

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen
Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt
von

Dipl.-Ing. Katrin Hacke

aus Langen

Tag der mündlichen Prüfung:

**Die Rolle des Tumorsuppressors p53 für die TNF- α -vermittelte
Induktion des *MCP-1*-Gens**

Gutachter:

Prof. Dr. Ulrich Hilgenfeldt

Prof. Dr. Lisa Wiesmüller

Vorab öffentlich präsentierte Teilergebnisse dieser Arbeit:

Hacke K., Buchwalter G., Rösl F., Siehler S., Wasyluk B., Wiesmüller L., und Finzer P. (2006):

»The role of p53 for the induction of monocyte-chemoattractant protein-1 by TNF- α «
DKFZ PhD Retreat 2006, Weil der Stadt. *Posterpräsentation*.

Hacke K., Buchwalter G., Rösl F., Siehler S., Wasyluk B., Wiesmüller L., und Finzer P. (2006):

»The role of p53 for the induction of monocyte-chemoattractant protein-1 by TNF- α «
International p53 Conference, New York, USA. *Posterpräsentation*.

Hacke K., Buchwalter G., Rösl F., Siehler S., Wasyluk B., Wiesmüller L., und Finzer P. (2005):

»The role of p53 for the induction of monocyte-chemoattractant protein-1 by TNF- α «
DKFZ PhD Students Poster Presentation, Heidelberg. *Posterpräsentation*.

Hacke K., Buchwalter G., Rösl F., Siehler S., Wasyluk B., Wiesmüller L., und Finzer P. (2005):

»The role of p53 for the induction of monocyte-chemoattractant protein-1 by TNF- α «
DKFZ-IARC Cooperation on Infection and Cancer 2005, St. Ullrich. *Vortrag*.

Was machen Sie?

Nichts.

Ich lasse das Leben auf mich regnen.

(Rahel Varnhagen)

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	1
1 EINLEITUNG	5
1.1 Chemokine	5
1.1.1 Funktionelle und strukturelle Einteilung der Chemokine.....	5
1.1.2 Chemokinrezeptoren	6
1.1.3 Funktionen von Chemokinen und deren Rezeptoren in physiologischen und pathologischen Prozessen	7
1.2 „Monocyte-Chemoattractant-Proteins“	10
1.2.1 <i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Eigenschaften von MCP-1	10
1.2.2 MCP-1 und Entzündungskrankheiten	11
1.3 Der Tumorsuppressor p53	12
1.3.1 Struktur und Organisation des p53-Proteins.....	13
1.3.2 Regulation der p53-Stabilität durch Mdm2/Mdmx.....	15
1.3.3 Regulation der zellulären Lokalisation von p53	15
1.3.4 Regulation der transkriptionellen Aktivität von p53	16
1.4 Der TNF-α-Signaltransduktionsweg	18
1.4.1 TNF- α -Rezeptoren	18
1.4.2 MAPK-Signaltransduktionsweg und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1	19
1.4.3 IKK-Signaltransduktionsweg und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B.....	19
1.4.4 p53 und der TNF- α -Signaltransduktionsweg	21
1.5 Zielsetzung der Arbeit	22
2 MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 Material	23
2.1.1 Chemikalien.....	23
2.1.2 Zellkulturreagenzien	25
2.1.3 Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel	25
2.1.4 Geräte	26
2.1.5 verwendete „Kits“.....	27
2.1.6 Enzyme	27

2.1.7 Größenstandards.....	28
2.1.8 Antikörper	28
2.1.9 Primer.....	30
2.1.10 Oligonukleotide für DNA-Bindungsstudien (EMSA).....	31
2.1.11 cDNA	32
2.1.12 Lösungen für die Molekularbiologie.....	32
2.1.13 Lösungen für die Zellkultur	37
2.1.14 Zelllinien	37
2.2 Methoden.....	38
2.2.1 Zellkulturtechniken.....	38
2.2.1.1 Auftauen von Zellen	38
2.2.1.2 Einfrieren von Zellen	39
2.2.1.3 Kultivierung von Zellen.....	39
2.2.1.4 Aussaat von Zellen für Versuche.....	39
2.2.1.5 Behandlung der Zellen mit TNF- α	40
2.2.1.6 Behandlung der Zellen mit Pifithrin- α	41
2.2.1.7 Transiente Transfektion von Zellen	41
2.2.1.7.1 Transiente Transfektion von Zellen mit Kalziumphosphat.....	41
2.2.1.7.2 Transiente Transfektion von Zellen mit Effectene®	41
2.2.2 Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren	42
2.2.2.1 Analytische und präparative Agarosegel-Elektrophorese.....	42
2.2.2.2 Herstellung von spezifischen Gensonden für die Northern Blot Analyse	42
2.2.2.2.1 Schneiden von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen.....	42
2.2.2.2.2 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	43
2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	43
2.2.2.4 RNA Isolierung mit dem RNeasy®-Kit der Firma Qiagen.....	44
2.2.2.5 Northern Blot Analyse	45
2.2.2.5.1 Gelelektrophorese und Transfer von RNA.....	45
2.2.2.5.2 Hybridisierung.....	46
2.2.2.5.3 Autoradiographie.....	47
2.2.2.6 Reverse Transkription von RNA (RT-PCR).....	47
2.2.2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	48

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden	51
2.2.3.1 Herstellung von Zellextrakten	51
2.2.3.1.1 RIPA-Extrakte	51
2.2.3.1.2 SDS-Extrakte	51
2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung der Proteine	52
2.2.3.2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten nach Bradford	52
2.2.3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten nach Lowry	52
2.2.3.3 Diskontinuierliche Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	52
2.2.3.4 Western Blot Analyse	53
2.2.3.4.1 Transfer der Proteine auf eine Membran	53
2.2.3.4.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen	54
2.2.3.4.3 Entfernen von Antikörpern von einer Membran durch Strippen	54
2.2.4 DNA-Bindungsstudien	55
2.2.4.1 p53-EMSA	55
2.2.4.1.1 Herstellung von radioaktiv-markierten Substraten für p53-DNA-Bindungsstudien	56
2.2.4.1.2 Diffusionselution von Oligonukleotiden aus Polyacrylamid- gelen	56
2.2.4.1.3 p53-EMSA	56
2.2.4.2 AP-1- und NF- κ B-EMSA	57
2.2.4.2.1 Gewinnung der zellulären Kernextrakte für AP-1- und NF- κ B-DNA-Bindungsstudien nach Schreiber	57
2.2.4.2.2 Herstellung von radioaktiv-markierten Substraten für AP-1- und NF- κ B-DNA-Bindungsstudien	57
2.2.4.2.3 AP-1- und NF- κ B-EMSA	58
2.2.5 Chromatin-Immunopräzipitations- (ChIP) Assay	58
2.2.5.1 Optimierung der Scherungsbedingungen der chromosomalen DNA durch Ultraschall	59
2.2.5.2 p53-Chromatin-Immunopräzipitations- (ChIP) Assay	60

3	ERGEBNISSE	62
3.1	Einfluss der Suppression von p53 auf die TNF-α-vermittelte Induktion des <i>MCP-1</i>-Gens	64
3.1.1	Suppression von p53 durch Pifithrin- α in A172 Zellen.....	65
3.1.2	Suppression von p53 in A172 Zellen mittels pSUPER-p53-siRNA	66
3.2	Induktion des <i>MCP-1</i>-Gens durch TNF-α in p53-negativen Zellen	67
3.2.1	Induktion des <i>MCP-1</i> -Gens durch TNF- α in p53-negativen Saos-2 Zellen im Vergleich zu p53-positiven A172 Zellen	68
3.2.2	Expression und Phosphorylierung von p38 MAPK nach Stimulation mit TNF- α in Saos-2 und A172 Zellen.....	70
3.3	Temperatursensitives Zellsystem zur Untersuchung der Rolle von p53 in der TNF-α-vermittelten Induktion des <i>MCP-1</i>-Gens	71
3.3.1	Aktivierung von p53 führt zur Induktion des <i>MCP-1</i> -Gens durch TNF- α	72
3.3.2	Der TNF- α -Signaltransduktionsweg wird in 4Bv Zellen durch die Rekonstitution der wtp53-Aktivität von p53val135 nicht beeinflusst.....	73
3.3.2.1	wtp53-Aktivität von p53val135 aktiviert nicht den MAPK-Signaltransduktionsweg durch TNF- α	73
3.3.2.2	wtp53-Aktivität von p53val135 aktiviert nicht den NF- κ B-Signaltransduktionsweg in 4Bv Zellen durch TNF- α	75
3.4	<i>In vitro</i>-Untersuchungen zur physikalischen Interaktion von p53 mit der putativen <i>MCP-1</i>-p53-Bindungssequenz (p53-EMSA)	76
3.5	Untersuchungen zur Interaktion von p53 mit der identifizierten <i>MCP-1</i>-p53-Bindungssequenz <i>in vivo</i> (p53-ChIP)	79
3.5.1	Optimierung der Scherungsbedingungen	80
3.5.2	p53 bindet an die 5'-Enhancer-Region des <i>MCP-1</i> -Gens <i>in vivo</i>	81
4	DISKUSSION	84
4.1	Einfluss der Suppression von p53 auf die TNF- α -vermittelte Induktion des <i>MCP-1</i> -Gens.....	86
4.2	Induktion des <i>MCP-1</i> -Gens durch TNF- α in p53-negativen Zellen	88
4.3	Temperatursensitives Zellsystem zur Untersuchung der Rolle von p53 in der TNF- α -vermittelten Induktion des <i>MCP-1</i> -Gens.....	90

4.4 Untersuchungen zur physikalischen Interaktion von p53 mit der identifizierten <i>MCP-1</i> -p53-Bindungssequenz.....	92
4.5 Untersuchungen zur Interaktion von p53 mit der identifizierten <i>MCP-1</i> -p53-Bindungssequenz in vivo: hypothetisches Modell der <i>MCP-1</i> -Genregulation	93
5 LITERATUR.....	97
ANHANG	DANKSAGUNG

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BSA	Bovines Serum Albumin
Bidest	zweifach destilliert
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	„copy“-DNA
CMV	Cytomegalovirus
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
dATP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytosin-Triphosphat
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DME	„Dulbecco's Modified Eagle's“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	„Enhanced-Chemoluminescence“
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
EGTA	Ethylen-Glykol-Tetraacetat
EMSA	„Electrophoretic Mobility shift assay“
FKS	Fötale Kälberserum
G	Guanosin
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	„messenger“-RNA
NP-40	Nonidet-40
p.a.	Analysequalität
PBS	„Phosphat-buffered saline“
PCR	„Polymerase chain reaction“
Pefabloc SC	4-(2-Aminoethyl)-Benzylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylfluorid

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecylsulfat
T	Thymidin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
Tris	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
t-RNA	„transfer“-RNA
Tween-20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitan-monolaurat
wt	Wildtyp

FORMELZEICHEN UND EINHEITEN

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
C	Celsius
Ci	Curie
cpm	„counts per minute“
Da	Dalton
g	Gramm
h	Stunde
k	Kilo
λ	Wellenlänge
M	Molarität
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
pg	Pikogramm
s	Sekunde
U	„Unit“
v	Volumen
V	Volt
w	Gewicht

ZUSAMMENFASSUNG

Das Immunsystem besteht aus hochspezialisierten Zellen und Molekülen, die in einer komplexen Beziehung miteinander agieren, um Pathogene zu detektieren und zu eliminieren. Chemotaktische Zytokine, so genannte Chemokine sind entscheidend an der Immunantwort beteiligt und bekannt für ihre Effekte bei der Anlockung und Aktivierung spezifischer Gruppen von Leukozyten.

