar <i>et al.</i> , 1996); (Coriell Cell Repositories #GM05823).
CV-1:	SV40 permissive Affennierenzelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiopsis</i>), Epithelzelle mit pseudodiploiden Chromosomensatz (Manteuil <i>et al.</i> , 1973), wurde freundlicherweise von Prof. E. Fanning (Department of Molecular Biology Vanderbilt University, Nashville, USA) zur Verfügung gestellt: Status wildtyp <i>p53</i> .
SW480	humane epitheliale Dickdarm Adenocarcinom Zelllinie mit zwei Mutationen im <i>p53</i> Gen (Exon 8, Codon 273 (Arg zu His) und Codon 309 (Pro zu Ser), (Leibovitz <i>et al.</i> , 1976); (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen #ACC 313).

Lösungen:

RPMI:	10,43 g/l RPMI-1640 Pulver (Gibco BRL) 2,0 g/l NaHCO ₃ in Viapurex H ₂ O pH 7,35 Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert.
DMEM:	13,38 g/l DMEM-Pulver (Gibco BRL) 3,7 g/l NaHCO ₃ in Viapurex H ₂ O pH 7,35 Die Lösung wurde anschließend sterilfiltriert.

Trypsinlösung: 2% (v/v) Trypsin-Stammlösung (Gibco BRL)
5 mM EDTA (pH 8,0) in 1 x PBS
Die Lösung wurde anschließend steriltrifriert.

PBS: 137 mM NaCl
2,7 mM KCl
4,3 mM Na₂HPO₄·7H₂O
1,4 mM KH₂PO₄
pH 7,4
Die Lösung wurde anschließend autokalaviert.

4.1.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Die humane, in Suspension wachsende Lymphom-Zelllinie wtp53 HSC93 wurde bei 37°C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% in RPMI-1640 Medium mit 10% FCS und 2 mM L-Glutamin ohne Zusatz von Antibiotika in Kultur gehalten. Die Zellen wurden für exponentielles Wachstum alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:5 verdünnt. Die Kultivierung erfolgte in 80 cm² Gewebekulturflaschen oder in 1 l Spinnergefäßen.

Zelllinie:

HSC93: humane wildtyp *p53* B-Lymphoblasten Zelllinie, die durch künstliche EBV-Transformation immortalisiert wurde; freundlicherweise von Prof. F. Grosse (IMB, Jena) zur Verfügung gestellt.

4.1.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Suspensionszellen bzw. trypsinisierte adhärenente Zellen wurden in einer Zellzentrifuge sedimentiert (200 g, 10 min, 4°C), der Überstand abgesaugt und das Zellsediment in einem entsprechenden Volumen Einfriermedium (0°C) resuspendiert. Jeweils 1 ml der Suspension (0,5–1 x 10⁷ Zellen) wurde in ein vorgekühltes Kryoröhrchen überführt und langsam innerhalb von 30 min in einem Styroporbehälter bei -20°C abgekühlt (-1°C/min). Anschließend erfolgte eine 24 h-Inkubation bei -70°C. Die eingefrorenen Zellen wurden in Flüssigstickstoff gelagert. Eingefrorene Zellen wurden schnell im 37°C Wasserbad aufgetaut und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Medium überführt. Die Suspension wurde sedimentiert (200 g, 5 min, Raumtemperatur [RT]), in entsprechendem Nährmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche bzw. Gewebekulturschale überführt. Zur Entfernung des restlichen toxischen DMSO und toter Zellen wurde 24 h später das Medium vollständig durch neues ersetzt.

Lösung:

Einfriermedium: 90% FCS
10% DMSO
wurde bei -20°C gelagert

4.2 Herstellung induzierbarer TO-Zelllinien

Das T-Rex System (Invitrogen) ist ein Tetracyclin induzierbares Expressionssystem für Säugerzellen. Die Induktion des entsprechenden Gens erfolgt nach Zugabe von Tetracyclin, das an den Tet-Repressor (TR) bindet und diesen vom Promoter verdrängt. Für die Herstellung stabiler, induzierbarer CV-1 Zelllinien wurden am Vorabend der Transfektion die Zellen so ausgesät, dass sie am nächsten Tag in subkonfluenter Dichte vorlagen (5×10^5 Zellen /10 cm-Gewebekulturschale). 1 μg pcDNA6/TR (kodiert für TR) und 6 μg pcDNA4/TO (kodiert für wtp53, mutp53-273H, wt Δ p53, mut Δ p53-175D oder der leere Vektor) wurden mit einem 2,5x Volumen Ethanol und 0,1x Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,5 bei -20°C präzipitiert, durch Zentrifugation (Eppendorf-5415C, 14000 rpm, 30 min, 4°C) sedimentiert, mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, 30 min unter der Sterilwerkbank getrocknet, in 438 μl 10 mM Tris-HCl pH 7,6 gelöst und mit 62 μl 2M CaCl_2 versetzt. Die Lösung wurde in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und mit einer Pasteurpipette belüftet, während langsam 500 μl 2x HEBS zugetropft wurden. Um die Ausformung von Kalziumphosphat-DNA-Kristallen zu erlauben, wurde die Lösung für 15 min bei RT inkubiert und anschließend dem Kulturmedium zugefügt. Nach einer vierstündigen Inkubationszeit unter normalen Kulturbedingungen wurde das Medium erneuert. Am Folgetag wurden die Zellen 1:5 bis maximal 1:8 umgesetzt und im Selektionsmedium (Zeozin [300 $\mu\text{g}/\text{ml}$] und Blastizidin [1,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$]) weiter kultiviert, das alle drei bis vier Tage bis zur Entstehung von Zellkolonien erneuert wurde. Die Isolierung der Einzelzellkolonien erfolgte mit Hilfe von Klonierungsringen. Dazu wurden diese in Silikon-Fett getunkt und über den Zellklon gestülpt. Die Zellen wurden durch ein bis zwei Tropfen Trypsin von der Kulturschale gelöst und in 24-Lochschalen umgesetzt. Für jede induzierbare TO-Zelllinie wurden zwischen vierzig und achtzig Klone getestet. Es wurden Klone verwendet, die nur nach Zugabe des Tetracyclin-Analogons Doxycyclin (DOX; 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) das entsprechende p53 Protein exprimierten. Die stabilen Zelllinien wurden für die weitere Kultivierung in Selektionsmedium gehalten.

Lösung:

2x HEBS: 274 mM NaCl
10 mM KCl

1,4 mM Na₂HPO₄

12 mM Glukose

42 mM HEPES (pH mit HCl auf 7,04); frisch angesetzt und sterilfiltriert.

4.3 Zellzyklussynchronisation

4.3.1 Gegenstromzentrifugation (Elutriation)

Die Trennung und Isolierung verschiedener Zellpopulationen aus einem Gemisch mittels Elutriation beruht auf dem Prinzip der Gegenstromzentrifugation. Dabei sind zwei gegeneinander wirkende Kräfte von Bedeutung: Zum einen die nach außen gerichtete Zentrifugalkraft, die durch die Rotationsgeschwindigkeit des Elutriatorrotors bestimmt wird und zum anderen die Zentripetalkraft, die durch die Strömungsgeschwindigkeit des Mediums in Richtung der Rotationsachse mittels einer geeigneten Pumpe bestimmt wird. Befinden sich beide Kräfte im Gleichgewicht, können Partikel bestimmter Größe und Dichte in der Elutriationskammer konzentriert werden, während die übrigen ausgewaschen werden. Dieser Vorgang wird sowohl von der eingesetzten Fließgeschwindigkeit der Zellsuspension, der Dichte, der Temperatur, der Viskosität des Mediums und der Rotorgeschwindigkeit beeinflusst. So ist es möglich, durch Variation des Faktors Fließgeschwindigkeit bei gleichzeitiger Konstanz der übrigen Faktoren verschiedene Zellpopulationen entsprechend ihres Sedimentationskoeffizienten zu elutriieren.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (200 g, 10 min, RT) gesammelt und in Elutriationsmedium aufgenommen. Die Elutriation erfolgte mit der J6-MC Zentrifuge (Beckmann). Es wurden folgende Parameter für die Elutriation gewählt: Die HSC Zellen wurden mit einer konstanten Rotorgeschwindigkeit (Rotor: JE-5.0) von 3000 rpm und mit einer zunehmenden Fließgeschwindigkeit von 17 bis 61 ml/min fraktioniert (Fraktionen G1-G2).

Lösung:

Elutriationsmedium: 500 ml 10x PBS
 3 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
 12,5 ml 40% Glukose
 50 ml FCS
 mit H₂O auf 5 l auffüllen

4.3.2 Isoleucinentzug

Um adhärent wachsende CV-1, TO-CV-1 und SW480 Zellen im Zellzyklus zu synchronisieren, wurden die nahezu konfluenten Zellen einen Tag vor dem Isoleucinentzug

1:3 umgesetzt. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und Isoleucin-freies Medium (5% FCS [gegen PBS dialysiert] + 1mM Glutamin) zugegeben. Nach 38 h Inkubation bei 37°C (SW480-Zellen: 24 h) wurde der Isoleucinblock durch Zugabe von DMEM bzw. RPMI (5% FCS) aufgehoben. Nach ca. 9 h befanden sich die CV-I-, TO-CV-1, SW480- bzw. LLC-MK2-Zellen synchron am G1/S Übergang.

4.4 Bestrahlung von Zellen

Für die γ -Bestrahlung wurde eine ^{137}Cs -Quelle verwendet. Unterschiedliche Strahlendosen wurden dabei über verschiedene Expositionszeiten erzielt. Unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität der Strahlenquelle entsprach eine Expositionszeit von 45 sec einer Strahlendosis von 1 Gy. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte ohne Entfernung des Mediums. Die Zellen wurden bis zu ihrer Aufarbeitung unter Standard-Bedingungen in Kultur gehalten.

4.5 Herstellung von Zellsedimenten

4.5.1 Suspensionskultur

Die Suspensionskulturen wurden in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 g für 6 min bei 4°C in einer Kühlzentrifuge (Eppendorf 5810 R) sedimentiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellsediment anschließend mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen. Die geernteten Zellen wurden sofort weiterverarbeitet oder bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.5.2 Adhärente Zellen

Konfluente Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und abgeschabt. Während dieser Vorgänge lagen die Gewebekulturschalen auf Eis. Die Zellsuspension wurde bei 300 g für 6 min in einer Kühlzentrifuge (Eppendorf 5810 R) bei 4°C sedimentiert. Das resultierende Zellsediment wurde sofort weiterverarbeitet oder bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.6 Zellbiologische Methoden

4.6.1 Bestimmung der Viabilität

Für die Überprüfung der Lebensfähigkeit wurde der einfach und schnell anzuwendende Routinetest der Trypanblaufärbung eingesetzt. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an Zellproteine bindet. Das Trypanblau dringt durch defekte Zellmembranen toter Zellen in das Cytosol und färbt diese Zellen tiefblau. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell. Bei zu langer Einwirkzeit des Trypanblaus ist ein Anstieg von

toten Zellen zu beobachten, da dieser Farbstoff cytotoxisch wirkt. Zur Zellzahlbestimmung wurde ein Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer) benutzt. Die Zellen wurden dafür 1:1 mit Trypanblau-Lösung gemischt, gut suspendiert und an den Rand des Deckglases pipettiert. Das Deckglas wurde zuvor leicht befeuchtet und auf die Zählkammer aufgesetzt, so dass die so genannten Newton-Ringe zu sehen waren. Durch die Kapillarkräfte wurden die Zellen unter das Deckglas gezogen. Für die Auswertung wurden die vier großen Eckquadrate ausgezählt. Das Volumen dieser Felder betrug 4×10^{-4} ml, somit beträgt die Gesamtzellzahl bei n ausgezählten Zellen unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors 2:

$$n \times 2 \times (4 \times 10^{-4})^{-1} \text{ ml} = n \times 5000 \text{ Zellen/ml.}$$

Lösung:

Trypanblau-Lösung: 0,4% in PBS

4.6.2 Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusscytometrie (FACS, Robinson *et al.*, 1997)

Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung mit Trypsin abgelöst (4.1.1). Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und einmal mit 10 ml 5 mM EDTA in PBS (4°C) gewaschen. Das Zellsediment wurde nach Zentrifugation (200 g, 10 min, 4°C) in 0,5 ml eiskaltem PBS aufgenommen und unter ständigem Mischen mit 5 ml Fixierlösung versetzt. Die fixierten Zellen wurden zunächst für ca. 1 h auf Eis inkubiert und anschließend bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Proben aus den fixierten Zellen (5×10^5 Zellen) wurden zentrifugiert (300 g, 5 min, 4°C) und einmal mit 5 ml sterilem PBS (4°C) gewaschen. Zur quantitativen DNA-Färbung wurde das Zellsediment in 1 ml Propidiumiodid-Lösung aufgenommen und für 30 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Der DNA-Gehalt pro Zelle wurde im Coulter Epics (Beckman) gemessen, und die Auswertung erfolgte mit dem Programm MultiCycle (Phoenix).

Lösungen:

Fixierlösung: Ethanol (80%)
-20°C

Propidiumiodid-Lösung: 40 µg/ml Propidiumiodid
250 µg/ml DNase freie RNase A in PBS

4.6.3 TUNEL-Methode

Die durchflusscytometrische Erfassung apoptotischer Zellen kann neben der Bestimmung der subG1-Population auch mit der TUNEL-Methode erfolgen. Die TUNEL-Methode (TdT *mediated* dUTP *nick end labeling*) basiert auf dem *tail labeling* der in apoptotischen Zellen erzeugten DNA-Strangbrüche. Dabei werden Desoxynukleotidderivate an die 3'OH-Enden mit Hilfe des Enzyms Terminale Desoxynukleotidyl Transferase angehängt. Die Verwendung von BrdUTP als Substrat und die anschließende Detektion mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten anti-BrdU-Antikörpers führt zu einer verbesserten Sensitivität des Assays gegenüber dem Standardprotokoll (Li und Darzynkiewicz, 1995).

Es wurden 2×10^6 Zellen sedimentiert (300 g, 5 min, 4°C) und mit PBS-BSA gewaschen. Anschließend wurde das Zellsediment in 100 µl PBS resuspendiert und mit 1 ml Formaldehyd (1% in PBS, 4°C) versetzt. Zur Fixierung wurden die Proben für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde einmal mit PBS-BSA gewaschen, in 100 µl PBS resuspendiert und mit 1 ml Ethanol (80% v/v, -20°C) unter leichter Bewegung (Vortex) versetzt. Nach Inkubation für mindestens 3 h bei -20°C wurde zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 40 µl TdT-Reaktionsmix zugegeben und bei 37°C unter leichtem Schütteln für 45 min inkubiert. Im nächsten Schritt wurde der Ansatz mit 500 µl PBS-BSA-T aufgefüllt und zentrifugiert. Zur Färbung wurden 20 µl BrdU-Färbemix (enthält Fluorescein-gekoppelten gegen BrdU gerichteten Antikörper) zugegeben und im Dunkeln unter leichtem Schütteln inkubiert (30 min, RT); nach Beendigung der Inkubationszeit wurde der Ansatz mit 500 µl PBS aufgefüllt. Die Fluoreszenzdetektion zur Erfassung der TUNEL-positiven Zellen erfolgte mit einem Cytometer (Coulter Epics, Beckman) unter Verwendung eines 505/25 nm Bandpassfilters (FL1).

Lösungen:

TdT-Reaktionsmix:	1 x TdT Reaktionspuffer 20 U Terminale Desoxynukleotidyl Transferase 0,1 mM BrdUTP
PBS-BSA:	PBS 0,5% BSA
PBS-BSA-T:	PBS 0,5% BSA 0,1% Triton X-100
BrdU-Färbemix:	0,3 µg anti-BrdU-FITC (Roche) PBS-BSA 0,3% Triton X-100

4.6.4 Chromatin-Immunpräzipitation-PCR (ChIP-PCR)

4.6.4.1 Zellkernpräparation und Zelllyse

Die Chromatin-Immunpräzipitation dient dem Nachweis von spezifischen Protein-DNA Interaktionen. Für die kovalente Kopplung von DNA-gebundenen Proteinen wurden die Zellen 10 min mit 1% Formaldehyd (Endkonzentration) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS und zweimal mit hypotonischem Puffer (+ Proteaseinhibitoren) gewaschen. Die Zellen wurden dann mit einem Gummischaber von der Zellkulturschalenoberfläche gelöst und anschließend 8-10x durch eine Kanüle (Braun Sterican Gr.18) gezogen. Die dadurch isolierten Zellkerne wurden durch Zentrifugation (10 min, 1000 g, 0°C) sedimentiert. Nachdem die Zellkerne in 100 µl SDS-Lysispuffer (+ Proteaseinhibitoren) resuspendiert wurden, erfolgte die Spaltung der genomischen DNA in 500 bis 1000 bp große Fragmente. Dazu wurden die Proben 6x 5 sec bei 30 W (Branson Sonifier B-12) beschallt. Zwischen den einzelnen Beschallungen wurden die Proben in einem Ethanol-Eis Gemisch gekühlt. Durch Zentrifugation (25 min, 21000 g, 0°C) wurde das Lysat geklärt.

Lösungen:

Hypotonischer Puffer:	20 mM Hapes/KOH (pH 7.5) 5 mM KCl 1,5 mM MgCl ₂ 0,1 mM DTT (frisch zugesetzt)
SDS-Lysispuffer:	1% SDS 10 mM EDTA 50 mM Tris-HCl pH (8,1)
Proteaseinhibitoren:	unmittelbar vor Verwendung wurden folgende Proteaseinhibitoren zugegeben: 5 µg/ml Aprotinin 5 µg/ml Leupeptin 5 µg/ml Pepstatin A 125 µg/ml Pefabloc [®] SC

4.6.4.2 Präzipitation

Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit zehnfachem Volumen EIA-Puffer (+ Proteaseinhibitoren) versetzt. Anschließend wurde die Probe für 45 min bei 4°C unter Schwenken mit 40 µl Lachssperma-präabsorbierter Protein A Sepharose (ssPAS, Upstate) inkubiert. Das präabsorbierte Lysat wurde auf mehrere Reaktionsgefäße

verteilt, mit jeweils 2 μg Antikörper versetzt und über Nacht bei 4°C auf dem Rolltisch inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Immunkomplexe für 1 h bei 4°C mit 30 μl ssPAS präzipitiert. Anschließend wurde die ssPAS mit jeweils 1 ml Waschpuffer (a-e) für 3-5 min bei 4°C auf dem Rolltisch gewaschen:

Immunologische Reagenzien:

DO-1	anti-p53 muriner monoklonaler Antikörper; erkennt die Aminosäuren 21-25 von humanem p53 (# OP43L Oncogene, Darmstadt)
DO12	anti-p53 muriner monoklonaler Antikörper; erkennt die Aminosäuren 250-270 von humanem p53 (#MCA1705 Serotec, Düsseldorf)
ICA9	anti-p53 muriner monoklonaler Antikörper; erkennt die Aminosäuren 383 bis 393 (# MCA1708 Serotec, Düsseldorf)
M2	anti-Flag muriner monoklonaler Antikörper (# F1804 Sigma; St.Louis USA)
PAb101	anti-SV40 T Ag muriner monoklonaler Antikörper (# MS-1832-P1ABX Lab Vision; Vermont USA)

Lösungen:

Waschpuffer:

- 0,1% SDS; 1% TritonX-100; 2 mM EDTA (pH 8.0); 20 mM Tris (pH 8.0); 150 mM NaCl
- 0,1% SDS; 1% TritonX-100; 2 mM EDTA (pH 8.0); 20 mM Tris (pH 8.0); 500 mM NaCl
- 250 mM LiCl; 1% NP40; 1% Natriumdeoxycholat; 1 mM EDTA; 10 mM Tris (pH 8.0)
- TE (pH 8.0)
- TE (pH 8.0)

Zwischen den Waschschrritten wurde die ssPAS durch Zentrifugation (1 min, 100 g, 4°C) sedimentiert und der Überstand verworfen.

E1A + PI:

- 50 mM HEPES
- 150 mM NaOH
- 0,1% NP-40
- pH mit KOH zwischen 7,0 und 7,5 einstellen und anschließend die Lösung steril filtrieren
- unmittelbar vor Verwendung wurden folgende Proteaseinhibitoren (PI) zum Lysispuffer E1A zugegeben:
- 5 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin
- 5 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin
- 5 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatin A
- 125 $\mu\text{g/ml}$ Pefabloc[®] SC

4.6.4.3 Elution der Immunkomplexe und Freisetzung der DNA

Die Elution der Immunkomplexe erfolgte durch Zugabe von 250 μl 1% SDS/0,1 M NaHCO_3 für 15 min bei RT. Das Eluat wurde abgenommen und der Vorgang wiederholt. Die beiden Eluate wurden anschließend vereint. Durch Zugabe von 20 μl 5 M NaCl und Inkubation der Proben für 5 h bei 65°C wurde die kovalente Bindung zwischen Proteinen und DNA aufgehoben. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 10 μl 0,5 M EDTA, 20 μl 1 M Tris/HCl pH 6.5 und 5 μl Proteinase K (5 mg/ml) für 1 h bei 45°C verdaut.

4.6.4.4 Phenol/Chloroform Extraktion und DNA-Präparation

Um Proteine und Peptide aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wurde eine Phenol/Chloroform Extraktion durchgeführt. Dazu wurden 500 μl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Biomol) zum Ansatz gemischt, zentrifugiert (2 min, 18000 g, RT), die obere, wässrige Phase abgenommen und in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Diese Prozedur wurde nochmals wiederholt. Nach Überführung des wässrigen Überstands in ein neues Reaktionsgefäß, wurde 1 μl Glycogen (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Sigma) als Fällungshilfe zur Probe gegeben und die Probe mit 1,3 ml Ethanol versetzt. Die Präzipitation der DNA-Fragmente erfolgte bei -70°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die DNA durch Zentrifugation (30 min, 21000 g, 0°C) sedimentiert. Das Sediment wurde mit 500 μl 70% Ethanol gewaschen und erneut für 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Ethanols, wurde der DNA-Niederschlag an der Luft unter sterilen Bedingungen getrocknet und anschließend in 30 μl TE-Puffer (pH 8,0) gelöst.

4.6.4.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen

Für den Nachweis p53 assoziierten Promotor-Elementen, wurde eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) durchgeführt. Dazu wurden 3 μl der DNA-Probe mit 4 μl zehnfach Reaktionspuffer (Eppendorf AG), 1 μl 10 mM dNTPs, je 1 μl vom vorwärts- und rückwärtsgerichteten Oligonukleotid (100 nM), spezifisch für die entsprechende Promotor-Sequenz, 0,3 μl Taq-Polymerase (0,025 U/ μl ; Eppendorf AG) und 30 μl Wasser unter sterilen Bedingungen zusammengemischt. Das Zyklusprogramm (30 Zyklen) wurde ausgehend von folgenden Starteinstellungen für die Reaktionen optimiert: Initiale Denaturierung (3 min, 94°C), Denaturierung (50 sec, 94°C), Annealing (40 sec, 56°C), Elongation (40 sec, 72°C), finale Elongation (5 min, 72°C). Zur Kontrolle wurde eine PCR ohne DNA und eine mit genomischer Gesamt-DNA durchgeführt.

Oligonukleotide für die PCR:

<i>p21</i> -Promotor:	5'-AGAGTAACAGGCTAAGGCTTACCT-3' 5'-TGTGGCTCTGATTGGCTTTCTGGCCAT-3'
<i>mdm2</i> -Promotor:	5'-AGCTTTTCCTCTTGAGCTGGTCA-3' 5'-TTCAATCGCCACTGAACACAGCT-3'
<i>bax</i> -Promotor:	5'-AGGTTTCCTGGCTCTCTGATC-3' 5'-TCTTCATGATCTGCTCAGAGC-3'

4.6.4.6 Neutrale Agarosegelelektrophorese (Sambroock *et al.*, 1989)

Die PCR amplifizierte DNA wurde in einem 1,2%igem Agarosegel in TAE Puffer überprüft. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V für 40 min in TAE Puffer durchgeführt. Nach Anfärbung der DNA mit dem DNA Interkalator Ethidiumbromid wurden die fluoreszierenden DNA Banden im Durchlicht bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht und mit einer Intas Kamera fotografiert.

Lösungen:

TAE Puffer:	40 mM Tris-Acetat pH 7,5 1 mM EDTA (pH 8,0)
10x DNA-Ladungspuffer	30% Glycerin 25 mM EDTA (pH 8,0) 0,1% Bromphenolblau
Ethidiumbromid-Stammlösung:	10 mg/ml in H ₂ O (10000x konzentriert)

4.6.5 Comet-Analyse

Die Comet-Analyse ist eine Einzelzell-gelelektrophoretische Anwendung zur Bestimmung des Gehalts von Einzelstrang- (ssDNA) und Doppelstrang- (dsDNA) Brüchen. Die Elektrophorese kann entweder unter neutralen Bedingungen für den Nachweis von dsDNA-Brüchen oder unter alkalischen Bedingungen für den Nachweis von dsDNA und ssDNA-Brüchen durchgeführt werden.

Auf einen Objektträger, der auf einer Seite aufgeraut ist, wurden 100 µl 1%ige Agarose Typ II (Sigma) gelöst in 0,5x PBS (50°C) mit einem Plastikspatel gleichmäßig auf die aufgeraute Seite aufgetragen. Anschließend ließ man die Agarose auf dem Objektträger eintrocknen. Die so präparierten Objektträger können bei RT mehrere Monate bis zur Verwendung aufbewahrt werden. Auf die erste Agaroseschicht wurde eine zweite Agaroseschicht aufgetragen. Dazu wurden 400 µl 1%ige Agarose Typ II gelöst in PBS (50°C)

auf den vorgewärmten Objektträger (ca. 30°C) aufgetragen und anschließend wurde ein Deckglas auf die warme Agarose gelegt, so dass sich die Agarose gleichmäßig verteilte. Der Einschluss von Luftblasen wurde vermieden. Anschließend wurde der Objektträger sofort auf eine 4°C kalte Aluminiumplatte gelegt, so dass die Agarose innerhalb von 10 min gelierte. Die so präparierten Objektträger konnten in einer „feuchten Kammer“ bis zu 3 Tagen bei 4°C aufbewahrt werden.

Für die Comet-Analyse wurden 5×10^5 Ethanol-fixierte Zellen (4.6.1) wurden durch Zentrifugation (5 min, 300 g, 4°C) sedimentiert, der Zellschlag in 1 ml PBS (+ 1% EDTA pH 8.0) resuspendiert und für die Rehydrierung 5 min auf Eis stehen gelassen. 100 μ l dieser Zellsuspension wurden mit 400 μ l 1%iger Agarose Typ VII gelöst in Wasser (40°C) gemischt, so dass eine Agaroseendkonzentration von 0,8% resultierte. Das Deckglas wurde von der zweiten Agaroseschicht auf dem Objektträger abgezogen und der Objektträger vorgewärmt. Auf die zweite Agaroseschicht wurden dann 100 μ l der Agarose-Zellsuspension aufgetragen und ein neues Deckglas unter Vermeidung des Einschlusses von Luftblasen aufgelegt. Der Objektträger wurde auf eine 4°C kalte Aluminiumplatte gelegt, bis die Agarose-Zellsuspension gelierte. Zur Lyse der Zellen wurden zuerst das Deckglas entfernt und die Objektträger für 30 min in 4°C kalten TICE-Lysispuffer gelegt. Anschließend wurden die Objektträger für 15 min in 330 mM NaOH/1mM EDTA (4°C) gelegt, um störende ssDNA/dsDNA-Sekundärstrukturen aufzulösen. Dieser und die folgenden Schritte wurden unter Lichtausschluss durchgeführt, um zusätzliche DNA-Strangbrüche zu vermeiden. Für den Nachweis von ssDNA- oder dsDNA-Strangbrüchen wurden die eingebetteten Zellen einer neutralen bzw. alkalischen Elektrophorese unterzogen. Die neutrale Elektrophorese erfolgte für 10 min bei einer Spannung von 1V/cm mit TBE als Laufpuffer. Die alkalische Elektrophorese wurde bei gleicher Spannung für 30 min mit 330 mM NaOH/1 mM EDTA (pH 8,0) als Laufpuffer durchgeführt und anschließend wurden die Proben mit 400 mM Tris-HCl pH 7.5 (15 min, 4°C, dunkel) neutralisiert. Zur Färbung der DNA wurde auf die abgetropften Objektträger 30 μ l SYBR[®]-Green II-Lösung (1:1 mit Antifade DABCO) zugegeben und mit einem Deckglas zugedeckt. Da während der Elektrophorese die ssDNA- oder dsDNA-Fragmente aus dem Zellkern heraus ins Gel liefen und ihrer Größe nach aufgetrennt wurden, aber die kompakte, ungeschädigte DNA zu groß war, um unter diesen Bedingungen aus dem Zellkern zu gelangen, ergab sich ein Bild, das einem Kometen ähnelt.

Die Proben wurden anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop und dem Computerprogramm VisComet 4.0 (Impuls Bildanalyse GmbH) ausgewertet. Es wurde jeweils das relative „Olive-Tail-Moment“ bei 50 einzelnen Zellen bestimmt und der

Durchschnitt ermittelt. Das relative „Olive-Tail-Moment“ definiert das Verhältnis der DNA im „Kometenschweif“ zur DNA im Zellkern und stellt ein Maß für den DNA-Schaden der untersuchten Zellen dar.

Lösungen:

TICE-Lysispuffer:	1% Natrium-N-Lauryl-Sarcosinat 10 mM Tris (pH 10,0) 100 mM EDTA (pH 10,0) 2,4 M NaCl 10% DMSO (frisch dazugeben) 1% Triton X-100 (frisch dazugeben)
Antifade DABCO:	223 mg DABCO in 0,8 ml H ₂ O lösen + 0,2 ml 1 M Tris/HCl (pH 8.0) + 9 ml Glycerol

4.6.6 [³H]-Thymidin Einbau

Die DNA-Synthese wurde durch den Einbau von [³H]-Thymidin quantifiziert. Dazu wurden die Zellen subkonfluent auf 5 cm Schalen ausgesät und am G1/S Übergang bestrahlt bzw. nicht bestrahlt. Die Markierung der DNA erfolgte durch Zugabe von 7 μ Ci [³H]-Thymidin (77 Ci/mmol; ICN Biomedicals) pro ml Kulturmedium für 1 h zu den jeweils angegebenen Zeitwerten. Der ³H-Einbau wurde durch zweimaliges Waschen mit eiskaltem PBS gestoppt, die Zellen mit einem Gummischaber gelöst und in 1 ml eiskaltes PBS überführt. Die Zellsuspension wurde bei 300 g für 6 min in einer Kühlzentrifuge (Eppendorf 5810 R) bei 4°C sedimentiert. Das resultierende Zellpräzipitat wurde bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die genomische DNA wurde mit dem „NucleoSpin Tissue Kit“ (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die Konzentration der DNA Lösung wurde photometrisch (Shimadzu BioSpec-1601E) bestimmt ($62,9 \times OD_{260} - 36,0 \times OD_{280} = \mu\text{g DNA/ml}$; Faktoren von Warburg und Christian) und der ³H-Einbau im Szintillationszähler (Beckman) gemessen. Die DNA-Syntheserate ergibt sich aus dem Verhältnis von ³H cpm zu $\mu\text{g DNA}$.

4.7 Proteinanalytische Methoden

4.7.1 Gesamtzellextrakt (Lysat)

Zellpräzipitate wurden auf Eis aufgetaut und mit etwa dem doppelten Volumen an E1A + PI versetzt. Die Probe wurde 25 min auf Eis lysiert. Die Lysate wurden durch Zentrifugation

(14000 rpm, 25 min, 0°C, Eppendorf 5810 R) geklärt und der Überstand in vorgekühlte Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford (4.7.2) ermittelt.

Lösungen:

E1A	50 mM HEPES 150 mM NaOH 0,1% NP-40 pH mit KOH zwischen 7,0 und 7,5 einstellen und anschließend die Lösung steril filtrieren
PI:	unmittelbar vor Verwendung wurden folgende Proteaseinhibitoren (PI) zum Lysispuffer E1A zugegeben: 5 µg/ml Aprotinin 5 µg/ml Leupeptin 5 µg/ml Pepstatin A 125 µg/ml Pefabloc® SC

4.7.2 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Je 2 µl des Gesamtzellextraktes wurden mit ddH₂O auf 800 µl ergänzt und mit 200 µl BioRad Reagenz versetzt. Nach einer 10 minütigen Inkubation wurde die Extinktion bei 595 nm gegen eine Referenz, die keinen Zellextrakt enthielt, gemessen (Photometer Bio Spec-1601E, Shimadzu). Die Ermittlung der Proteinkonzentrationen aus der gemessenen Absorption bei 595 nm erfolgt dabei mit Hilfe einer zuvor angefertigten BSA Standard-Eichreihe.

4.7.3 Immunpräzipitation von Proteinen aus Gesamtzellextrakten

Für die Immunpräzipitation wurde ausschließlich Protein G-Sepharose (PGS) verwendet. Das Säulenmaterial wurde für die Äquilibrierung mit dem zehnfachen Säulenvolumen an H₂O (4°C) versetzt. Die Suspension wurde bis zum Absetzen der PGS auf Eis stehen gelassen. Dieser Vorgang wurde 4-5x mit jeweils frischem Wasser und anschließend zweimal mit E1A wiederholt. Zur Herstellung einer 10%igen Suspension wurde der Überstand abgesaugt und ein entsprechendes Volumen E1A zugefügt. Für die Bindung der Immunglobuline an die Trägermatrix wurden je 100 µl der 10%igen PGS-Suspension mit 500 µl E1A + PI (4.6.2.2) gewaschen. Die PGS wurde mit 2 µg Immunglobulin in 300 µl E1A + PI für 1 h auf einem Horizontalschüttler bei 4°C inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit je 500 µl E1A entfernt. Zu den PGS gebundenen Antikörpern wurde 0,5-1,5 mg Zelllysate (4.7.1) in 300 µl E1A + PI gegeben und 1-2 h auf einem Horizontalschüttler bei 4°C

inkubiert. Nicht gebundenes Antigen wurde durch dreimaliges Waschen mit je 500 μ l E1A entfernt. Die Immunpräzipitate wurden wie unter (4.7.4, 4.7.5) beschrieben weiterverarbeitet.

Immunologische Reagenzien:

anti-p53 (DO-1)	muriner monoklonaler Antikörper; erkennt die Aminosäuren 21-25 von humanem p53 (# OP43L Oncogene, Darmstadt)
anti-p53 (DO12)	muriner monoklonaler Antikörper; erkennt die Aminosäuren 250-270 von humanem p53 (#MCA1705 Serotec, Düsseldorf)
anti-p53 (ICA9)	muriner monoklonaler Antikörper; erkennt die Aminosäuren 383 bis 393 (# MCA1708 Serotec, Düsseldorf)
anti-Flag (M2)	muriner monoklonaler Antikörper (# F1804 Sigma; St.Louis, USA)
anti-SV40 T Ag (PAb101)	muriner monoklonaler Antikörper (# MS-1832-P1ABX Lab Vision; Fermtont, USA)
anti-p21 (H-164)	polyklonales Kaninchenserum (# sc-756 Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA)
anti-Cyclin A (H432)	polyklonales Kaninchenserum (# sc-751 Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA)
anti-Cyclin E (HE67)	muriner monoklonaler Antikörper (# 554193 BD Bioscience; San Diego, USA)
anti-Cyclin B (GSN-1)	muriner monoklonaler Antikörper (# 554177 BD Bioscience; San Diego, USA)

4.7.4 „Target-bound“-Histon- Kinaseaktivitätstest

Die Zelllyse (4.7.1) und Immunpräzipitation (4.7.3) von Cyclin-Kinase Komplexen erfolgte in E1A + PI unter Zusatz von Phosphataseinhibitoren. Die immunpräzipitierten, über Antikörper an PGS gebundenen Komplexe wurden im Kinasepuffer äquilibriert. Als Substrat dienten 1-2 μ g Histon H1 (Biomol). Die Phosphorylierung der Substrate erfolgte in 20 μ l Kinasepuffer mit 4 μ Ci [³²P]- γ ATP für 30 min bei 37°C unter leichtem Schwenken. Die Kinasereaktion wurde durch Zugabe von 20 μ l 2x SB (4.7.5) gestoppt; es folgte eine Inkubation für 10 min bei 65°C zur Denaturierung. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE (4.7.5) getrennt, durch Coomassie Lösung gefärbt und die markierten Proteine durch Autoradiographie detektiert.