Das „Monocyte-Chemoattractant-Protein-1“ (MCP-1/CCL2) ist ein wichtiges Mitglied der Chemokin-Familie und löst die Infiltration von Monozyten/Makrophagen aus. Die Expression von MCP-1 tritt bei verschiedenen Krankheiten, die durch den Einstrom von Monozyten charakterisiert sind, auf. Es gibt eindeutige biologische und genetische Hinweise, dass MCP-1 eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Krankheiten, wie der Arteriosklerose, der Rheumatischen Arthritis und der Multiplen Sklerose, spielt. Zahlreiche Zellen, darunter Monozyten, Fibroblasten, vaskuläre Endothelzellen und glatte Muskelzellen produzieren MCP-1 *in vitro* als Antwort auf verschiedene proinflammatorische Stimuli, wie Lipopolysaccharid (LPS), Interleukin-1 (IL-1) und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α).

Das Gen, welches für MCP-1 codiert, ist ein „immediate-early“-Gen. Die Induktion des *MCP-1*-Gens durch TNF- α wird auf der Ebene der Initiation der Transkription hauptsächlich durch einen Enhancer, der sich 2,2 bis 2,7 bp „upstream“ zum Transkriptionsstart befindet, reguliert. Durch eine bioinformatische Analyse dieser 5'-Enhancer-Region wurde eine mögliche Bindungsstelle für p53 identifiziert.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob der Tumorsuppressor p53 in der durch TNF- α -vermittelten Induktion von *MCP-1* als Transkriptionsfaktor beteiligt ist. Transiente Transfektionen der Glioblastoma-Zelllinie A172 mit siRNA gerichtet gegen p53-Transkripte reduzierten die Induktion von *MCP-1* durch TNF- α signifikant. Zusätzlich wurden Hep3B Zellen, stabil transfiziert mit temperatursensitiven p53val135, als Modell verwendet: bei 32°C, wenn p53val135 wtp53-Aktivität besitzt, wurde durch die Stimulation mit TNF- α die Transkription von *MCP-1* induziert. Im Gegensatz dazu, wurde durch TNF- α bei 37°C und inaktivem p53val135 das *MCP-1*-Gen nicht aktiviert. Die physikalische Interaktion von p53 mit dem MCP-1-Enhancer konnte tatsächlich in p53-DNA-Bindungsstudien (EMSA) gezeigt werden. Chromatin-Immunopräzipitations- (ChIP) Assays ergaben, dass p53 nach der Stimulation mit TNF- α auch *in vivo* mit der identifizierten p53-Bindungsstelle

interagiert. Dieses weist darauf hin, dass unter der Beteiligung des TNF- α -Signaltransduktionsweg die Bindung von p53 an den MCP-1-Enhancer erfolgt.

Daher liefert diese Arbeit nicht nur eine neue Perspektive, wie der Tumorsuppressor p53 an der Immunantwort durch die Modulation der Chemokin-Expression beteiligt ist, sondern liefert zusätzlich auch ein nützliches Modell, um die Vernetzung zwischen p53 und dem TNF- α -Signaltransduktionsweg im Detail zu verstehen.

SUMMARY

The immune system consists of highly specialized cells and molecules interacting in a complex manner to detect and eliminate pathogens. Chemotactic cytokines, so called chemokines, are crucially involved in the immune response and known for their effects of attracting and activating specific subsets of leukocytes.

The monocyte-chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) is a prominent member of the chemokine family. MCP-1 triggers the infiltration of cells of the monocyte-macrophage lineage. Its expression occurs in a variety of diseases characterized by monocyte-rich infiltrates, and there is substantial biological and genetic evidence for its essential role in atherosclerosis, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis. A wide variety of cells, including monocytes, fibroblasts, vascular endothelial cells and smooth muscle cells produces MCP-1 *in vitro* in response to various proinflammatory stimuli such as lipopolysaccharide (LPS), interleukin-1 (IL-1) and tumor-necrosis factor- α (TNF- α).

The gene coding for MCP-1 is an immediate early gene. The induction of the *MCP-1* gene by TNF- α is regulated at the level of initiation of transcription mainly by an enhancer region located about 2.2 to 2.7 kb upstream. By bioinformatic analysis of this 5'-enhancer region a putative p53 binding site was identified.

The purpose of this study was to determine whether the tumor suppressor p53 may be act as a transcription factor in the *MCP-1* expression induced by TNF- α . Transient transfection of the glioblastoma cell line A172 with siRNA directed against p53 transcripts reduced the inducibility of the *MCP-1* gene by TNF- α significantly. In addition Hep3B cells stably transfected with temperature sensitive p53val135 were used as a model system: temperature shift to 32°C resulted in wild-type properties of p53val135 and induction of *MCP-1* transcription after stimulation with TNF- α . In contrast, TNF- α stimulation with inactive p53val135 at 37°C did not cause *MCP-1* induction. Indeed, physical interaction of p53 with the MCP-1 enhancer could be shown in electrophoretic mobility shift assays (EMSA). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments showed p53 DNA-interaction *in vivo* in a manner depending on TNF- α stimulation, indicating that the TNF- α pathway may be involved in the binding of p53 to the MCP-1 enhancer.

SUMMARY

Therefore, these data open new perspective of how the tumor suppressor p53 may be involved in the immune response through modulation of chemokine expression and provide a useful model for the crosstalk between p53 and the TNF- α pathway.

1 EINLEITUNG

1.1 Chemokine

Das Immunsystem besteht aus Billionen von freibeweglichen Zellen, die durch den Körper wandern. Es werden daher Kommunikationssignale benötigt, die diese Zellen orts- und zeitabhängig entlang komplizierter Signaltransduktionswege leiten und ihnen somit ermöglichen, sowohl ihre Interaktionen zu organisieren, als auch ihre Funktionen auszuüben. An der Realisierung dieser Funktionen sind die so genannten Chemokine beteiligt (Rot und von Andrian, 2004).

1.1.1 Funktionelle und strukturelle Einteilung der Chemokine

Chemokine sind chemotaktisch wirkende Zytokine („CHEMOtactic cytoKINES“), die von einer Vielzahl von Zellen entweder konstitutiv oder als Antwort auf einen inflammatorischen Reiz produziert werden. Bisher wurden 50 verschiedene Chemokine identifiziert (Le *et al.*, 2004). Es sind kleine, basische Proteine bestehend aus 70-125 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 6-14 kDa.

Chemokine können basierend auf ihrem Expressionsmuster und Funktion im Immunsystem funktionell in zwei Hauptkategorien zusammengefasst werden: den homeostatischen und den inflammatorischen Chemokinen (Rossi und Zlotnik, 2000). Homeostatische Chemokine werden stets konstitutiv exprimiert und sekretiert. Sie sind beteiligt an der homeostatischen Wanderung der Lymphozyten und dendritischen Zellen (DC), sowie an der Lokalisierung von Lymphozyten, die ein Antigen präsentieren, im lymphatischen System (Fernandez und Lolis, 2002). Andere Chemokine werden hingegen nur nach einer Infektion oder einem proinflammatorischen Stimulus produziert und vermitteln die Migration von Leukozyten zu verletzten oder entzündlichen Stellen sowie zu Tumoren. Solche inflammatorischen Chemokine können zusätzlich die Immunantwort verstärken und den Wundheilungsprozess einleiten (Laing und Secombes, 2004). Neuere Untersuchungen zeigen, dass einige Chemokine nicht nur einer der beiden funktionellen Kategorien zugeteilt werden können. Diese werden dann als „dual function“ Chemokine bezeichnet (Moser *et al.*, 2004).

Die Mehrzahl der Chemokine besitzt vier konservierte Cystein-Reste in der N-terminalen Region. Abhängig von der Anordnung der ersten beiden Cystein-Reste

erfolgt daher die strukturelle Klassifizierung der Chemokine in C-, CC-, CXC- und CX3C-Chemokine. Hierbei repräsentiert C die Anzahl der Cystein-Reste in der aminoterminalen Region und X gibt die Anzahl der Aminosäuren zwischen den beiden ersten Cysteinen an (Rollins, 1997, Zlotnik *et al.*, 1999).

Die CXC-Familie wird oftmals weiter unterteilt in ELR⁺ und ELR⁻, basierend auf der Präsenz oder Abwesenheit des Aminosäure-Tripletts Glutaminsäure-Leuzin-Arginin (ELR), welches dem ersten Cystein-Rest in der primären Aminosäure-Sequenz dieser Chemokine vorangestellt ist. Innerhalb der CXC-Gruppe besitzen die meisten Chemokine das ELR-Motiv in der N-terminalen Region. Diese Chemokine wirken chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten, während hingegen die chemotaktischen Aktivitäten der CXC-Chemokine ohne ELR-Motiv auf mononukleare Zellen beschränkt sind (Laing und Secombes, 2004).

Generell locken Chemokine ausgeprägte Klassen von Leukozyten an: CC-Chemokine attrahieren mononukleare Zellen, eosinophile Granulozyten und basophile Leukozyten, C-Chemokine (Lymphotaktin) locken T-Lymphozyten an und CX3C-Chemokine (Fraktalkin) interagieren mit T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen sowie Monozyten (Luster *et al.*, 1998).

1.1.2 Chemokinrezeptoren

Chemokine üben ihre biologischen Effekte durch Interaktionen mit Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen aus. Die Chemokinrezeptoren gehören zu der Superfamilie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Charakteristisch für diese Rezeptorfamilie sind sieben transmembrane Domänen und die Kopplung der Signaltransduktion an G-Proteine (Le *et al.*, 2004).

Die Nomenklatur der Chemokinrezeptoren leitet sich von der Chemokinklasse ab, die an den jeweiligen Rezeptor bindet. Bisher wurden neunzehn verschiedene humane Chemokinrezeptoren identifiziert: zehn CC- (CCR1-10), sieben CXC- (CXCR1-6 und CXCR3B), ein CX3C- (CX3CR1) sowie ein C- (XCR1) Rezeptor (Murphy *et al.*, 2000). Des Weiteren existieren zwei Proteine, die den Chemokinrezeptoren ähneln. Dieses ist der „Duffy antigen receptor for chemokines“ (DARC) und D6, die promiskuitiv CXC- und CC-Chemokine mit gleicher Affinität binden, ohne jedoch dadurch aktiviert zu werden. Ihre Aufgabe besteht vermutlich darin, den Spiegel an zirkulierenden inflammatorischen Chemokinen zu regulieren (Le *et al.*, 2004). Das Ungleichgewicht zwischen der großen Anzahl an Chemokinen

zu der vergleichsweise geringen Anzahl an Chemokinrezeptoren wird dadurch ausgeglichen, dass mehrere Chemokine an einen Rezeptor binden und ein Chemokin verschiedene Rezeptoren an der Zelloberfläche erkennt (D'Ambrosio *et al.*, 2003).

Die Aktivierung der Chemokinrezeptoren erfolgt in zwei Schritten. In einem ersten Schritt erkennt und bindet das Chemokin an den Rezeptor. Anschließend erfolgt eine Konformationsänderung des Chemokins, die hauptsächlich durch den flexiblen N-Terminus des Proteins vermittelt wird und zu der Aktivierung des Rezeptors führt. Durch die Aktivierung des Rezeptors erfolgt der Austausch von gebundenem GDP zu GTP in der α -Untereinheit der G-Proteine. Die G-Proteine dissoziieren von dem Rezeptor und aktivieren verschiedene Effektormoleküle. Dadurch wird eine Signaltransduktionskaskade in der Zelle aktiviert und die verschiedenen biologischen Effekte der Chemokine werden ausgelöst (Fernandez und Lolis, 2002).

1.1.3 Funktionen von Chemokinen und deren Rezeptoren in physiologischen und pathologischen Prozessen

Mit der zunehmenden Anzahl an identifizierten Chemokinen wird deutlich, dass Chemokine nicht nur wichtige Funktionen für die angeborene und adaptive Immunität, wie die Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen besitzen, sondern auch an vielen weiteren physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt sind. Abb. 1.1.3-1 gibt einen Überblick über die verschiedenen pathophysiologischen Prozesse bei denen Chemokine eine Rolle spielen:

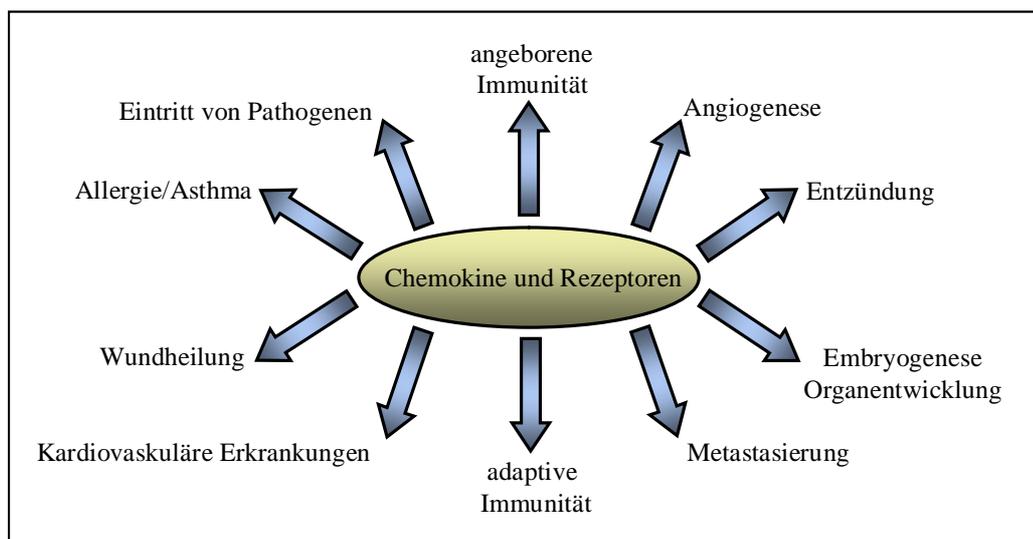


Abbildung 1.1.3-1: Funktionen von Chemokinen und deren Rezeptoren in physiologischen und pathophysiologischen Prozessen [modifiziert nach Le *et al.*, 2004].

Hämatopoese

Zahlreiche Studien zeigten, dass den Chemokinen eine bedeutsame Funktion in der Hämatopoese zukommt (Le *et al.*, 2004). Die Blutbildung ist ein dynamischer Prozess, der durch verschiedene Zytokine reguliert wird. Mehr als 25 verschiedene Chemokine der CC-, CXC- und C- Familie wurden identifiziert, *in vivo* die Proliferation von myeloiden Vorläuferzellen zu hemmen (Broxmeyer und Kim, 1999). Jedoch konnte in *in vivo* Studien, basierend auf „knockout“-Mäusen, nur für eine weitaus geringere Anzahl an Chemokinen und ihren Rezeptoren dieser Befund bestätigt werden. Beispielsweise inhibiert CCL3 (MIP-1 α), appliziert in Mäusen, den Zellzyklus und reduziert die absolute Anzahl an Vorläuferzellen im Knochenmark (Cooper *et al.*, 1994). Broxmeyer und Mitarbeiter (Broxmeyer *et al.*, 1999) führten Studien in „knockout“-Mäusen mit deletiertem CCR1, dem Hauptrezeptor für MIP-1 α , durch. In diesen besaßen die myeloide Zellen hingegen eine erhöhte Proliferationsrate und es trat eine verstärkte Wanderung von Leukozyten in den Blutstrom auf. Einige Chemokine kontrollieren die Entwicklung sekundärer lymphoider Organe. So besitzen „knockout“-Mäuse mit einem defekten CXCL13 (BCA-1) Gen Mesenteriallymphknoten, jedoch bildeten sie keine peripheren Lymphknoten aus (Forster *et al.*, 1996).

Angiogenese

Die physiologische Neubildung von Blutgefäßen ist zeitlich begrenzt und präzise reguliert. Im Gegensatz dazu erfolgt die pathologische Angiogenese, die während chronischen Entzündungsprozessen und Tumorstadium auftritt, als Folge einer unausbalancierten Produktion von positiven und negativen Regulatoren.

Chemokine können sowohl als positive, wie auch als negative Regulatoren der Angiogenese wirken. Chemokine der CXC-Familie mit ELR-Motiv, CXCL8 (IL-8), CXCL5 (ENA78) und CXCL1, 2, 3 (GRO- α , - β , - γ) induzieren die Bildung von Blutgefäßen (Koch *et al.*, 1992), während hingegen ELR⁻ CXC-Chemokine, wie CXCL4 (PF4), CXCL10 (IP-10) und CXCL9 (MIG), die durch ELR⁺ CXC-Chemokine ausgelöste Angiogenese unterbrechen (Strieter *et al.*, 1992). Eine Ausnahme dieser auf der Struktur basierenden Einteilung in Chemokine, die die Angiogenese fördern und angiostatischen Chemokinen, bildet CXCL12 (SDF-1). Dieses wirkt trotz des Fehlens des ELR-Motivs *in vitro*, als auch *in vivo* positiv auf die Angiogenese (Strieter *et al.*, 1992). Chemokine anderer Subklassen sind ebenfalls an der

Neubildung von Blutgefäßen beteiligt. So aktivieren CCL-1 (I-309), CCL2 (MCP-1), CCL11 (Eotaxin) und CX3CL1 (Fraktalkin) die Angiogenese, während hingegen CCL21 (SLC) ein potenter angiostatischer Faktor ist (Bernadini *et al.*, 2003).

Entzündungsprozesse

Die Ereignisse, die zu einer inflammatorischen Antwort führen, sind charakterisiert durch die Erkennung einer Läsion durch Entzündungszellen, Rekrutierung von spezifischen Leukozyten, Entfernung von mikrobiologischen Eindringlingen, Beseitigung von verletzten Zellen/Gewebe und der Wundheilung.

Chemokine sind an akuten und chronischen Entzündungsprozessen sowie an deren Kontrolle beteiligt, indem sie die Infiltration und Aktivierung von inflammatorischen Effektorzellen in das verletzte oder entzündliche Gewebe steuern (Gerard & Rollins, 2001). Verschiedene CC-Chemokine, wie CCL3 (MIP-1 α) und CCL5 (RANTES) werden z.B. während der Sepsis exprimiert und lösen proinflammatorische Effekte durch den Eintritt und die Aktivierung spezifischer Leukozyten aus (Standiford *et al.*, 1995; van Otteren *et al.*, 1995). Die Mitglieder der CXC-Chemokine stehen mit der Pathogenese der systemischen Entzündungsantwort in Verbindung (van Zee *et al.*, 1991, Standiford *et al.*, 1995). So werden bei einer bakteriellen Lungenentzündung neutrophile Granulozyten, die für die Beseitigung der eingedrungenen Mikroorganismen verantwortlich sind, durch CXC-Chemokine aktiviert (Greenberger *et al.*, 1995). Dieses wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Überexpression von KC, dem murinen Homolog des humanen CXCL1 (GRO- α), insbesondere in der Lunge die Resistenz gegenüber *Klebsiella pneumoniae* verstärkt (Tsai *et al.*, 1998).