Immunologische Reagenzien:

anti-Cyclin A (H432)	polyklonales Kaninchenserum (# sc-751 Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA)
anti-Cyclin E (HE67)	muriner monoklonaler Antikörper (# 554193 BD Bioscience; San Diego, USA)

anti-Cyclin B (GSN-1) muriner monoklonaler Antikörper (# 554177 BD Bioscience; San Diego, USA)

Lösungen:

Phosphataseinhibitoren: 1 mM EDTA (pH 8,0)
4 mM EGTA (pH 7,5)
5 mM NaF

Kinasepuffer: 20 mM HEPES (pH 7,5)
1 mM DDT
10 mM MgCl₂
5 mM NaF
1 mM EDTA (pH 8,0)
4 mM EGTA (pH 7,5)
0,1 mg/ml BSA
10 μM ATP

4.7.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli et al., 1970)

Zur Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurden die Zellen wie unter 4.7.1 beschrieben lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt (4.7.2). Gesamtzellextrakte wurden mit dem 0,2 fachen Volumen an 6x SB versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die aus Gesamtzellextrakten immunpräzipitierten Antigen-Antikörperkomplexe wurden durch die Zugabe des doppelten Volumens von 2x SB von der PGS-Matrix eluiert und für 5 min bei 95°C denaturiert. Durch Zentrifugation (10000 g, RT, 20 sec) wurde die PGS abgetrennt. Anschließend wurden die Proben entweder bei -20°C gelagert oder direkt auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Zur Auftrennung der Proteine wurde die Minigelapparatur Hoefler Mighty Small II (Gelgröße 100 mm x 80 mm x 1 mm) und je nach Proteingröße Trenngele verschiedener Polyacrylamid-Konzentrationen (8, 10, 12,5 oder 15%) verwendet. Als Größenmarker wurde ein „prestained marker“ (SDS-7B; Sigma) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei konstanten 20-25 mA/Gel für 1-2 h durchgeführt.

Lösungen:

2x Auftragspuffer (2x SB): 125 mM Tris-HCl pH 6,8
4% (w/v) SDS
20% (w/v) Glyzerin
0,2 M DDT
0,001% Bromphenolblau

6x Auftragspuffer (6x SB):	350 mM Tris-HCl pH 6,8 30% Glycerin 10% (w/v) SDS 0,6 M DTT 0,012% Bromphenolblau
4x Gel-Puffer 1:	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
4x Gel-Puffer 2:	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4% (w/v) SDS
Sammelgel:	4% Acrylamid 1x Gel-Puffer 1
Trenngel:	8, 10, 12,5 oder 15% Acrylamid 1x Gel-Puffer 2
5x Laufpuffer	0,125 M Tris Base 0,96 M Glyzin 0,5% (w/v) SDS

Die Polymerisierung des Acrylamids wurde durch Zugabe von 0,0005% Ammoniumpersulfat und 0,001% TEMED gestartet.

4.7.6 Nachweis von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen

4.7.6.1 Coomassiefärbung

Polyacrylamid Gele wurden 10-15 min in Coomassie Färbelösung und anschließend im Schnellentfärber bei RT geschwenkt, bis der Hintergrund sich entfärbt hatte und die Proteinbanden sichtbar wurden.

Lösungen:

Färbelösung:	0,15% (w/v) Coomassiebrillantblue R250 45% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure
Schnellentfärber:	10% (v/v) Isopropanol 10% (v/v) Essigsäure

4.7.6.2 Nachweis von Proteinen durch Autoradiographie

Für die Analyse ³²P-markierter Proteine (4.7.4) wurde nach Coomassiebrillantblue-Färbung (zur Fixierung der Proteine und zur optischen Analyse der Banden) und dem Trocknen des Gels die Histon H1-Phosphorylierung autoradiographisch nachgewiesen und mittels Phosphoimager (Fujifilm, BAS-2500) quantifiziert.

4.7.6.3 Western Blot (WB) und immunologische Detektion

Die PVDF-Membran (Immobilon™-P; Millipore) wurde 2 min mit Methanol inkubiert, 5x mit ddH₂O gewaschen und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Im Nassblotverfahren wurden die durch SDS-PAGE (4.7.5) aufgetrennten Proteine auf die Membran transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Der Transfer erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Elektroblobt-Apparatur (BioRad) für 1 h bei 100 V unter Kühlung (Power Supply: Power Pac 200, BioRad). Die auf die Membran transferierten Proteine wurden immunologisch detektiert. Vor der eigentlichen Detektion erfolgte zuerst die Absättigung freier Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in Blocklösung auf einem Schwenktisch für 1 h bei RT. Überschüssige Blocklösung wurde durch eine 5 minütigen Inkubation in Waschlösung entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem spezifischen Antikörper (jeweils verdünnt in Blocklösung) über Nacht bei 4°C unter leichtem Schwenken. Nicht gebundener Antikörper wurde durch viermalige Inkubation in Waschlösung bei RT für je 15 min entfernt. Die Inkubation mit einem in Blocklösung verdünnten Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper, der spezifisch gegen das Fc-Fragment des ersten Antikörpers gerichtet ist, erfolgte für 1 h bei RT unter leichtem Schwenken. Nicht gebundener Zweitantikörper wurde ebenfalls durch viermaliges Waschen entfernt. Der Nachweis des Peroxidase-konjugierten Zweitantikörpers erfolgte mit einem ECL-Detektionssystem über eine Chemilumineszenz-Reaktion. Die Membran wurde mit 10 ml der ECL Detektionslösung bedeckt. Die Reaktion erfolgte in der Dunkelkammer für genau 1 min bei RT. Die feuchte Membran wurde in eine Filmkassette überführt, mit Folie bedeckt und auf Röntgenfilme (Biomax, Kodak) bei RT exponiert. Zur Weiterverwendung wurden die Membranen kurz mit TBS-Tween gewaschen und getrocknet oder erneut für 30-45 min in Blocklösung inkubiert, um in eine neue Immunreaktion eingesetzt zu werden. Getrocknete Membranen wurden vor dem Einsatz in einer weiteren Immunreaktion zunächst mit Methanol benetzt, unter fließendem Wasser (deionisiert) abgespült und für 30-45 min in Blocklösung inkubiert.

Immunologische Reagenzien:

Primäre Antikörper:

anti-14-3-3 α	polyklonales Ziegenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt wurde (# sc-7683 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
anti-14-3-3 β	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# SC-629 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)
anti-bax	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# 06-499 Upstate; Virginia, USA)

anti-Cleaved Caspase 3	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# 9661 Cell Signaling, Frankfurt)
anti-Cdc25A	muriner monoklonaler Antikörper, der im WB in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt wurde (# sc-7389 Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA)
anti-P-Cdc25C (S216)	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt wurde (# 9528 Cell Signaling, Frankfurt)
anti-Cdk1	muriner monoklonaler Antikörper, der im WB in einer Verdünnung von 1:2500 eingesetzt wurde (# C82320 BD Bioscience; San Diego, USA)
anti-P-Cdk1 (Y15)	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# 21944 BD Bioscience; San Diego, USA)
anti-Cdk2	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# 06-505 Upstate; Virginia, USA)
anti-Chk1	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# sc-7898 Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA)
anti-P-Chk1 (S345)	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# 2341 Cell Signaling, Frankfurt)
anti-Chk2	muriner monoklonaler Antikörper, der im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# 05-649 Upstate; Virginia, USA)
anti-P-Chk2 (T68)	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# 2661 Cell Signaling, Frankfurt)
anti-Flag (M2)	muriner monoklonaler Antikörper, der im WB in einer Verdünnung von 1:4000 eingesetzt wurde (# F1804 Sigma; St. Louis, USA)
anti-Geminin	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt wurde (# sc-13015 Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA)
anti-P-Histon H3 (S10)	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# 06-570 Upstate; Virginia, USA)
anti-p21 (H-164)	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# sc-756 Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA)
anti-p53 (SAPU)	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt wurde (S238-120; Scottish Antibody Production Unit, Lanarkshire, Scotland)
anti-p53 (DO-1)	muriner monoklonaler Antikörper, der im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde; erkennt die Aminosäuren 21-25 von humanem p53 (# OP43L Oncogene, Darmstadt)
anti-P-p53 (S15)	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# 9284 Cell Signaling, Frankfurt)
anti-P-p53 (S37)	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# 9289 Cell Signaling, Frankfurt)
anti-P-p53 (S46)	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# 2521 Cell Signaling, Frankfurt)

anti-PIG3	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt wurde (# PC268 Oncogene, Darmstadt)
anti-Cyclin A (H-432)	polyklonales Kaninchenserum, das im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# sc-751 Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, USA)
anti-P-pRb (S795)	polyklonales Kaninchenserum (# 9301 Cell Signaling, Frankfurt)
anti-pRb (unterphosph.)	muriner monoklonaler Antikörper, der im WB in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt wurde (# 554164 BD Bioscience; San Diego, USA)
anti-Cyclin E (HE12)	muriner monoklonaler Antikörper, der im WB in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt wurde (# 554182 BD Bioscience; San Diego, USA)
anti-Cyclin B (GSN-1)	muriner monoklonaler Antikörper, der im WB in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde (# 554177 BD Bioscience; San Diego, USA)

Sekundäre Antikörper:

Ziege anti-Maus IgG (H + L)	konjugiert mit Peroxidase, wurde im WB in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt (Biomol, Hamburg)
Ziege anti-Kaninchen IgG (H + L)	konjugiert mit Peroxidase, wurde im WB in einer Verdünnung von 1:10'000 eingesetzt (Biomol, Hamburg)
Esel anti-Ziege IgG (H + L)	konjugiert mit Peroxidase, wurde im WB in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt (Dianova, Hamburg)

Lösungen:

Transferpuffer:	50 mM Tris 192 mM Glyzin pH 8,3
Waschlösung:	TBS: 20 mM Tris-HCl (pH 7,6) 137 mM NaCl 0,2% Tween [®] 20
Blocklösung	5% Magermilchpulver in Waschlösung

ECL-Detektion:

Lösung 1:	2,5 mM Luminol (3-Aminophthalhydrazid) 400 mM 4-Cumarsäure (p-Hydroxymzimsäure) 100 mM Tris-HCl pH 8,5
Lösung 2:	0,1% H ₂ O ₂ 100 mM Tris-HCl pH 8,5
ECL-Reaktionslösung	5 ml Lösung 1 und 5 ml Lösung 2 unmittelbar vor Verwendung in der Dunkelkammer vermischt.

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

5. Ergebnisse

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

Zur Überprüfung der oben gemachten Annahmen sollte zunächst untersucht werden, ob in wildtyp *p53* (wtp53) Primatenzelllinien der Ausgang der Schadensreaktion tatsächlich durch Variation des Schadensausmaßes gezielt beeinflusst werden kann. Für die Untersuchungen wurden zwei verschiedene wtp53 Primatenzelllinien verwendet, die sich aus unterschiedlichen embryonalen Keimschichten entwickelten. Ausgewählt für die Untersuchungen wurden die humane wtp53 Zelllinie HSC93, ein B-Zelllymphom, und die immortalisierte, diploide wtp53 Epithelzelllinie CV-1 der afrikanischen Grünen Meerkatze. Die Zelllinie CV-1 hat den Vorteil, dass sie nicht transformiert ist, keine offensichtlichen Defekte im schadeninduzierten Signal- und Reparaturweg hat und darüber hinaus sich sehr gut zur Herstellung induzierbarer isogener Zellsysteme eignet (Rohaly et al., 2005). Im Gegensatz zu Maus- bzw. Rattenzellen exprimieren wtp53 Primatenzellen nicht nur p53 sondern auch wildtyp $\Delta p53$ (wt $\Delta p53$), eine kürzlich entdeckte Spleißvariante von p53, die über differenzielle Transaktivierungseigenschaften verfügt und in UV-geschädigten Zellen nach Aktivierung des ATR-vermittelten intra-S-Phasen Kontrollpunkts eine essenzielle Rolle spielt (Rohaly et al., 2005). Unbekannt jedoch ist, ob die differenzielle Transaktivierungseigenschaft von wt $\Delta p53$ von Bedeutung für den Ausgang der Schadensreaktion nach γ -Bestrahlung ist. Zu diesem Zweck wurden die wtp53/wt $\Delta p53$ -exprimierenden Zellen mit je einer subletalen und einer letalen Dosis ionisierender γ -Strahlung geschädigt. Die dabei verwendeten Gy wurden in Hinblick auf den gewünschten Ausgang empirisch ermittelt, wobei 2 Gy für subletale und 10 Gy für letale Schäden appliziert wurden.

5.1 Geringe Strahlenschäden beeinträchtigt das Zellwachstum nicht, während schwere Strahlenschäden Apoptose induzieren

Die Schadensantwort von bestrahlten wtp53 Zellen wurde zunächst durch eine durchflusscytometrische Analyse (FACS-Analyse) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung untersucht. Bei dieser Methode wird die Verteilung einer Zellpopulation auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus über die Fluoreszenzintensität des DNA-Interkalators Propidiumiodid erfasst, die wiederum direkt proportional zum DNA-Gehalt der Zelle ist. Neben G1, S und G2/M-Zellen können daher auch DNA-haltige Zellfragmente, wie sie bei

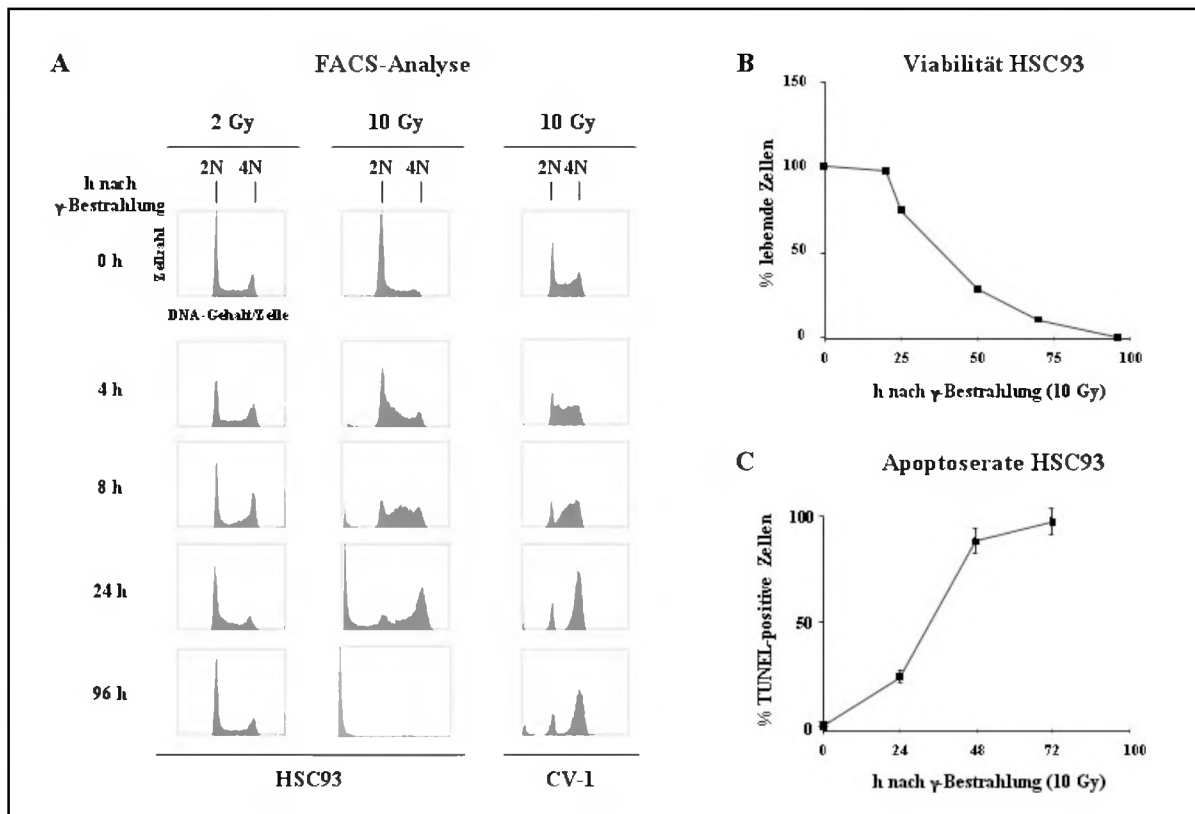


Abb. 5-1: Analyse der Apoptose-Induktion in Abhängigkeit von der Schwere des DNA Schadens. (A) Zellzyklusprofile bestrahlter wtp53 Primatenzellen. Asynchron wachsende Zellen wurden mit 2 Gy und 10 Gy bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit Ethanol fixiert. Für die durchflusscytometrische Analyse wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und jeweils 10.000 Zellen erfasst. Zwei Gy bestrahlte Zellen zeigen temporäre Veränderungen in der Zellzyklusverteilung. Bestrahlung mit 10 Gy führt zur DNA-Fragmentierung, sichtbar als sub-G1 Fraktion. (B) Apoptotische Ereignisse wurden zusätzlich mit der TUNEL-Methode gemessen, mit der BrdU-markierte fragmentierte DNA unter Verwendung eines FITC-gekoppelten anti-BrdU Antikörpers nachgewiesen wird. Pro Ansatz wurden 10.000 Ereignisse gezählt und über einen 605/35 Bandpassfilter (Propidiumiodid-Signal, Gesamt-DNA pro Zelle) und einen 505/25 Bandpassfilter (FITC-Signal, fragmentierte DNA) detektiert. (C) Bestimmung der Überlebens- bzw. Apoptoserate bestrahlter humaner HSC93 Zellen. Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und zu den angegebenen Zeiten erfolgte die Ermittlung der Viabilität mittels Trypanblaufärbung.

der Apoptose entstehen, erfasst und unterschieden werden. Veränderungen des FACS-Profiles geben wichtige Hinweise auf die Aktivierung der schadeninduzierten Kontrollpunkte und Eliminierungsprozesse.

Wie aus **Abb. 5-1 A** ersichtlich ist, reagieren HSC93 Zellen auf Bestrahlung mit 2 Gy oder 10 Gy sehr verschieden. Ausgehend von einem für proliferierende Zellkulturen normalen FACS-Profil bei unbestrahlten Zellen mit ca. 65 % G1-Phase Zellen (DNA-Gehalt: 2N), 15 % S-Phase Zellen (DNA Gehalt zwischen 2 und 4N) und 20 % G2/M-Phase Zellen (DNA Gehalt 4N) führen sowohl 2 Gy als auch 10 Gy zu signifikanten Änderungen in der Verteilung der Zellpopulation auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Dieser Befund zeigt, dass Bestrahlung die Zellzyklusprogression der Zellen beeinflusst. Auch geringe Schäden sind somit offenbar ausreichend, um eine deutlich erfassbare Schadensantwort in HSC93 Zellen hervorzurufen.

Aus den FACS-Profilen ist ersichtlich, dass sich Qualität und Kinetik der durch unterschiedliche Strahlenschäden induzierten Schadensantworten unterscheiden: Während die Bestrahlung mit 2 Gy nur zu temporären Veränderungen führt, die sich in der Zunahme der G2-Population 8 h nach Bestrahlung deutlich bemerkbar macht, und die FACS-Profile zum Ende des Beobachtungszeitraums wieder eine normale Zellzyklusphasenverteilung zeigen, induzieren starke DNA-Schäden (10 Gy) apoptotische Ereignisse. Nach Bestrahlung mit 10 Gy erscheint bereits 8 h nach Schadensinduktion ein zusätzlicher *peak* im FACS-Profil links von der Position der G1-Zellen. Dieser *peak* repräsentiert DNA-haltige Fragmente mit einem sub-G1 DNA-Gehalt, wie sie im Zuge des apoptotischen Prozesses gebildet werden. Die sub-G1 Fraktion nimmt kontinuierlich zu und beinhaltet 24 h nach Bestrahlung ca. 25 % aller Zellen. Die stetige Zunahme solcher Zelltrümmer während des Beobachtungszeitraums spricht stark dafür, dass die Bestrahlung mit 10 Gy in wtp53 HSC93 Zellen das apoptotische Programm aktiviert und eine derart bestrahlte Zellpopulation durch den Prozess des programmierten Zelltods vollständig eliminiert wird, wie dies aus dem vier Tage nach Bestrahlung erstelltem FACS-Profil sowie der mit Trypanblaufärbung ermittelten Überlebensrate (**Abb. 5-1 B**) hervorgeht. Die Bestrahlung der Epithelzelllinie CV-1 mit 2 Gy oder 10 Gy ergab vergleichbare Ergebnisse, jedoch waren apoptotische Ereignisse in der FACS-Analyse wesentlich später und zwar erst 24 h nach Bestrahlung eindeutig zu erkennen (**Abb. 5-1A**, Daten für 2 Gy nicht gezeigt). Ein Hinweis für apoptotische Ereignisse, die in mit 10 Gy bestrahlten CV-1 Zellen besonders gut erkennbar sind, ist die Verbreiterung der G2-Phase Population nach links (24 h nach Bestrahlung), hervorgerufen durch DNA Fragmentierung. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass der Zeitpunkt der Induktion von apoptotischen Ereignissen abhängig von der embryonalen Keimschicht ist, aus der sich die somatischen Zellen entwickelten. Demnach werden schwer geschädigte Zellen des lymphatischen Systems schneller eliminiert als Epithelzellen.

Die durchflusscytometrische Erfassung apoptotischer Zellen kann neben der Bestimmung der sub-G1 Population auch mit der TUNEL-Methode (*TdT mediated dUTP nick end labeling*) erfolgen. Die Methode basiert auf dem „tail labeling“ der in apoptotischen Zellen erzeugten DNA Strangbrüche; dabei werden mit Fluorochrom-gekoppelte Desoxynukleotidderivate an die 3'-OH Enden unter Verwendung des Enzyms Terminale Desoxynukleotidyl Transferase angehängt. Der Einbau von Fluorochrom-gekoppelten Desoxynukleotiden in die fragmentierte DNA erzeugt TUNEL-positive Zellen und erlaubt somit den Nachweis von apoptotischen Zellen mittels FACS-Analyse (**Abb. 5-1C**).

Ein zentrales Ereignis des Apoptoseprogramms einer Zelle ist die Aktivierung einer spezifischen Endonuklease, die die genomische DNA internukleosomal zunächst in Fragmente von 180-200 bp schneidet, die anschließend in kleinere 50-10 kb große Fragmente degradiert werden. Die fragmentierte DNA lässt sich im Agarose Gel als charakteristische DNA Leiter darstellen und gibt deshalb zuverlässig Auskunft über apoptotische Ereignisse. Mit dieser Nachweismethode lässt sich zeigen, dass mit 10 Gy, aber nicht mit 2 Gy bestrahlte HSC93 und CV-1 Zellen die charakteristische DNA Leiter aufweisen (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt zeigt sich damit, dass durch Unterschiede im Ausmaß eines induzierten DNA-Schadens der Ausgang der Schadensreaktion gezielt beeinflusst werden kann. Schädigung mit 2 Gy führt nur zur temporären Veränderungen in der Zellzyklusprogression, die sich vor allem in der Zunahme der G2-Population bzw. als Attenuation der G2-Phasen Progression bemerkbar macht. Auch Zellen die mit 10 Gy bestrahlt werden zeigen 24 h nach Bestrahlung eine deutliche Zunahme der G2-Population. Aus diesen Befunden lässt sich schließen, dass der G2-Kontrollpunkt unabhängig von der Schwere des Schadens aktiviert wird. Bei subletalen Schäden ist die Aktivierung des G2-Kontrollpunkts temporär, der zu Gunsten der Zellproliferation aufgehoben wird. Im Gegensatz dazu weisen schwer geschädigte Zellen auf einen „permanenten“ G2-Arrest bzw. G2-„Exit“ hin, der jedoch bei B-Zell Lymphoma sowie Epithelzellen nicht vor der Aktivierung des zellulären Eliminierungsprogramms schützt.

5.2 Aktivierung des G2-Kontrollpunkts ist unabhängig von der Position der Zelle im Zellzyklus zum Zeitpunkt der Bestrahlung

Die Bestrahlung von asynchronen wtp53 Zellen mit 2 Gy führt zur Induktion des G2-Kontrollpunktes, der nach einiger Zeit zu Gunsten der Zellproliferation wieder aufgehoben wird (**Abb. 5-1A**, linke Spalte). Die Verwendung einer asynchron wachsenden Zellpopulation gibt jedoch keinen Hinweis darauf, inwieweit die Aktivierung des schadeninduzierten G2-Kontrollpunkts abhängig von der Position der Zelle im Zellzyklus zum Zeitpunkt der Schädigung ist. Zur Klärung dieser Frage wurden asynchrone HSC93 Zellen in die diskreten Phasen des Zellzyklus mittels Gegenstromzentrifugation (Elutriation) getrennt. Diese Trennungsmethode einer asynchron wachsenden Zellpopulation beruht auf den verschiedenen Sedimentationseigenschaften der G1-, S- und G2-Phase Zellen, die sich durch die unterschiedliche Größe und Dichte auf Grund des zellzyklusabhängigen DNA-Gehaltes (2N-4N) ergeben. **Abb. 5-2A** zeigt das Elutriations-Profil von HSC93, das sich aus der Zuordnung der Zellzahl pro Fraktion zur Position im Zellzyklus erstellen lässt. Darüber hinaus wurde die Zuordnung der Zellfraktionen zu den definierten Zellzyklusphasen durch den Nachweis von zellzyklusregulierenden Faktoren ermittelt. Ein Faktor, der während der Zellzyklusprogression von G1 nach S phosphoryliert wird ist das Retinoblastomagenprodukt pRB. Für den Nachweis von unterphosphoryliertem pRB im Western Blot wurde ein spezifischer Antikörper verwendet, der nur die hypophosphorylierte Form erkennt. Wie **Abb. 5-2B** zeigt, ist die hypophosphorylierte Form von pRB nur in der G1-Phase, aber nicht nach dem Übergang in die replikative S-Phase auf Grund der Cyclin E-Cdk2-katalysierten Phosphorylierung detektierbar (s. **Abb. 3-4**). Als zusätzliche Marker zur Verifizierung der Zellzyklusphasenauftrennung dienten die regulatorischen Cdk-Untereinheiten Cyclin E, A und B. Cyclin E, die regulatorische Untereinheit der G1- und G1/S-Phase spezifischen Cdk2 Kinase, wird in der Mitte der S-Phase (Fraktion 5) abgebaut, während das S- und S/G2-Phase spezifische Cyclin A nach der späten G1-Phase (Fraktion 2) und das G2-Phase bzw. Mitose spezifische Cyclin B ab dem G1/S-Übergang (Fraktion 3) kontinuierlich ansteigt (**Abb. 5-2B**). Somit bestätigt das Expressionsmuster der zellzyklusregulierenden Faktoren das mittels FACS-Analyse erhaltene Elutriations-Profil.

Für die Bestrahlungsexperimente zur Ermittlung inwieweit die Position der Zelle zum Zeitpunkt der Bestrahlung eine Rolle bei der Induktion des G2-Kontrollpunkts spielt, wurden die Zellzyklusphasen G1 (Fraktion 1), G1/S (Fraktion 3), früh-S (Fraktion 4), spät-S (Fraktion 6), S/G2 (Fraktion 7) sowie früh-G2 (Fraktion 8) verwendet. Nach Bestrahlung mit 2 Gy

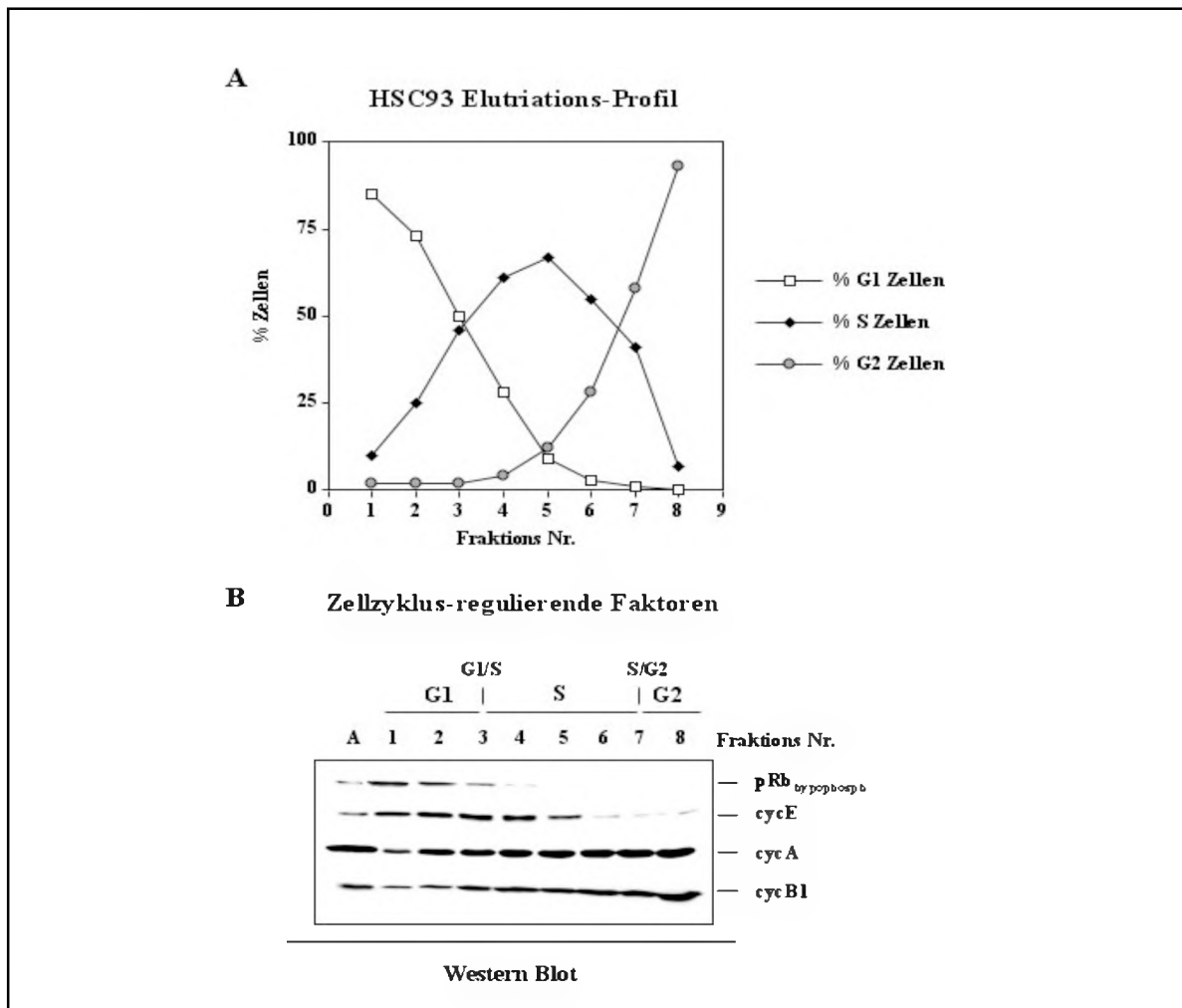


Abb. 5-2: Analyse zellzyklusregulierender Faktoren elutrierter wtp53 HSC93 Zellen. (A) Exponentiell wachsende HSC93 Zellen wurden in die diskreten Phasen des Zellzyklus durch Gegenstromzentrifugation getrennt. Von jeder Fraktion wurden 10^6 Zellen fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Bei der durchfluscytometrischen Analyse zur Bestimmung des DNA Gehalts wurden je 10.000 Zellen erfasst. (B) Western Blot elutrierter HSC93 Zellen. Von jeder Fraktion wurden $100 \mu\text{g}$ Gesamtzellextrakt (Spur 1-8) für die Western Blot Analyse aufbereitet. Als Kontrolle (A) wurde Lysat von asynchron wachsenden HSC93 Zellen mitgeführt. Der Nachweis von zellzyklusregulierenden Faktoren erfolgte mit spezifischen Antikörpern.

wurde die Zellzyklusphasenverteilung 4 h und 8 h nach Bestrahlung durchfluscytometrisch ermittelt.

Zur Ermittlung der ungestörten Progression durch den Zellzyklus wurden die entsprechenden unbestrahlten Fraktionen jeweils 4 h und 8 h nach Reaktivierung einer FACS-Analyse unterzogen und die erhaltenen Profile mit denen der bestrahlten Fraktionen verglichen (**Abb. 5-3**). Die Messung der Verteilung der Zellpopulation auf die verschiedenen Zellzyklusphasen zeigt, dass unabhängig von der Position der Zelle im Zellzyklus zum Zeitpunkt der Bestrahlung der G2-Kontrollpunkt immer ausgelöst wird, der deutlich am

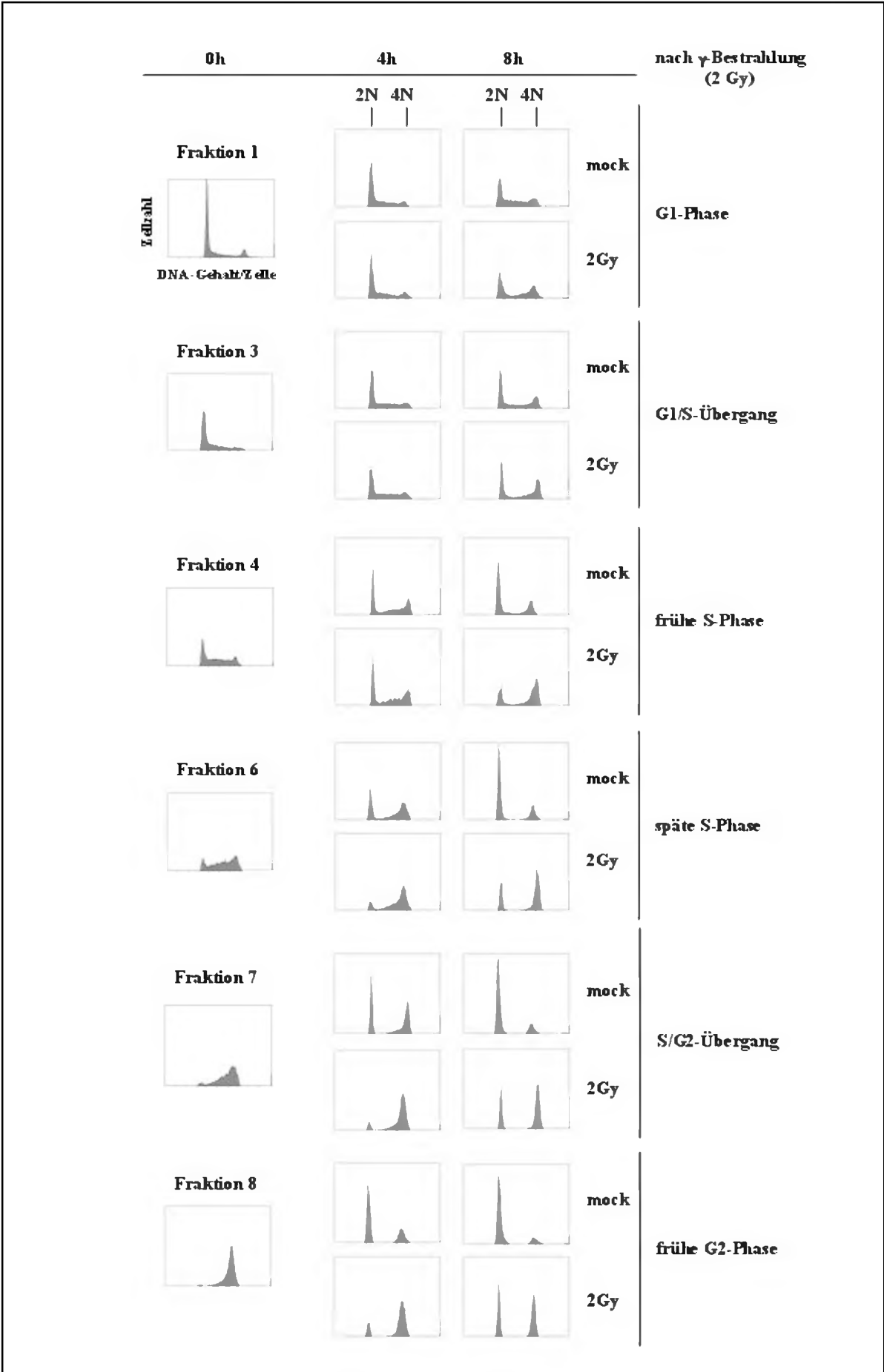


Abb. 5-3: Aktivierung des G2-Kontrollpunkts in Abhängigkeit der Position der Zelle zum Zeitpunkt der DNA Schädigung. Zellzyklusprofile unbestrahlter und bestrahlter HSC93 Zellen zu definierten Zeiten im Zellzyklus. Die elutrierten Zellen wurden zu den angegebenen Positionen im Zellzyklus mit 2 Gy bestrahlt bzw. für die Kontrollexperimente nicht bestrahlt („mock“) und 4 h sowie 8 h später mit Ethanol fixiert. Für die durchflusscytometrische Analyse wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und jeweils 10.000 Zellen erfasst.

erhöhten G2-Phasen Anteil erkennbar ist. Zellen, die in der frühen G1-Phase geschädigt werden aktivieren zusätzlich den G1-Kontrollpunkt, der auf Grund des reduzierten S-Phasen Anteils 8 h nach Bestrahlung im FACS-Profil gut erkennbar ist (**Abb. 5-3**, Fraktion 1). Auch Zellen die in der späten S-Phase, am S/G2-Übergang oder in der frühen G2-Phase bestrahlt wurden zeigen eine deutliche Akkumulation an G1-Phase Zellen. Allerdings ist diese G1-Akkumulation nicht auf die Aktivierung des schadeninduzierten G1-Kontrollpunkts zurückzuführen sondern auf einen Wachstumsarrest, der durch Verdoppelung der Zellzahl in den darauf folgenden 8 h (s. **Abb. 3-3**) unter Verbrauch des Kulturmediums hervorgerufen wird. Die Verdoppelung der Zellzahl findet trotz der DNA Schädigung auf Grund der temporären Aktivierung des G2-Kontrollpunkts statt. Diese auch als Dichtearretierung bezeichnete Reaktion ist ebenfalls gut erkennbar in den unbestrahlten Zellfraktionen Nr. 6, 7 und 8, deren Zellzyklusprofile 4 h bzw. 8 h nach Reaktivierung auf Grund der fehlenden S-Phase einen Proliferationsstopp aufweisen (**Abb. 5-3**).