Tumorentstehung und Metastasierung

Zahlreiche Chemokine üben einen bedeutsamen Einfluss auf das Tumorstadium und die Metastasierung aus, indem sie die Infiltration von Leukozyten in den Tumor steuern, die Angiogenese vermitteln, als autokrine und parakrine Wachstumsfaktoren wirken sowie die Wanderung der Tumorzellen beeinflussen (Balkwill, 2003). Alle bisherigen Untersuchungen zu der Bedeutung von Chemokinen in der Tumorentstehung zeigen auf, dass die biologischen Aktivitäten der Chemokine die Ausbildung von Tumoren fördert. Diese Beobachtung wird beispielsweise durch Studien von Burger und Mitarbeitern (Burger *et al.*, 1999) mit

chemokinrezeptorartigen Molekülen, die von Kaposi-Sarkom induzierenden Herpes-Viren (KSHV) codiert werden, unterstützt. KSHV codiert einen G-Proteingekoppelten Rezeptor (GPCR) ähnlich dem CXCR2. KSHV-GPCR liegt stets in einem konstitutiv aktiven Zustand vor und wird zusätzlich durch die Bindung von CXC-Chemokinen, wie CXCL8 (IL-8) und CXCL1 (GRO- α), aktiviert. Überexpression von KSHV-GPCR in Mäusen führt zur Entwicklung von Läsionen, die dem Kaposi-Sarkom gleichen. Beteiligung von Chemokinen und Chemokinrezeptoren in der Tumormetastasierung sind unter anderem für Melanome, die akute myeloide Leukämie, die akute T-Zellen Leukämie sowie Ovarialtumore und das Pankreaskarzinom beschrieben worden (Mohle *et al.*, 1999; Hasegawa *et al.*, 2000; Koshiba *et al.*, 2000; Scotton *et al.*, 2001).

1.2 „Monocyte-Chemoattractant-Proteins“

Das „Monocyte-Chemoattractant-Protein-1“ (MCP-1/CCL2) gehört zu der Familie der CC-Chemokine. Es wurde von verschiedenen Gruppen, auf Grund seiner Fähigkeit Monozyten *in vitro* anzulocken, aufgereinigt (Valente *et al.*, 1988; Matsushima *et al.*, 1989; Yoshimura *et al.*, 1989). Die Analyse der primären Aminosäuresequenz von MCP-1 ergab jedoch, dass das Gen, welches das murine Homolog codiert und als *JE* bezeichnet wird, bereits als „platelet-derived growth factor“ (PDGF)-induzierbares Gen aus embryonalen Mausfibroblasten kloniert wurde (Cochran *et al.*, 1983; Rollins *et al.*, 1988). Die humane MCP-1 Familie besteht neben MCP-1 selbst, aus drei weiteren Mitgliedern: MCP-2, MCP-3 und MCP-4 (Laing und Secombes, 2004). Das humane *MCP-1*-Gen ist auf Chromosom 17 (17q 11.2-12) lokalisiert (Rollins, 1996) und wird *in vitro* unter anderem in Monozyten, Fibroblasten, vaskulären Endothelzellen und glatten Muskelzellen (Rollins und Pober, 1999; Ylä-Herttuala *et al.*, 1991; Bogdanov *et al.*, 1998) durch verschiedene Stimuli wie Lipopolysaccharid (LPS), Interleukin-1 (IL-1) (Rollins, 1991), Interferon- γ (IFN- γ) (Valente *et al.*, 1998) oder 12-*o*-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) induziert (Ueda *et al.*, 1997).

1.2.1 *In vitro* und *in vivo* Eigenschaften von MCP-1

Chemotaxis-Assays zeigten, dass die Hauptaufgabe von MCP-1 *in vitro* darin besteht, Monozyten anzulocken (Matsushima *et al.*, 1989). Zusätzlich vermittelt

MCP-1 die Wanderung von T-Lymphozyten und basophilen Granulozyten sowie die Freisetzung von Histamin (Alam *et al.*, 1992; Bischoff *et al.*, 1992; Carr *et al.*, 1994).

Der Rezeptor für MCP-1, CCR2, ist wie alle anderen Chemokinrezeptoren auch, ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor. Dadurch kann durch MCP-1, neben der Migration von Zellen, auch zahlreiche andere physiologische Prozesse in Zellen, die CCR2 auf ihrer Oberfläche präsentieren, induzieren. Zu diesen Vorgängen gehören in Monozyten unter anderem, die Zunahme des intrazellulären Kalzium-Spiegels, die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies („respiratory burst“) und die dadurch hervorgerufene Induktion verschiedener Gene (Rollins *et al.*, 1991; Jiang *et al.*, 1992;). Da CCR2 neben Leukozyten auch von anderen Zellen exprimiert wird, ist es möglich, dass durch MCP-1 in diesen nicht-hämatopoetischen Zellen noch weitere, bisher unbekannte spezifische Antworten hervorgerufen werden (Daly und Rollins, 2003).

Der Mechanismus, wie CCR2 durch MCP-1 aktiviert wird, wird kontrovers diskutiert. Wie auch für andere Chemokine beschrieben, kann MCP-1 Multimere ausbilden (Handel *et al.*, 1996). Normalerweise üben Chemokine der CC-Subklasse ihre Funktionen als Dimere aus. MCP-1 bildet jedoch zusätzlich stabile Tetramere, bei denen die Grenzfläche zwischen zwei MCP-1 Dimeren, strukturelle Ähnlichkeiten zu den Dimeren der CXC-Chemokine aufweist (Lubkowsky *et al.*, 1997). Daher stellt sich die Frage, in welcher Form MCP-1 mit CCR2 interagiert. MCP-1 zeigt bereits als Monomer *in vitro* biologische Effekte, liegt aber hingegen als Multimer vor, wenn es Leukozyten *in vivo* anlockt (Daly und Rollins, 2003).

Interessanterweise werden die Monozyten von MCP-1 *in vivo* nur chemoattrahiert und nicht aktiviert. Dieses zeigten Untersuchungen an transgenen Mausmodellen von Fuentes und Mitarbeitern (Fuentes *et al.*, 1995), in denen MCP-1 in spezifischen Organen, wie Thymus, Gehirn und Bauchspeicheldrüse konstitutiv exprimiert werden kann. Durch die konstitutive Expression an MCP-1 in diesen Mäusen tritt eine spontane Infiltration von Monozyten in das entsprechende Organ ein, ohne jedoch Gewebeschäden hervorzurufen.

1.2.2 MCP-1 und Entzündungskrankheiten

MCP-1 wird bei einer Reihe von Entzündungskrankheiten, wie Rheumatische Arthritis (RA), Arteriosklerose oder Multiple Sklerose (MS) exprimiert, die durch die Akkumulation von mononukleären Zellen charakterisiert sind. Dadurch trägt MCP-1

wahrscheinlich zu der Pathobiologie dieser Krankheiten bei. Bei der Rheumatischen Arthritis produzieren die Zellen der Synovialis MCP-1, wodurch entzündliche Prozesse in den Gelenken eingeleitet werden (Koch *et al.*, 1992).

Dem Entzündungsmodell der Arteriosklerose liegt die Annahme zugrunde, dass MCP-1 als proinflammatorisches Protein an der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt ist (Clinton und Libby, 1992). MCP-1 wird von den Endothelzellen und den glatten Muskelzellen der Arterienwand, als Folge von pathophysiologischen Stimuli, wie z.B. Hypertonie und Hyperlipidämie sekretiert. Hierdurch werden Monozyten aus dem zirkulierenden Blutstrom angelockt, welche in dem Subendothelium akkumulieren und dort zu Makrophagen differenzieren. Die Makrophagen nehmen weiterhin Lipide auf, wodurch sie zu Schaumzellen werden und die Bildung arteriosklerotischer Läsionen einleiten (Daly und Rollins, 2003). Die Expression von MCP-1 erfolgt auch in arteriosklerotischen Plaques (Nelken *et al.*, 1991).

Wie bei der Arteriosklerose, ist an der Pathogenese der Multiplen Sklerose ebenfalls die Infiltration von mononukleären Zellen in das Zielgewebe von Bedeutung. Auch hier ist hauptsächlich MCP-1 für die Migration dieser Zellen in das Zentrale Nervensystem (ZNS) verantwortlich. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen der MCP-1 Expression und dem Ausbruch der Multiplen Sklerose (Ransohoff *et al.*, 1996). So exprimieren Astrozyten in demyelinisierten Läsionen (Simpson *et al.*, 1998; van der Voorn *et al.*, 1999) MCP-1, und in Mausmodellen der experimentellen allergischen Encephalomyelitis (EAE) tritt eine MCP-1-Expression während des Ausbruchs der Krankheit auf (Ransohoff *et al.*, 1993; McManus *et al.*, 1998).

1.3 Der Tumorsuppressor p53

p53 ist einer der wichtigsten Tumorsuppressoren in der Zelle und wird daher oft als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Kastan *et al.*, 1991; Lane, 1992). Das p53-Protein wurde 1979 von unterschiedlichen Gruppen unabhängig voneinander als zelluläres Protein isoliert, das einen Komplex mit dem großen T-Antigen von SV40 ausbildet (Lane und Crawford, 1979; Linzer und Levine, 1979).

Als Folge von intra- und extrazellulärem Stress, wie DNA-Schäden, Hypoxia oder der Expression eines Onkoproteins, wird p53 rasch stabilisiert und aktiviert (Vousden, 2002). Ungestresste Zellen besitzen einen niedrigen Level an p53. Das

aktivierte p53-Protein fungiert hauptsächlich als sequenzspezifischer DNA-bindender Transkriptionsfaktor und reguliert eine große Anzahl von Zielgenen. Diese Gene vermitteln Zellzyklusarrest, Apoptose, Differenzierung, DNA-Reparatur, Inhibition der Angiogenese und Metastasierung sowie andere p53-abhängige Funktionen (Harms *et al.*, 2004). So induziert p53 einen G1-Arrest durch die Induktion des *p21* Gens (el-Deiry *et al.*, 1993) und einen G2-Arrest durch die Aktivierung von Gadd45, p21 und 14-3-3 σ (Hermeking *et al.*, 1997; Bunz *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999). p53 ist an der Regulation der Apoptose durch die Induktion verschiedener proapoptotischer Gene wie Bax, Noxa und Puma (Miyashita und Reed, 1995; Nakano und Vousden, 2001) sowie der Todesrezeptoren, Fas und DR5 (Wu *et al.*, 1997) beteiligt.