5.3 Wtp53 Zellen, die am G1/S-Übergang geschädigt werden, attenuieren sowohl die S- als auch die G2-Phasen Progression unabhängig von der Schwere des Schadens

Zusätzlich zur Attenuation der G2-Phase zeigen HSC93 Zellen, die am G1/S-Übergang mit 2 Gy bestrahlt wurden, eine etwas verlangsamte S-Phasen Progression, die sich durch den verzögerten Eintritt der Zellen in die G2-Phase bemerkbar macht (**Abb. 5-2**, Fraktion 3). Die Verlangsamung der S-Phasen Progression ist ein erster Hinweis auf die Aktivierung des intra-S-Phasen Kontrollpunkts, der eindeutig in mit UV-Licht bestrahlten wtp53 Zellen nachgewiesen wurde (Rohaly et al., 2005). Schädigung der DNA mit UV-Licht unmittelbar vor Beginn der DNA Replikation, also am G1/S-Übergang, führt zur Aktivierung des ATR-vermittelten intra-S-Phasen Kontrollpunkts. In der FACS-Analyse ist die Aktivierung dieses schadeninduzierten Kontrollpunkts an der Akkumulation von Zellen in der replikativen S-Phase und an dem verzögerten Eintritt in die G2-Phase gut erkennbar (Rohaly et al., 2005). Zur genaueren Überprüfung inwieweit γ -Strahlung ebenfalls zur Aktivierung des intra-S-Phasen Kontrollpunkts führt, wurden wtp53 HSC93 Zellen mittels einer präparativen Gegenstromzentrifugation am G1/S-Übergang angereichert, mit 2 Gy bestrahlt und die

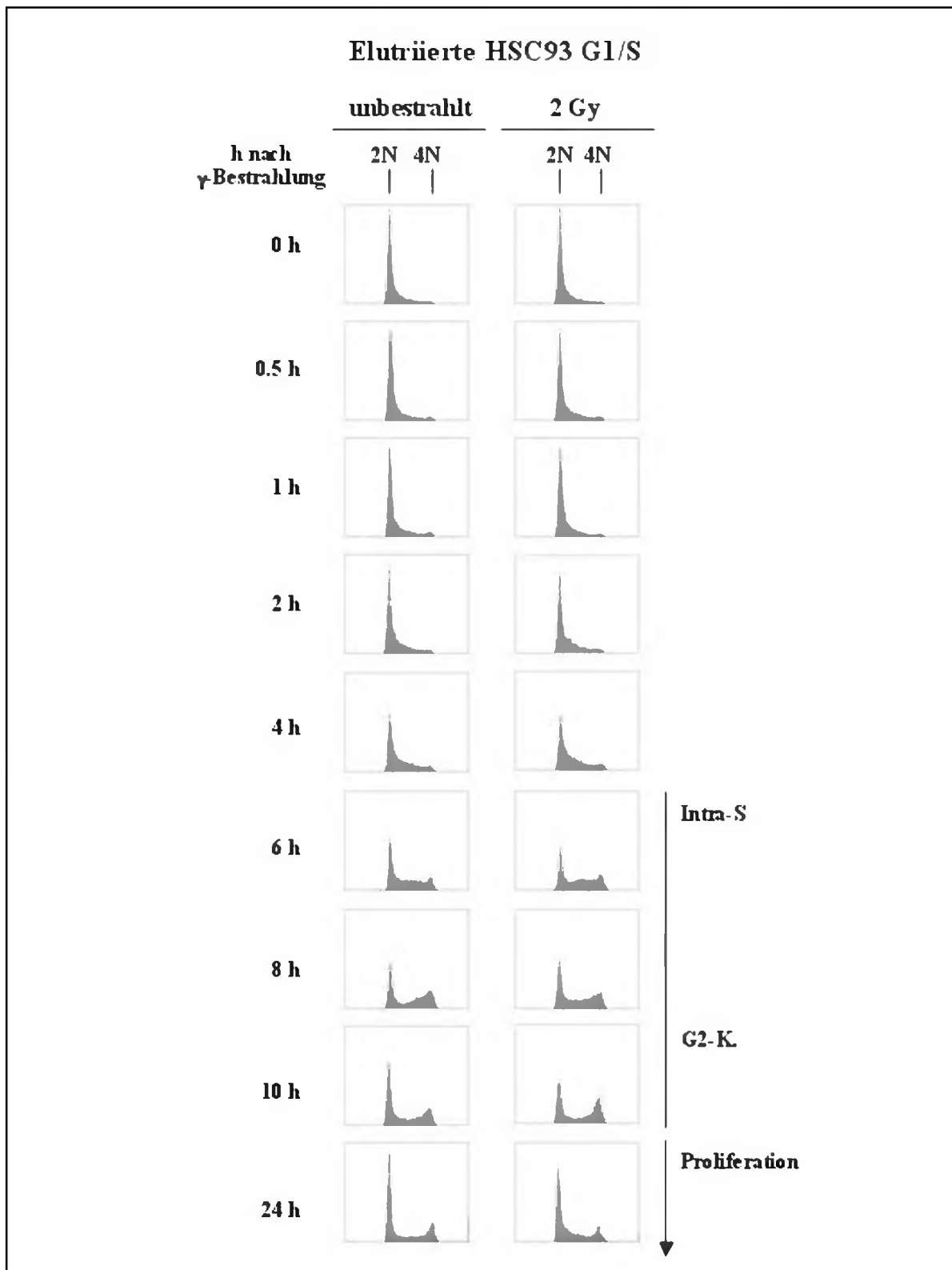


Abb. 5-4: FACS-Analyse elutriierter HSC93 Zellen, unbestrahlt und mit 2 Gy am G1/S-Übergang bestrahlt. Ausgehend vom G1/S-Übergang (0 h) wurden unbestrahlte sowie bestrahlte Zellen 24 h lang weiter kultiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen mit Ethanol fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Bei der durchflusszytometrischen Analyse zur Bestimmung des DNA Gehalts wurden je 10.000 Zellen erfasst. Bestrahlte Zellen zeigen temporäre Veränderungen in der S- und G2-Phasenverteilung, gekennzeichnet als intra-S und G2-Kontrollpunkt.

Zellzyklusprogression zu definierten Zeiten nach Bestrahlung durchflusscytometrisch analysiert. Die FACS-Analyse (**Abb. 5-4**) zeigt im Vergleich zu den unbestrahlten HSC93 Zellen, dass Bestrahlung am G1/S-Übergang zur Verlangsamung der S-Phasen Progression (6 h nach Bestrahlung) und somit zum verzögerten Eintritt in die G2-Phase führt (8 h nach Bestrahlung). Darüber hinaus ist neben der Attenuation der S-Phasen Progression, die Aktivierung des G2-Kontrollpunkts 10 h nach Bestrahlung deutlich zu erkennen.

Um auszuschließen, dass dieser Befund nur für die humane Zelllinie wtp53 HSC93 gilt, wurde das Experiment mit synchronisierten wtp53 CV-1 Zellen wiederholt. Jedoch erfordern die adhärent wachsenden Epithelzellen CV-1 eine andere Synchronisationsmethode als die in Suspension wachsenden HSC93 Zellen. Adhärent wachsende Zellen können, solange sie funktionelles pRB exprimieren, durch Entzug der Aminosäure Isoleucin in G0/G1 arretieren und nach Zugabe von Isoleucin-haltigem Medium synchron in den Zellzyklus entlassen werden. **Abb. 5-5** zeigt den Verlauf der Zellzyklusprogression ausgehend vom G1/S-Übergang (0 h Wert) unbestrahlter CV-1 Zellen. Aus der FACS-Analyse geht hervor, dass in unbestrahlten CV-1 Zellen die replikative S-Phase nach 8 h beendet ist und nach dem Durchlaufen der vierstündigen G2-Phase mit anschließender Mitose die nächste G1-Phase beginnt. Demnach brauchen Isoleucin-synchronisierte, unbestrahlte CV-1 Zellen beginnend vom G1/S-Übergang 12 h bis zum Eintritt in die nächste Proliferationsrunde. Im Gegensatz zu den unbestrahlten CV-1 Zellen, zeigt die durchflusscytometrische Analyse der am G1/S-Übergang mit 2 Gy bestrahlten Zellen 4 h nach Bestrahlung eine attenuierte S-Phasen Progression, die sich 10 h nach Bestrahlung in eine G2-Phasen Attenuation manifestiert, die schließlich zu Gunsten der Proliferation aufgehoben wird. Die FACS-Daten zeigen, dass bei Bestrahlung mit 2 Gy im Gegensatz zu den unbestrahlten G1/S-Zellen, die Zellzyklusprogression um ca. 2 h verlängert ist, wodurch sich der Eintritt der Zellen in die nächste Proliferationsrunde dementsprechend verlängert. Gravierender wirkt sich die Bestrahlung mit 10 Gy auf die Zellzyklusprogression aus. Die S-Phasen Attenuation ist wesentlich stärker ausgeprägt und nach Progression der Zellen in die G2-Phase arretieren diese bis 24 h nach Bestrahlung. Zu diesem Zeitpunkt zeigen die Zellen einen breiter werdenden G2-DNA Gehalt sowie eine kleine sub-G1 Fraktion, die 72 h nach Bestrahlung deutlich zunimmt. Beide Ereignisse sind eindeutige Anzeichen für den Abbau von DNA und somit den induzierten Eliminierungsprozess (Liu et al., 1997; Vaux, 2002).

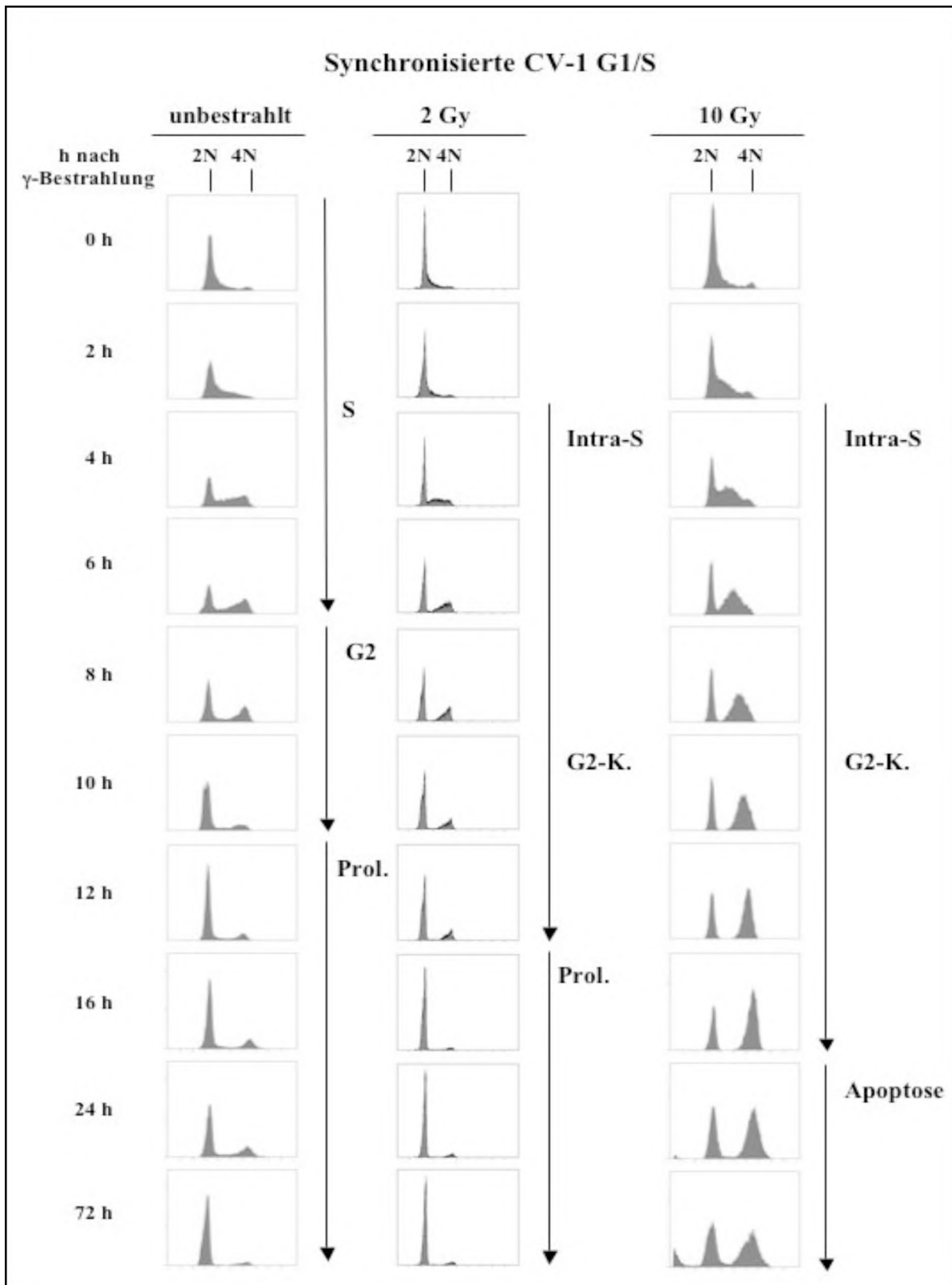


Abb. 5-5: FACS-Analyse Isoleucin-synchronisierter CV-1 Zellen, unbestrahlt und mit 2 Gy, 10 Gy am G1/S-Übergang bestrahlt. Ausgehend vom G1/S-Übergang (0 h) wurden unbestrahlte sowie bestrahlte Zellen 72 h lang weiter kultiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen mit Ethanol fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Bei der durchflusscytometrischen Analyse zur Bestimmung des DNA Gehalts wurden je 10.000 Zellen erfasst. Zwei Gy bestrahlte Zellen zeigen temporäre Veränderungen in der S- und G2-Phasenverteilung. Bestrahlung mit 10 Gy führt zur Aktivierung der intra-S- und G2-Kontrollpunkte sowie apoptotischer Ereignisse, sichtbar als sub-G1 Fraktion.

Aus diesem Experiment geht hervor, dass bei Schädigung der Zellen am G1/S-Übergang unabhängig vom Ausmaß des induzierten DNA-Schadens immer die Kontrollpunkte intra-S und G2 aktiviert werden. Dieser Befund ist ein erster Hinweis dafür, dass wtp53 Zellen, die am G1/S-Übergang mit γ -Strahlung geschädigt werden anders reagieren als wtp53 Zellen, die mit UV-Licht bestrahlt wurden. Am G1/S-Übergang mit UV-Licht geschädigte wtp53 Primatenzellen aktivieren in Abhängigkeit von funktionellem wt Δ p53 ausschließlich den intra-S aber nicht den G2-Kontrollpunkt (Rohaly et al., 2005). Jedoch ist hinsichtlich der molekularen Mechanismen, die in Abhängigkeit der Schadensart und Position der Zelle im Zellzyklus zum Zeitpunkt der Schädigung diese unterschiedlichen Schadensreaktionen induzieren und regulieren, nur wenig bekannt.

5.4 Wtp53 Zellen, die am G1/S-Übergang geschädigt werden, aktivieren unabhängig von der Schwere des Schadens sowohl den ATM- als auch den ATR-induzierten Kontrollpunkt

Die Beobachtung, dass γ -Bestrahlung von Zellen, die sich am G1/S-Übergang befinden, sowohl den intra-S- als auch den G2-Kontrollpunkt auslöst, wurde auf der biochemischen Ebene näher untersucht. Die erfolgte Aktivierung der schadeninduzierten Signalkaskade kann durch den Nachweis von phosphoryliertem Chk1 und Chk2 erbracht werden. Diese Kinasen sind einer der ersten Zielproteine, die unmittelbar nach DNA Schädigung von den schadensspezifischen PIK Kinasen ATR und ATM an definierten Aminosäureresten modifiziert und somit aktiviert werden. Für diese Untersuchungen wurden Isoleucin-synchronisierte wtp53 CV-1 Zellen, die am G1/S-Übergang mit 2 Gy oder 10 Gy bestrahlt wurden, verwendet.

Die Western Blot Analyse von 2 Gy bestrahlten CV-1 Zellen zeigt, dass bereits 1 h nach Bestrahlung die schadensspezifische Kinase Chk2 am Threoninrest 68 phosphoryliert und somit die ATM-vermittelte Phosphorylierungskaskade aktiviert ist (**Abb. 5-6A**). Die Phosphorylierung von Chk2 verläuft in zwei Wellen, die 1-2 h und 10-12 h nach Bestrahlung am G1/S-Übergang auftreten. Diese biphasisch verlaufende Phosphorylierung von Chk2 weist darauf hin, dass Chk2 sowohl bei der Aktivierung des intra-S- als auch des G2-Kontrollpunkts involviert ist. Die Dephosphorylierung von Chk2 12 h nach Bestrahlung korreliert mit dem Zeitpunkt bei dem der temporäre G2-Kontrollpunkt zu Gunsten der Proliferation aufgehoben wird, wie dies bereits aus der FACS-Analyse ersichtlich war (**Abb. 5-5**, mittlere Spalte). Zusätzlich zur Chk2-Modifikation, erfolgt die Phosphorylierung von Chk1 am Serinrest 345,

die von 1-6 h nach Bestrahlung deutlich detektierbar ist und vermutlich eine Funktion im intra-S-Phasen Kontrollpunkt hat.

Ein verändertes Phosphorylierungsmuster präsentiert sich bei CV-1 Zellen, die am G1/S-Übergang mit 10 Gy bestrahlt wurden. Der Phosphorylierungsverlauf von Chk2 zeigt sich ebenfalls biphasisch, der jedoch in der zweiten Phase bis 16 h nach Bestrahlung anhält (**Abb. 5-6B**). Deutlicher ist der Phosphorylierungsunterschied für die Kinase Chk1 zu erkennen. In 10 Gy bestrahlten Zellen beginnt die Phosphorylierung und somit die ATR-vermittelte Aktivierung dieser Kinase erst 8 h nach Bestrahlung, zu einem Zeitpunkt, bei dem die geschädigten Zellen in der G2-Phase akkumulieren (**Abb. 5-5**, rechte Spalte). Diese Befunde weisen darauf hin, dass in schwer geschädigten Zellen die Aktivität von Chk1 zwar nicht für den intra-S- aber für den G2-Kontrollpunkt eine Rolle spielen könnte. Dies würde bedeuten, dass in γ -bestrahlten wtp53 Zellen ATM den intra-S- und ATR den G2-Kontrollpunkt aktiviert. Chk1 wird wie auch Chk2 16 h nach Bestrahlung dephosphoryliert, ein Ereignis das auf die Termination des G2-Kontrollpunkts bzw. Exit hinweist und mit der Induktion apoptotischer Ereignisse, wie dies bereits aus der FACS-Analyse ersichtlich war (**Abb. 5-5**, rechte Spalte), korreliert.

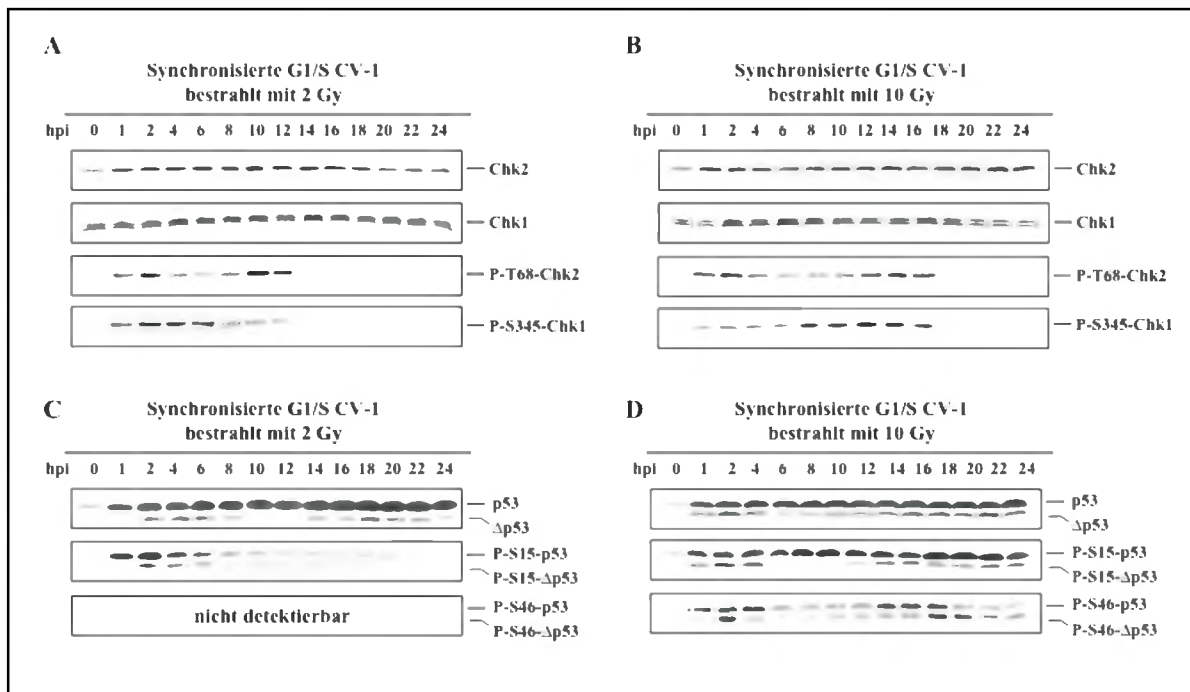


Abb. 5-6: Aktivierung der schadeninduzierten ATM/ATR-Signalwege in Abhängigkeit der Schwere des DNA Schadens. Synchronisierte CV-1 Zellen wurden am G1/S-Übergang (0) mit 2 Gy (**A**, **C**) oder 10 Gy (**B**, **D**) bestrahlt, zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und in einer Western Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern untersucht. Bestrahlung mit 2 Gy oder 10 Gy führen zu Unterschieden in der Phosphorylierung von Chk2, Chk1 (**A**, **B**) sowie Stabilisierung und Phosphorylierung von p53 und Δ p53 (**C**, **D**).

Der Tumorsuppressor p53 gilt als einer der Schlüsselfaktoren in der zellulären Reaktion auf DNA-Schäden (Jin und Levine, 2001). Wie zahlreiche Untersuchungen belegen, spielt p53 eine Rolle sowohl bei der Schadensantwort, die ein Überleben der geschädigten Zelle ermöglicht wie auch bei der Eliminierung von Zellen durch Apoptose (Vousden und Lu, 2002; Oren, 2003). Kürzlich wurde auch eine neue p53-Isoform entdeckt, die eine wichtige Funktion im schadeninduzierten intra-S-Phasen Kontrollpunkt ausübt (Rohaly et al., 2005); unbekannt jedoch ist, ob Δ p53 auch an den apoptotischen Prozessen beteiligt ist.

Um zu untersuchen, inwieweit p53 und die neue Spleißvariante Δ p53 an den γ -induzierten Schadensreaktionen beteiligt sind, wurden diese p53-Proteine zunächst im Western Blot analysiert. Als zentrale Kennzeichen einer Aktivierung von p53 und Δ p53 gelten die Stabilisierung auf Proteinebene sowie die Phosphorylierung durch die PIK Kinasen ATM/ATR an Serin-15 (Jin und Levine, 2001; Rohaly et al., 2005). Wie **Abb. 5-6C, D** zeigt, gibt es in Abhängigkeit der Schwere des Schadens erhebliche Unterschiede in der Stabilisierung sowie im Phosphorylierungsmuster zwischen p53 und Δ p53. Zunächst ist offensichtlich, dass die Stabilisierung beider p53 Proteine sowie deren Phosphorylierung am Serinrest 15 unabhängig voneinander reguliert werden. Sowohl bei den 2 Gy als auch bei den 10 Gy bestrahlten Zellen ist stabilisiertes p53 im Zeitraum zwischen 1 und 24 h deutlich zu sehen, während Δ p53 bei den 2 Gy bestrahlten Zellen zu den Zeitpunkten 2-8 h sowie 14-22 h und bei den 10 Gy bestrahlten Zellen zu den Zeitpunkten 1-4 h sowie 8-24 h detektierbar ist. Der biphasische Verlauf von stabilisiertem Δ p53 korreliert mit der Phosphorylierung am Serinrest 15 in 10 Gy bestrahlten Zellen, dagegen ist in 2 Gy bestrahlten Zellen Δ p53 nur von 2-6 h phosphoryliert. Auch p53 ist am Serinrest 15 nur in den ersten 6 h nach 2 Gy γ -Bestrahlung deutlich phosphoryliert, während die Schädigung mit 10 Gy ebenfalls einen biphasischen Phosphorylierungsverlauf erzeugt. Darüber hinaus ist in schwer geschädigten CV-1 Zellen p53 und Δ p53 am Serinrest 46 phosphoryliert (**Abb. 5-6D**). Diese Modifikation zeigt ebenfalls für beide Proteine einen biphasischen Verlauf und tritt sowohl zum Zeitpunkt des intra-S-Kontrollpunkts (ersten 4 h nach Bestrahlung) als auch nach Aktivierung des G2-Kontrollpunkts (12 h nach Bestrahlung) mit anschließendem „Exit“ (14 h nach Bestrahlung) und der Induktion der apoptotischen Vorgänge (18 h nach Bestrahlung) auf. Auffällig ist die sequenzielle Phosphorylierung und Dephosphorylierung von p53 und Δ p53 14-24 h nach Bestrahlung. Bekannt ist, dass nur bei sehr hoher γ -Strahlung p53 an Serin-46 durch die Kinase HIPK2 modifiziert wird und ein Indikator für die Induktion des programmierten Zelltods ist (Oda et al., 2000b). Die Western Blot Analyse weist jedoch darauf hin, dass auch

$\Delta p53$, auf Grund der Serin-46 Phosphorylierung, an der Induktion apoptotischer Vorgänge beteiligt sein könnte.

Insgesamt zeigt sich, dass unabhängig von der Schwere des Schadens beide Proteine stabilisiert werden, wobei die Hochregulation von p53 kontinuierlich und die von $\Delta p53$ biphasisch verläuft. Im Gegensatz dazu beeinflusst das Schadensausmaß die Serin-15 Phosphorylierung und somit die Aktivierung der p53 Proteine: Bestrahlung mit 2 Gy führt zur Serin-15 Phosphorylierung nur in den ersten 6 h, während in 10 Gy bestrahlten Zellen die Modifikation dieses Aminosäurerests dem Stabilisierungsverlauf beider Proteine entspricht. Vermutlich erfolgt die Dephosphorylierung von p53 und $\Delta p53$ über die p53-induzierte Serin/Threonin Phosphatase PPM1D, die nicht nur p53 sondern auch Chk1 dephosphoryliert und eine essenzielle Rolle bei der Aufhebung des intra-S- und G2-Kontrollpunkts spielt (Lu et al., 2005). Dieser Befund ist ein erster Hinweis dafür, dass die Schwere des Schadens den Ausgang der Schadensantwort durch Modulation der ATM/ATR-vermittelten Signalkaskade mittels der Effektoren p53 und $\Delta p53$ determinieren könnte zumal diese nur nach letalen Schäden von der schadensspezifischen Kinase HIPK2 am Serinrest 46 phosphoryliert werden.

Die Beobachtung, dass in letal geschädigten Zellen die sequenzielle Aktivierung der Kontrollpunkte intra-S und G2 über die ebenfalls sequenziell induzierte ATM- und ATR-vermittelte Signalkaskade erfolgt, lässt vermuten, dass in γ -bestrahlten Zellen ATM für die Aktivierung des intra-S-Kontrollpunkts und ATR für die Aktivierung des G2-Kontrollpunkts benötigt wird. Diese Annahme wurde mit humanen, nicht immortalisierten wtp53 AT5 Zellen näher untersucht. AT5 Zellen stammen von einem Patienten mit *Ataxia telangiectasia*, einer genetisch bedingten Krankheit bei der die PIK Kinase ATM durch Mutation inaktiviert ist. Die FACS-Analyse zeigt 4 h nach Bestrahlung der asynchron wachsenden wtp53 AT5 Zellen keine Attenuation der S-Phasen Progression (**Abb. 5-7**, linke Spalte), die in geschädigten ATM-intakten wtp53 HSC93 Zellen auf Grund der S-Phasen Akkumulation gut zu erkennen ist (**Abb. 5-1A**). Diese Beobachtung korreliert mit dem Befund, dass bei ATM-Patienten auch bei sehr hoher DNA Schädigung kein Replikationsarrest und somit kein intra-S-Kontrollpunkt auslösbar ist. Deutlich ausgeprägt ist die Erhöhung der Zellpopulation in G1 und G2 8 h nach Bestrahlung, die für die Aktivierung des G1- und G2-Kontrollpunkts spricht. Dieser Befund zeigt, dass im Gegensatz zu den beiden anderen Kontrollpunkten, der intra-S-Kontrollpunkt abhängig von der ATM-initiierten Signalkaskade ist. Darüber hinaus erwies sich ATR als die PIK Kinase, deren Aktivität essenziell für die Initiation des G2-Kontrollpunkts ist. Dieses

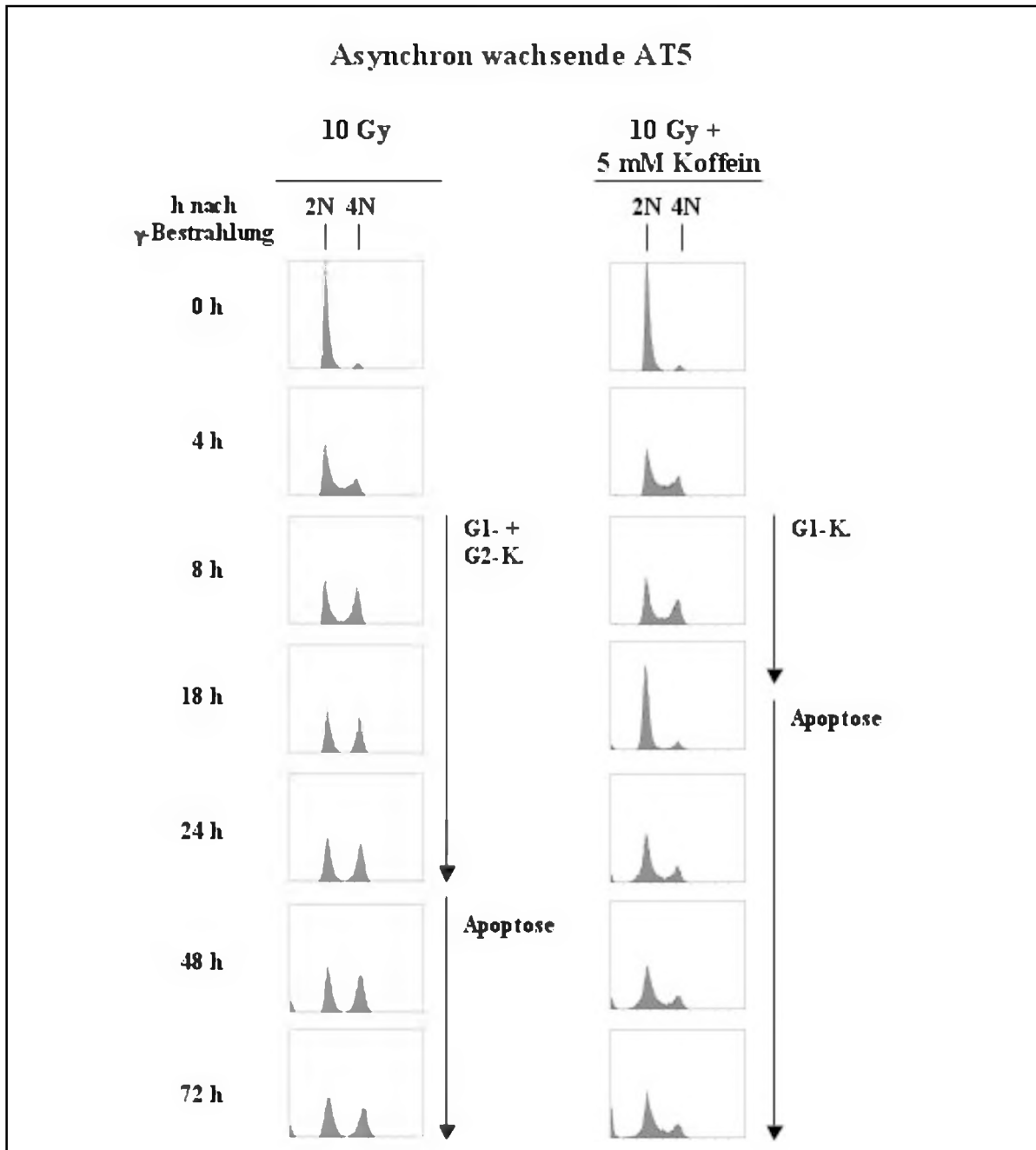


Abb. 5-7: FACS-Analyse 10 Gy bestrahlter ATM-defekter AT5 Zellen, ohne oder mit dem ATM/ATR-Inhibitor Koffein. Asynchron wachsende AT5 Zellen wurden +/- 5 mM Koffein mit 10 Gy bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit Ethanol fixiert. Für die durchflusscytometrische Analyse wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und jeweils 10.000 Zellen erfasst. AT5 Zellen akkumulieren in G1 und G2, aber nicht in S und gehen 24 h nach Bestrahlung in die Apoptose, erkennbar am sub-G1 DNA Gehalt. Koffeinbehandelte und somit ATR- und ATM-defekte AT5 Zellen akkumulieren nur in G2 und zeigen bereits 18 h nach Bestrahlung apoptotische Ereignisse.