Die transkriptionelle Aktivität von p53 ist kritisch für dessen Funktion als Tumorsuppressor (Vogelstein und Kinzler, 1992). Dieses wird insbesondere durch die Tatsache verdeutlicht, dass in ca. 50 % der Krebsarten Mutationen im *p53*-Gen vorliegen. Hiervon ist bei mehr als 80 % der Mutationen die DNA-Bindungsdomäne (DBD) von p53 betroffen, wodurch die transkriptionelle Aktivität von p53 unterbunden wird (Hainaut *et al.*, 1998).

1.3.1 Struktur und Organisation des p53-Proteins

Das humane *p53*-Gen ist auf Chromosom 17 (17p13.1) lokalisiert (Soussi, 2005) und codiert für ein 53 kDa großes Protein bestehend aus 393 Aminosäuren. Das p53-Protein beinhaltet verschiedene funktionelle Domänen (Abb. 1.3.1-1):

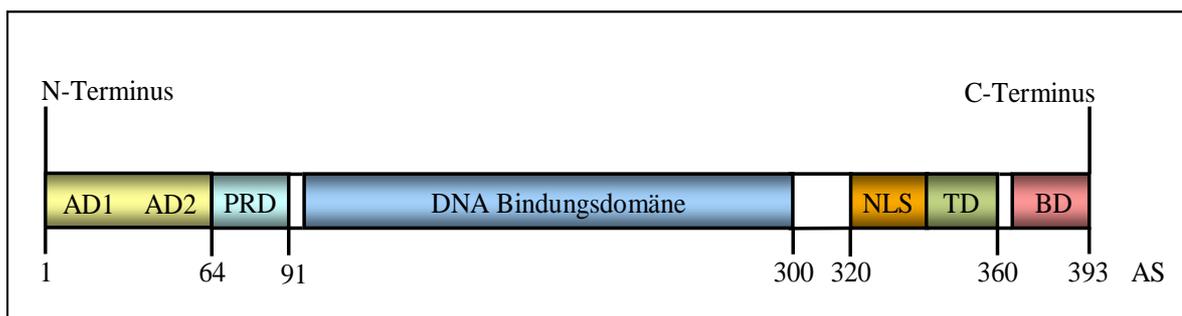


Abbildung 1.3.1-1: Schematische Darstellung der strukturellen Organisation des p53-Proteins. Gezeigt sind die N-terminale Aktivierungsdomänen (AD1 und AD2), die prolinreiche Domäne (PRD), die sequenzspezifische DNA-Bindungsdomäne, das Kern-Lokalisierungssignal (NLS), die Oligomerisierungsdomäne (TD) und die stark basische Domäne (BD). (AS): Aminosäure [modifiziert nach McKinney und Prives, 2005].

Die ersten 100 Aminosäuren (AS) der N-terminalen Region des p53-Proteins bilden zwei Transaktivierungsdomänen aus: die Aktivierungsdomäne 1 (AD1) von AS 1-42

und die Aktivierungsdomäne 2 (AD2) von AS 43-91. Des Weiteren befindet sich in diesem Sequenzbereich (AS 64-91) des p53-Proteins eine prolinreiche Domäne (PRD), die sich durch fünf Wiederholungen des Motivs „PXXP“ (P=Prolin; X=beliebige Aminosäure) auszeichnet. Diese Domäne ist für die p53-vermittelte Apoptose bedeutsam (Walker und Levine, 1996; Baptiste *et al.*, 2002).

Die sequenzspezifische DNA-Bindungsdomäne (DBD) von AS 100-300 ist für die zentrale Funktion des p53-Proteins als transkriptionellem Aktivator verantwortlich. Neben der DNA-Bindung ist in dieser Domäne auch die 3'-5' gerichtete Exonukleaseaktivität von p53 lokalisiert, wodurch p53 an DNA-Reparaturprozessen, die wiederum für die genomische Stabilität von Bedeutung sind, beteiligt ist (Mummenbrauer *et al.*, 1996). Die sich gegenseitig ausschließenden Funktionen der sequenzspezifischen DNA-Bindung und der Exonukleaseaktivität werden über die C-terminale Domäne und über Phosphorylierungsprozesse reguliert (Janus *et al.*, 1999).

Der carboxyterminale Sequenzbereich des p53-Proteins beinhaltet zwei Kern-Lokalisierungssignale (NLS): von AS 316-325 und AS 340-351. Das zweite NLS liegt in der Oligomerisierungsdomäne (TD), die von AS 320-356 reicht, und muss für eine effektive Funktion ubiquitiniert werden (Boyd *et al.*, 2000). Das erste NLS, dem die größere Bedeutung zukommt, überschneidet sich mit der TD (Shaulsky *et al.*, 1990). Die Oligomerisierungsdomäne ist dafür verantwortlich, dass das p53-Protein in Lösung Tetramere ausbildet.

Im Anschluss an diese Region folgt die stark basische Domäne (BD) von AS 364-393. Diese Domäne ist in der Lage unspezifisch an DNA zu binden (Foord *et al.*, 1991; Wang *et al.*, 1993). So interagiert dieser Bereich des C-Terminus von p53 mit non-B-DNA-Strukturen, wie einzelsträngige DNA-Enden (Bakalkin *et al.*, 1995), „stem-loops“ (Kim *et al.*, 1997), DNA-Intermediaten des Rekombinationsprozesses (Dudenhöffer *et al.*, 1998), sowie mit „supercoiled“ DNA (Palecek *et al.*, 2004). Zusätzlich kann über posttranslationale Modifikationen der BD die sequenzspezifische DNA-Bindungsaktivität von p53 positiv reguliert werden (Hupp *et al.*, 1992; Halazonetis und Kandil, 1993; Hupp und Lane 1994; Gu und Roeder, 1997).

1.3.2 Regulation der p53-Stabilität durch Mdm2/Mdmx

Das zelluläre Level an p53-Protein wird über das 26S Proteasom durch Ubiquitinierung gesteuert (Bond *et al.*, 2005). Mdm2 ist eine E3 Ubiquitin-Ligase, die die Degradation von p53 vermittelt (Bond *et al.*, 2005). Für die optimale Funktion von Mdm2 wird Mdmx benötigt (Gu *et al.*, 2002). Mdm2 und Mdmx binden mit ihrem N-Terminus an die hydrophoben Seitenketten eines amphipathischen α -Helixmotifs in der aminoterminalen Transaktivierungsdomäne (TD) (siehe Abb. 1.3.1-1) von p53 (Chen *et al.*, 1993). Hierdurch wird die Ubiquitinierung der Lysin-Reste im C-Terminus des p53-Proteins durch Mdm2 erzielt. Eine durch Mdm2 induzierte Monoubiquitierung fördert den Export von p53 aus dem Zellkern; jedoch erfolgt erst durch eine Polyubiquitinierung eine Degradation von p53 über das 26S Proteasom (Li *et al.*, 2003).

Durch die Bindung von Mdm2 an die N-terminale Transaktivierungsdomäne von p53 kann zusätzlich die Transaktivierung gehemmt werden, wodurch die Bindung der basalen Transkriptionsmaschinerie unterbunden und die Acetylierung von p53 durch Histonacetyltransferasen verhindert wird (Gu *et al.*, 1997).

Neben Mdm2 existieren noch weitere derartige E3 Ligasen, die an der Degradation von p53 beteiligt sind, wie Pirh2 und „constitutively photomorphogenetic 1“ (COP1) (Leng *et al.*, 2003; Dornan *et al.*, 2004).

1.3.3 Regulation der zellulären Lokalisation von p53

Die richtige Lokalisierung von p53 ist essentiell für dessen Aktivierung und Aktivität. In nicht gestressten Zellen ist das p53-Protein unregelmäßig über den Zellkern verteilt. Die Translokation von p53 in den Zellkern wird durch das Kern-Lokalisierungssignal (NLS) vermittelt (Liang und Clarke, 2001). Das nukleäre p53 bindet an Mdm2, wodurch dessen Ubiquitinierung und Degradation erfolgt. Die Synthese, nukleäre Translokation, sowie die Degradation von p53 stellen einen dynamischen Prozess dar, wodurch das Level an p53 in nicht gestressten Zellen reguliert wird (Liang und Clarke, 2001).

Zusätzlich zu dem Transport von p53 zwischen dem Nukleus und dem Zytoplasma, kann p53 von speziellen nukleären Substrukturen rekrutiert werden. Das „promyelocytic leukemia gene“ (PML) ist eine wichtige Komponente dieser nukleären Substrukturen, die als „nuclear bodies“ (PML-NB) bezeichnet werden. PML-NB

wirken als „molekulare Depots“ und steuern dadurch wichtige Vorgänge im Zellkern (Coutts und La Thangue, 2005). In den PML-NB können nukleäre Proteine, wie p53, posttranslational modifiziert werden (Bernardi und Pandolfi, 2003). So wird nach einer DNA-Schädigung p53 und „CREB-binding protein (CBP)/adenoviral protein E1A (p300)“ (CBP/p300) durch PML zu den PML-NB rekrutiert. Dadurch erfolgt die Acetylierung des C-Terminus von p53 mittels CPB/p300, wodurch die transkriptionelle Aktivität von p53 zunimmt (Guo *et al.*, 2000; Boisvert *et al.*, 2001). Zusätzlich wird durch PML die Phosphorylierung von p53 in den PML-NB stimuliert, was zu einer Stabilisierung von p53 führt (Louria-Hayon *et al.*, 2003). Durch PML kann der Eintritt von Mdm2 in den Zellkern verhindert werden, wodurch eine Akkumulation von p53 im Zellkern verursacht wird (Bernardi *et al.*, 2004).

1.3.4 Regulation der transkriptionellen Aktivität von p53

Um seine Zielgene zu aktivieren, muss eine „kritische Menge“ an p53-Protein im Nukleus vorhanden sein, damit dieses mit seiner DNA-Bindungsdomäne (DBD) an die spezifische p53-DNA-Sequenz des Zielgens, die dort meistens im Promotor lokalisiert ist, binden kann. Anschließend wechselwirkt p53 über seine N-terminalen Aktivierungsdomänen (AD) mit der basalen Transkriptionsmaschinerie sowie mit Koaktivatoren und reguliert dadurch die Genexpression des Zielgens.

Das geschlossene Chromatin ist das erste Hindernis, das die basale Transkriptionsmaschinerie überwinden muss, um Zugang zu der Promotorregion des Zielgens zu erhalten. Um die spezifische Genexpression zu aktivieren, interagiert p53 daher mit Enzymen, die wiederum Histone modifizieren, wodurch das Chromatin geöffnet und der Promoter für den Transkriptionsprozess zugänglich gemacht wird.

Zu diesen histonmodifizierenden Enzymen gehört CPB/p300, welches eine Histonacetyltransferase-Aktivität besitzt (Chan und La Thangue, 2001). CPB/p300 stützt die p53-Transaktivierung und kann direkt mit p53 wechselwirken (Avantaggiati *et al.*, 1997; Gu und Roeder, 1997; Scolnick *et al.*, 1997). CPB/p300 kann die Histone in der Umgebung der p53-spezifischen DNA-Sequenz im Promotor acetylieren (Liu *et al.*, 2003). Neben CPB/p300 existieren drei weitere Proteine, hADA3, TRRAP sowie Tip60, die eine Histonacetyltransferase-Aktivität besitzen und hierdurch die transkriptionelle Aktivität von p53 beeinflussen (Wang *et al.*, 2001; Ard *et al.*, 2002; Legube *et al.*, 2004).

Erst kürzlich stellte sich heraus, dass die p53-abhängige Transkription auch durch die Methylierung der Histone reguliert wird. Die Histonmethyltransferasen, PRMT1 und CARM1, können direkt mit p53 wechselwirken und modifizieren zusammen mit p300/CPB kooperativ und unabhängig voneinander Histone und damit den „Zugang“ zu der DNA (An *et al.*, 2004).

Die DNA-Bindungsaktivität von p53 wird durch verschiedene posttranslationale Modifikationen des Proteins reguliert. Der C-Terminus von p53 kann durch CPB/p300 acetyliert werden. Luo und Mitarbeiter zeigten (Luo *et al.*, 2004), dass hochaufgereinigtes, am C-Terminus acetyliertes p53 eine verstärkte sequenzspezifische DNA-Bindungsaktivität, sowohl gegenüber kurzen Oligonukleotiden, als auch gegenüber längeren DNA-Fragmenten, besitzt. Unter Verwendung von artifiziellen chromatinhaltigen längeren DNA-Oligonukleotiden als Bindungssubstrat für p53 ergab sich hingegen, dass die Acetylierung von p53 am C-Terminus nicht zu einer verstärkten DNA-Bindungsaktivität von p53 führt (Espinosa und Emerson, 2001). Mit Hilfe von ChIP-Assays konnte gezeigt werden, dass wtp53 und p53, in dem mehrere Acetylierungsstellen (Lysin320, Lysin373, Lysin381 und Lysin382) mutiert wurden, in gleichem Maße an den p21-Promotor binden (Barlev *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Ergebnisse ist es bisher unklar, inwieweit eine Acetylierung von p53 tatsächlich zu einer verstärkten DNA-Bindungsaktivität von p53 führt (Liu und Chen, 2006).

Der Effekt, den die Phosphorylierung von p53 auf dessen DNA-Bindungsaktivität ausübt, ist bisher ebenfalls noch nicht eindeutig geklärt (Feng *et al.*, 2005). Es existiert bisher ein Modell, das die Bedeutung der N-terminalen Phosphorylierung für die Aktivierung von p53 beschreibt (Sakaguchi *et al.*, 1998). Eine Phosphorylierung von Serin15, Serin20 und Threonin18 führt zu einer Konformationsänderung des p53-Proteins, wodurch eine Interaktion von Mdm2 mit p53 verhindert wird. Möglicherweise führt dies zu einer verstärkten Bindung von p300/CBP an p53 und als Folge daraus, vermutlich zu der Wechselwirkung von p53 mit der basalen Transkriptionsmaschinerie. Da CPB/p300 und die basale Transkriptionsmaschinerie p53 in dem Sequenzbereich bindet, die zum Teil mit der Region überlappt, an die Mdm2 mit p53 wechselwirkt, führt dieses zu einer Konkurrenz zwischen der Bindung von Mdm2 und CPB/p300 (Lu und Levine, 1995; De Guzman *et al.*, 2000). Eine verhinderte Bindung von Mdm2 bedingt eine Akkumulation von p53, womit p53 vermehrt für transkriptionelle Prozesse zur Verfügung steht (Wahl *et al.*, 2005).

SUMO-1 ist ein kleines, ubiquitinartiges Protein, das an viele Transkriptionsfaktoren, einschließlich p53, bindet (Gostissa *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 1999). Dieser Prozess wird als Sumoylierung bezeichnet und ähnelt der Ubiquitinierung (Dohmen, 2004). Die Sumoylierung erfolgt an Lysin386 des p53 Proteins und verstärkt dessen transkriptionelle Aktivität. Die Ubiquitinierung des Proteins wird jedoch hierdurch nicht beeinflusst (Gostissa *et al.*, 1999). Bisher ist nicht bekannt, welcher Mechanismus der Aktivierung von p53 durch Sumoylierung zugrunde liegt (Liu und Chen, 2006).

1.4 Der TNF- α -Signaltransduktionsweg

Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) ist ein Zytokin, welches von einer Vielzahl von Zellen, wie Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten, Keratinozyten und Fibroblasten, als Folge von entzündlichen Prozessen, Infektionen, Verletzungen oder anderen Umwelteinflüssen produziert und sekretiert wird (Baud und Karin, 2001). Durch TNF- α können zahlreiche zelluläre Antworten, wie die Aktivierung und Migration von Lymphozyten und Leukozyten, Fieber, Proliferation, zelluläre Differenzierung und, über die Aktivierung der Caspasekaskade, Apoptose hervorgerufen werden (Tracey und Cerami, 1993).

Die Bindung von TNF- α an seine Rezeptoren (siehe 1.4.1) führt unter anderem zu der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren „Aktivator-Protein-1“ (AP-1) und „Nuklearer Faktor-kappaB“ (NF- κ B), die wiederum Gene induzieren, welche sowohl an der chronischen, als auch an der akuten Entzündungsantwort beteiligt sind (Barnes und Karin, 1997; Karin *et al.*, 1997). Der TNF- α -Promotor selbst beinhaltet DNA-Bindungsstellen für AP-1 und NF- κ B, wodurch TNF- α einer positiven Autoregulation unterworfen ist. Diese Eigenschaft ist bedeutsam für die Verstärkung der inflammatorischen Antwort (Baud und Karen, 2001).

1.4.1 TNF- α -Rezeptoren

TNF- α übt seine Funktionen durch zwei individuelle Rezeptoren, TNFR1 und TNFR2, aus (Vandenabeele *et al.*, 1995). Die Bindung von TNF- α an TNFR1 und TNFR2 induziert sowohl die Trimerisierung des Rezeptors, als auch die Rekrutierung verschiedener Proteine des TNF- α -Signaltransduktionsweges an der zytoplasmatischen Seite der beiden Rezeptoren. Das erste Protein, das zu TNFR1

rekrutiert wird, ist „TNFR1-associated death domain protein“ (TRADD), wodurch eine Plattform ausgebildet wird, an die drei weitere Mediatoren binden können. Diese sind „receptor-interacting protein-1“ (RIP1), „Fas-associated death domain protein“ (FADD) und TNF-receptor-associated factor-2“ (TRAF2) (Hsu *et al.*, 1996). Aus der Bindung von TNF- α an TNFR2 resultiert eine direkte Rekrutierung von TRAF2, wodurch wiederum TRAF1 rekrutiert wird (Rothe *et al.*, 1994). TRAF2 führt zu der Aktivierung des „I κ B kinase komplex“ (IKK)-Signaltransduktionsweges und des „mitogen activated protein kinase“ (MAPK)-Signaltransduktionsweges (Liu *et al.*, 1996; Karin und Ben-Neriah, 2000).

1.4.2 MAPK-Signaltransduktionsweg und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1

Wie alle „mitogen activated protein kinases“ (MAPK) werden auch „c-Jun N-terminal kinases“ (JNK) und p38 MAPK über eine Serin/Threonin-Kinasekaskade ausgehend von „MAPK kinase kinases“ (MAP3K) über „MAPK kinases“ (MAP2K) aktiviert (Dempsey *et al.*, 2003). MAP3K kann direkt mit TRAF2 interagieren (Baud *et al.*, 1999). Die biologische Hauptfunktion des MAPK-Signaltransduktionsweges ist die TNF- α -vermittelte Aktivierung von AP-1 (Abb. 1.4.2-1). AP-1 ist eine heterogene Sammlung von Transkriptionsfaktoren, die als Dimere biologisch aktiv sind. Diese Dimere bestehen aus Jun, Fos und Fra Untereinheiten, deren Aktivität durch verschiedene Mechanismen, wie die Phosphorylierung durch zahlreiche MAPK reguliert wird. Bei der Stimulation mit TNF- α treten die MAPK aus dem Zytoplasma in den Zellkern ein, um dort die DNA-gebundenen Transkriptionsfaktoren zu phosphorylieren (Karin *et al.*, 1997).

1.4.3 IKK-Signaltransduktionsweg und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B

NF- κ B ist eine Gruppe von dimeren Transkriptionsfaktoren, deren Untereinheiten aus Mitgliedern der NF- κ B/Rel-Familie bestehen (Wajant *et al.*, 2003). In Säugerzellen sind fünf Familienmitglieder der NF- κ B/Rel-Familie bekannt: NF- κ B1/p50, welches konstitutiv aus dessen Vorläufer p105 prozessiert wird und NF- κ B2/p52, welches induzierbar aus dessen Vorläufer p100, c-Rel, RelA/p65 und RelB prozessiert werden kann (Verma *et al.*, 1995). NF- κ B wird hauptsächlich durch die

Phosphorylierung seiner inhibitorischen Proteine, den I κ Bs, welche NF- κ B in nicht-stimulierten Zellen im Zytoplasma zurückhalten, reguliert (Baldwin, 1996).