Ergebnis wurde mit AT5 Zellen erzielt, die vor der Bestrahlung mit dem ATM/ATR-Inhibitor Koffein inkubiert wurden. Die durchflusscytometrische Analyse der Zellzyklusprogression zeigt, dass die γ -bestrahlten und mit Koffein behandelten AT5 Zellen ohne aktives ATM und ATR weder den intra-S noch den G2- sondern nur noch den G1-Kontrollpunkt aktivieren

können. Auffallend ist, dass die Zellen mit Beginn der G1-Phasen Akkumulation in die Apoptose gehen und diese wesentlich früher beginnt als bei den unbehandelten AT5 Zellen (**Abb. 5-7**). Wie aus der Western Blot Analyse γ -bestrahlter AT5 Zellen hervorgeht, ist sowohl p53 als auch Δ p53 unmittelbar nach Schädigung stabilisiert aber auf Grund der fehlenden ATM Aktivität nicht an Serin-15 phosphoryliert und somit aktiviert (**Abb. 5-8**). Darüber hinaus beginnt bereits 6 h nach Bestrahlung die Destabilisierung von beiden p53 Proteinen (**Abb. 5-8**). Vermutlich erfolgt die Initiation der Stabilisierung von p53 und Δ p53 nicht durch Modifikation der Serinreste 15 und 20, jedoch erfordert die Manifestation der Stabilisierung die Kinasierung dieser Serinreste durch ATM und ATM-aktiviertes Chk2. Die Befunde weisen zusätzlich darauf hin, dass in AT5 Zellen der ATR-induzierte G2-Kontrollpunkt p53 unabhängig ist. Daraus kann geschlossen werden, dass die Aktivierung des G2-Kontrollpunkts, der zur temporären Attenuation der Zellzyklusprogression führt, prinzipiell p53 unabhängig ist. Unterstützt wird dieses Postulat durch die Beobachtung, dass die Aktivierung des G2-Kontrollpunkts ohne Serin-15 Phosphorylierung und somit Aktivierung von p53 und Δ p53 erfolgt (**Abb. 5-5; 5-6C**). Anzunehmen jedoch ist, dass bei schweren Schäden der p53-unabhängige temporäre G2-Kontrollpunkt in einen p53-abhängigen terminierenden G2-Arrest bzw. G2-„Exit“ überführt wird, der letztendlich zur Induktion der Eliminierungsprozesse führt.

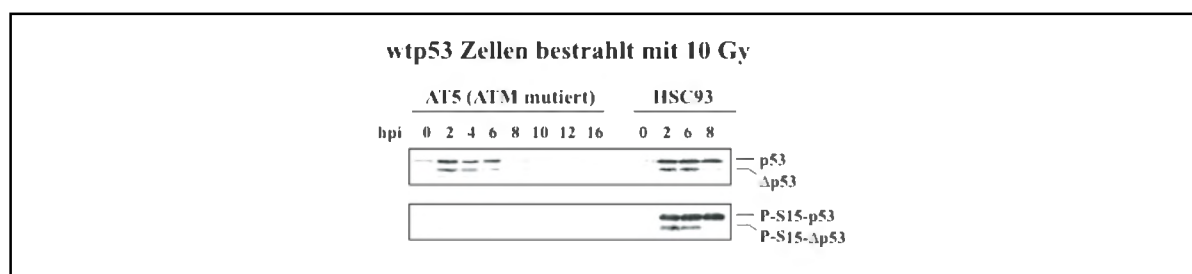


Abb. 5-8: Analyse der schadeninduzierten Stabilisierung und Serin-15 Phosphorylierung von p53 und Δ p53 in 10 Gy bestrahlten ATM-defekten wtp53 AT5 Zellen. Asynchron wachsende AT5 Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt, zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und in einer Western Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern untersucht. Asynchron wachsende, mit 10 Gy bestrahlte wtp53 HSC93 Zellen dienten als Kontrolle für die strahleninduzierte Stabilisierung sowie Serin-15 Phosphorylierung von p53 und Δ p53.

Insgesamt weisen die Daten darauf hin, dass die Schwere des Schadens sowohl den Zeitpunkt der Initiation als auch die Dauer der ATM/ATR-vermittelten Signalwege beeinflusst, wodurch bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt die Weichen für oder gegen den Eliminierungsprozess gestellt werden könnten. Diese Annahme wird bestärkt durch die Beobachtung, dass koffeinbehandelte AT5 Zellen, die auf Grund der fehlenden ATM und ATR Aktivitäten weder den intra-S- noch den G2-Kontrollpunkt aktivieren können, schneller in die Apoptose gehen

als unbehandelte AT5 Zellen. Es ist deshalb nahe liegend einen Zusammenhang zwischen Termination des schadeninduzierten Kontrollpunkts und der sich unmittelbar daran anschließenden Initiation der Eliminierungsprozesse zu sehen.

5.5 Wtp53 und Δp53 zeigen differenzielle Transaktivierungsaktivität, die in Abhängigkeit der Schwere des Schadens reguliert wird

Die Phosphorylierungsstudien mit p53 und Δp53 weisen darauf hin, dass deren transkriptionelle Aktivitäten in Abhängigkeit der Schwere des Schadens zu definierten Zeiten im Zellzyklus eingesetzt werden. In 2 Gy bestrahlten G1/S CV-1 Zellen erfolgt die Serin-15 Phosphorylierung und somit Aktivierung beider p53 Proteine nach Auslösung des ATM-vermittelten intra-S-Kontrollpunkts. Aus der FACS-Analyse ist ersichtlich (**Abb. 5-5**, mittlere Spalte), dass unmittelbar nach Beendigung des intra-S-Kontrollpunkts die Aktivierung des ATR-vermittelten G2-Konrollpunkts erfolgt, der jedoch nicht zu den Serin-15 Phosphorylierungen und somit Aktivierung von p53 und Δp53 führt (**Abb. 5-6C**). Anders verhält es sich nach Bestrahlung mit 10 Gy, wo p53 immer und Δp53 14 h nach Bestrahlung erneut an Serin-15 phosphoryliert ist, und demzufolge eine Funktion im G2-„Exit“ und/oder in der sich anschließenden Apoptose ausüben könnten.

Die zentrale Aktivität beider p53 Proteine besteht in der Transaktivierung von Zielgenen, deren Genprodukte, zu denen sowohl pro- wie auch anti-apoptotische Faktoren gehören, zur Auslösung der p53/Δp53 assoziierten biologischen Effekte führen. Zunächst wurde anhand repräsentativer Beispiele untersucht, ob in bestrahlten, asynchron wachsenden wtp53 CV-1 Zellen eine differenzielle Induktion p53- bzw. Δp53-abhängiger pro- bzw. anti-apoptotischer Faktoren zu beobachten ist, die mit dem unterschiedlichen Ausgang der Schadensreaktion korreliert und damit als mögliche Ursache für die Selektivität der Schadensantwort in Frage kommt. Zu der Vielzahl der bislang bekannten Zielgene von p53 gehören die pro-apoptotischen Faktoren *Bax* und *PIG3*, die Zellzyklusregulatoren *p21* und *14-3-3σ*, die eine anti-apoptotische Wirkung haben sowie die Ubiquitin-Ligase *mdm2*, die für die Stabilität von p53 eine zentrale Rolle spielt. Im Unterschied dazu kann Δp53 nur Gene anschalten, die für anti-apoptotische Faktoren kodieren (Rohaly et al., 2005). Western Blot Analysen, in denen die Expression dieser fünf genannten, p53-regulierten Zielgene auf Proteinebene untersucht wurde, zeigen klar, dass die Schwere des Schadens Einfluss auf die Induktion von pro- und anti-apoptotischen Gene hat (**Abb. 5-9**). In der Tat scheint p53 im verwendeten experimentellen System Zielgene unterschiedlicher Wirkungsklassen als Transkriptionsfaktor

differenziell zu aktivieren. Auffällig ist, dass die Induktion wachstumsregulierender Faktoren sehr schnell erfolgt, während die Aktivierung der pro-apoptotischen Faktoren erst zu einem späteren Zeitpunkt zu beobachten ist. Eine selektive Hochregulation von p53-abhängigen

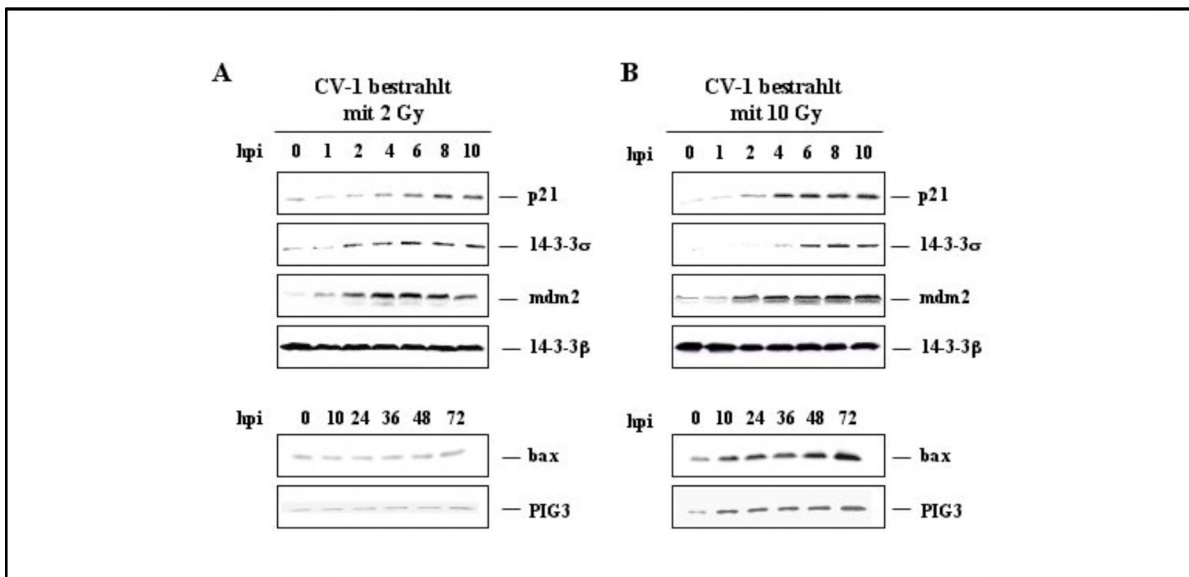


Abb. 5-9: Analyse p53-induzierbarer Genprodukte in Abhängigkeit der Schwere des Schadens. Exponentiell wachsend CV-1 Zellen wurden mit 2 Gy (A) oder 10 Gy (B) bestrahlt und zu den angegebenen Zeiten nach Bestrahlung (hpi) für die Western Blot Analyse aufbereitet. Der Nachweis p53-induzierbarer Genprodukte erfolgte mit spezifischen Antikörpern. Als Auftragskontrolle diente 14-3-3 β , das unabhängig von der Schadensstärke sowie Position der Zelle im Zellzyklus exprimiert wird.

Zielgenen, die entweder Apoptose einleiten oder anti-apoptotisch wirken, scheint in bestrahlten wtp53 CV-1 Zellen somit als Erklärungsmöglichkeit für den jeweils unterschiedlichen Ausgang der Schadensreaktion möglich. Zumindest korreliert eine persistierende p53-Aktivität mit einer dauerhaften Hochregulation von p53-Zielgenen und der Eliminierung der geschädigten Zellen. Eine solche Korrelation ist jedoch nur richtig bei Berücksichtigung der Serin 15-Phosphorylierung als Marker für die Aktivität von p53 und/oder Δ p53. In der Tat bleiben die Serin-15 Phosphorylierungen beider p53-Proteine bei einer Bestrahlung mit 10 Gy bis zum Ende des Beobachtungszeitraums erhalten (Abb. 5-6 D).

Die Bestrahlung von asynchron wachsenden wtp53 CV-1 Zellen zeigt, dass in Abhängigkeit der Schadensstärke p53-regulierte Zielgene differenziell transaktiviert werden. Allerdings geben die Resultate keinen Hinweis darauf, welches p53-Protein zur Induktion der p53-regulierten Zielgene führt. Für die Untersuchung dieser Fragestellung wurden synchronisierte wtp53 CV-1 Zellen am G1/S-Übergang mit 2 Gy bzw. 10 Gy bestrahlt und die Expression des anti-apoptotischen Faktors p21, des pro-apoptotischen Faktors bax sowie der Ubiquitin-Ligase mdm2 zunächst im Western Blot analysiert. **Abb. 5-10 A** zeigt, dass 2 Gy bestrahlte CV-1

Zellen die Zielgene *p21* und *mdm2* sehr schnell induzieren, während der pro-apoptotische Faktor *bax* nicht hochreguliert wird. Sowohl die Expression von *p21* als auch die von *mdm2* reduziert sich deutlich 10 h nach Bestrahlung. Die FACS-Analyse zeigt, dass zu diesem Zeitpunkt der intra-S-Kontrollpunkt endet und der G2-Kontrollpunkt beginnt, wobei 16 h nach Bestrahlung der Normalzustand wieder hergestellt ist (**Abb. 5-5**, mittlere Spalte).

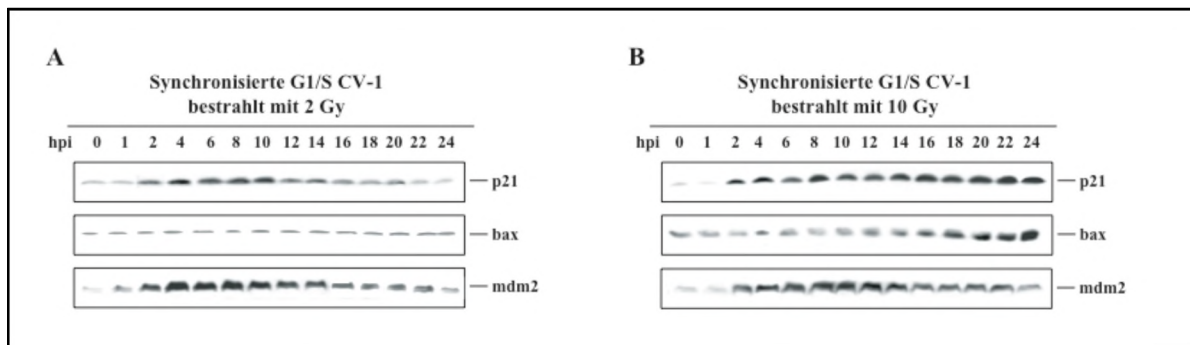


Abb. 5-10: Analyse p53-induzierbarer Genprodukte nach strahleninduzierter Aktivierung der ATM/ATR-Signalkaskade. Synchronisierte wtp53 CV-1 Zellen wurden am G1/S-Übergang mit 2 Gy (**A**) oder 10 Gy (**B**) bestrahlt und zu den angegebenen Zeiten nach Bestrahlung (hpi) für die Western Blot Analyse aufbereitet. Der Nachweis p53-induzierbarer Genprodukte erfolgte mit spezifischen Antikörpern.

Schwere Schäden führen ebenfalls zur Transaktivierung des zellzyklusregulierenden Faktors *p21*, der allerdings bis zum Ende des Beobachtungszeitraums exprimiert wird. Anders verhält sich *mdm2*, dessen Expression von 2-14 h erhöht und 16 h nach Bestrahlung deutlich reduziert ist. Zeitgleich mit der Reduktion von *mdm2* erfolgt bei schweren Schäden die Induktion des pro-apoptotischen Faktors *bax* (**Abb. 5-10B**). Die sehr spät einsetzende Expression von *bax*, korreliert mit den aus der FACS-Analyse hervorgehenden Eliminierungsprozessen (**Abb. 5-5**, rechte Spalte).

Die Korrelation zwischen einer temporären Hochregulation von p53-Zielgenen bei geringem DNA Schaden und einer dauerhaften Induktion bei schweren Schäden legt nahe, dass die Dauer der p53-Aktivität ein wichtiger Parameter bei der Entscheidung ist, ob die Schadensantwort in der Wiederherstellung des Normalzustands endet oder zur Eliminierung der geschädigten Zellen durch Apoptose führt. Darüber hinaus lässt die dauerhafte Aktivierung von p53 nach schwerer Schädigung vermuten, dass die Eliminierung derart geschädigter Zellen p53-abhängig erfolgt, insbesondere durch die Transaktivierung von *bax*. Darüber hinaus kann sowohl in 2 Gy als auch in 10 Gy bestrahlten CV-1 Zellen beobachtet werden, dass der Expressionsverlauf von *mdm2* nicht mit der Stabilisierung von p53 und Δ p53 korreliert (**Abb. 5-6 C, D**). Auffallend ist, dass der Zeitpunkt zu dem die Expression von

mdm2 deutlich reduziert ist mit den zellulären Ereignissen, die in 2 Gy bestrahlten Zellen zur Aufhebung der Attenuation und in 10 Gy bestrahlten Zellen zur Induktion der Apoptose führen, korreliert. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass nach Aktivierung der ATM/ATR-induzierten Signalkaskade p53-induziertes mdm2 die differenzielle transkriptionelle Aktivität von p53 und eventuell auch die von Δ p53 direkt oder indirekt regulieren könnte.

Der Vergleich des zeitlichen Verlaufs des schadeninduzierten p53-Zielgens *p21* mit der Position der geschädigten Zelle im Zellzyklus weist darauf hin, dass der Cdk-Inhibitor in Abhängigkeit der Schwere des Schadens verschiedene Funktionen ausüben könnte. In 2 Gy bestrahlten G1/S-Zellen scheint p21 spezifisch für den intra-S-Kontrollpunkt zu sein, während in 10 Gy bestrahlten Zellen dieser zellzyklusregulierende Faktor eine Rolle im sogenannten G2-„Exit“ spielen könnte. In CV-1 Zellen, die mit UV-Licht am G1/S-Übergang geschädigt wurden erfolgt die Induktion des *p21*-Promotors über einen Zeitraum von 16 h, wobei in den ersten 8 h Δ p53 und in den darauf folgenden 8 h p53 verantwortlich für die Induktion des Cdk-Inhibitors ist (Rohaly et al., 2005). Nachdem in 10 Gy bestrahlten CV-1 Zellen eine dauerhafte Hochregulation von p21 erfolgt, war es nahe liegend, dass auch p21 in γ -bestrahlten Zellen mittels sequenzieller Aktivierung von Δ p53 und p53 hochreguliert wird. Die Untersuchungen wurden mit induzierbaren wtp53 TO-CV-1 Zelllinien durchgeführt, in denen nach Zugabe von Dox endogenes wtp53 bzw. wt Δ p53 durch konditionale Expression der entsprechenden p53-Mutante, die mit einem Flag-Tag markiert ist, dominant-negativ inaktiviert wird. Als Kontrolle für den Nachweis der dominant-negativen Inaktivierung von endogenem wtp53 in wtp53 TO-CV-1-mutp53 Zellen bzw. nicht erfolgten Inaktivierung in wtp53 TO-CV-1-mut Δ p53 Zellen wurde die Expression der p53-spezifisch induzierbaren Faktoren mdm2 und bax in allen verwendeten TO-CV-1 Zelllinien untersucht.

Die Western Blot Analyse von 10 Gy bestrahlten wtp53 CV-1 Zellen zeigt, dass nach Bestrahlung am G1/S-Übergang (0 h) p21 ab 2 h bis Ende des Beobachtungszeitraums hochreguliert war. Bei Inaktivierung von Δ p53 war die p21 Expression erst 8 h nach Bestrahlung deutlich zu sehen, während nach der Inaktivierung von wtp53 die p21 Hochregulation von 2-22 h nach Bestrahlung erfolgt (**Abb. 5-11A**). Insgesamt zeigt dieses Experiment, dass in γ -bestrahlten G1/S Zellen wie auch in UV-bestrahlten Zellen unmittelbar nach DNA Schädigung Δ p53 verantwortlich für die p21 Expression ist, während p53 erst 6 h nach Bestrahlung den Cdk-Inhibitor p21 induziert. Neu ist, dass in letal geschädigten Zellen, die über kein funktionelles p53 verfügen, die Expression von p21 bis 22 h nach Bestrahlung anhält und diese Hochregulation über Δ p53 erfolgen muss (**Abb. 5-11A**, dritte Spalte).

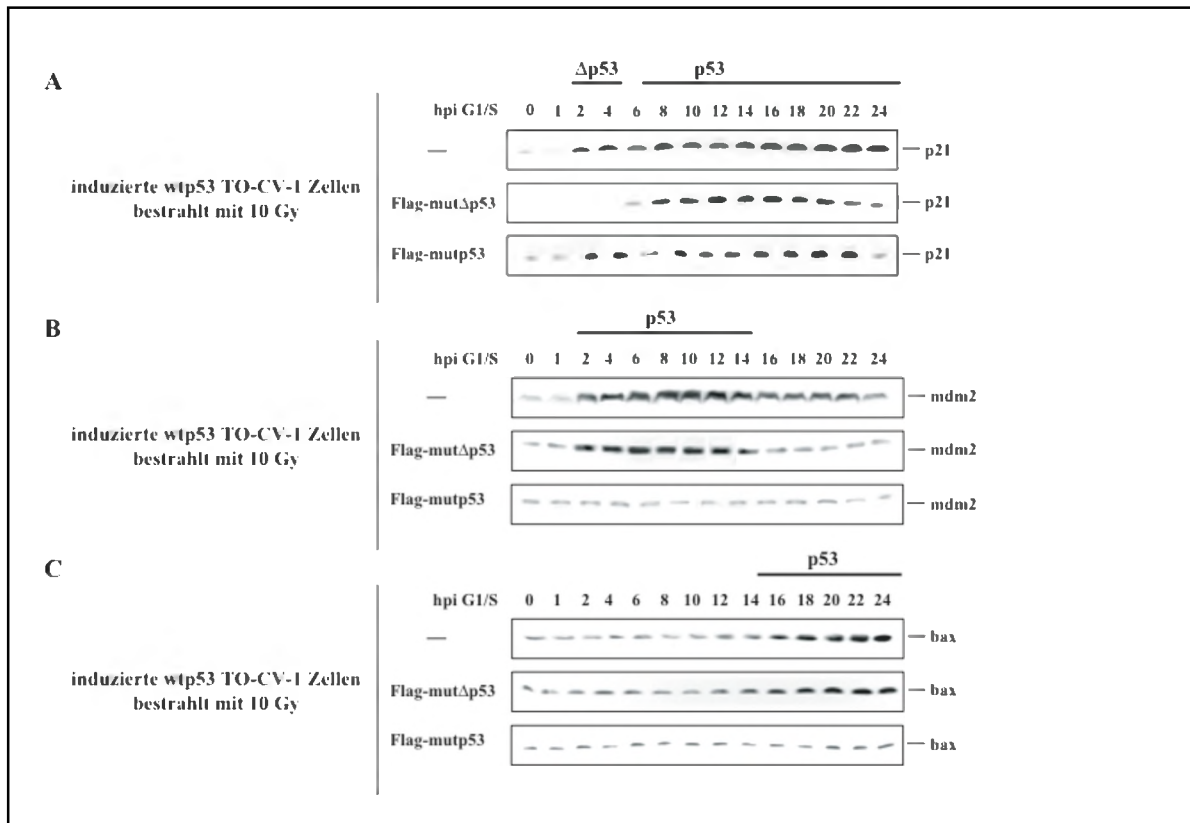


Abb. 5-11: Zellen, die am G1/S-Übergang mit 10 Gy bestrahlt werden, zeigen, dass die transkriptionelle Aktivität von Δp53 und p53 differenziell reguliert ist. Synchronisierte induzierbare wtp53 TO-CV-1 Zellen, die nach Zugabe von Dox den leeren Vektor, Flag-mutΔp53 oder Flag-mutp53 exprimieren, wurden nach Bestrahlung zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die Expression von p21 (A), mdm2 (B) und bax (C) in einer Western Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern untersucht. Dominant-negative Inaktivierung von endogenem Δp53 oder p53 führt zu Veränderungen der Expression der untersuchten p53-induzierbaren Faktoren.

Wie erwartet, unterbindet die Inaktivierung von endogenem wtp53 vollständig die p53-induzierte Transaktivierung von *mdm2*, während inaktives wtΔp53 sich nicht negativ auf die *mdm2* Expression auswirkt (Abb. 5-11B). Dasselbe Resultat wurde für den pro-apoptotischen Faktor *bax* erzielt, der nur in Zellen mit funktionellem p53 detektierbar ist (Abb. 5-11C).

Die Western Blot Analyse zeigt, dass p53 sowohl anti-apoptotische als auch pro-apoptotische Gene und *mdm2* transaktiviert, während Δp53 nur *p21* aber nicht *bax* und *mdm2* anschaltet. Dieser Befund bestätigt die differenzielle transkriptionelle Eigenschaft von Δp53 bezüglich der selektiven Hochregulation von p53-abhängigen Zielgenen, die bereits in UV-bestrahlten CV-1 Zellen beobachtet wurde (Rohaly et al., 2005). Darüber hinaus geht aus diesen Experimenten hervor, dass auch die transkriptionelle Aktivität von p53 differenziell reguliert ist. Unmittelbar nach Bestrahlung der Zellen am G1/S-Übergang induziert p53 *mdm2* aber nicht *p21*, erst 6 h später wird auch *p21* induziert und schließlich ab 14 h nach Bestrahlung erfolgt die p53-abhängige Transaktivierung von *bax*.

Der direkte Nachweis, dass p53 über eine differenzielle Transaktivierungsaktivität verfügt, die vermutlich durch Modifikation sowie Interaktion mit anderen Faktoren reguliert wird, erfolgte durch Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP), eine Technik die es ermöglicht, die Interaktion von p53 mit den Promotoren p53-induzierbarer Zielgene *in vivo* zu analysieren. Die Chromatin-Immunpräzipitation wurde mit monoklonalen anti-p53 Antikörper durchgeführt, die spezifisch unterschiedliche Epitope ihres Antigens erkennen. Eingesetzt für die Chromatin-Immunpräzipitation wurden die anti-p53 Antikörper DO1, spezifisch für den N-Terminus und DO12, spezifisch für die Core-Domäne, sowie der anti-T Ag Antikörper PAb101 als negativ Kontrolle. Der Antikörper DO1 erkennt beide p53-Formen, während DO12, dessen Epitop in Δ p53 auf Grund des alternativen Spleißens fehlt, nur mit p53 interagiert. Die Assoziation von p53 bzw. Δ p53 koimmunpräzipitierter Promotor-DNA wurde durch PCR-Amplifikation unter Verwendung von Promotor-spezifischen „primern“ analysiert. Für die Chromatin-Immunpräzipitation wurden die Zelllinien wtp53 CV-1 und mutp53 SW480 verwendet. In der mutanten p53 Zelllinie SW480 vom „type II“ ist p53 in dem Bereich mutiert, der durch das alternative Spleißens entfernt wird. Auf Grund dessen ist in SW480 Zellen p53 durch die Mutation inaktiviert, während die durch alternatives Spleißens generierte Isoform eine völlig intakte wildtyp Sequenz hat. Die Verwendung der oben beschriebenen anti-p53 Antikörper für die Chromatin-Immunpräzipitation erlaubt jedoch keinen direkten Nachweis der Δ p53-assozierten Promotoren in diesen humanen Zelllinien. Deshalb wurde für den direkten Nachweis der p21-Promotorbindung von Δ p53 die induzierbaren wtp53 TO-CV-1-Flag-wtp53, -Flag-mutp53, -Flag-wt Δ p53 und -Flag-mut Δ p53 Zelllinien eingesetzt, in denen nach Zugabe von Dox entweder Flag-wtp53 und Flag-wt Δ p53 oder die dominant-negativen Flag-mutp53 und Flag-mut Δ p53 Proteine exprimiert werden. Die ausschließliche Präzipitation von Flag-markierten p53 Proteinen erfolgte mit dem anti-Flag Antikörper M2. Für die Chromatin-Immunpräzipitation wurden alle verwendeten Zellen mit der Isoleucinmethode am G1/S-Übergang synchronisiert und mit 2 Gy bzw. für die Evaluierung der differenziellen Transaktivierungsaktivität von p53 in Bezug auf die *mdm2* und *bax* Promotorbindung zusätzlich mit 10 Gy bestrahlt.

Abb. 5-12A zeigt die Interaktion von Δ p53 und p53 mit dem p21-Promoter in wtp53 CV-1, „type II“ mutp53 SW480 und den isogenen, Dox-induzierten wtp53 TO-CV-1 Zellen, die am G1/S-Übergang mit 2 Gy bestrahlt wurden. Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, bindet 3 h nach Bestrahlung ausschließlich Δ p53 an den p21-Promotor, während p53 erst 7 h nach Schädigung am G1/S-Übergang mit dem Promotor assoziiert. Die Befunde bestätigen, dass Bestrahlung am G1/S-Übergang zur sequenziellen Aktivierung von Δ p53 und p53 führt,

wobei der *p21*-Promoter zunächst von $\Delta p53$ und anschließend von *p53* transaktiviert wird. Der Zeitpunkt in dem $\Delta p53$ als Transaktivator für *p21* arbeitet (2-4 h nach Bestrahlung) entspricht dem intra-S-Kontrollpunkt, während *p53* den Cdk-Inhibitor am Ende dieses Kontrollpunkts und zu Beginn des G2-Kontrollpunkts (6-10 h nach Bestrahlung) induziert (s. **Abb. 5-5**, mittlere Spalte). Obwohl *p53* während der ersten 6 h nach Bestrahlung *p21* nicht induzieren kann und deshalb als transkriptionell inaktiv erscheint, erfolgt sowohl in 2 Gy als

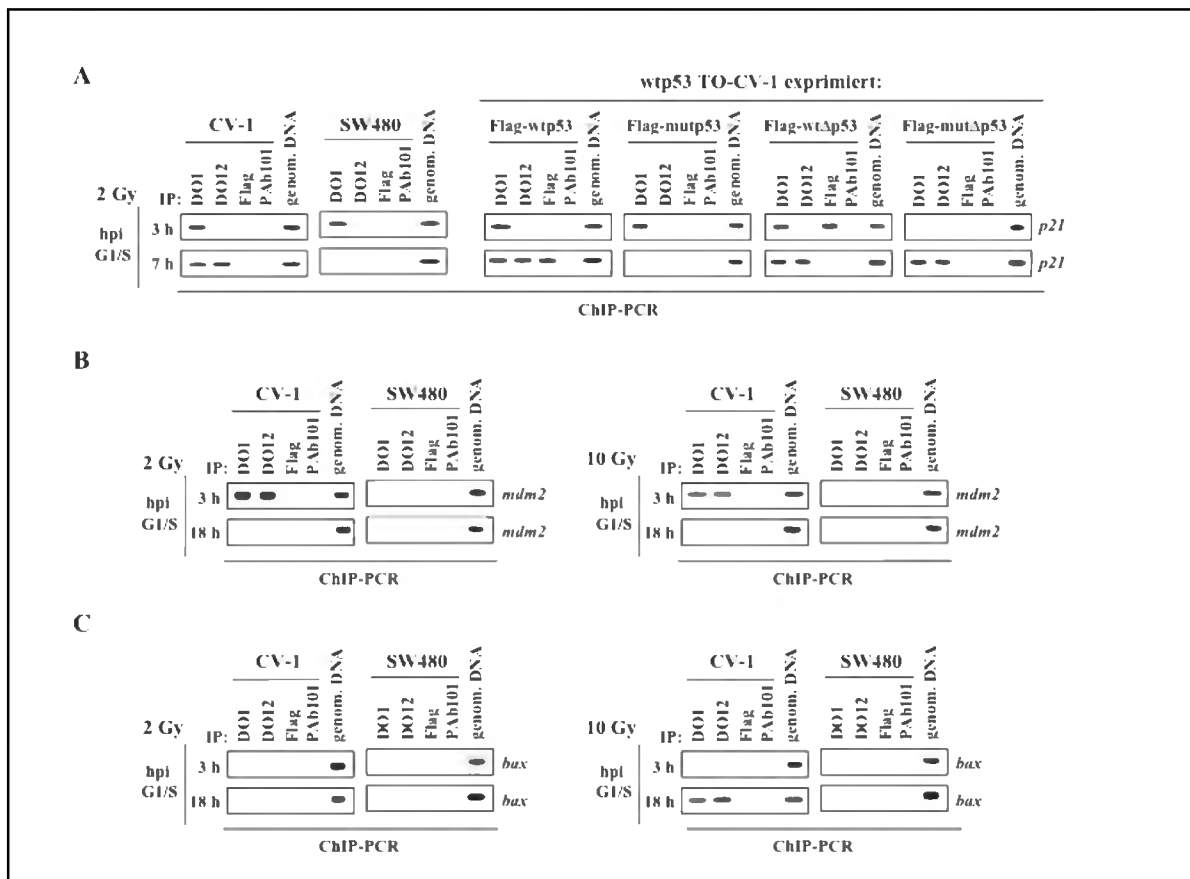


Abb. 5-12: ChIP-PCR von Zellen, die am G1/S-Übergang geschädigt wurden, zeigen differenzielle Promotorbindung von $\Delta p53$ und *p53* in Abhängigkeit von der Schwere und dem Zeitpunkt der Schadensapplikation. Synchronisierte wtp53 CV-1, „type II“ mutp53 SW480 und induzierbare wtp53 TO-CV-1 Zellen, die nach Zugabe von Dox Flag-wtp53, Flag-mutp53, Flag-wt $\Delta p53$ oder Flag-mut $\Delta p53$ exprimieren, wurden nach Bestrahlung mit 2 Gy oder 10 Gy zu den angegebenen Zeitpunkten mit Formaldehyd behandelt und einer ChIP-Analyse unterzogen. Für die Chromatin-Immünpräzipitation wurden die folgenden monoklonalen Antikörper verwendet: anti-Flag, erkennt Flag-Tag markierte *p53* und $\Delta p53$ Proteine; DO1, erkennt *p53* und $\Delta p53$; DO12, erkennt nur *p53*; PAb101 ist T Ag spezifisch und erkennt keine *p53* Proteine. Die *p53* bzw. $\Delta p53$ assoziierten Promotoren *p21* (**A**), *mdm2* (**B**), *bax* (**C**) wurden mit spezifischen Primern durch PCR amplifiziert und im Agarosegel mit Ethidium Bromid gefärbt. Genomische DNA wurde als Größenmarker eingesetzt.

auch in 10 Gy bestrahlten Zellen zu diesem Zeitpunkt die Transaktivierung von *mdm2* durch *p53* (**Abb. 5-12B**). Wie aus der ChIP-PCR Analyse hervorgeht hat *p53* 18 h nach Bestrahlung seine Fähigkeit *mdm2* zu transaktivieren verloren (**Abb. 5-12B**), jedoch kann der

Tumorsuppressor zu diesem Zeitpunkt den pro-apoptotischen Faktor *bax* in letal geschädigten Zellen hochregulieren (**Abb. 5-12C**, rechte Spalte).

Ergebnisse aus der Western Blot Analyse (**Abb. 5-11**) und der Chromatin-Immunpräzipitation (**Abb. 5-12**) zeigen eindeutig, dass nicht nur $\Delta p53$ sondern auch $p53$ über differenzielle Transaktivierungseigenschaften verfügt. Im Gegensatz zu $\Delta p53$, dessen differenzielle Transaktivierungseigenschaft intrinsisch ist, muss diese Eigenschaft von $p53$ durch Modifikation und vermutlich Protein-Protein Interaktionen reguliert werden. Die Experimente zeigen, dass die selektive Hochregulation von $p53$ -regulierten Zielgenen zum einen abhängig von der Schwere des Schadens und somit von der ATM/ATR-Signalkaskade ist und zum anderen von $p53$ selbst, dessen induziertes Zielgen *mdm2* eine Rolle bei der Regulation der differenziellen Transaktivierungsaktivität insbesondere für pro-apoptotische Faktoren spielen könnte. Unterstützt wird diese Annahme durch den Befund, dass, im Gegensatz zu subletal geschädigten Zellen, $p53$ bei letalen Schäden immer an Serin-15 phosphoryliert und somit aktiviert bleibt (**Abb. 5-6C, D**), aber erst nach deutlicher Reduktion der *mdm2* Expression den *bax*-Promotor binden und transaktivieren kann (**Abb. 5-12B, C**).

Darüber hinaus kann auch spekuliert werden, dass $p53$ -induziertes *mdm2* eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung von $\Delta p53$ spielen könnte. Wie 10 Gy bestrahlte TO-CV-1-mutp53 Zellen zeigen, die auf Grund der dominant-negativen Inhibition von endogenem wtp53 *mdm2* nicht hochregulieren können, bleibt nach der Initiation des intra-S-Kontrollpunkts $\Delta p53$ transkriptionell aktiv, was sich anhand der anhaltenden *p21* Expression deutlich bemerkbar macht (**Abb. 5-11A, B**). Eine Bestätigung dieser Annahme könnte nur durch ChIP-*p21*-PCR von 10 Gy bestrahlten CV-1 sowie den isogenen TO-CV-1 Zellen erfolgen, die jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden konnten.

5.6 Regulation der Cyclin-abhängigen Kinase Aktivität in Abhängigkeit des Schadensausmaß und dem *p53* Status der geschädigten Zellen

Insgesamt ergibt sich aus der Analyse der synchronisierten Zellen, die am G1/S-Übergang mit 2 Gy oder 10 Gy bestrahlt wurden, dass die Schwere und der Zeitpunkt des gesetzten Schadens die differenzielle Aktivierung der Transkriptionsfaktoren $p53$ und $\Delta p53$ beeinflusst. Aus Untersuchungen bezüglich der Funktion von $\Delta p53$ in mit UV-Licht geschädigten wtp53 Zellen ging hervor, dass die Isoform ein essenzieller Bestandteil des ATR-aktivierten intra-S-Kontrollpunkts ist (Rohaly et al., 2005). Die Funktion von $\Delta p53$ in diesem Kontrollpunkt bezieht sich auf die Transaktivierung des *p21*-Promotors, dessen Genprodukt mit der S-Phasen spezifischen Kinase Cyclin A-Cdk2 komplexiert und somit deren Aktivität, die für die

Progression durch die S-Phase essenziell ist, stark reduziert. Unbekannt jedoch ist, ob auch in γ -bestrahlten wtp53 Zellen die beobachtete Attenuation der S-Phasen Progression auf eine p21-vermittelte Reduktion der Cyclin A-Cdk2 Aktivität zurückzuführen ist.

Die Western Blot Analyse von 2 Gy und 10 Gy bestrahlten CV-1 sowie induzierten TO-CV-1 Zellen zeigt, dass unmittelbar nach Bestrahlung am G1/S-Übergang die Cyclin E-Cdk2 aktivierende Phosphatase Cdc25A degradiert, aber bereits ab 2-4 h wieder stabilisiert ist (**Abb. 5-13A**; **Abb. 5-14A**). Diese Ergebnisse bestätigen, dass nach γ -Bestrahlung von Zellen, die sich am G1/S-Übergang befinden, unabhängig vom p53 Status die ATM-abhängige Initiation der S-Phasen Schadensantwort mittels Aktivierung der Chk2 Kinase erfolgt, deren enzymatische Aktivität zur Degradation der Cyclin E-Cdk2 aktivierenden Phosphatase Cdc25A führt. Die daraus resultierende Inhibition der Zyklin E-Cdk2 Aktivität, die für den Eintritt in die replikative S-Phase essenziell ist, führt zur kurzfristigen Attenuation der Zellzyklusprogression (Bartek und Lukas, 2001; Rohaly et al., 2005). Abhängig vom p53 Status der geschädigten Zelle jedoch ist die Induktion des Cdk-Inhibitors p21, dessen Expression zeitgleich mit der Restabilisierung von Cdc25A erfolgt (**Abb. 5-9**). Unabhängig von der Schwere des zugefügten DNA Schadens interagiert in γ -bestrahlten wtp53 CV-1 Zellen der Cdk-Inhibitor p21 mit den Cyclin A-abhängigen Kinasen Cdk2 ab 4 h bzw. Cdk1 ab 6 h nach Bestrahlung. Allerdings beeinflusst das Schadensausmaß die Dauer der Interaktion von p21 mit Cyclin A-Cdk2/Cdk1, die in 2 Gy bestrahlten Zellen von 4-10 h und in 10 Gy bestrahlten Zellen von 4-18 h nach Bestrahlung detektiert werden kann (**Abb. 5-13B**). Die Verwendung der induzierbaren TO-CV-1 Zelllinien macht deutlich, dass 4-6 h nach Bestrahlung ausschließlich Δ p53-transaktiviertes p21 an die S-Phase-spezifische Cyclin A-Cdk2 bindet, während ab 6 h nach Bestrahlung p53-transaktiviertes p21 mit der spät-S- bzw. S/G2-Phase-spezifischen Cyclin A-Cdk1 interagiert (**Abb. 5-14B**).

Der Eintritt der Zellen in die replikative S-Phase ist gekennzeichnet durch die sequenzielle Bildung der Cyclin A-Cdk2 und -Cdk1 Komplexe, die nach Beendigung der S-Phase bzw. Eintritt in die G2-Phase dissoziieren und deren Komponenten nach erfolgter Mitose und noch vor dem Eintritt in die nächste Proliferationsrunde proteolytisch abgebaut werden. In 2 Gy bestrahlten CV-1 Zellen entstehen und dissoziieren die Cyclin A-Cdk2/Cdk1 Komplexe zu denselben Zeitpunkten wie in den unbestrahlten Zellen, woraus geschlossen werden kann, dass eine subletale Schädigung von wtp53 CV-1 Zellen sich nicht gravierend auf das Proliferationsverhalten auswirkt. Diese Annahme wird unterstützt durch den Befund, dass auch der zeitliche Verlauf der Formation und Dissoziation des Cyclin B-Cdk1

Komplexes, ein für die Mitose essenzieller Proteinkomplex, in unbestrahlten bzw. 2 Gy bestrahlten CV-1 Zellen identisch ist (**Abb. 5-13C**; **Abb. 5-14C**). Darüber hinaus ist in unbestrahlten und 2 Gy bestrahlten CV-1 Zellen die inhibitorische Tyrosin-15 Phosphorylierung von Cdk1 genau zu dem Zeitpunkt (10 h) entfernt, bei dem die Zellen von der G2-Phase in die Mitose über gehen. Die Dephosphorylierung und somit Aktivierung von Cdk1 erfolgt durch die Cdk1-aktivierende Phosphatase Cdc25C, deren strahleninduzierte inhibitorische Phosphorylierung an Serin-216 10 h nach 2 Gy Bestrahlung aufgehoben ist (**Abb. 5-13C**, mittlere Spalte).

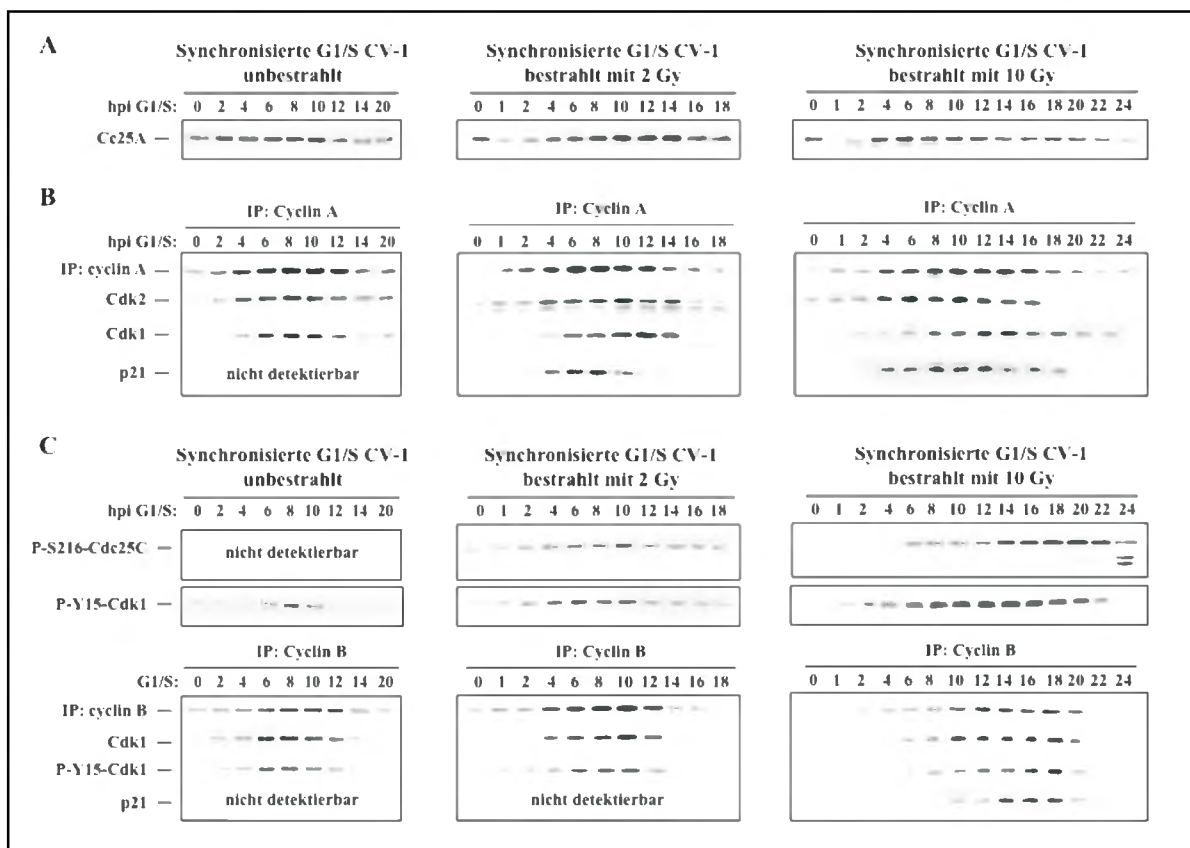


Abb. 5-13: Wtp53 CV-1 Zellen, die am G1/S-Übergang bestrahlt werden, zeigen Veränderungen in der Cyclin-Cdk Komplexbildung, Cdk-Phosphorylierung und Interaktion mit dem Cdk-Inhibitor p21 in Abhängigkeit der Schwere des DNA Schadens. Synchronisierte CV-1 Zellen wurden am G1/S-Übergang (0 h) nicht, mit 2 Gy oder 10 Gy bestrahlt, zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und in einer Western Blot Analyse die Expression von Cdc25A (**A**), die Komplexbildung von Cyclin A mit Cdk2, Cdk1 und p21 (**B**), die Expression von P-S216-Cdc25C, P-Y15-Cdk1, sowie die Komplexbildung von Cyclin B mit Cdk1, P-Y15-Cdk1 und p21 (**C**) mit spezifischen Antikörpern untersucht.

Ein anderes Bild entsteht, wenn CV-1 Zellen am G1/S-Übergang mit 10 Gy geschädigt werden: der Cyclin A-Cdk1 Komplex entsteht im Vergleich zu 2 Gy bestrahlten CV-1 Zellen erst 2 h später und die Interaktion von Cyclin A mit Cdk2 sowie Cdk1 erstreckt sich bis 16 bzw. 18 h nach Bestrahlung (**Abb. 5-13B**, rechte Spalte). Die länger anhaltende Komplexbildung von Cyclin A mit der entsprechenden Kinase sowie die verzögerte Cyclin A-

Cdk1 Komplexbildung wird auch in 10 Gy bestrahlten wtp53 TO-CV-1 Zellen unabhängig von der Funktionalität der beiden p53-Proteine beobachtet (**Abb. 5-14B**). Dieser Befund spricht für die schadeninduzierte Verzögerung der S-Phasen Progression und dem daraus resultierenden verspäteten Eintritt in die G2-Phase, wobei beide Ereignisse eine Folgeerscheinung des ATM-vermittelten intra-S-Kontrollpunkts sind. Darüber hinaus wird in den geschädigten CV-1 Zellen eine deutlich verlängerte Komplexbildung von Cyclin A-Cdk mit dem Cdk-Inhibitor p21 beobachtet, der bis 16 h nach Bestrahlung detektierbar ist (**Abb. 5-13B**). Eine lang anhaltende Komplexierung von Cyclin A-Cdk mit p21 findet auch in TO-CV-1-Flag-mut Δ p53 Zellen statt, jedoch ist dieser Protein-Protein Komplex erst 6 h nach Bestrahlung detektierbar (**Abb. 5-14B**). Der Befund bestätigt, dass während der ersten 4-6 h nach Bestrahlung Δ p53 verantwortlich für die Induktion von *p21* ist und p53 erst 6 h nach Schädigung der Zellen am G1/S-Übergang die Transaktivierung von *p21* übernimmt. Aus der Western Blot Analyse von TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen geht deutlich hervor, dass Δ p53-

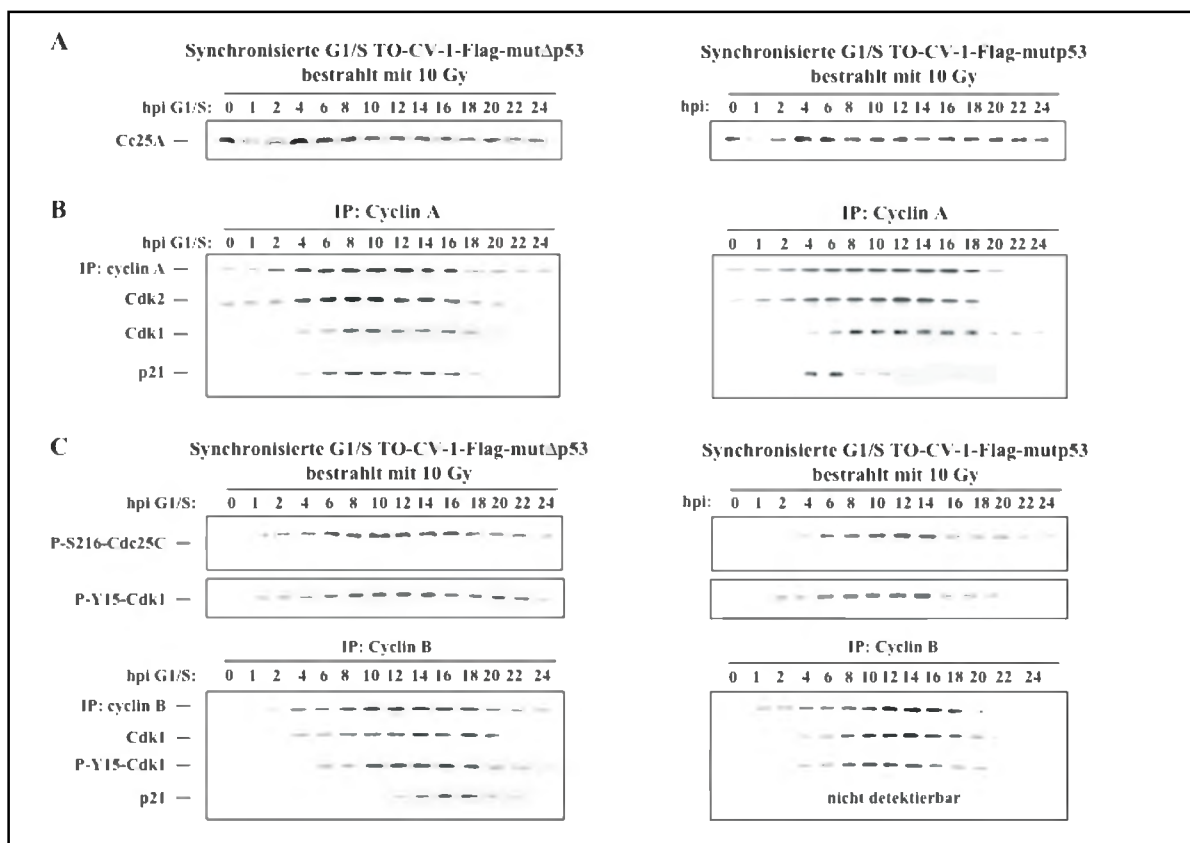


Abb. 5-14: Wtp53 TO-CV-1 Zellen, die am G1/S-Übergang mit 10 Gy bestrahlt werden, zeigen Veränderungen in der Cyclin-Cdk Komplexbildung, Cdk-Phosphorylierung und Interaktion mit dem Cdk-Inhibitor p21 in Abhängigkeit des p53 Status. Synchronisierte CV-1 Zellen wurden am G1/S-Übergang (0 h) mit 10 Gy bestrahlt, zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und in einer Western Blot Analyse die Expression von Cdc25A (**A**), die Komplexierung von Cyclin A mit Cdk2, Cdk1 und p21 (**B**), die Expression von P-S216-Cdc25C, P-Y15-Cdk1, sowie die Komplexierung von Cyclin B mit Cdk1, P-Y15-Cdk1 und p21 (**C**) mit spezifischen Antikörpern untersucht.

induziertes p21 mit Cyclin A-Cdk2 nur von 4-6 h nach Bestrahlung komplexiert (**Abb. 5-14B**). Nachdem in diesen Zellen die transkriptionelle Aktivität von $\Delta p53$ nach Beendigung des intra-S-Kontrollpunkts nicht abgeschaltet und auf Grund dessen $\Delta p53$ -induziertes p21 bis 22 h nach Bestrahlung hochreguliert wird (Abb. 5-11A), impliziert dieser Befund, dass $\Delta p53$ -induziertes p21 nur an Cyclin A-Cdk2 aber nicht an Cyclin A-Cdk1 binden kann. Dies lässt vermuten, dass es wohl qualitative Unterschiede zwischen dem $\Delta p53$ -induzierten p21 von dem p53-induzierten p21 geben muss.

In 10 Gy bestrahlten wtp53 Zellen deutet die lang anhaltende Interaktion von p21 mit Cyclin A-Cdk2/1 auf eine gravierende Veränderung im Proliferationsverhalten geschädigter CV-1 Zellen sowie TO-CV-1-Flag-mut $\Delta p53$ Zellen hin. Die einschneidende Auswirkung letaler Schädigung auf die Zellzyklusprogression zeigt sich vor allem in der andauernden inhibitorischen Phosphorylierung von Cdk1, die auf Grund der fehlenden Reaktivierung der Cdk1-aktivierenden Phosphatase Cdc25C, die ab 4 h nach Bestrahlung inhibitorisch phosphoryliert wird, ebenfalls bis 18 h nach Bestrahlung erhalten bleibt (**Abb. 5-13C**, rechte Spalte; **Abb. 5-14C**, linke Spalte). Anzeichen für die Aktivierung des programmierten Zelltods ist nicht nur die Aufrechterhaltung der inhibitorischen Phosphorylierung der Cyclin B-Cdk1 aktivierenden Phosphatase Cdc25C sondern vor allem der proteolytische Abbau dieser Phosphatase, der 24 h nach Bestrahlung deutlich erkennbar ist. Ein weiteres Indiz für die Terminierung der mit 10 Gy bestrahlten CV-1 und TO-CV-1-Flag-mut $\Delta p53$ Zellen ist die Interaktion des Cdk-Inhibitors p21 mit der G2- bzw. Mitose-spezifischen Kinase Cyclin B-Cdk1. Die Interaktion der Mitose-fördernden Kinase mit p21 erfolgt 14 h nach Bestrahlung und genau zu dem Zeitpunkt, bei dem die schwer geschädigten und in G2 arretierten Zellen in die Apoptose gehen (**Abb. 5-5**, rechte Spalte).

10 Gy bestrahlte TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen folgen nicht dem Schema, das für die oben erwähnten Zellen beschrieben wurde. In diesen Zellen erfolgt 14 h nach Bestrahlung die Reaktivierung der Cdk1-aktivierenden Phosphatase Cdc25C und konsequenterweise die Dephosphorylierung von Cdk1 (**Abb. 5-14C**, rechte Spalte). Darüber hinaus findet in diesen Zellen auf Grund der fehlenden transkriptionellen Aktivität von p53 keine Komplexbildung zwischen der Cyclin B-Cdk1 und dem Cdk-Inhibitor p21 statt. Offensichtlich ist p21, das von $\Delta p53$ in wtp53 TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen 16 h nach Bestrahlung induziert wird nicht in der Lage mit Cyclin B-Cdk1 zu komplexieren. Deshalb ist anzunehmen, dass $\Delta p53$ transaktiviertes p21 ausschließlich an Cyclin A-Cdk2 aber nicht an Cyclin B-Cdk1 bindet und sich deshalb qualitativ von p53 transaktiviertem p21 unterscheiden muss. Postuliert werden

kann, dass Zellen mit der Konstellation wt Δ p53 und mutp53 trotz der Schwere des DNA Schadens, den protektiven G2-Kontrollpunkt zu Gunsten der Proliferation verlassen können, vorausgesetzt der Mitose-fördernde Faktor Cyclin B-Cdk1 wird aktiviert.

Die schadeninduzierte Interaktion des Cdk-Inhibitors p21 mit den Cyclin-abhängigen Kinasen sowie die Phosphorylierung der katalytischen Untereinheit Cdk1 von Cyclin B-Cdk1 an Tyrosin-15 sind ein Indiz für die Reduktion bzw. Inhibition der Aktivitäten dieser zellzyklusregulierenden Kinasen, die sich negativ auf die Progression sowie Proliferation der geschädigten Zellen auswirken. Zur Überprüfung der Cdk-Aktivitäten in geschädigten Zellen, wurden synchronisierte wtp53 CV-1 sowie induzierte wtp53 TO-CV-1-Flag-mutp53/mut Δ p53 Zellen am G1/S-Übergang bestrahlt und die Aktivität der Cdks im „target-bound“-Histon-Kinaseaktivitätstest gemessen. Für das Kontrollexperiment zur Bestimmung der Cdk-Aktivitäten wurden die entsprechenden am G1/S-Übergang synchronisierten, unbestrahlten Zellen verwendet. Die Abb. **5-15** sowie **5-16** geben einen Überblick der gemessenen Aktivitäten von Cyclin E-Cdk2, Cyclin A-Cdk2/1 und Cyclin B-Cdk1 über einen Zeitraum von 20 h bzw. 25 h. Die Messung der Cyclin E-Cdk2 Aktivität zeigt, dass in den unbestrahlten wtp53 CV-1 sowie induzierten wtp53 TO-CV-1-Flag-mutp53/mut Δ p53 Zellen 6 h nach dem G1/S-Übergang die Aktivität der Kinase ihr Maximum erreicht und im Laufe der S-Phasen Progression kontinuierlich abnimmt. Zur gleichen Zeit steigt die für die S-Phasen Progression sowie für den S/G2-Übergang essenzielle Cyclin A-Cdk2 bzw. Cyclin A-Cdk1 Aktivität kontinuierlich an, erreicht ihr Maximum 8-10 h nach dem G1/S-Übergang und kehrt 5 h später auf das Ausgangsniveau zurück. Dabei entsprechen die ersten 6 h der S-Phasen spezifischen Cyclin A-Cdk2 Aktivität und die darauf folgenden Stunden der S/G2-spezifischen Cyclin A-Cdk1 Aktivität. Die für die Mitose essenzielle Aktivität von Cyclin B-Cdk1 erreicht ihr Maximum 2 h nach der von Cyclin A-Cdk2/1 und zwar genau zu dem Zeitpunkt, bei dem die Zellen durch die Mitose gehen (**Abb. 5-5**, linke Spalte).

Nahe liegend ist, dass diese sehr schnelle ATM-vermittelte Initialisierung der zellulären Schadensantwort in nachhaltigere und vor allem differenziertere Signale umgewandelt werden muss. Dies zeigt sich vor allem in 10 Gy bestrahlten CV-1 Zellen, in denen verglichen mit 2 Gy bestrahlten Zellen die Aktivitäten der Cdks signifikant verändert sind. Während der ersten 6 h ist die Cyclin A-Cdk Aktivität stark reduziert wenn nicht sogar inhibiert und erreicht ihr Maximum erst 14 h nach G1/S, also 4 h später als in unbestrahlten und 2 h später als in 2 Gy bestrahlten CV-1 Zellen (**Abb. 5-15**). Die deutliche Reduktion der Cyclin A-Cdk Aktivität korreliert mit der Interaktion des Cdk-Inhibitors p21, die in 2 Gy

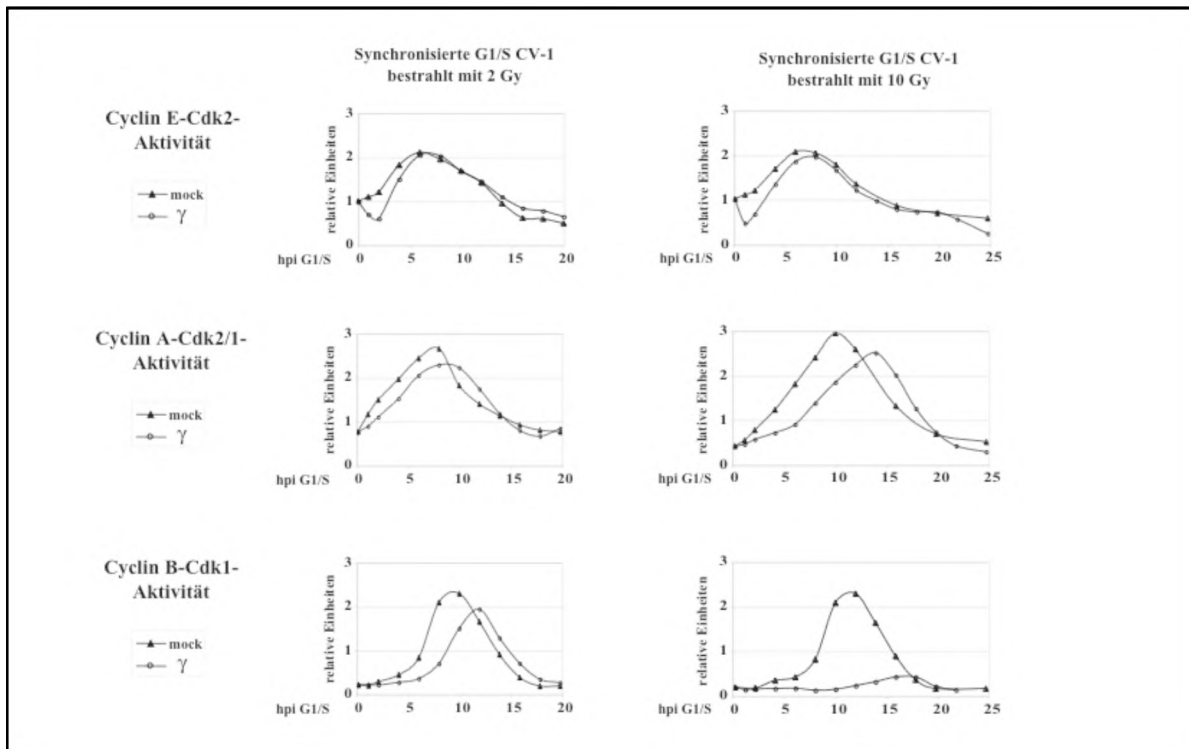


Abb. 5-15: Wtp53 CV-1 Zellen, die am G1/S-Übergang bestrahlt werden, zeigen Veränderungen in den Cyclin-Cdk Aktivitäten in Abhängigkeit der Schwere des DNA Schadens. Synchronisierte CV-1 Zellen wurden am G1/S-Übergang (0 h) nicht, mit 2 Gy oder 10 Gy bestrahlt, zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die Cdk-Aktivitäten im „target-bound“-Histon-Kinaseaktivitätstest gemessen.

bestrahlten Zellen von 4-6 h und in 10 Gy bestrahlten Zellen deutlich von 4-12 h bzw. abgeschwächt von 14-18 h nachweisbar ist (**Abb. 5-13B**). Dominant-negative Inaktivierung von $\Delta p53$ bzw. p53 in den entsprechenden wtp53 TO-CV-1 Zellen bestätigt, dass während der ersten 6 h nach Bestrahlung ausschließlich $\Delta p53$ induziertes p21 die Aktivität der Cyclin A-Cdk2 Aktivität reduziert (**Abb. 5-16**), während ab 6 h nach Bestrahlung p53 induziertes p21 zuständig für die Reduktion der Cyclin A-Cdk1 Aktivität ist (**Abb. 5-14B; Abb. 5-16**). Die Auswirkung der Schadensstärke auf die Zellzyklusprogression verdeutlicht sich besonders bei Betrachtung der gemessenen Cyclin B-Cdk1 Aktivität in 2 Gy und 10 Gy bestrahlten CV-1 Zellen. Im Falle subletaler DNA Schädigung verzögert sich die volle Aktivierung des Mitosefördernden Faktors und somit der Eintritt in die Mitose nur um 2 h, während diese Kinaseaktivität in 10 Gy bestrahlten CV-1 Zellen völlig zum Erliegen kommt (**Abb. 5-15**). Dieser Befund korreliert mit der beobachteten Tyrosin-15 Phosphorylierung der katalytischen Untereinheit Cdk1, die in 2 Gy bestrahlten Zellen ab 10 h nicht mehr nachweisbar ist, jedoch in 10 Gy bestrahlten Zellen bis zum Beginn der apoptotischen Ereignisse aufrechterhalten bleibt. Auch in TO-CV-1-Flag-mut $\Delta p53$ Zellen, in denen endogenes $\Delta p53$ dominant-negativ inhibiert ist, korreliert die anhaltende Cdk1-Tyrosin-15 Phosphorylierung mit der

vollständigen Inhibition dieser Kinase (**Abb. 5-16**, linke Spalte), woraus geschlossen werden kann, dass diese schadeninduzierte Reaktion unabhängig von funktionellem $\Delta p53$ ist.

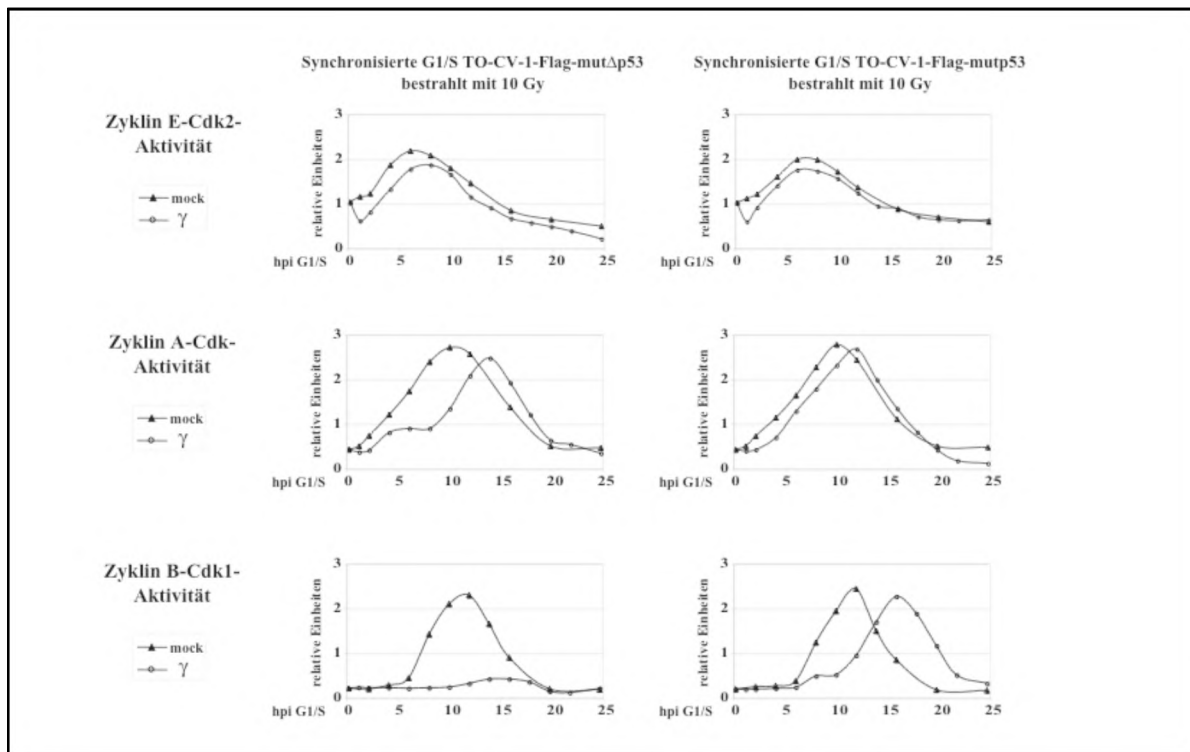


Abb. 5-16: Wtp53 TO-CV-1 Zellen, die am G1/S-Übergang mit 10 Gy bestrahlt werden, zeigen Veränderungen in den Cyclin-Cdk Aktivitäten in Abhängigkeit des $p53$ Status. Synchronisierte CV-1 Zellen wurden am G1/S-Übergang (0 h) nicht bzw. mit 10 Gy bestrahlt, zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und die Cdk-Aktivitäten im „target-bound“-Histon-Kinaseaktivitätstest gemessen.

Allerdings weisen die Ergebnisse, die mit 10 Gy bestrahlten, induzierten wtp53 TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen erhalten wurden, darauf hin, dass die lang anhaltende inhibitorische Phosphorylierung von Cdk1 unmittelbar mit der Anwesenheit von funktionellem $p53$ in Verbindung stehen muss. In letal geschädigten wtp53 TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen steigt ab 10 h nach Bestrahlung die Zyklin B-Cdk1 Aktivität kontinuierlich an und erreicht ihr Maximum (**Abb. 5-16**) genau zu dem Zeitpunkt bei dem die Cyclin B-assoziierte Cdk1 nicht mehr inhibitorisch phosphoryliert ist (**Abb. 5-14C**, rechte Spalte). Im Unterschied zu CV-1 und TO-CV-1-Flag-mut $\Delta p53$ Zellen ist in den TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen, in denen $p53$ inaktiviert vorliegt, Cyclin B-Cdk1 nicht mit p21 komplexiert, woraus sich schließen lässt, dass die Abwesenheit von transkriptionell aktivem $p53$ die Cdc25C-katalysierte Dephosphorylierung des Tyrosinrestes 15 von Cdk1 begünstigt. Demnach ist in letal geschädigten Zellen $p53$ -induziertes p21 für die Verstärkung bzw. Aufrechterhaltung der inhibitorischen Phosphorylierung von Cyclin B-Cdk1 essenziell und somit ein wichtiger Bestandteil des G2-„Exit“, der letztendlich in Apoptose mündet.

Insgesamt zeigt sich damit, dass nicht nur durch Unterschiede im Ausmaß des induzierten DNA Schadens sondern auch durch den *p53* Status der Ausgang der Schadensreaktion beeinflusst wird. Der Einfluss von *p53* auf den Ausgang der Schadensreaktion wird allerdings erst bei letalen Schäden, die normalerweise zur Aktivierung der Eliminierungsprozesse führen, offensichtlich. Anscheinend spielen bei den *p53*-induzierten Eliminierungsprozessen nicht nur die bekannten pro-apoptischen Faktoren wie z.B. *bax* und *pig3* eine Rolle sondern überraschenderweise auch zellzyklusregulierende Faktoren wie *p21* und $14\text{-}3\text{-}3\sigma$, denen eine anti-apoptische Wirkung zugeschrieben wird. Grund dieser Annahme ist, dass in 10 Gy bestrahlten *wtp53* TO-CV-1-Flag-*mutp53* Zellen die Cdk1-aktivierende Phosphatase *Cdc25C* durch Dephosphorylierung ihres Serinrestes 216 aktiviert wird, ein Ereignis das erst ermöglicht wird durch die fehlende Interaktion mit $14\text{-}3\text{-}3\sigma$, ein Faktor der phosphoryliertes Serin-216 vor Dephosphorylierung schützt. Dieses Prinzip gilt auch für Cdk1, dessen inaktivierend wirkende Tyrosin-15 Phosphorylierung auf Grund der fehlenden Interaktion mit *p21* nicht vor der aktivierend wirkenden *Cdc25C*-katalysierten Dephosphorylierung geschützt werden kann. Darüber hinaus weisen die Daten darauf hin, dass der Cdk-Inhibitor *p21* in Abhängigkeit des induzierenden *p53*-Proteins und des Zeitpunkts der Induktion sowohl anti-apoptische als auch pro-apoptische Funktionen ausüben kann. Festzustellen ist, dass die ATM/ATR-vermittelte Initialisierung des G2-Kontrollpunkts, wie auch die Initiation des intra-S-Kontrollpunkts, unabhängig von *p53* ist, jedoch ist die transkriptionelle Aktivität von *p53* für die Umwandlung des G2-Kontrollpunkts in einen G2-Arrest relevant.