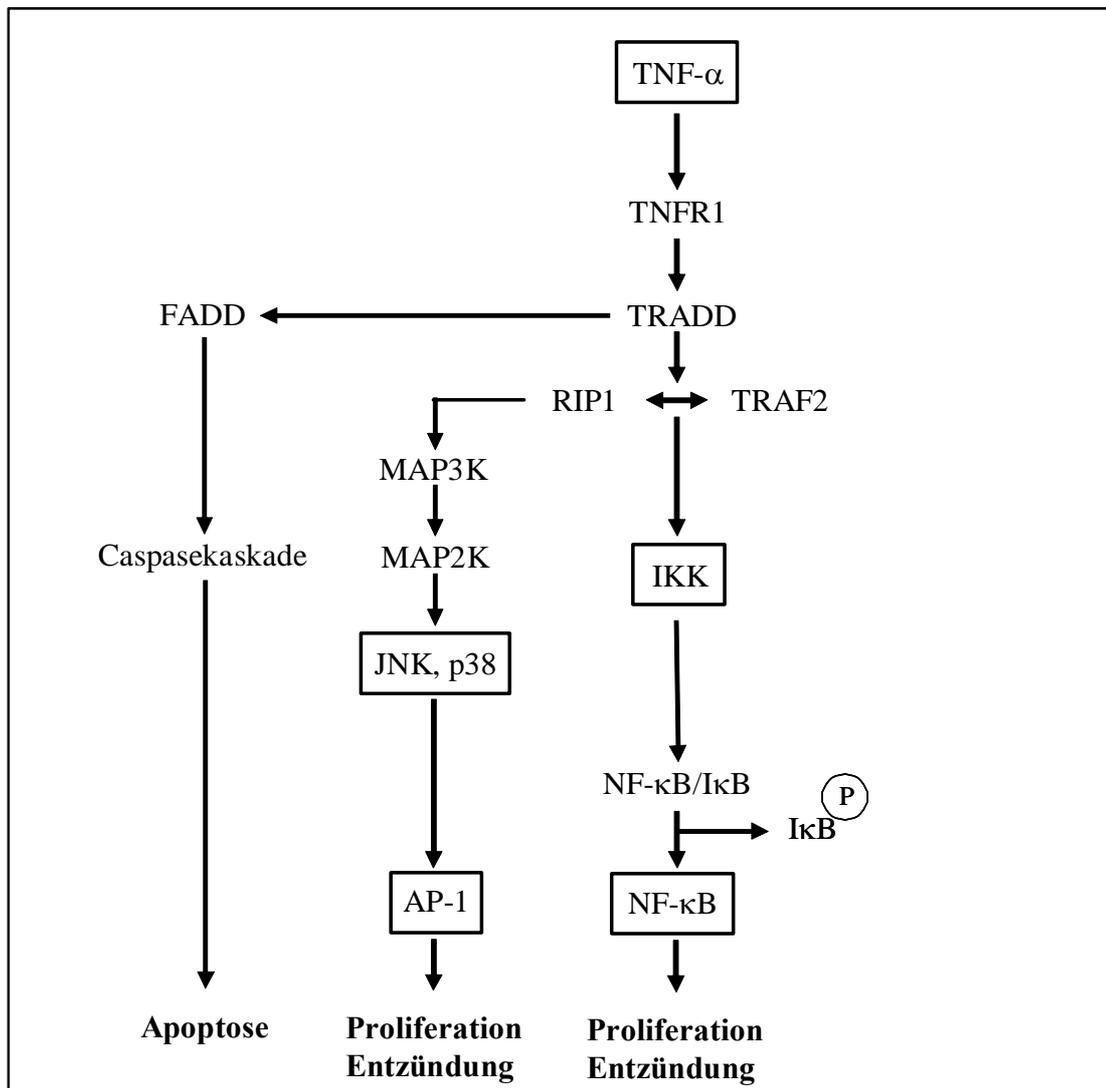


Abbildung 1.4.3-1: Schematische Darstellung der Komponenten des TNF- α -Signaltransduktionsweges von TNFR1 bis zur Apoptose und den Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B. Die Bindung von TNF- α an dessen Rezeptor TNFR1 bewirkt die Rekrutierung von TRAF2, RIP1 und FADD über das Adaptor-Protein TRADD. Die Aktivierung von FADD führt über die Aktivierung der Caspasekaskade zu Apoptose. TRAF2 und RIP1 lösen über die Proteinkinasen JNK, p38 und IKK die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B aus. FADD: „Fas-associated death domain protein“; IKK: I κ B kinase komplex; JNK: „c-Jun N-terminal kinase“; RIP1: „receptor-interacting protein-1“; TNF- α : Tumor-Nekrose-Faktor- α ; TNFR1: „TNF-rezeptor-typ-1“; TRAF2: „TNF-rezeptor-associated factor-2“ [modifiziert nach Baud und Karin, 2001].

Durch die Stimulation mit TNF- α werden diese inhibitorischen Proteine durch den IKK-Komplex phosphoryliert, wodurch diese ubiquitiniert und degradiert werden (Abb. 1.4.2-1). NF- κ B kann nun ungehindert in den Zellkern eintreten (Karin und Ben-Neriah, 2000). Die TNF- α -vermittelte Aktivierung des IKK-Komplexes über TNFR1 ist von der Interaktion zwischen RIP1 und der IKK γ /NEMO-regulatorischen Untereinheit

abhängig, wohingegen TRAF2 für die Rekrutierung des IKK-Komplexes, welche die IKK α - und IKK β -Untereinheiten beinhaltet, erforderlich ist (Devin *et al.*, 2000; Karin und Ben-Neriah, 2000). Befindet sich NF- κ B im Zellkern, kann dessen transkriptionelle Aktivität zusätzlich durch Phosphorylierung mittels Proteinkinasen, die durch TNF- α induzierbar sind, modifiziert werden. Zu diesen gehört unter anderem die p38 MAPK, so dass hier eine Verbindung zu anderen Signaltransduktionswegen gegeben ist (Baud und Karin, 2001).

1.4.4 p53 und der TNF- α -Signaltransduktionsweg

Es existieren Verknüpfungen zwischen dem TNF- α -Signaltransduktionsweg und dem Tumorsuppressor p53: so kann p53 durch TNF- α induziert werden (Donato und Perez, 1998) und es wurde die Transaktivierung des p53-Promotors durch NF- κ B beobachtet (Wu und Lozano, 1994). Die Aktivierung von NF- κ B durch p53 korreliert mit der Fähigkeit von p53 Apoptose auszulösen (Ryan *et al.*, 2000). Diese p53-abhängige Aktivierung von NF- κ B erfolgt unter Beteiligung des ERK/MEK/p90^{rsk}-Signaltransduktionsweges und unterscheidet sich von der durch TNF- α -vermittelten Aktivierung des Transkriptionsfaktors (Abschnitt 1.4.3) (Ghoda *et al.*, 1997; Ryan *et al.*, 2000). Zusätzlich kann die Induktion der ERK/MEK/p90^{rsk}-Kinasen und die daraus resultierende Aktivierung von NF- κ B aber auch zum Überleben der Zelle führen (Tergaonkar *et al.*, 2002; Panta *et al.*, 2004). p53 reguliert die Aktivität von NF- κ B nicht auf der Ebene des IKK-Komplexes, sondern interagiert mit dem IKK-Signaltransduktionsweg „downstream“ dieses Komplexes (Panta *et al.*, 2004). Dreyfuss und Mitarbeiter (Dreyfuss *et al.*, 2005) konnten zeigen, dass die transkriptionelle Aktivität von p53 durch eine direkte Bindung von p53 an I κ B- α inhibiert werden kann.

Des Weiteren scheint p38 MAPK an der Aktivierung von p53 durch TNF- α (Sayed *et al.*, 2000) und durch verschiedene Formen von Zellstress, wie die Behandlung mit UV-Strahlung (Bulavin *et al.*, 1999) und Chemotherapeutika (Sanchez-Prieto *et al.*, 2000), beteiligt zu sein.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die fundamentale Rolle von MCP-1 und dessen Rezeptor CCR2 bei der Anlockung und Aktivierung von Monozyten in verschiedenen, durch entzündliche Prozesse hervorgerufenen Krankheiten, wie Multiple Sklerose (MS), Rheumatische Arthritis (RA) und Arteriosklerose, macht dieses Chemokin zu einem idealen Ziel für therapeutische Ansätze. Es ist daher von besonderem Interesse zu verstehen, wie MCP-1 auf transkriptioneller Ebene reguliert wird.

Eine bioinformatische Analyse der 5'-Promotorregion des *MCP-1*-Gens ergab, dass in dem bereits charakterisierten Enhancer, der 2,2 bis 2,7 bp „upstream“ zum Transkriptionsstart lokalisiert ist, zusätzlich eine mögliche Bindungsstelle für den Tumorsuppressor p53 befindet. Daher soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob p53 als Transkriptionsfaktor in der durch TNF- α -vermittelten Induktion von *MCP-1* beteiligt ist.

Hierfür sollen zum einen geeignete Zellsysteme, in denen *MCP-1* durch TNF- α induzierbar ist, etabliert, als auch Methoden gefunden werden, die es ermöglichen, in diesen Systemen p53 spezifisch zu supprimieren oder zu aktivieren. Aufschluss über eine direkte physikalische Interaktion von p53 mit der möglichen p53-DNA-Bindungsstelle in der MCP-1-Promoterregion soll mittels DNA-Bindungsstudien (EMSA) erbracht werden. Um aufzuzeigen, dass eine Bindung von p53 *in vivo* an den MCP-1-Enhancer erfolgt, sollen p53-Chromatin-Immunopräzipitations-(ChIP) Assays etabliert und durchgeführt werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien

[α -³²P]-dCTP 10 mCi/mL

Acrylamid/bis-Acrylamid (29:1),
30 % (w/v) Lösung

Agarose für die Elektrophorese

Ammoniumpersulfat für die Elektrophorese

Biogel P30, fein

Borsäure für die Elektrophorese

Bovines Serumalbumin

Bradford-Reagenz

Bromphenolblau

Diethylpyrocarbonat

DNA-Ladepuffer (6 x)

E-64

ECL-Reagenz

EDTA für die Molekularbiologie

EGTA

Ethanol, p.a.