5.7 Der Ausgang der Schadensreaktion bei letaler Schädigung wird durch den *p53* Status determiniert

Der Nachweis, dass die gemessenen Cdk-Aktivitäten sowie die zeitliche Abfolge der Cdk-Komplexbildung und -Modifikation einen Rückschluss auf den Ausgang der Schadensreaktion in Abhängigkeit des *p53* Status zulassen, wurde durch FACS-Analyse erbracht. Analysiert wurden synchronisierte, am G1/S-Übergang mit 10 Gy bestrahlte *wtp53* CV-1 Zellen sowie die isogenen *wtp53* TO-CV-1 Zellen, in denen nach Zugabe von Dox endogenes *wtp53* bzw. *wtΔp53* dominant-negativ inaktiviert wird. Wie **Abb. 5-17** zeigt, erfolgt in *wtp53* CV-1 Zellen nach sukzessiver Aktivierung der Kontrollpunkte intra-S, G2 sowie G2-„Exit“ die Induktion der Apoptose, die sich 24 h nach Bestrahlung durch einen breiter werdenden G2-DNA Gehalt sowie eine kleine sub-G1 Fraktion bemerkbar macht.

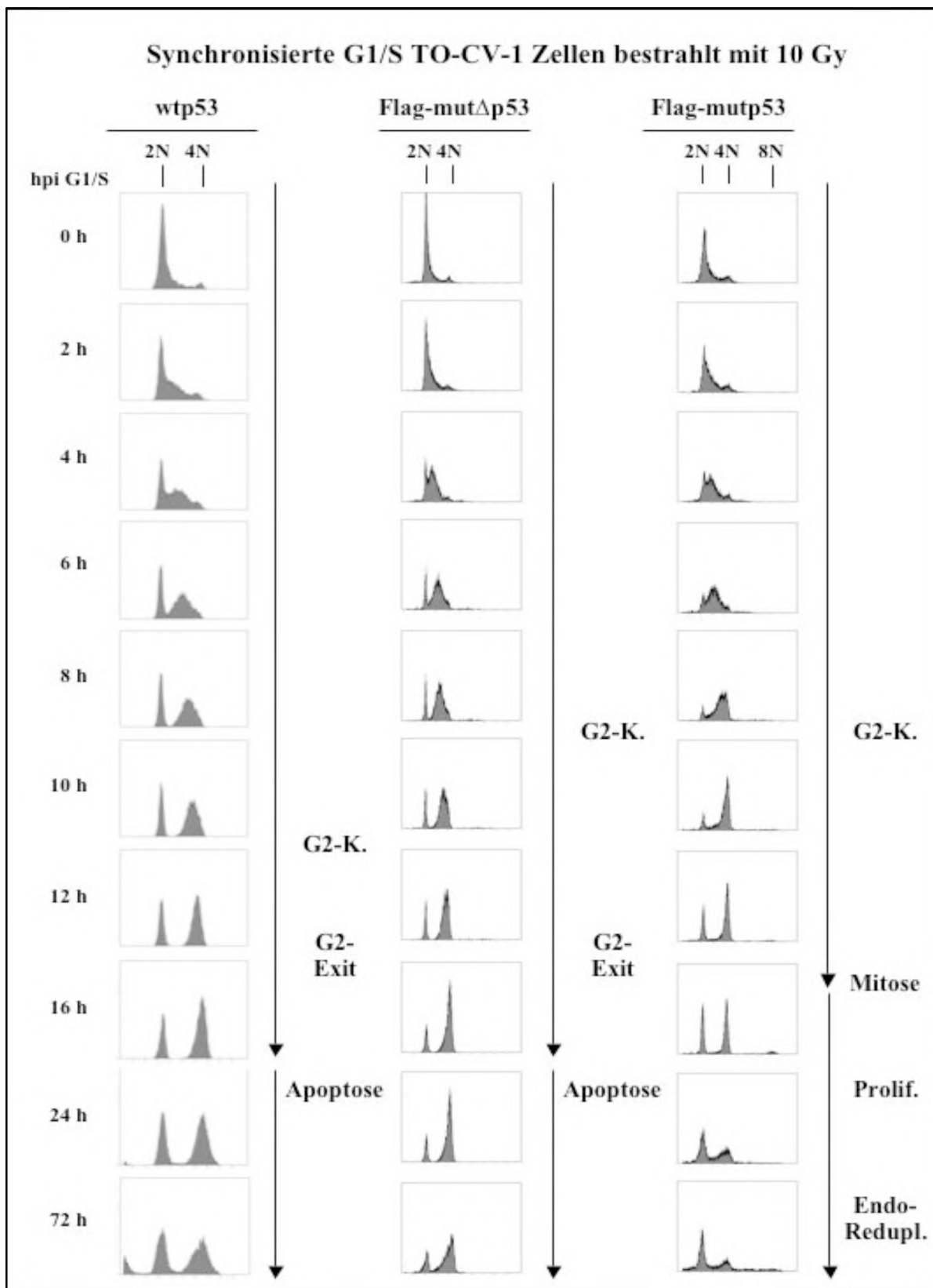


Abb. 5-17: FACS-Analyse 10 Gy bestrahlter CV-1 und TO-CV-1-Flag-mutp53/mut Δ p53 Zellen. Ausgehend vom G1/S-Übergang (0 h) wurden bestrahlte Zellen 72 h lang weiter kultiviert, zu den angegebenen Zeiten mit Ethanol fixiert und mit Propidiumiodid gefärbt. Bei der durchflusscytometrischen Analyse des DNA Gehalts wurden je 10.000 Zellen erfasst. Bestrahlung mit 10 Gy führt zur Aktivierung apoptotischer Ereignisse in Abhängigkeit des p53 Status. TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen entziehen sich der Apoptose durch Polyploidisierung, erkennbar am DNA Gehalt größer als 4N.

Auch letal geschädigte Zellen ohne funktionelles $\Delta p53$ weisen zu diesem Zeitpunkt die charakteristischen Merkmale der Apoptose auf, der ebenfalls die Aktivierung der Kontrollpunkte G2 und G2-„Exit“ vorausgehen. Allerdings progressieren TO-CV-1-Flag-mut $\Delta p53$ Zellen im Vergleich zu wtp53 CV-1 und TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen wesentlich schneller durch die replikative S-Phase, eine Konsequenz des fehlenden $\Delta p53$ -vermittelten intra-S-Kontrollpunkts, und aktivieren den G2-Kontrollpunkt 2 h früher als wtp53 CV-1 Zellen. Diese Resultate zeigen, dass der $\Delta p53$ -vermittelte intra-S-Kontrollpunkt keine Voraussetzung für die Induktion der Eliminierungsprozesse ist. Eine unabdingbare Voraussetzung für die Apoptose jedoch ist funktionelles p53, dessen transkriptionelle Aktivität für den Übergang vom G2-Kontrollpunkt in den p53-vermittelten G2-„Exit“ essenziell ist. Dies wird umso deutlicher bei Betrachtung der FACS-Profile bestrahlter TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen, die zwar nach Beendigung der S-Phase 8 h nach Bestrahlung den G2-Kontrollpunkt aktivieren, diesen aber nicht in einen „Exit“ manifestieren können. Aus der FACS-Analyse geht eindeutig hervor, dass in diesen Zellen der G2-Kontrollpunkt zu Gunsten der Proliferation aufgehoben wird und die Zellen nach dem Durchlaufen der Mitose in die nächste Zellzyklusphase übergehen. Des Weiteren geht aus der FACS-Analyse hervor, dass TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen nicht nur eine DNA Schädigung mit 10 Gy überleben sondern einen DNA Gehalt größer als 4N aufweisen, der bereits 16 h nach Bestrahlung gemessen werden kann. Das besondere Ereignis der strahleninduzierten Polyploidisierung wurde auch nach Bestrahlung mit 10 Gy bzw. 20 Gy in den humanen „type II“ mutp53 Zellen SW480 (Colon-Adenocarcinom), A431 (epidermoides Carcinom) sowie Karpas-299 (T-Zell Lymphom) beobachtet (Daten nicht gezeigt). Demzufolge ist die Generierung von polyploiden Zellen infolge 10 Gy bzw. 20 Gy Bestrahlung nicht Zelllinien spezifisch, sondern korreliert mit der Konstellation mutp53 und wt $\Delta p53$ die in diesen „type II“ mutp53 Zellen vorgefunden wird. Bestrahlung von „type I“ mutp53 CEM Zellen (T-Zell Lymphom), in denen beide p53-Formen mutiert sind, sowie p53-null Zellen HL60 (promyelocytische Zelllinie), in denen p53 deletiert ist, zeigen dieses Phänomen der Polyploidisierung nicht, im Gegenteil, diese schwer geschädigten Zellen werden ebenfalls durch apoptotische Vorgänge vollständig eliminiert (**Abb. 5-18**).

Auffallend ist, dass in schwer geschädigten TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen die transkriptionelle Aktivität von $\Delta p53$ 16 h nach Bestrahlung reaktiviert wird und den Cdk-Inhibitor p21 hochreguliert (**Abb. 5-11**). Allerdings hat dieses p21 auf Grund der fehlenden Komplexierung mit Cyclin B-Cdk1 keinerlei inhibitorische Wirkung auf diese Mitose-

fördernde Aktivität (**Abb. 5-14; 5-15**). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Expression von $\Delta p53$ -induziertes p21 negative Auswirkungen auf den Eliminierungsprozess haben könnte, zumal „type I“ mutp53 und p53-null Zellen wie auch wtp53 Zellen in die Apoptose gehen. Dieser Befund weist darauf hin, dass die biologische Rolle von $\Delta p53$ vor allem in einer anti-apoptotischen Wirkung besteht. Dabei ist die anti-apoptotische Wirkung von $\Delta p53$ anscheinend eng koordiniert mit der p53-Aktivität. So zeigt die Induktion von Apoptose in wtp53 exprimierenden CV-1 und HSC93 Zellen nach 10 Gy Bestrahlung, dass bei gemeinsamer Expression von wtp53 und wt $\Delta p53$ pro-apoptotische p53-Aktivitäten über die anti-apoptotische $\Delta p53$ -Wirkung dominieren.

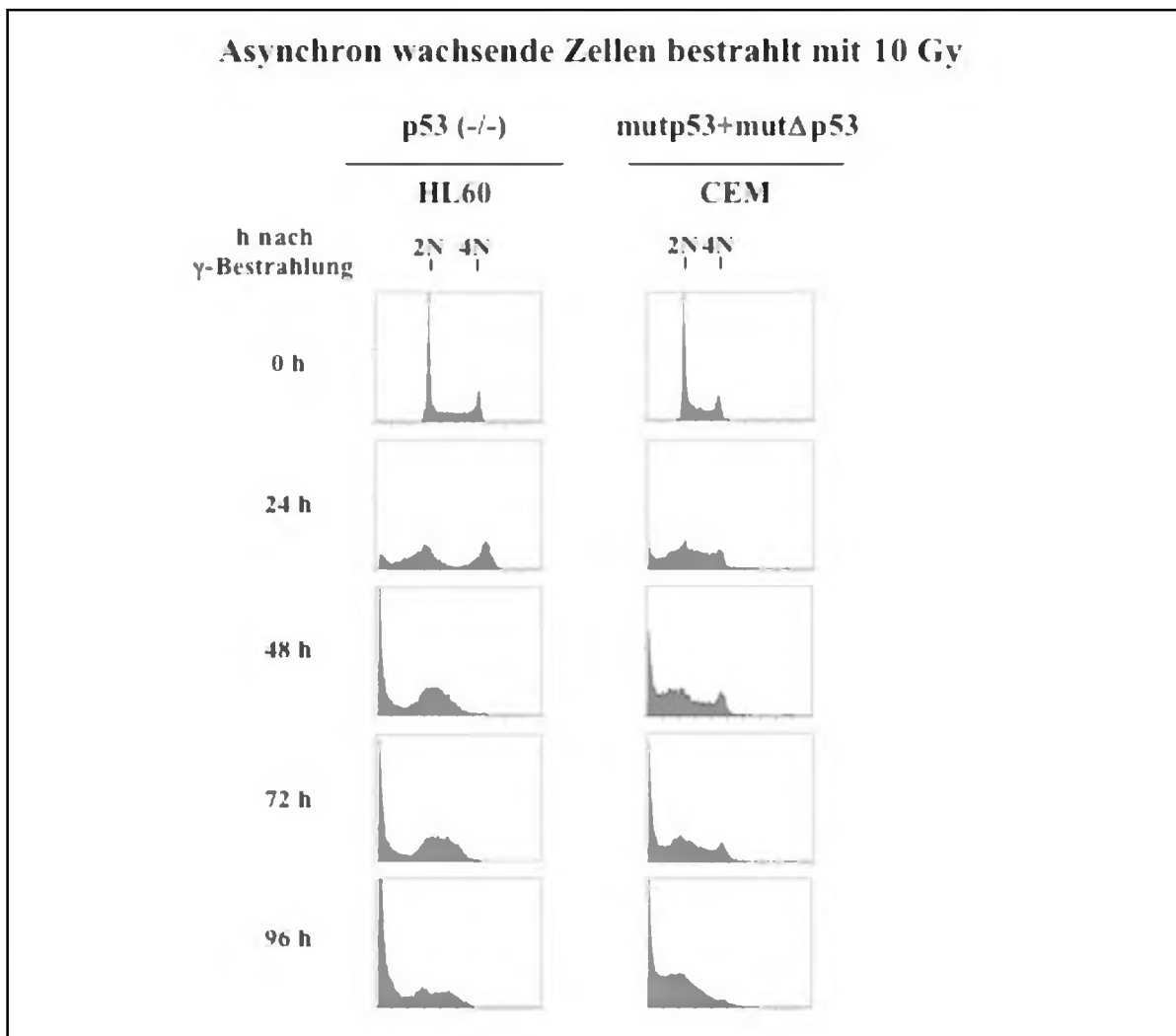


Abb. 5-18: FACS-Analyse 10 Gy bestrahlter humaner p53-null und „type I“ mutp53 Lymphom-Zellen. Asynchron wachsende HL60 und CEM Zellen wurden mit 10 Gy bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit Ethanol fixiert. Für die durchflusscytometrische Analyse wurden die Zellen mit Propidiumiodid gefärbt und jeweils 10.000 Zellen erfasst. Die Zellen gehen 24 h nach Bestrahlung in die Apoptose, erkennbar an der vollständigen Fragmentierung der DNA.

Um die zellulären Reaktionen Apoptose und Polyploidisierung, als Folge schwerer DNA Schädigung nach Bestrahlung mit 10 Gy auch biochemisch nachzuweisen, wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Die Zerstörung einer Zelle im Zuge des programmierten Zelltods erfolgt im Wesentlichen durch den gesteuerten Abbau von Proteinen und DNA (Thornberry und Lazebnik, 1998). Die Protease Caspase 3 gehört als eine der Effektor-Caspasen dabei zu den Faktoren, deren Aktivität maßgeblich für das Voranschreiten des Zerstörungsprozess verantwortlich sind (Degterev *et al.*, 2003). Das Vorhandensein von aktiver Caspase 3, die durch proteolytische Spaltung im Zuge der Induktion des apoptotischen Programms aus dem Proenzym Procaspase 3 gebildet wird, kann daher als Marker für Apoptose dienen. Zum Nachweis von aktiver Caspase 3 in Western Blot Analysen wurde ein spezifischer Antikörper verwendet, der nur die proteolytisch aktive Form, nicht jedoch die inaktive Procaspase 3 erkennt. Wie **Abb. 5-19A, B** zeigt, ist die aktive Form von Caspase 3 nur im Lysat aus wtp53 CV-1 Zellen nach 10 Gy Bestrahlung detektierbar. Damit konsistent können Spaltprodukte der Cdk1-aktivierenden Phosphatase Cdc25C ebenfalls nur in wtp53 CV-1 Zellen nachgewiesen werden. Nachweisbar sind aktivierte Caspase 3 sowie degradierte Cdc25C auch in TO-CV-1-Flag-mut Δ p53 Zellen (Daten nicht gezeigt). Charakteristisch für die p53-induzierten apoptotischen Ereignisse ist die Hochregulation der pro-apoptotischen Faktoren bax und pig3, die ebenfalls in TO-CV-1-Flag-mut Δ p53 nicht jedoch in TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen detektierbar sind (Daten nicht gezeigt, **Abb. 5-19B**).

Ein direkter Nachweis für die Progression der Zellen durch die Mitose ist die Phosphorylierung von Histon 3 am Serinrest 10. Verantwortlich für die Phosphorylierung ist die zellzyklusregulierende Kinase Aurora-B, deren Aktivität essenziell für die Chromatinkondensation und somit von fundamentaler Bedeutung für die Mitose ist (Monaco *et al.*, 2005). Wie die Western Blot Analyse zeigt, ist in den TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen tatsächlich Histon 3 an Serin-10 von 16-20 h nach Bestrahlung phosphoryliert und somit ein direkter Beweis, dass diese schwer geschädigten Zellen durch die Mitose gehen (**Abb. 5-19B**). Ein zusätzlicher Hinweis für die erfolgreiche Zellteilung schwer geschädigter TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen ergibt sich aus der Expressions-Analyse des Cdk2 Inhibitors p27. Die Western Blot Analyse zeigt, dass dieser Cdk-Inhibitor 18 h nach Bestrahlung zunächst stark exprimiert, aber ab 20 h wieder degradiert wird (**Abb. 5-19B**). Bekannt ist, dass die Expression von p27 zur Arretierung der Zellen in G₀ führt und zwar in der Zellzyklusposition, die sich unmittelbar nach der Mitose und noch vor dem Eintritt in die G₁-Phase befindet (Myers *et al.*, 2004). Für den Wiedereintritt der G₀-Zelle in den replikativen Zellzyklus ist die Degradation von p27 unerlässlich (Bartek und Lukas, 2001; Nakayama *et*

al., 2004). Diese Daten sind ein eindeutiger Hinweis dafür, dass schwer geschädigte TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen in der Lage sind nicht nur dem ATM/ATR-vermittelten Zellzyklusstopp zu entkommen sondern auch nach erfolgter Zellteilung die Zellzyklusprogression anzutreiben.

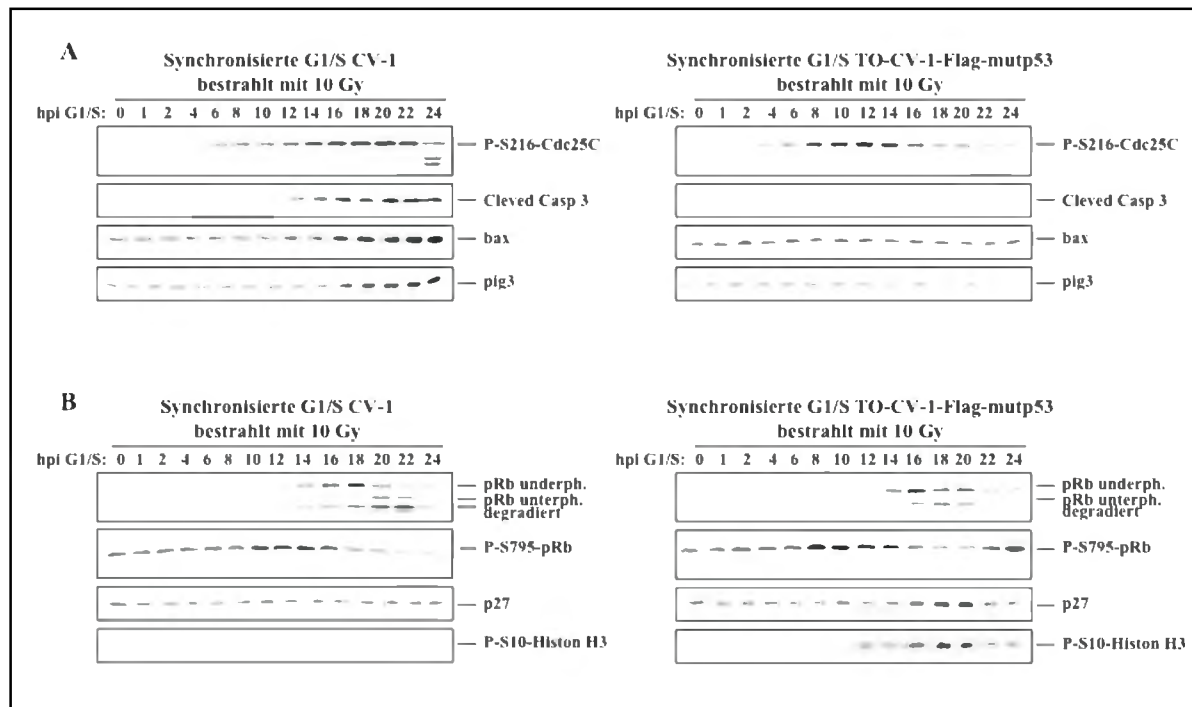


Abb. 5-19: Bestrahlung mit 10 Gy induziert die Eliminierung von wtp53 CV-1 Zellen, während TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen, mit der Konstellation mutp53 und wt Δ p53, proliferieren. Western Blot Analyse synchronisierter Zellen, die am G1/S-Übergang mit 10 Gy bestrahlt wurden. Die Zellen wurden nach Bestrahlung zu den angegebenen Zeiten geerntet und für die Western Blot Analyse aufbereitet. Die Apoptosemarker, aktive Caspase 3 und die apoptotischen Fragmente von Cdc25C, sowie die p53-induzierten pro-apoptotischen Faktoren bax und pig3 sind nur in CV-1 Zellen detektierbar (A). Der Nachweis der erfolgten Mitose sowie Eintritt in die nächste Proliferationsrunde bestrahlter TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen zeigt sich anhand der Phosphorylierung von Histon H3, Expression und Degradation des Cdk-Inhibitors p27 sowie des Phosphorylierungsmusters von pRb (B).

Schwer geschädigte „type II“ mutp53 Zellen mit der Konstellation mutp53 und wt Δ p53, die in TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen nach Zugabe von Dox erzeugt wird, entkommen nicht nur dem G2-„Exit“ und der daraus resultierenden Eliminierung, sie zeigen zusätzlich das Phänomen der Polyploidisierung. Die Erhöhung des DNA Gehaltes über 4N erfordert die Endoreduplikation des Genoms, ein Vorgang, der dem Prinzip der einmaligen Replikation pro Zellzyklusrunde nicht Folge leistet. Ein wichtiger Faktor, der geschädigte Zellen vor Polyploidisierung als Folge der Endoreduplikation schützt ist pRB, das in seiner unterphosphorylierten und somit aktiven Form den Transkriptionsfaktor E2F inhibitorisch komplexiert und folglich die Zellzyklusprogression stoppt. Aus **Abb. 5-19B** geht hervor, dass sowohl in CV-1 als auch in TO-CV-1-mutp53 Zellen pRB ab 10 h bzw. 8 h nach Bestrahlung

für 6 h an Serin-798 verstärkt phosphoryliert ist. Auffallend ist, dass der Beginn der verstärkten Phosphorylierung von pRB dem Zeitpunkt der Aktivierung des G2-Kontrollpunkts entspricht und der Beginn der Dephosphorylierung korreliert mit der Manifestation des G2-„Exit“ in CV-1 bzw. des „Escape“ in TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen. Anzunehmen ist, dass die inaktivierende Phosphorylierung von pRB eine Voraussetzung ist, um die letal geschädigten Zellen tiefer in den Zellzyklus und somit in den G2-„Exit“ zu treiben, der allerdings in TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen auf Grund der fehlenden transkriptionellen Aktivität von p53 nicht etabliert werden kann. **Abb. 5-19B** zeigt auch, dass sowohl in CV-1 als auch in TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen pRB 16 h nach Bestrahlung dephosphoryliert und degradiert wird. Der Mechanismus der zur Degradation von unterphosphoryliertem pRB führt ist bislang unbekannt, jedoch ist die Dephosphorylierung von pRB eine Voraussetzung für den Abbau (Ma *et al.*, 2003). Anzunehmen ist, dass in CV-1 Zellen im Zuge des Eliminierungsprozesses die Transkription zum Erliegen kommt, wodurch nach der Degradation von pRB das freigesetzte E2F zwar aktiv ist aber die für die Zellzyklusprogression notwendigen Faktoren wie Cyclin A, B sowie Cdk1 nicht mehr induzieren kann. Im Unterschied dazu sind TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen durchaus in der Lage Proteine zu exprimieren, wie die erneute Expression von pRB, die 22 h nach Bestrahlung detektierbar ist, zeigt. Darüber hinaus wird pRB zum selben Zeitpunkt am Serin-795 inhibitorisch phosphoryliert, wodurch E2F aktiviert bleibt und auf Grund dessen die Transaktivierung der E2F-regulierten essenziellen Zellzyklusfaktoren durchaus vorstellbar ist.

Insgesamt weisen diese Befunde darauf hin, dass die transkriptionelle Aktivität von p53 eine wichtige Komponente für den G2-„Exit“ ist. Dieser G2-Arrest, der nur durch die p21-vermittelte Inhibition der Cyclin B-Cdk1 Aktivität möglich ist, unterbindet die weitere Progression der schwer geschädigten Zelle zu Gunsten apoptotischer Ereignisse. Eine weitere Komponente, die eine wichtige Rolle bei der Eliminierung letal geschädigter Zellen spielt, ist pRB. Dieses wachstumsregulierende Protein, das durch Komplexierung mit E2F die E2F-regulierte Transaktivierung von Cyclin B und Cdk1 inhibiert, gewährleistet auf der transkriptionellen Ebene die vollständige Eliminierung der Mitose-fördernden Kinase. Letal geschädigte Zellen, die kein funktionelles p53 exprimieren, sind nicht in der Lage den strahlendinduzierten G2-Kontrollpunkt in einen terminierenden G2-„Exit“ umzuwandeln. Im Gegenteil, diese Zellen verlassen den G2-Kontrollpunkt sehr schnell und progressieren nach erfolgter Mitose ungebremst in die nächste Proliferationsrunde. Ermöglicht wird dies durch Inaktivierung des wachstumsregulierenden Faktors pRB, dessen funktioneller Verlust in letal

geschädigten Zellen zusätzlich zur Entkopplung von S-Phase und Mitose führt, wie die Entstehung von polyploiden TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen beweist.

5.8. In wtp53 Zellen sind Entkopplung der Reparatur- und Replikationsereignisse $\Delta p53$ -abhängig, während die Eliminierungsprozesse abhängig von funktionellem p53 sind

Die Aktivierung strahlendinduzierter Kontrollpunkte führt in erster Linie zur Attenuation der Zellzyklusprogression und zur Mobilisierung der Reparaturmaschinerie, bevor in Abhängigkeit der Schwere des DNA Schadens die Entscheidung zwischen Proliferation und Apoptose fällt. Wie die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen, ist die Aktivierung der Kontrollpunkte intra-S und G2 unabhängig von der transkriptionellen Aktivität beider p53-Proteine, jedoch spielen beide Aktivitäten eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der schadeninduzierten Kontrollpunkte in S bzw. G2 und vor allem bei dem Ausgang der Schadensreaktion. Anzunehmen ist, dass während der Attenuation der Zellzyklusprogression die Reparatur des geschädigten Genoms erfolgt, dessen qualitative Instandsetzung wiederum Einfluss auf die Schadensreaktion nimmt. Dies wird besonders deutlich bei der Betrachtung von Zellen, die am G1/S-Übergang mit UV-Licht geschädigt wurden. Ausschließlich Zellen, die auf Grund der transkriptionellen Aktivität von $\Delta p53$ den ATR-initiierten intra-S-Kontrollpunkt aufrechterhalten können, reparieren die geschädigte DNA noch vor Beginn der Replikation (Rohaly et al., 2005). Unbekannt ist, ob γ -bestrahlte Zellen ebenfalls in Abhängigkeit des p53 Status ihr geschädigtes Genom noch vor Beginn der DNA Replikation reparieren. Diese Fragestellung ergibt sich aus dem unterschiedlichen Reparaturprozessen, die in UV- bzw. γ -geschädigten Zellen stattfinden. UV-Strahlung aktiviert den „nucleotide excision repair“ (NER) Mechanismus, während durch γ -Strahlung verursachte DNA Doppelstrangbrüche die schadeninduzierte Signalkaskade mobilisieren, die zur Aktivierung der Reparaturwege NHEJ (non homologous end joining) und HDR (homology-dependent recombination) führen. Die Art und Weise wie die Reparatur von DNA Doppelstrangbrüchen erfolgt ist abhängig vom DNA Gehalt und somit von der Position der geschädigten Zelle im Zellzyklus. Plausibel ist, dass geschädigte Zellen mit einem DNA Gehalt von 2N ihre Schäden nur über den NHEJ Reparaturweg beheben können, während die akkuratere HDR erst während bzw. nach Duplikation des Genoms ermöglicht werden kann. Auf Grund dessen war es von Interesse, die Reparaturvorgänge in G1/S γ -bestrahlten CV-1 bzw. TO-CV-1-Flag-mutp53/mut $\Delta p53$ Zellen zu untersuchen insbesondere in Hinblick auf den unterschiedlichen Ausgang in der Schadensreaktion.

Die Messung der Reparaturaktivität von CV-1 sowie den isogenen induzierbaren TO-CV-1 Zellen, die am G1/S-Übergang geschädigt wurden, erfolgte mit der Comet-Analyse. Allerdings erzeugen replikative Vorgänge wie auch γ -Strahlung Strangbrüche, die mit der Comet-Analyse erfasst werden (Olive und Banath, 1993). Deshalb wurde zur Unterscheidung zwischen replikationsbedingten und strahleninduzierten Strangbrüchen zusätzlich die DNA Replikation mittels ^3H -Thymidin-Einbau gemessen. Synchronisierte, unbestrahlte und mit 2 Gy bestrahlte wtp53 CV-1 Zellen weisen während der S-Phase ein DNA Strangbruch Signal auf, das, wie die Messung der Replikationsaktivität mittels ^3H -Thymidin-Einbau zeigt, auf aktive DNA Replikation zurückzuführen ist (**Abb. 5-20A**). Offensichtlich ist, dass die maximale Replikationsaktivität in 2 Gy bestrahlte CV-1 Zellen 2 h später auftritt als in den unbestrahlten Zellen und reflektiert die intra-S-vermittelte zweistündige Inhibition des Replikationsstarts. Die strahlendinduzierte zweistündige Verzögerung des Beginns der DNA Replikation bestätigt sich bei Betrachtung des Expressionsverlaufs von Geminin. Geminin ist ein wichtiger Replikationsfaktor der unmittelbar nach Initiation der Replikation stabilisiert wird und eine fundamentale Rolle bei der Prävention einer Reinitiation spielt. Die Expression von Geminin steigt während der S- und G2-Phase kontinuierlich an und ist schließlich nach dem Eintritt der Zellen in die Mitose nicht mehr detektierbar (McGarry und Kirschner, 1998).

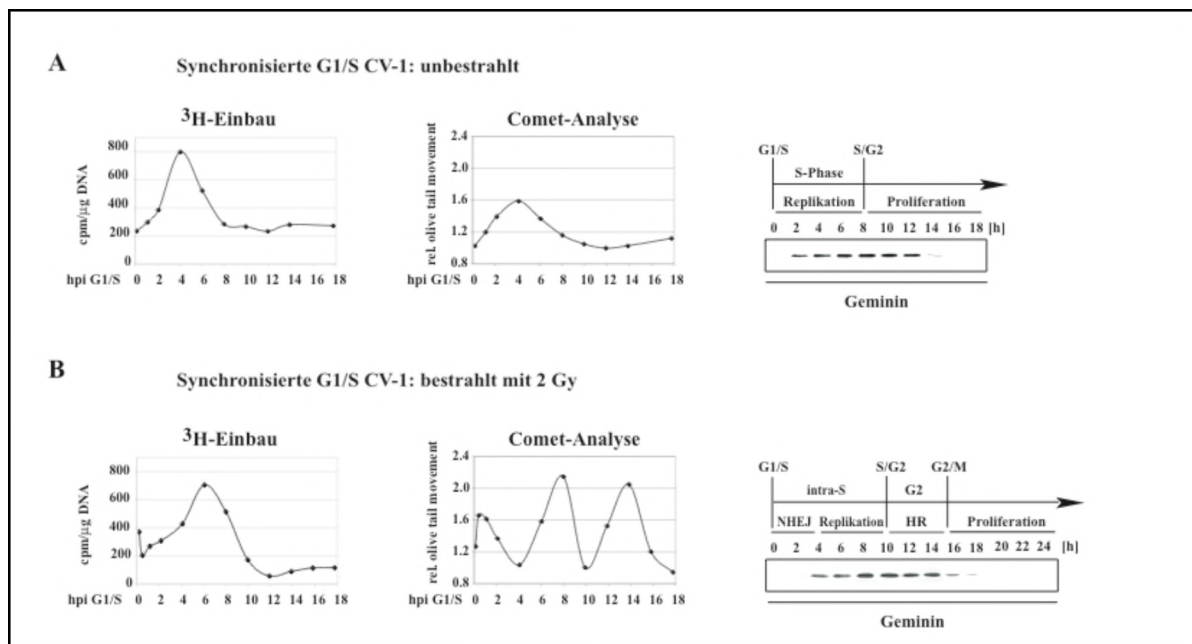


Abb. 5-20: Replikations- und Reparaturereignisse am G1/S-Übergang mit 2 Gy bestrahlter wtp53 CV-1 Zellen. Synchronisierte CV-1 Zellen wurden am G1/S-Übergang (0 h) nicht (**A**) bzw. mit 2 Gy (**B**) bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten für die Messung der Replikations- (^3H -Einbau) sowie Reparaturaktivität (Comet-Analyse) verwendet. Der Nachweis von Geminin, ein Marker für den Beginn der DNA Replikation sowie den Beginn der Mitose, erfolgte im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper. Bestrahlung mit 2 Gy verzögert den Beginn der Replikation und der Mitose um 2 h.

In unbestrahlten CV-1 Zellen entspricht die Geminin Expression der Replikationsaktivität sowie einer ungestörten Zellzyklusprogression. Unmittelbar nach dem Eintritt der Zellen in die S-Phase steigt die Proteinmenge an Geminin kontinuierlich an und bricht nach dem Beginn der Mitose, die 12 h nach dem G1/S-Übergang stattfindet, abrupt ab (**Abb. 5-20A**). Auch in 2 Gy bestrahlten CV-1 Zellen korreliert der Verlauf der Geminin Expression mit dem Beginn der Replikation und dem Eintritt der Zellen in die Mitose, wobei Geminin von 4 h bis 14 h nach Bestrahlung detektierbar ist (**Abb. 5-20B**). Dieses Ergebnis bestätigt, dass subletale Schädigung am G1/S-Übergang die Zellzyklusprogression kaum beeinträchtigt und die Zellen mit nur einer zweistündigen Verspätung durch die Mitose gehen.

Direkt nach Bestrahlung mit 2 Gy ist in CV-1 Zellen ein deutliches DNA Strangbruch-Signal detektierbar, das 2 h nach Bestrahlung auf das Grundniveau absinkt und anschließend zwei Maxima zu den Zeitpunkten 8 h und 14 h nach Bestrahlung aufweist (**Abb. 5-20B**). Der Vergleich mit der ³H-Einbaurrate zeigt, dass das zweite DNA Strangbruch-Signal mit der Replikationsaktivität korreliert, während das erste und das dritte Signal nicht von dieser Aktivität stammen. Daraus kann geschlossen werden, dass das erste Comet-Signal, das noch vor Beginn der DNA Replikation gemessen wird, der NHEJ Reparatur entspricht, während das dritte Signal, das nach Beendigung der DNA Replikation entsteht, die Aktivität der HDR Reparatur reflektiert. Der Vergleich der gemessenen ³H-Einbaurrate mit der Position der 2 Gy bestrahlten CV-1 Zellen im Zellzyklus zeigt, dass unmittelbar nach Aktivierung des ATM-vermittelten intra-S-Kontrollpunkts die Replikation zu Gunsten der NHEJ Reparatur inhibiert ist, während nach Beendigung der DNA Replikation und Aktivierung des G2-Kontrollpunkts die HDR Reparatur stattfindet. Dieses Experiment zeigt zum ersten Mal, dass am G1/S-Übergang erzeugte DNA Doppelstrangbrüche durch zwei verschiedene Reparaturwege repariert werden, wobei die NHEJ im intra-S und die HDR nach abgeschlossener Replikation im G2-Kontrollpunkt erfolgen.

Bestrahlung von Zellen am G1/S-Übergang mit 10 Gy induziert in Abhängigkeit des *p53* Status entweder apoptotische Ereignisse oder Polyploidisierung, wobei letzteres Ereignis den schwer geschädigten „type II“ mutp53 Zellen das Überleben ermöglicht. Deshalb war es von Interesse, die Replikations- und Reparaturaktivitäten in „type II“ mutp53 Zellen zu messen und mit den Aktivitäten terminierter wtp53 CV-1 sowie TO-CV-1-mutΔp53 Zellen zu vergleichen. Wie **Abb. 5-21A** zeigt, ist in wtp53 CV-1 Zellen nach einer Bestrahlung mit 10 Gy der Beginn der Replikation zu Gunsten der NHEJ Reparatur bis zu 4 h inhibiert. Wie auch in 2 Gy bestrahlte Zellen, beginnt unmittelbar nach Beendigung der Replikation der HDR

Reparaturprozess. Unterschiedlich jedoch ist die Dauer der HDR Reparatur, die in 2 Gy bestrahlten wtp53 CV-1 Zellen ca. 4 h und in 10 Gy bestrahlten wtp53 CV-1 Zellen ca. 8 h beträgt. Ein gravierender Unterschied zeigt sich im Comet-Signal, das in schwer geschädigten Zellen 20 h nach Bestrahlung sprunghaft ansteigt und bis zum Ende des 45stündigen Beobachtungszeitraums kontinuierlich zunimmt. Nachdem mit der Comet-Analyse DNA Strangbrüche gemessen werden, reflektiert dieses Comet-Signal die apoptotisch induzierte Fragmentierung der DNA. Ein ähnliches Bild ergibt die Untersuchung 10 Gy bestrahlter TO-CV-1-Flag-mut Δ p53 Zellen, in denen endogenes wt Δ p53 dominant-negativ inaktiviert ist. Auf Grund der fehlenden transkriptionellen Aktivität von Δ p53, wird die DNA Replikation, im Vergleich zu wtp53 CV-1 Zellen nur kurzfristig inhibiert, wie dies auch bei Betrachtung der Geminin Expression deutlich hervorgeht. Darüber hinaus impliziert die Comet-Analyse,

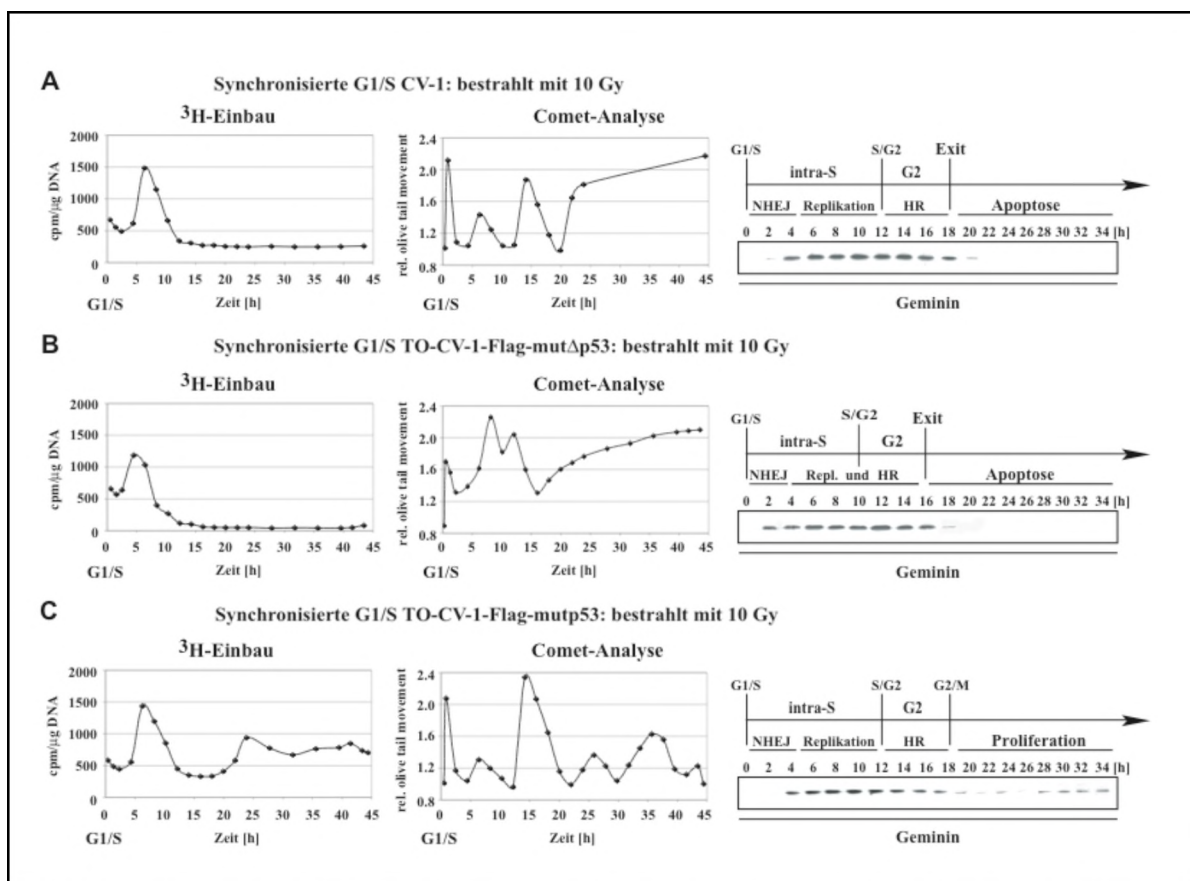


Abb. 5-21: Replikations- und Reparaturereignisse am G1/S-Übergang mit 10 Gy bestrahlter wtp53 CV-1 und TO-CV-1-Flag-mutp53/mut Δ p53 Zellen. Synchronisierte CV-1 (A), TO-CV-1-Flag-mut Δ p53 (B) und TO-CV-1-Flag-mutp53 (C) Zellen wurden am G1/S-Übergang (0 h) mit 10 Gy bestrahlt und zu den angegebenen Zeitpunkten für die Messung der Replikations- (3 H-Einbau) sowie Reparaturaktivität (Comet-Analyse) verwendet. Der Nachweis von Geminin, ein Marker für den Beginn der DNA Replikation sowie den Beginn der Mitose, erfolgte im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper. Bestrahlung mit 10 Gy verzögert den Beginn der Replikation um 4 h nur in wt Δ p53 exprimierenden Zellen, während Bestrahlung mit 10 Gy Apoptose nur in wtp53 exprimierenden Zellen induziert.

dass die Replikation noch vor Beendigung der NHEJ Reparatur initiiert wird. Dies gilt auch für den sich anschließenden HDR Reparaturvorgang, der, wie das Comet-Signal zeigt, noch vor Beendigung der Replikation beginnt (**Abb. 5-21B**). Die Daten weisen darauf hin, dass, wie auch in UV-bestrahlte TO-CV-1-Flag-mut Δ p53 Zellen beobachtet wurde, die Δ p53-vermittelte Attenuation der S-Phasen Progression essenziell für die Entkopplung der Reparatur- und Replikationsereignisse ist (Rohaly et al., 2005). Insgesamt attenuiert transkriptionell aktives Δ p53 nach γ -Bestrahlung am G1/S-Übergang die S-Phasen Progression nur um 2 h, jedoch werden diese zusätzlichen 2 h für eine optimale Entkopplung von NHEJ Reparatur, Replikation und HDR Reparatur benötigt. Wie auch in wtp53 Zellen, steigt nach der zweiten Reparaturphase das Comet-Signal in TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen kontinuierlich an und ist somit ein eindeutiger Beweis für die Initiation apoptotischer Ereignisse.

Die Messung der Replikationsaktivität, Reparaturaktivität sowie die Erfassung apoptotisch induzierter Strangbrüche bestätigen, dass Δ p53 eine wichtige Funktion in der geschädigten S-Phase, nicht jedoch bei der Induktion apoptotischer Ereignisse ausübt. Anders wirkt sich der Verlust von transkriptionell aktivem wtp53 in wt Δ p53 exprimierenden Zellen aus, die auch nach letaler Schädigung der vollständigen Eliminierung entkommen können. Die Messung der Replikationsaktivität zeigt, dass in 10 Gy bestrahlten TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen wie auch in wtp53 CV-1 Zellen, die beide funktionelles wt Δ p53 exprimieren, die Initiation der DNA Replikation für 4 h zu Gunsten der NHEJ Reparatur inhibiert ist (**Abb. 5-21C**). Die Inhibition der DNA Synthese zeigt sich besonders deutlich in der Expression von Geminin, das erst 4 h nach Schädigung der Zellen am G1/S-Übergang exprimiert wird. Im Vergleich zu den anderen 10 Gy bestrahlten Zellen, in denen Geminin 18 h bzw. 16 h nach Bestrahlung nicht mehr exprimiert wird, ist in TO-CV-1-mutp53 Zellen ab 28 h nach Bestrahlung eine schwache Geminin Expression detektierbar. Dieser Befund weist darauf hin, dass trotz der Schwere des DNA Schadens die Zellen replizieren können, ein Ereignis, das durch die Messung der Replikationsaktivität erhärtet wird. Die Replikationsaktivitätskurve zeigt, dass 10 h nach Bestrahlung die DNA Synthese beendet ist, aber bereits ab 20 h nach Bestrahlung eine erneute Replikationsaktivität mit einem Maximum bei 26 h und eventuell ab 32 h ein dritte gemessen werden kann. In der Comet-Analyse sind zu den Zeitpunkten 26 h und 36 h zwei zusätzliche Signale detektierbar, die sich unmittelbar nach dem HDR Reparatursignal anschließen, wovon der erste durchaus replikativen Ursprungs sein könnte, während das zweite von weiteren Reparaturereignissen stammen könnte. Synchronisierte Zellen, die durch die Mitose gegangen

sind werden asynchron und erschweren deshalb die Erfassung molekularer Vorgänge wie Replikation, Reparatur und Cdk-Aktivitäten. Auch TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen werden 20 h nach Bestrahlung am G1/S-Übergang asynchron und zeigen auf Grund dessen keinen diskreten Verlauf solcher Aktivitäten mehr.

Insgesamt zeigt sich, dass der Effekt der Polyploidisierung infolge 10 Gy Bestrahlung auf einem besonderen *p53* Status, d.h. der Kombination aus inaktiviertem *p53* und aktivem wt Δ p53 beruht. Einer der Hauptursachen ist sicherlich die Tatsache, dass „type II“ mutp53 Zellen auf Grund der fehlenden transkriptionellen Aktivität von *p53* keinen G2-Arrest bzw. G2-„Exit“ etablieren können und sich folglich der Terminierung entziehen, jedoch ist die Rolle von Δ p53 bei der Entstehung polyploider „type II“ mutp53 Zellen bislang völlig unbekannt. Anzunehmen jedoch ist, dass die koordinierte Aktivität von *p53* und Δ p53 einen substantiellen Einfluss auf die zelluläre Reaktion nach DNA Schädigung hat, und der *p53*/ Δ p53 Status von großer Bedeutung für den Ausgang der zellulären Schadensreaktion ist.

6. Diskussion

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Aufklärung der molekularen Mechanismen, mit denen die Aktivierung des schadeninduzierten G2-Kontrollpunkts erreicht und insbesondere die darauf folgende Entscheidung zwischen Wachstum und Eliminierung der geschädigten Zelle in Abhängigkeit von p53 und Δ p53 getroffen wird.

Wie zahlreiche Studien gezeigt haben, verfügt p53 sowohl über anti-apoptotische als auch pro-apoptotische Aktivitäten. Der Tumorsuppressor kann dadurch ein Überleben geschädigter Zellen ermöglichen, aber auch deren Eliminierung induzieren. Trotz intensivster Forschungsbemühungen war bislang völlig unklar, wie die konträr wirkenden p53-Aktivitäten nach DNA Schädigung integriert werden und welche Mechanismen für die Selektivität der p53-Antwort auf genotoxischen Stress verantwortlich sind. Eine der fundamentalen Fragen in diesem Zusammenhang ist, ob p53 selbst durch eine differenzielle Regulation seiner anti- und pro-apoptotischen Aktivitäten die Selektivität der zellulären Schadensreaktion bestimmt oder ob andere Faktoren verantwortlich dafür sind, dass die Aktivierung von p53 zu Überleben oder Eliminierung der geschädigten Zelle führt.

Gut untersucht ist die Funktion der neuen p53-Spleißvariante Δ p53 in mit UV-Licht geschädigten Zellen. Wie p53 verfügt auch die kleinere p53-Isoform über transkriptionelle Aktivität, jedoch transaktiviert Δ p53 ausschließlich zellzyklusregulierende Faktoren, die für die Aufrechterhaltung des ATR-vermittelten intra-S-Phasen Kontrollpunkts essenziell sind. Unbekannt ist jedoch inwieweit Δ p53 auch nach Aktivierung des schadeninduzierten G2-Kontrollpunkts eine Rolle bei der Entscheidung zwischen Wachstum und Eliminierung spielt.

Die Untersuchung dieser Fragen stand im Zentrum der hier vorgelegten Arbeit und erfolgte überwiegend anhand synchronisierter wtp53 CV-1 Zellen sowie induzierbarer wtp53 TO-CV-1-mutp53/mut Δ p53 Zellen, die am G1/S-Übergang bestrahlt wurden. Dieses isogene TO-Zellsystem erlaubt nach Zugabe von Dox die ektopische Expression von mutp53 bzw. mut Δ p53 und somit die dominant-negative Inaktivierung von endogenem wtp53 bzw. wt Δ p53. Von Vorteil ist, dass im isogenen Zellsystem die individuelle Funktion der Effektoren p53 und Δ p53 sowie deren koordinierte Aktivität im schadeninduzierten Signalweg unter Beibehaltung des identischen genetischen Hintergrundes untersucht werden kann. Für die Untersuchungen schadeninduzierter zellulärer Vorgänge wurden überwiegend synchronisierte Zellen am G1/S-Übergang bestrahlt. Ausgewählt wurde diese Position im Zellzyklus nachdem festgestellt werden konnte, dass DNA Schädigung zu diesem Zeitpunkt

zwei Kontrollpunkte sequenziell aktiviert, den intra-S- und den G2-Kontrollpunkt. Diese durch γ -Strahlung induzierte Schadensantwort unterscheidet sich von der zellulären Reaktion, die am G1/S-Übergang durch UV-Licht ausgelöst wird. UV-Strahlung löst nur die Aktivierung des ATR-vermittelten p53-unabhängigen intra-S- aber nicht den G2-Kontrollpunkt aus, vorausgesetzt, die am G1/S-Übergang geschädigten Zellen exprimieren funktionelles $\Delta p53$. Der Verlust von funktionellem $\Delta p53$ führt zum Abruch des intra-S-Kontrollpunkts und zur Induktion des p53-unabhängigen G2-Kontrollpunkts (Rohaly et al., 2005).

Durch Bestrahlung von wtp53 Zellen mit je einer subletalen (2 Gy) und einer letalen (10 Gy) Dosis an ionisierender γ -Strahlung konnten verschiedene Schadensreaktionen gezielt hervorgerufen werden. So führt die Bestrahlung mit 2 Gy zu einer temporär begrenzten Schadensreaktion, die Überleben und Proliferation der bestrahlten Zellpopulation nicht beeinträchtigt. Ein stärkeres Schadensausmaß führt zur Induktion apoptotischer Ereignisse. Unabhängig vom Ausgang der zellulären Schadensreaktion induzieren subletale wie auch letale Schäden eine Stabilisierung und Aktivierung von p53 und $\Delta p53$ sowie die Induktion von p53-Zielgenen. Dies zeigt, dass beide p53-Proteine unabhängig von der Schadensstärke an der Schadensreaktion beteiligt sind. Jedoch wirkt sich bei einer letalen Dosis an ionisierender Strahlung der p53 Status der geschädigten Zelle definitiv auf den Ausgang der Schadensreaktion aus, wie dies aus den Untersuchungen bestrahlter wtp53 CV-1 bzw. wtp53 TO-CV-1-mutp53/mut $\Delta p53$ Zellen hervorging.

6.1 Selektivität der Schadensreaktion in Abhängigkeit der differenziellen Transaktivierungsaktivität von p53 und $\Delta p53$

Entscheidend für die Klärung, ob p53 und $\Delta p53$ selbst den Ausgang der zellulären Schadensreaktion steuern oder der zelluläre Kontext dafür verantwortlich ist, war die Suche nach differenziell regulierten Parametern der Aktivitäten von p53 und $\Delta p53$. Dabei waren zwei Szenarien denkbar: Bei Vergleich der p53-abhängigen Signale in verschiedenen bestrahlten Zellen finden sich ungeachtet des unterschiedlichen Ausgangs der Schadensreaktion keine differenziell regulierten p53-Aktivitäten. Ein solcher Befund würde implizieren, dass der zelluläre Kontext und somit andere Faktoren entscheiden, zu welchem Ergebnis die Aktivierung von p53 führt (Vousden, 2000). Im anderen Fall steuern die p53-Proteine selbst den Ausgang der zellulären Schadensreaktion. Dies sollte sich bei Vergleich der verschiedenen bestrahlten Zellen in differenziell regulierten p53-Aktivitäten widerspiegeln, die spezifisch und selektiv mit einer bestimmten Schadensreaktion korrelieren.

Die Stabilisierung von p53 nach genotoxischem Stress gilt als zentrales Merkmal einer Aktivierung des Tumorsuppressors, die sich in der Induktion von p53-Zielgenen auswirkt (Übersichtsartikel: Ashcroft und Vousden, 1999; El-Deiry, 2003). In Übereinstimmung damit führt sowohl eine Bestrahlung mit 2 Gy als auch mit 10 Gy zu einer Stabilisierung von p53 und Δ p53 in wtp53 CV-1 Zellen. Interessanterweise zeigten sich bei Vergleich der unterschiedlich schwer geschädigten Zellen keine Unterschiede im Ausmaß der p53 Stabilisierung (**Abb. 5-6**), die jedoch nicht mit der transkriptionellen Aktivität, gemessen an der Expression von p53-Zielgenen, korreliert (**Abb. 5-9**). Das Muster der Zielgen-Induktion in 2 Gy und 10 Gy bestrahlten wtp53 Zellen zeigt bezüglich Kinetik und Ausmaß der Protein-Induktion große Unterschiede und korreliert vor allem mit dem unterschiedlichen Ausgang der Schadensreaktion (**Abb. 5-1, Abb. 5-5**). Offenbar ist die Stabilisierung von p53 und Δ p53 kein Kriterium, um alle untersuchten Zielgene wirksam und dauerhaft hochzuregulieren, jedoch eine unabdingbare Voraussetzung für die Funktionalität dieser Transaktivatoren. Dies weist darauf hin, dass posttranslationale Modifikationen und Interaktionen mit anderen Proteinen wohl die Kriterien bei der Übermittlung von Signalen sind, die die differenzielle Transaktivierung von p53-induzierbaren Zielgenen regulieren.

Bei Vergleich der 2 Gy bestrahlten wtp53 Zellen mit 10 Gy bestrahlten wtp53 Zellen konnten in der Tat differenziell regulierte Parameter der p53/ Δ p53-Aktivitäten identifiziert werden. Wie sich zeigte, korreliert die Dauer der p53/ Δ p53-Aktivierung mit dem Ausgang der Schadensreaktion. So führt ein DNA Schaden geringen Ausmaßes (2 Gy) zu einer temporär begrenzten Aktivierung beider p53-Proteine, erkennbar an der ATM/ATR-katalysierten Serin-15 Phosphorylierung, und zu einer ebenfalls temporär begrenzten Schadensantwort der Zellen. Derart geschädigte Zellen nehmen nach Abschluss der Schadensantwort, die sich in der Attenuation der S- sowie G2-Phasen Progression äußert, wieder ein normales Proliferationsverhalten an. Hingegen induziert Bestrahlung mit hohen Dosen (10 Gy Gamma) eine persistierende Serin-15 Phosphorylierung von p53 sowie eine biphasische Serin-15 Phosphorylierung von Δ p53 und führt trotz sequenzieller Aktivierung der intra-S- und G2-Kontrollpunkte zur Initialisierung des programmierten Zelltods (**Abb. 5-5, 5-6**).

Dieser Befund ist umso erstaunlicher, wenn in Betracht gezogen wird, dass bei letaler Schädigung noch vor Beginn des Eliminierungsprogramms die ATM/ATR-vermittelten intra-S- und G2-Kontrollpunkte aktiviert werden, die nicht zum Zellzyklusarrest sondern nur zu einer temporären Attenuation der Zellzyklusprogression führen. Dies bedeutet, dass es schwer geschädigten G1/S-Zellen noch vor der Termination gestattet wird, verlangsamt aber

kontinuierlich in die G2-Phase zu progressieren. Der Phosphorylierungsverlauf des wachstumsregulierenden Faktors pRB, der unmittelbar nach Aktivierung des G2-Kontrollpunkts phosphoryliert und somit in seiner proliferationshemmenden Eigenschaft inaktiviert wird, verdeutlicht dies besonders (**Abb. 5-19B**). Die vergleichende Analyse 2 Gy und 10 Gy bestrahlter wtp53 Zellen ermöglichte daher besonders gut, Determinanten einer zellzyklusregulierenden Wirkung von solchen der p53-vermittelten Apoptose zu unterscheiden. Gemäß gängigen Vorstellungen leisten die transkriptionell vermittelten Aktivitäten von p53 den zentralen Beitrag zur biologischen Funktion von p53. Die meisten theoretischen Erklärungsmodelle bezüglich der unterschiedlichen Effekte von p53 und der Selektivität der p53-Antwort basieren demgemäß auf dem Prinzip einer differenziellen Aktivierung von p53-Zielgenen (Übersichtsartikel: Vousden und Lu, 2002; Oren, 2003). Tatsächlich zeigen die Untersuchungen, dass das Schadensausmaß die differenzielle Transaktivierungsaktivität von p53 und auch von Δ p53 zellzyklusabhängig reguliert. Die vorgelegten Daten machen deutlich, dass die differenzielle transkriptionelle Aktivität essenziell für die biologische Funktion von p53 und Δ p53 ist und erst durch ihre Einbeziehung die Selektivität der strahleninduzierten Schadensreaktion verstanden werden kann.

Bei Vergleich der verschieden bestrahlten CV-1 Zellen ergaben sich im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen eindeutige Befunde für eine differenzielle Regulation anti- und pro-apoptotischer p53-Zielgene (**Abb. 5-10**). Dies wird insbesondere beim Vergleich der entsprechenden Western Blot Analysen von 2 Gy und 10 Gy bestrahlten CV-1 Zellen deutlich: Nur die Bestrahlung mit 10 Gy führt zur p53-vermittelten Induktion und Hochregulation von bax und pig3 (**Abb. 5-9, Abb.5-19A**). In der Hochregulation dieser pro-apoptotischen Faktoren lässt sich ein apoptotischer Verstärkungseffekt vermuten, der im Fall von bax auf dessen Translokation in die Mitochondrien und somit deren Zerstörung beruht. Das pro-apoptotische Protein bax gehört zur Bcl-2 Proteinfamilie, die verantwortlich ist für die Durchlässigkeit der äußeren Mitochondrien-Membran (Cory und Adams, 2002; Tsujimoto, 2003; Kroemer, 2003). Die Einlagerung von bax in die Mitochondrien-Membran führt dann zu einer Porenbildung und einem Abfall des Membranpotentials an der äußeren Membran (Degli Esposti und Dive, 2003). Dadurch gelangen mitochondriale Faktoren wie Cytochrom c oder Smac/Diablo in das Cytoplasma und aktivieren dort die proteolytische Kaskade der Caspasen, die dann zur Zerstörung der Zelle führt (Wang, 2001; Scorrano und Korsmeyer, 2003). Die Hochregulation von bax in 10 Gy bestrahlten wtp53 CV-1 Zellen ging dabei der Aktivierung von Caspase 3 voran, die ein wichtiger Bestandteil der apoptotischen

Exekutionsphase ist (**Abb. 5-10, Abb. 5-19**). Dies liefert einen guten Hinweis darauf, dass Bax die Initiation des apoptotischen Programms verstärkt. Obwohl es Studien gibt die klar zeigen, dass die Aktivierung von bax und die Induktion der bax vermittelten bzw. verstärkenden Apoptose keine p53-transkriptionelle Aktivität erfordert (Chipuk *et al.*, 2003; Chipuk *et al.*, 2004), widersprechen die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeit dieser Studien. Die Daten zeigen, dass die bax Hochregulation nur in Zellen mit funktionellem p53 erfolgt und somit im Rahmen der zellulären Schadensreaktion auf genotoxischen Stress strikt p53 abhängig ist, da sie in TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen nicht stattfindet (**Abb. 5-11C**). Allerdings ist die p53-abhängige Aktivierung von bax im Rahmen des Eliminierungsprozesses anscheinend nur in wtp53 Zellen relevant, da, wie die Bestrahlungsexperimente zeigten, auch p53-null und „type I“ mutp53 Zellen in die Apoptose gehen (**Abb. 5-18**). Die 10 Gy bestrahlungsinduzierte p53-unabhängige Apoptose in p53-null Zellen erfolgt somit ohne eine Aktivierung von bax, damit zeigen wtp53 und p53-null Zellen einen klaren Unterschied hinsichtlich der molekularen Mechanismen, die mit dem induzierten programmierten Zelltod verbunden sind. Diese Zellen haben jedoch eine Gemeinsamkeit, sie exprimieren kein funktionelles $\Delta p53$.

Ursache für die beobachtete Apoptoseresistenz der TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen, deren p53 Expressionsstatus den „type II“ mutp53 Zellen entspricht, ist vermutlich die $\Delta p53$ -vermittelte Induktion des anti-apoptotisch wirkenden Cdk-Inhibitors p21. Die $\Delta p53$ -abhängige Hochregulation des zellzyklusregulierenden p21 konnte eindeutig mit einem anti-apoptotischen Effekt in Zusammenhang gebracht werden. Dieser Befund ergab sich klar aus vergleichenden Analysen 10 Gy bestrahlter TO-CV-1 Zellen mit unterschiedlichem p53 Status. Dabei zeigt sich, dass in allen mit 10 Gy bestrahlten Zellen zuerst der anti-apoptotische Faktor p21 induziert wird, wobei zu Beginn $\Delta p53$ und etwas später p53 verantwortlich für dessen Transaktivierung ist (**Abb. 5-11, 5-12**). Die Hochregulation von p21 ging mit einem großen zeitlichen Abstand, der 12 h in wtp53 und 6 h in Flag-mut $\Delta p53$ exprimierenden CV-1 Zellen betrug, deutlich der Induktion apoptotischer Ereignisse voran (**Abb. 5-11**). Dieser $\Delta p53/p53$ -abhängige und p21-vermittelte anti-apoptotische Effekt kann anscheinend nur unter bestimmten Bedingungen überwunden werden. Dies geschieht in CV-1 und CV-1-Flag-mut $\Delta p53$ Zellen trotz starker Hochregulation von p21. Wie sich zeigte, geht das dafür erforderliche pro-apoptotische Signal ebenfalls von p53 aus und wird über eine differenziell regulierte Transaktivierung des Tumorsuppressors gesteuert. Demnach muss in 10 Gy bestrahlten CV-1 und TO-CV-1-Flag-mut $\Delta p53$ Zellen zur Aktivierung der Apoptose die Induktion pro-apoptotischer Proteine erfolgen, um die anti-apoptotische Wirkung von p21

aufzuheben. Die apoptotische Wirkung der p53-vermittelten Induktion und Hochregulation von bax und pig3 ist demnach in letal geschädigten wtp53 Zellen für den Eliminierungsprozess essenziell, nachdem in TO-CV-1-Flag-mutp53 bzw. in „type II“ mutp53 Zellen die Induktion des apoptotischen Prozesses, vermutlich auf Grund der persistierenden Δ p53-induzierten Aktivierung des anti-apoptotischen Faktors p21, fehlgeschlagen ist. Die Signale, die p53 für die Induktion pro-apoptotischer Proteine befähigen, stammen offensichtlich von der ATM/ATR-induzierten Schadensantwort, die das Schadenssignal mittels einer Phosphorylierungskaskade auf Effektoren wie p53 überträgt. Bekannt ist, dass HIPK2, eine Serin/Threonin Kinase, nach letaler Schädigung p53 zu einem sehr späten Zeitpunkt phosphoryliert und zur Aktivierung der pro-apoptotischen Funktion von p53 führt (D’Orazi *et al.*, 2002, Hofmann *et al.*, 2002; Oda *et al.*, 2000). Untersuchungen der am G1/S-Übergang bestrahlten CV-1 Zellen bestätigten diesen Befund, zeigten aber auch, dass die strahlendinduzierte Phosphorylierung von p53 und überraschenderweise auch Δ p53 an Serin-46 bereits unmittelbar nach der DNA Schädigung mit 10 Gy erfolgt und nach anschließender Dephosphorylierung erst wieder zu einem sehr späten Zeitpunkt auftritt (**Abb. 5-6D**).

Die schadeninduzierte differenzielle Modifikation von p53 spielt einerseits eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung von p53 und andererseits bei der differenziellen Regulation der p53 Aktivität. Der wichtigste Faktor, der einen Einfluss auf die p53-Stabilität hat, ist mdm2, ein von p53 transaktiviertes Zielgen. Mdm2 ist eine Ubiquitin-Ligase, die p53 ubiquitiniert und dem proteolytischen Abbau zuführt, wodurch mdm2 als der zentrale und bedeutendste Regulator der p53-Menge gilt (Übersichtsartikel: Ashcroft und Vousden, 1999; El-Deiry, 2003). Erstaunlicherweise war in 10 Gy bestrahlten CV-1 Zellen, trotz der starken mdm2-Expression, keine verringerte p53-Stabilisierung detektierbar, wodurch sich vermuten ließ, dass ebenfalls differenziell regulierte Faktoren offensichtlich in der Lage sind, die Ubiquitin-Ligase-Aktivität von mdm2 zu inhibieren. D’ Orazi und Kollegen (Di Stefano *et al.*, 2004) zeigten, dass es sich bei diesem differenziell regulierten Faktor um die Kinase HIPK2 handelt, die p53 über die Serin-46 Phosphorylierung vor der mdm2-katalysierten Ubiquitinierung und folglich vor Proteolyse schützt. Allerdings korrelieren die Ergebnisse dieser Studie nicht mit den Befunden 10 Gy bestrahlter CV-1 Zellen. Im Gegenteil, während der Hochregulation von mdm2 ist stabilisiertes und aktiviertes p53 nicht an Serin-46 phosphoryliert und auffallend ist, dass diese Modifikationen erst wieder nach einer deutlichen Reduktion der mdm2 Expression detektierbar ist, wobei zeitgleich die Hochregulation von bax erfolgt (**Abb. 5-6D**). Die

Hochregulation von mdm2 reduziert zwar nicht die p53-Expression, korreliert aber mit der $\Delta p53$ Destabilisierung, woraus geschlossen werden kann, dass p53-induziertes mdm2 verantwortlich für die Inaktivierung der $\Delta p53$ -vermittelten Induktion von anti-apoptotisch wirkendem p21 ist (**Abb. 5-6D, Abb. 5-12A**). Somit könnte postuliert werden, dass die S-Phasen spezifische transkriptionelle Aktivität von $\Delta p53$ durch die differenzielle Transaktivierungsaktivität von p53 reguliert wird und lässt darüber hinaus vermuten, dass p53 eine wichtige Funktion bei der Regulation von $\Delta p53$ ausübt. Die p53-abhängige Destabilisierung und somit Inaktivierung von $\Delta p53$ wird besonders deutlich in induzierten TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen, in denen nach einer Bestrahlung mit 10 Gy wt $\Delta p53$ während des gesamten 24stündigen Beobachtungszeitraums im stabilisierten und auf Grund der Serin-15 Phosphorylierung im aktivierten Zustand vorliegt (Daten nicht gezeigt). Auf welchen Mechanismen die Regulation der differenziellen transkriptionellen Aktivität von p53 beruht, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Gerade im Kontext der hier charakterisierten Konsequenz, den die Schadensschwere für die Regulation der transkriptionellen Aktivität von p53 und $\Delta p53$ hat, stellt die Aufklärung der molekularen Mechanismen, welche der differenziellen Regulation der Transkriptionsaktivität beider p53-Proteine zu Grunde liegen, ein wichtiges Ziel künftiger Forschungsbemühungen dar.

6.2 Der protektive G2-Arrest

Mit der Identifizierung der p53-Spleißvariante $\Delta p53$ kommt in Primatenzellen ein weiterer Faktor hinzu, der die Komplexität der p53-vermittelter Signale erhöht und die zelluläre Schadensreaktion beeinflusst. Die beobachtete Stabilisierung von $\Delta p53$ nach genotoxischem Stress, die unabhängig von der Schadensschwere erfolgt (Abb. 5-6C, D) weist darauf hin, dass $\Delta p53$ an der zellulären Schadensreaktion beteiligt ist. Dies konnte durch detaillierte Analysen belegt und charakterisiert werden. Dabei zeigte sich, dass die transkriptionelle Aktivität von $\Delta p53$ in geschädigten Zellen vor allem während der replikativen S-Phase von Bedeutung ist und eine Entkopplung des NER (*nucleotide excision repair*) Reparaturweges und der Replikation nach UV-Strahlung bewirkt (Rohaly et al., 2005). Während in UV-geschädigten wtp53 Zellen $\Delta p53$ ausschließlich nach Aktivierung des ATR-vermittelten intra-S-Kontrollpunkts den Cdk-Inhibitor p21 transaktiviert, induziert p53 erst kurz vor dem S/G2-Übergang und vor allem während der G2-Phase diesen anti-apoptotisch wirkenden Faktor. Nicht bekannt war, ob auch γ -Strahlung eine zellzyklusabhängige Aktivierung von p53 und $\Delta p53$ bewirkt und insbesondere, ob in letal geschädigten Zellen die Aktivität von $\Delta p53$ einen Einfluss auf den G2-Arrest bzw. G2-„Exit“ nehmen kann.

Bekannt ist, dass DNA Schädigung in die beginnende Zellteilung intervenieren kann, indem die Aktivierung des Mitose-fördernden Faktors Cyclin B-Cdk1 entweder verspätet erfolgt oder komplett inhibiert wird. Dieser in der G2-Phase operierende Kontrollmechanismus involviert die Aktivierung der ATM/ATR-induzierten Signalkaskade, an deren höchsten Stelle der heterotrimer Mre11/Rad50/Nbs1-Komplex (MRN) steht, der sowohl „upstream“ als auch „downstream“ von ATM und ATR als Sensor fungiert (Kim *et al.*, 1999; Lee und Paul, 2004). ATM kann direkt oder indirekt und ATR nur indirekt Einfluss auf die Reparatur strahlendinduzierter Doppelstrangbrüche nehmen, wobei in der G2-Phase auf Grund des doppelten Chromosomensatzes der Reparaturweg über die homologe Rekombination (*homologous directed recombination*, HDR) genommen wird. Dagegen wird postuliert, dass strahlendinduzierte Doppelstrangbrüche, die vor Beginn der Replikation entstehen auf Grund des einfachen Chromosomensatzes über den nicht-homologen Reparaturweg (*non homologous end joining*, NHEJ) beseitigt werden. Diese Annahme impliziert, dass subletale DNA Schäden, die am G1/S-Übergang entstehen, nach erfolgter Aktivierung des ATM/ATR-induzierten intra-S-Kontrollpunkts durch den NHEJ Reparaturweg noch vor Beginn der Replikation repariert werden und folglich die Zellen ohne weitere Verzögerung Richtung Mitose progressieren sollten. Die hier vorgestellte Arbeit zeigt jedoch, dass unabhängig von der Position der Zelle im Zellzyklus zum Zeitpunkt der Erzeugung von Doppelstrangbrüchen der G2-Kontrollpunkt immer aktiviert wird (**Abb. 5-3**). Dabei stellte sich die Frage, warum am G1/S-Übergang geschädigte wtp53 Zellen, trotz Aktivierung des intra-S-Kontrollpunkts zusätzlich den G2-Kontrollpunkt anschalten, wobei die sequenzielle Aktivierung dieser Kontrollpunkte unabhängig von der applizierten Schadensschwere ist (**Abb. 5-5**). Beide Kontrollpunkte werden über die ATM/ATR-Chk2/Chk1-Phosphorylierungskaskade induziert, die bei subletaler Schädigung die transaktivierende Eigenschaft von $\Delta p53$ und p53 kurzfristig sequenziell aktiviert und die Zellzyklusprogression konsequenterweise nur moderat attenuiert. Die kurzfristige temporäre Attenuation der Progression der Zellzyklusphasen in S und G2 ist auf die $\Delta p53$ - und p53-induzierte Hochregulation des Cdk-Inhibitors p21 zurückzuführen, wobei $\Delta p53$ -transaktiviertes p21 die Aktivität der S-Phasen spezifischen Kinase Cyclin A-Cdk2 reduziert und p53-transaktiviertes p21 verantwortlich für die Reduktion der S/G2-spezifischen Cyclin A-Cdk1 Aktivität ist (**Abb. 5-13; Abb. 5-13**). Eine Beteiligung von p53 an der verzögerten Aktivierung von Cyclin B-Cdk1 ist nicht nachweisbar und zeigt, dass in wtp53 Zellen der G2-Kontrollpunkt bei subletalen γ -induzierten Schäden unabhängig von transkriptionell aktivem p53 ist (**Abb. 5-13C**) und ausschließlich auf der ATM-Chk2 und/oder ATR-Chk1-

vermittelten temporären Inaktivierung der Cdk1-aktivierenden Phosphatase Cdc25C beruht (**Abb. 5-6A; Abb. 5-13C**). Angenommen wird, dass in γ -bestrahlten Zellen die phosphorylierungsbedingte Inhibition von Cdc25C durch ATM-aktiviertes Chk2 erfolgt, jedoch weisen die hier vorgelegten Ergebnisse darauf hin, dass in geschädigten wtp53 Zellen die Inaktivierung der zellzyklusregulierenden Phosphatase durch die ATR-Chk1-Phosphorylierungskaskade erfolgt. Grund dieser Annahme sind die Resultate, die mit humanen wtp53 AT5 Zellen, in denen die PIK Kinase ATM mutiert ist, erzielt wurden. Bestrahlte AT5 Zellen können wie erwartet nicht den ATM-vermittelten intra-S-Kontrollpunkt aktivieren, sind aber in der Lage den G2-Kontrollpunkt zu induzieren, der, wie die Behandlung mit dem ATR-Inhibitor Koffein zeigt, ATR abhängig ist (**Abb. 5-7**).

Der Grund der sequenziellen Aktivierung der Kontrollpunkte intra-S und G2 zeigt sich bei der Messung der Reparaturaktivitäten, die einmal unmittelbar nach Initiation des intra-S-Kontrollpunkts und später noch einmal nach Initiation des G2-Kontrollpunktes auftreten (**Abb. 5-20**). Dabei entspricht das erste Reparatursignal der NHEJ Reparatur, die noch vor Beginn der DNA Replikation die Doppelstrangbrüche schließt und das zweite Reparatursignal der HDR Reparatur, die erst nach abgeschlossener DNA Replikation durchgeführt wird. In der G1- und der frühen S-Phase werden Doppelstrangbrüche über das NHEJ repariert, während die akkuratere HDR erst nach erfolgter Duplikation des Genoms möglich ist und deshalb der bevorzugte Reparaturweg in den späteren Zellzyklusphasen ist (Lieber *et al.*, 2003; Rothkamm *et al.*, 2001). Dieser Sachverhalt erklärt, warum am G1/S-Übergang induzierte Doppelstrangbrüche zur Aktivierung beider Kontrollpunkte führen, die einerseits die Reparatur der geschädigten DNA noch vor Beginn der Replikation und andererseits eine qualitativ hochwertigere Reparatur nach Duplikation des Genoms gewährleisten. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass, wie auch in UV-bestrahlten Zellen beobachtet wurde, die $\Delta p53$ -vermittelte Reduktion der S-Phasen- und Replikations-spezifischen Cyclin A-Cdk2 Aktivität eine Voraussetzung für die Entkopplung von Reparatur und Replikation ist. Bestrahlte G1/S-TO-CV-1-Flag-mut $\Delta p53$ Zellen können nach Initiation der schadeninduzierten ATM-Signalkaskade die ansteigende Cyclin A-Cdk2 Aktivität nicht drosseln und initiieren auf Grund dessen die Replikation noch vor Beendigung der NHEJ Reparatur (**Abb. 5-21B**). Die verfrühte Aktivierung von Cyclin A-Cdk2 bedingt, trotz p53-induzierter p21 Expression, auch einen zu frühen Anstieg der Cyclin A-Cdk1 Aktivität, wodurch noch vor Beendigung der Replikation die HDR gestartet wird. Auch wenn die $\Delta p53$ -vermittelte Reduktion der Cyclin A-Cdk2 Aktivität nur 2 h beträgt, sind diese 2 h für einen optimalen Verlauf von NHEJ Reparatur, Replikation und HDR Reparatur entscheidend.

Darüber hinaus kann postuliert werden, dass es keine direkte Kommunikation bzw. keinen „feedback loop“ zwischen der Reparatur- und Replikationsmaschinerie gibt, sondern die Entkopplung dieser fundamentalen Ereignisse über die Modulation der Cdk Aktivitäten reguliert wird.

Die Frage ob p53 überhaupt eine Rolle im G2-Kontrollpunkt spielt beantwortete sich bei Betrachtung der molekularen Vorgänge 10 Gy bestrahlter wtp53 CV-1 Zellen, die im Unterschied zu 2 Gy bestrahlten Zellen nach sequenzieller Aktivierung der Kontrollpunkte intra-S und G2 eliminiert werden (**Abb. 5-5**). Kurz vor dem Eintritt der geschädigten Zellen in die Mitose komplexiert p53-induziertes p21 mit der Mitose-fördernden Cyclin B-Cdk1 (Abb. 5-13C), wodurch die inhibitorische Phosphorylierung der katalytischen Untereinheit dieser Kinase verstärkt wird. Diese Komplexbildung ist anscheinend für die permanente Inhibition der Cyclin B-Cdk1 Aktivität, die eine Voraussetzung für den G2-„Exit“ ist, essenziell, nachdem in TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen die Aktivität dieser Kinase nur temporär inhibiert ist (**Abb. 5-14C**, **Abb. 5-16**). Dieser Befund zeigt deutlich, dass die Initiation des p53-unabhängigen temporären G2-Kontrollpunkts nur in Anwesenheit von funktionellem p53 in einen stabilen und terminierenden G2-Arrest bzw. G2-„Exit“ umgewandelt werden kann. Demnach ist in letal geschädigten wtp53 Zellen der Tumorsuppressor p53 nicht nur verantwortlich für die Inaktivierung der anti-apoptotisch wirkenden Aktivität von $\Delta p53$ sondern vor allem auch für die Aufrechterhaltung der inhibitorischen Phosphorylierung von Cyclin B-Cdk1 und trägt somit entscheidend für den Zellzyklus-„Exit“ schwer geschädigter Zellen bei.

Geschädigte TO-CV-1-mutp53 Zellen können, wie auch „type II“ mutp53 Zellen, nicht nur dem G2-„Exit“ entkommen, sie können sich auch der Eliminierung entziehen. Demzufolge ist die Konstellation mutp53/wt $\Delta p53$ ein entscheidendes Merkmal, das zu dem Phänomen der Radioresistenz beiträgt. Anzunehmen ist, dass die Konstellation mutp53/wt $\Delta p53$ zur Unterbrechung der schadeninduzierten ATM/ATR-Signalkaskade führt, wobei außer der p53/ $\Delta p53$ -induzierten Transaktivierung p53-regulierter Zielgene keine weiteren über diese Effektoren vermittelten Signale bekannt sind. Der Ablauf der ATM/ATR-Signalkaskade, der zur Arretierung der Zellen in G2 führt beinhaltet in erster Linie die p53-unabhängige Inaktivierung der Cdk1-aktivierenden Phosphatase Cdc25C. Die Progression durch die G2-Phase sowie der Eintritt der Zelle in die mitotische Phase erfordert die Aktivierung der Kinase Cyclin B-Cdk1, deren katalytische Untereinheit Cdk1 während der S-Phase generell

inhibitorisch phosphoryliert ist und erst zu Beginn der G2-Phase durch die Cdc25C-katalysierte Dephosphorylierung aktiviert wird. Ein weiterer, von p53 transaktivierter Faktor, 14-3-3 σ , bindet an inhibitorisch phosphoryliertes Cdc25C und schützt vor der aktivierenden Dephosphorylierung. Tatsächlich wird in „type II“ mutp53 bzw. in TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen Cdc25C dephosphoryliert, wodurch die für den Eintritt in die Mitose erforderlichen zellulären Prozesse gestartet werden können (**Abb. 5-19A**).

Letal geschädigte Zellen, in denen p53 aber nicht Δ p53 inaktiviert ist, verlassen nicht nur den G2-Kontrollpunkt sondern beginnen nach erfolgter Mitose mit der nächsten Zellzyklusrunde. Dies setzt einerseits die Inaktivierung des wachstumsregulierenden Faktors pRB voraus und andererseits die E2F-vermittelte Transaktivierung essenzieller Zellzyklusfaktoren, zu denen die Cycline und Cdks gehören. Jedoch erscheint dieser molekulare Mechanismus als zu einfach, denn auch in wtp53 Zellen könnte nach der Degradation der unterphosphorylierten und somit aktiven Form von pRB gebundenes E2F freigesetzt werden und die notwendigen zellzyklustreibenden Faktoren wie Cyclin B und Cdk1 transaktivieren. Eine erneute Synthese dieser Mitose-fördernden Komponenten würde den Zellen das Verlassen des G2-„Exits“ ermöglichen. Tatsächlich reicht die Inaktivierung von pRB nicht aus, um den schwer geschädigten Zellen den Wiedereintritt in den Zellzyklus zu ermöglichen. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von K. Batra konnte gezeigt werden, dass wtp53 die Expression von Cyclin B und Cdk1 inhibiert. Diese p53-vermittelte Inhibition erfolgt indirekt, indem p53 durch Bindung an den Promotor von hPAF1 dessen Expression inhibiert. hPAF1 (*human RNA Polymerase II-associated factor 1*), ist ein zellzyklusregulierter Transkriptionsfaktor der für die Rekrutierung der RNA Polymerase II an die Cyclin B- und Cdk1-Promotoren in der G2-Phase essenziell ist (Moniaux *et al.*, zur Veröffentlichung eingereicht). Demzufolge hat in schwer geschädigten wtp53 Zellen p53 nicht nur transaktivierende sondern auch reprimierende Eigenschaften, die für die Aufrechterhaltung des ATM/ATR-vermittelten G2-„Exits“ entscheidend sind.

Die Bestrahlung von TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen mit einer letalen (10 Gy) Dosis an ionisierender γ -Strahlung führt nicht nur zum Abbruch des induzierten G2-Arrests sondern auch zur Entkopplung von S-Phase und Mitose, wie die Entstehung von polyploiden Zellen zeigt (**Abb. 5-17**). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die spezifische Kombination aus mutiertem, inaktiven p53 und wt Δ p53, wie sie in „type II“ mutp53 Zellen vorliegt, zur Bildung von polyploiden Zellen führt, die mit einer Radioresistenz verbunden ist. Aus der Tumorbilogie, aber auch aus anderen Krankheitsbildern, ist die Polyploidisierung darüber

hinaus als pathologischer Effekt bekannt, der zu einem frühen Zeitpunkt der Tumorgenese zu beobachten ist und mit der genetischen Instabilität vieler Tumorzellen korreliert wird. Genetische Instabilität kann unter Selektionsdruck, wie ihn z.B. genotoxischer Stress darstellt, derart „flexiblen“ Zellen einen erheblichen Vorteil verschaffen. Diese Überlegung steht in Einklang mit der häufig beobachteten Radio- und Chemoresistenz vieler Tumorzellen (Johnstone *et al.*, 2002). Eine Verbindung zwischen genetischer Instabilität, Polyploidie und Therapieresistenz wird durch zwei Studien nachdrücklich belegt. So wurde beschrieben, dass polyploide Zellen über besondere Überlebens- und Reparatur-Mechanismen verfügen, die sie resistent gegen genotoxischen Stress machen und vor Apoptose schützen (Illidge *et al.*, 2000; Ivanov *et al.*, 2003). Tatsächlich zeigen polyploide TO-CV-1-Flag-mutp53 Zellen neben der anhaltenden Replikationsaktivität auch deutlich Reparaturaktivität (**Abb. 5-21C**), woraus geschlossen werden kann, dass ein polyploider Chromosomensatz die HDR Reparatur nicht nur in der G2-Phase sondern in allen Zellzyklusphasen erlaubt und somit diesen schwer geschädigten Zellen, im Sinne des „clonogenic survivals“, das Überleben garantiert.

7. Literaturverzeichnis

- Abraham, R. T.** (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 15, 2177-2196.
- Abramova, N. A., Russell, J., Botchan, M., and Li, R.** (1997). Interaction between replication protein A and p53 is disrupted after UV damage in a DNA repair-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7186-7191.
- Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Grosse, F., Kim, E., Wiesmuller, L., and Deppert, W.** (1999). Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene* 18, 7706-7717.
- Appella, E., and Anderson, C. W.** (2000). Signaling to p53: breaking the posttranslational modification code. *Pathol Biol (Paris)* 48, 227-245.
- Ashcroft, M., and Vousden, K. H.** (1999). Regulation of p53 stability. *Oncogene* 18, 7637-7643.
- Attardi, L. D., Reczek, E. E., Cosmas, C., Demicco, E. G., McCurrach, M. E., Lowe, S. W., and Jacks, T.** (2000). PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family. *Genes Dev* 14, 704-718.
- Azzam, E. I., de Toledo, S. M., Pykett, M. J., Nagasawa, H., and Little, J. B.** (1997). CDC2 is down-regulated by ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Cell Growth Differ* 8, 1161-1169.
- Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., and Oren, M.** (1993). mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *Embo J* 12, 461-468.
- Bartek, J., and Lukas, J.** (2001). Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 13, 738-747.
- Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S. W., Luzio, J. P., Simari, R., and Weissberg, P.** (1998). Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* 282, 290-293.
- Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., and Wallach, D.** (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Breivik, J., and Gaudernack, G.** (1999). Genomic instability, DNA methylation, and natural selection in colorectal carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 9, 245-254.

- Caelles, C., Helmberg, A., and Karin, M.** (1994). p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 370, 220-223.
- Chang, B. D., Broude, E. V., Dokmanovic, M., Zhu, H., Ruth, A., Xuan, Y., Kandel, E. S., Lausch, E., Christov, K., and Roninson, I. B.** (1999a). A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res* 59, 3761-3767.
- Chang, B. D., Swift, M. E., Shen, M., Fang, J., Broude, E. V., and Roninson, I. B.** (2002). Molecular determinants of terminal growth arrest induced in tumor cells by a chemotherapeutic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 389-394.
- Chang, B. D., Xuan, Y., Broude, E. V., Zhu, H., Schott, B., Fang, J., and Roninson, I. B.** (1999b). Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene* 18, 4808-4818.
- Chemnitz, J.** (2003) Regulation des Intra-S-Phasen Kontrollpunktes in UV-geschädigten Primatenzellen, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg.
- Chen, X., Ko, L. J., Jayaraman, L., and Prives, C.** (1996). p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev* 10, 2438-2451.
- Chene, P.** (2003). Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 102-109.
- Chipuk, J. E., and Green, D. R.** (2003). p53's believe it or not: lessons on transcription-independent death. *J Clin Immunol* 23, 355-361.
- Chipuk, J. E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N. M., Newmeyer, D. D., Schuler, M., and Green, D. R.** (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 303, 1010-1014.
- Clifford, B., Beljin, M., Stark, G. R., and Taylor, W. R.** (2003). G2 arrest in response to topoisomerase II inhibitors: the role of p53. *Cancer Res* 63, 4074-4081.
- Cline, S. D., and Hanawalt, P. C.** (2003). Who's on first in the cellular response to DNA damage? *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 361-372.
- Cory, S., and Adams, J. M.** (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656.
- D'Andrea, A. D., and Grompe, M.** (2003). The Fanconi anaemia/BRCA pathway. *Nat Rev Cancer* 3, 23-34.

- D'Orazi, G., Cecchinelli, B., Bruno, T., Manni, I., Higashimoto, Y., Saito, S., Gostissa, M., Coen, S., Marchetti, A., Del Sal, G., et al.** (2002). Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser 46 and mediates apoptosis. *Nat Cell Biol* 4, 11-19.
- Degli Esposti, M., and Dive, C.** (2003). Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 455-461.
- Degterev, A., Boyce, M., and Yuan, J.** (2003). A decade of caspases. *Oncogene* 22, 8543-8567.
- Di Stefano, V., Blandino, G., Sacchi, A., Soddu, S., and D'Orazi, G.** (2004). HIPK2 neutralizes MDM2 inhibition rescuing p53 transcriptional activity and apoptotic function. *Oncogene* 23, 5185-5192.
- Dutta, A., Ruppert, J. M., Aster, J. C., and Winchester, E.** (1993). Inhibition of DNA replication factor RPA by p53. *Nature* 365, 79-82.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M., and Kaufmann, S. H.** (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68, 383-424.
- El-Deiry, W. S.** (2003). The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. *Oncogene* 22, 7486-7495.
- El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B.** (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75, 817-825.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S.** (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.
- Fei, P., and El-Deiry, W. S.** (2003). P53 and radiation responses. *Oncogene* 22, 5774-5783.
- Fortin, A., Cregan, S. P., MacLaurin, J. G., Kushwaha, N., Hickman, E. S., Thompson, C. S., Hakim, A., Albert, P. R., Cecconi, F., Helin, K., et al.** (2001). APAF1 is a key transcriptional target for p53 in the regulation of neuronal cell death. *J Cell Biol* 155, 207-216.
- Fridman, J. S., and Lowe, S. W.** (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22, 9030-9040.
- Fritsche, M., Haessler, C., and Brandner, G.** (1993). Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* 8, 307-318.
- Gaiddon, C., Moorthy, N. C., and Prives, C.** (1999). Ref-1 regulates the transactivation and pro-apoptotic functions of p53 in vivo. *Embo J* 18, 5609-5621.

- Gao, C., and Tsuchida, N.** (1999). Activation of caspases in p53-induced transactivation-independent apoptosis. *Jpn J Cancer Res* 90, 180-187.
- Ginsberg, D., Mechta, F., Yaniv, M., and Oren, M.** (1991a). Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9979-9983.
- Ginsberg, D., Michael-Michalovitz, D., and Oren, M.** (1991b). Induction of growth arrest by a temperature-sensitive p53 mutant is correlated with increased nuclear localization and decreased stability of the protein. *Mol Cell Biol* 11, 582-585.
- Gudkov, A. V., and Komarova, E. A.** (2003). The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat Rev Cancer* 3, 117-129.
- Hainaut, P., and Hollstein, M.** (2000). p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 77, 81-137.
- Haldar, S., Negrini, M., Monne, M., Sabbioni, S., and Croce, C. M.** (1994). Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer Res* 54, 2095-2097.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M.** (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-299.
- Haupt, Y., Rowan, S., Shaulian, E., Vousden, K. H., and Oren, M.** (1995). Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev* 9, 2170-2183.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B.** (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell* 1, 3-11.
- Hofmann, T. G., Moller, A., Sirma, H., Zentgraf, H., Taya, Y., Droge, W., Will, H., and Schmitz, M. L.** (2002). Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat Cell Biol* 4, 1-10.
- Horikoshi, N., Usheva, A., Chen, J., Levine, A. J., Weinmann, R., and Shenk, T.** (1995). Two domains of p53 interact with the TATA-binding protein, and the adenovirus 13S E1A protein disrupts the association, relieving p53-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 15, 227-234.
- Horton, L. E., and Templeton, D. J.** (1997). The cyclin box and C-terminus of cyclins A and E specify CDK activation and substrate specificity. *Oncogene* 14, 491-498.
- Hwang, B. J., Ford, J. M., Hanawalt, P. C., and Chu, G.** (1999). Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 424-428.
- Iliakis, G.** (1997). Cell cycle regulation in irradiated and nonirradiated cells. *Semin Oncol* 24, 602-615.

- Iliakis, G., Wang, Y., Guan, J., and Wang, H.** (2003). DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* 22, 5834-5847.
- Illidge, T.M., Cragg, M.S., Fringes, B., Olive, P., and Erenpreisa, J.A.** (2000). Polyploid giant cells provide a survival mechanism for p53 mutant cells after DNA damage. *Cell Biol. Int.* 24, 621-633.
- Ivanov, A., Cragg, M.S., Erenpreisa, J., Emzinsh, D., Lukman, H., and Illidge, T.M.** (2003). Endopolyploid cells produced after severe genotoxic damage have the potential to repair DNA double strand breaks. *J. Cell Sci.* 116, 4095-4106.
- Janus, F., Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Wiesmuller, L., Grosse, F., and Deppert, W.** (1999). The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cell Mol Life Sci* 55, 12-27.
- Jayaraman, L., and Prives, C.** (1999). Covalent and noncovalent modifiers of the p53 protein. *Cell Mol Life Sci* 55, 76-87.
- Jin, S., and Levine, A. J.** (2001). The p53 functional circuit. *J Cell Sci* 114, 4139-4140.
- 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, 587-597.
- Johnston, R.W., Ruefli, A.A., and Lowe, S.W.** (2002). Apoptosis: A link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108, 153-164.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R.** (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kim, G. D., Choi, Y. H., Dimtchev, A., Jeong, S. J., Dritschilo, A., and Jung, M.** (1999). Sensing of ionizing radiation-induced DNA damage by ATM through interaction with histone deacetylase. *J Biol Chem* 274, 31127-31130.
- Ko, L. J., and Prives, C.** (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 10, 1054-1072.
- Kokontis, J. M., Wagner, A. J., O'Leary, M., Liao, S., and Hay, N.** (2001). A transcriptional activation function of p53 is dispensable for and inhibitory of its apoptotic function. *Oncogene* 20, 659-668.
- Komarova, E. A., Neznanov, N., Komarov, P. G., Chernov, M. V., Wang, K., and Gudkov, A. V.** (2003). p53 inhibitor pifithrin alpha can suppress heat shock and glucocorticoid signaling pathways. *J Biol Chem* 278, 15465-15468.
- Kroemer, G.** (2003). Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 433-435.

- Kubbutat, M. H., Jones, S. N., and Vousden, K. H.** (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299-303.
- Kubbutat, M. H., and Vousden, K. H.** (1998). Keeping an old friend under control: regulation of p53 stability. *Mol Med Today* 4, 250-256.
- Kuhn, C., Muller, F., Melle, C., Nasheuer, H. P., Janus, F., Deppert, W., and Grosse, F.** (1999). Surface plasmon resonance measurements reveal stable complex formation between p53 and DNA polymerase alpha. *Oncogene* 18, 769-774.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lane, D. P.** (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16.
- Lee, J. H., and Paull, T. T.** (2004). Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* 304, 93-96.
- Leibovitz, A., Stinson, J. C., McCombs, W. B., 3rd, McCoy, C. E., Mazur, K. C., and Mabry, N. D.** (1976). Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 36, 4562-4569.
- Leu, J. I., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M. E., and George, D. L.** (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* 6, 443-450.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X.** (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Li, R., and Botchan, M. R.** (1993). The acidic transcriptional activation domains of VP16 and p53 bind the cellular replication protein A and stimulate in vitro BPV-1 DNA replication. *Cell* 73, 1207-1221.
- Li, X., and Darzynkiewicz, Z.** (1995). Labelling DNA strand breaks with BrdUTP. Detection of apoptosis and cell proliferation. *Cell Prolif* 28, 571-579.
- Lieber, M. R., Ma, Y., Pannicke, U., and Schwarz, K.** (2003). Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 712-720.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X.** (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89, 175-184.
- 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, 5154-5158.

Lu, X., Nannenga, B., and Donehower, L. A. (2005). PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints. *Genes Dev* *19*, 1162-1174.

Lundberg, A. S., and Weinberg, R. A. (1999). Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* *35*, 1886-1894.

Ma, D., Zhou, P., and Harbour, J. W. (2003). Distinct mechanisms for regulating the tumor suppressor and antiapoptotic functions of Rb. *J Biol Chem* *278*, 19358-19366.

Manteuil, S., Pages, J., Stehelin, D., and Girard, M. (1973). Replication of simian virus 40 deoxyribonucleic acid: analysis of the one-step growth cycle. *J Virol* *11*, 98-106.

Marchenko, N. D., Zaika, A., and Moll, U. M. (2000). Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* *275*, 16202-16212.

McGarry, T. J., and Kirschner, M. W. (1998). Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell* *93*, 1043-1053.

McKay, B. C., Ljungman, M., and Rainbow, A. J. (1999). Potential roles for p53 in nucleotide excision repair. *Carcinogenesis* *20*, 1389-1396.

Melchior, F., and Hengst, L. (2002). SUMO-1 and p53. *Cell Cycle* *1*, 245-249.

Melle, C., and Nasheuer, H. P. (2002). Physical and functional interactions of the tumor suppressor protein p53 and DNA polymerase alpha-primase. *Nucleic Acids Res* *30*, 1493-1499.

Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., and Moll, U. M. (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* *11*, 577-590.

Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M., and Reed, J. C. (1994). Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Res* *54*, 3131-3135.

Miyashita, T., and Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* *80*, 293-299.

Moll, U. M., and Zaika, A. (2001). Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS Lett* *493*, 65-69.

Monaco, L., Kolthur-Seetharam, U., Loury, R., Menissier-de Murcia, J., de Murcia, G., and Sassone-Corsi, P. (2005). Inhibition of Aurora-B kinase activity by poly(ADP-ribosylation) in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Moniaux, N., Nemos, C., Zhu, B., Dornreiter, I., Hollingsworth, M.A., Reinberg, D., and Batra, S.K. (2005). The human RNA Polymerase II-associated factor 1, hPAF1: cereberus of cell-cycle progression. (submitted).

Moroni, M. C., Hickman, E. S., Lazzerini Denchi, E., Caprara, G., Colli, E., Cecconi, F., Muller, H., and Helin, K. (2001). Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol* 3, 552-558.

Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., et al. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827.

Myers, T. K., Andreuzza, S. E., and Franklin, D. S. (2004). p18INK4c and p27KIP1 are required for cell cycle arrest of differentiated myotubes. *Exp Cell Res* 300, 365-378.

Nakano, K., Balint, E., Ashcroft, M., and Vousden, K. H. (2000). A ribonucleotide reductase gene is a transcriptional target of p53 and p73. *Oncogene* 19, 4283-4289.

Nakano, K., and Vousden, K. H. (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7, 683-694.

Nakayama, K., Nagahama, H., Minamishima, Y. A., Miyake, S., Ishida, N., Hatakeyama, S., Kitagawa, M., Iemura, S., Natsume, T., and Nakayama, K. I. (2004). Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Dev Cell* 6, 661-672.

Nigg, E. A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* 17, 471-480.

Obaya, A. J., and Sedivy, J. M. (2002). Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 59, 126-142.

Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000a). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053-1058.

Oda, K., Arakawa, H., Tanaka, T., Matsuda, K., Tanikawa, C., Mori, T., Nishimori, H., Tamai, K., Tokino, T., Nakamura, Y., and Taya, Y. (2000b). p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 102, 849-862.

Olive, P. L., and Banath, J. P. (1993). Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and 125IdUrd. *Int J Radiat Biol* 64, 349-358.

Oren, M. (2003). Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 10, 431-442.

Orrenius, S., Zhivotovsky, B., and Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 552-565.

Owen-Schaub, L. B., Angelo, L. S., Radinsky, R., Ware, C. F., Gesner, T. G., and Bartos, D. P. (1995). Soluble Fas/APO-1 in tumor cells: a potential regulator of apoptosis? *Cancer Lett* *94*, 1-8.

Passalaris, T. M., Benanti, J. A., Gewin, L., Kiyono, T., and Galloway, D. A. (1999). The G(2) checkpoint is maintained by redundant pathways. *Mol Cell Biol* *19*, 5872-5881.

Pelizon, C., d'Adda di Fagagna, F., Farrace, L., and Laskey, R. A. (2002). Human replication protein Cdc6 is selectively cleaved by caspase 3 during apoptosis. *EMBO Rep* *3*, 780-784.

Peng, C. Y., Graves, P. R., Thoma, R. S., Wu, Z., Shaw, A. S., and Piwnica-Worms, H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* *277*, 1501-1505.

Picksley, S. M., and Lane, D. P. (1993). The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? *Bioessays* *15*, 689-690.

Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature* *389*, 300-305.

Robinson, J. P., and International Society for Analytical Cytology (1997). *Current protocols in cytometry* (New York, Wiley).

Robles, A. I., Bemmels, N. A., Foraker, A. B., and Harris, C. C. (2001). APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res* *61*, 6660-6664.

Rohaly, G., Chemnitz, J., Dehde, S., Nunez, A. M., Heukeshoven, J., Deppert, W., and Dornreiter, I. (2005). A novel human p53 isoform is an essential element of the ATR-intra-S phase checkpoint. *Cell* *122*, 21-32.

Roninson, I. B. (2003). Tumor cell senescence in cancer treatment. *Cancer Res* *63*, 2705-2715.

Rothkamm, K., Kuhne, M., Jeggo, P. A., and Lobrich, M. (2001). Radiation-induced genomic rearrangements formed by nonhomologous end-joining of DNA double-strand breaks. *Cancer Res* *61*, 3886-3893.

Rubbi, C. P., and Milner, J. (2003). p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage. *Embo J* *22*, 975-986.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual. 2* (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sandri, M. I., Isaacs, R. J., Ongkeko, W. M., Harris, A. L., Hickson, I. D., Broggin, M., and Vihanskaya, F. (1996). p53 regulates the minimal promoter of the human topoisomerase IIalpha gene. *Nucleic Acids Res* *24*, 4464-4470.

Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17, 1675-1687.

Schmitz, I., Walczak, H., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1999). Differences between CD95 type I and II cells detected with the CD95 ligand. *Cell Death Differ* 6, 821-822.

Schneider, E., Montenarh, M., and Wagner, P. (1998). Regulation of CAK kinase activity by p53. *Oncogene* 17, 2733-2741.

Schuler, M., and Green, D. R. (2001). Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* 29, 684-688.

Scorrano, L., and Korsmeyer, S. J. (2003). Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 437-444.

Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* 3, 155-168.

Smith, M. L., and Fornace, A. J., Jr. (1995). Genomic instability and the role of p53 mutations in cancer cells. *Curr Opin Oncol* 7, 69-75.

Smith, M. L., and Seo, Y. R. (2002). p53 regulation of DNA excision repair pathways. *Mutagenesis* 17, 149-156.

Stambolic, V., MacPherson, D., Sas, D., Lin, Y., Snow, B., Jang, Y., Benchimol, S., and Mak, T. W. (2001). Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell* 8, 317-325.

Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y., and Nakamura, Y. (2000). A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* 404, 42-49.

Taylor, W. R., Agarwal, M. L., Agarwal, A., Stacey, D. W., and Stark, G. R. (1999). p53 inhibits entry into mitosis when DNA synthesis is blocked. *Oncogene* 18, 283-295.

Taylor, W. R., and Stark, G. R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20, 1803-1815.

Telatar, M., Wang, Z., Udar, N., Liang, T., Bernatowska-Matuszkiewicz, E., Lavin, M., Shiloh, Y., Concannon, P., Good, R. A., and Gatti, R. A. (1996). Ataxia-telangiectasia: mutations in ATM cDNA detected by protein-truncation screening. *Am J Hum Genet* 59, 40-44.

Therrien, J. P., Drouin, R., Baril, C., and Drobetsky, E. A. (1999). Human cells compromised for p53 function exhibit defective global and transcription-coupled nucleotide excision repair, whereas cells compromised for pRb function are defective only in global repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15038-15043.

- Thoma, F.** (1999). Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair. *Embo J* 18, 6585-6598.
- Thornberry, N. A., and Lazebnik, Y.** (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- Tsujimoto, Y.** (2003). Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria. *J Cell Physiol* 195, 158-167.
- Vaux, D. L.** (2002). Apoptosis timeline. *Cell Death Differ* 9, 349-354.
- Vousden, K. H.** (2000). p53: death star. *Cell* 103, 691-694.
- Vousden, K. H., and Lu, X.** (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2, 594-604.
- Wagner, A. J., Kokontis, J. M., and Hay, N.** (1994). Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and the ability of p53 to induce p21waf1/cip1. *Genes Dev* 8, 2817-2830.
- Wang, Q., Zambetti, G. P., and Suttle, D. P.** (1997). Inhibition of DNA topoisomerase II alpha gene expression by the p53 tumor suppressor. *Mol Cell Biol* 17, 389-397.
- Wang, X.** (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15, 2922-2933.
- 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 TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nat Genet* 10, 188-195.
- Wang, X. W., Zhan, Q., Coursen, J. D., Khan, M. A., Kontny, H. U., Yu, L., Hollander, M. C., O'Connor, P. M., Fornace, A. J., Jr., and Harris, C. C.** (1999). GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3706-3711.
- Wolter, G.** (2001) Charakterisierung der strahlen-induzierten Komplexbildung von DNA Polymerase α -Primase mit dem Tumorsuppressor p53, Dissertation, Heinrich-Pette-Institut, Hamburg.
- Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald, E. R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I. D., Kao, G., Gan, D. D., Zhou, J. Y., Muschel, R., *et al.*** (1997). KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet* 17, 141-143.
- Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D., and Levine, A. J.** (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 7, 1126-1132.
- Xiao, H., Pearson, A., Coulombe, B., Truant, R., Zhang, S., Regier, J. L., Triezenberg, S. J., Reinberg, D., Flores, O., Ingles, C. J., and *et al.*** (1994). Binding of basal transcription factor TFIIH to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Mol Cell Biol* 14, 7013-7024.

- Yu, J., Wang, Z., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Zhang, L.** (2003). PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 1931-1936.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B.** (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* *7*, 673-682.
- Zhan, Q., Antinore, M. J., Wang, X. W., Carrier, F., Smith, M. L., Harris, C. C., and Fornace, A. J., Jr.** (1999). Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* *18*, 2892-2900.
- 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*, 981-993.
- Zhou, B. B., and Elledge, S. J.** (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* *408*, 433-439.
- Zhou, J., Ahn, J., Wilson, S. H., and Prives, C.** (2001). A role for p53 in base excision repair. *Embo J* *20*, 914-923.
- Zhou, X. Y., Wang, X., Hu, B., Guan, J., Iliakis, G., and Wang, Y.** (2002). An ATM-independent S-phase checkpoint response involves CHK1 pathway. *Cancer Res* *62*, 1598-1603.