Ethidiumbromid-Lösung 1 %

Ficoll

Formaldehydlösung, p.a. 37 %

Formamid, p.a.

[γ -³²P]-dATP 10 mCi/mL

Glyzin

Glyzerin p.a.

Firma

Amersham-Pharmacia,
Freiburg

Serva, Heidelberg

Invitrogen, Karlsruhe

Sigma, Deisenhofen

BioRad, München

Sigma, Deisenhofen

Biomol, Hamburg

Biorad, München

Sigma, Deisenhofen

Roth, Karlsruhe

MBI-Fermentas,
St. Leon-Roth

Roche Diagnostics,
Mannheim

Amersham-Pharmacia,
Freiburg

Roche Diagnostics,
Mannheim

Sigma, Deisenhofen

Fluka, Deisenhofen

Roth, Karlsruhe

Sigma, Deisenhofen

Merck, Darmstadt

Fluka, Deisenhofen

Amersham-Pharmacia,
Freiburg

Sigma, Deisenhofen

Merck, Darmstadt

Glykogen	Roche Diagnostics, Mannheim
Harnstoff für Molekularbiologie	Merck, Darmstadt
HEPES für Molekularbiologie	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol, p.a.	Fluka, Deisenhofen
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Methanol, p.a.	Fluka, Deisenhofen
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure	Fluka, Deisenhofen
Natriumazetat, p.a. wasserfrei	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat, p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
Nonidet-P40, 10 %	Roche Diagnostics, Mannheim
Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Invitrogen, Karlsruhe
PCR-Puffer (10 x)	Invitrogen, Karlsruhe
Pefabloc SC	Roche Diagnostics, Mannheim
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol für DNA/RNA	Roth, Karlsruhe
Polyvinylpyrrolidon 25	Serva, Heidelberg
Proteinase Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
Proteinase K	Sigma, Deisenhofen
RT-Puffer (5 x)	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure, p.a. 32 %	Merck, Darmstadt
T ₄ -Polynukleotidkinase Puffer (10 x)	New England Biolabs, Schwalbach
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Tri-Natriumzitat-Dihydrat	Sigma, Deisenhofen
t-RNA	Sigma, Deisenhofen
Tumor-Nekrose-Faktor- α	Strathmann Biotech, Hannover
Tween 20,	Sigma, Deisenhofen
Xylenblau	Sigma, Deisenhofen

2.1.2 Zellkulturreagenzien

Zellkulturreagenzien

	Firma
Dimethylsulfoxid, p.a.	Merck, Darmstadt
Doxyzyklin	Calbiochem, Schwalbach
Dulbecco's modified Eagle's Medium	Sigma, Deisenhofen
	Gibco, Eggenstein
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
	Invitrogen, Karlsruhe
Penizillin (10000 U/ μ L)/Streptomycin (10000 μ /mL)	Gibco, Eggenstein
Pifithrin- α	Calbiochem, Schwalbach
Puromyzin	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin/EDTA	Gibco, Eggenstein

2.1.3 Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel

Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel

	Firma
Autoradiographie-Kassetten	Kodak, Stuttgart
Einmalpapiertücher	Wepa, Mainz
Einmalplastikküvetten	Greiner, Nürtingen
Einmalskalpell	PFM, Köln
Einmalspritzen (steril)	B. Braun, Melsungen
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1,0 mL, 2,0 mL)	Eppendorf, Hamburg
Filme Hyperfilm ECL	Amersham-Pharmacia, Freiburg
Filme BioMax	Kodak, Stuttgart
Frischhaltefolie	Igefa, Bremen
Glaspipetten	Renner, Darmstadt
Glaswolle, silikonisiert	Serva, Heidelberg
Kanülen (steril)	B. Braun, Melsungen
Kryoröhrchen	Greiner, Nürtingen
Nylonmembranen, modifiziert	NEN Life Science, Köln
PCR-Reaktionsgefäße	Applied Biosystems, Darmstadt

Plastikküvetten (1 cm)	Greiner, Nürtingen
PVDF-Membran (Immobilon P)	Millipore, Eschborn
Sterilfilter	Millipore, Eschborn
Verstärkerfolien für Röntgenfilme	Kodak, Stuttgart
Whatman 3 MM Papiere	Schleicher und Schüll, Dassel
Zellkulturflaschen	Greiner, Nürtingen; TPP, Aindling-Arnhofen
Zellkulturschalen	Greiner, Nürtingen; Sarstedt, Nürmbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nürmbrecht
Zentrifugenröhrchen (15 mL)	Greiner, Nürtingen; TPP Aindling-Arnhofen
Zentrifugenröhrchen (50 mL)	Greiner, Nürtingen

2.1.4 Geräte

Geräte

Analysenwaage 2004 MP
Begasungsbrutschrank Stericult 200
Entwicklermaschine classic E.O.S
Geigerzähler LB 1210B
Gelelektrophoresekammer, horizontal
Gelelektrophoresekammer, vertikal

Geltrockner 483
Heizblock/Schüttler
Hybridisierungssofen Hybrid Mini
Mikroskop CK2
PCR-Maschine GeneAmp 2400
Pipetten (automatisch) Pipetman classic
P10, P20, P200, P1000
Photometer Ultraspec 3000

Quarzküvette (1 cm)
Spannungsgerät Phero-Stab. 500

Firma

Sartorius, Göttingen
Labotect, Göttingen
Agfa, München
Berthold, Wildbad
Renner, Darmstadt
Amersham-Pharmacia,
Freiburg
BioRad, München
Eppendorf, Hamburg
Bachhofer, Reutlingen
Olympus, Hamburg
Perkin Elmer, Rodgau
Gilson, Villiers-le Bel,
Frankreich
Amersham-Pharmacia,
Freiburg
Hellma, Mühlheim
Biotec-Fischer,
Reiskirchen

Szintillationszähler QC 2000	Bioscan Washington D.C. (USA)
Ultraschallgerät Sonifier 250	Branson/Heinemann, Schwäbisch Gemünd
Überkopfschüttler Reax 2	Heidolph, Rust
Wippschüttler DuoMax2030	Heidolph, Rust
Waage 1216 MP	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Julabo, Seelbach
Westernblotkammer semidry; Hofer, SemiPhor	Amersham-Pharmacia, Freiburg

2.1.5 verwendete „Kits“

Kit

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit
DC Protein Assay
Effectene[®] Transfection Reagent
HexaLabelPlus, DNA Labeling Kit
QIAquick[®] Gel Extraction Kit
RNeasy[®] RNA

Firma

Upstate, Hampshire, UK
BioRad, München
Qiagen, Hilden
MBI Fermentas,
St. Leon-Rot
Qiagen, Hilden
Qiagen, Hilden

2.1.6 Enzyme

Enzyme

RNase H (2 U/μL)
RNaseOUT[™] (40 U/μL)
Superscript II[™] (RNase H (-) (200 U/μL)
T₄- Polynukleotidkinase (10000 U/μL)
Taq-Polymerase (5 U/μL)

Firma

Invitrogen, Karlsruhe
Invitrogen, Karlsruhe
Invitrogen, Karlsruhe
New England Biolabs,
Schwalbach
Invitrogen, Karlsruhe

2.1.7 Größenstandards

Größenstandard

Firma

a) DNA-Größenstandard

Gene Ruler™ DNA-Leiter-Mix (1 kb)

MBI-Fermentas,
St. Leon-Rot

b) Protein-Größenstandard

BenchMark™ Pre-Stained Protein-Leiter

Invitrogen, Karlsruhe

2.1.8 Antikörper

a) Antikörper für Western Blot

Erstantikörper:

p53 sc-126

Maus monoklonal IgG, Klon DO-1, Lot A1204, Lot D2303 und
Lot J2804

Santa Cruz, Heidelberg

Verdünnung: 1:1000

p21 (Anti-Cip1/Waf1)

Maus monoklonal IgG, Lot 74601

BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg

Verdünnung: 1:500

p38 MAP Kinase NEB #9212

Kaninchen polyklonal IgG, Lot 3 und Lot 10

New England Biolabs, Schwalbach

Verdünnung: 1:1000

Phospho-p38 MAP Kinase (Thr180/Tyr182) NEB #9211s

Kaninchen polyklonal IgG, Lot 6 und Lot 15

New England Biolabs, Schwalbach

Verdünnung: 1:1000

I κ B- α /MAD-3 sc-371

Kaninchen polyklonal IgG, Klon C-21, Lot H076 und Lot L0805
Santa Cruz, Heidelberg

Verdünnung: 1:1000

β -Aktin # Nr. 691001

Maus monoklonal IgG, Klon 4, Lot 8739F und Lot 2928H
ICN-Biotechnology, Eschwege

Verdünnung: 1:10000

Zweitantikörper:

Anti-Kaninchen IgG-HRP # W401B

gekoppelt an Merrettichperoxidase, Lot 16032802 und Lot
19187502

Promega, Mannheim

Verdünnung: 1:5000

Anti-Maus IgG_{2a}-HRP sc-2970

gekoppelt mit Merrettichperoxidase, Lot G1003 und Lot H0504
Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

Verdünnung: 1:5000

Anti-Maus IgG-HRP # W402B

gekoppelt an Merrettichperoxidase, Lot 16066001

Promega, Mannheim

Verdünnung: 1:10000

Anti-Maus IgG-HRP # 115-035-068

gekoppelt an Merrettichperoxidase, Lot 32133

Dianova, Hamburg

Verdünnung: 1:5000

b) Antikörper für EMSA

GAPDH ab 9484-100

Maus monoklonal IgG, Klon mAbcam 9484, Lot 79415

Abcam, Cambridge, UK

p53

Maus monoklonal IgG, Klon DO-1, Lot D14289-3
Calbiochem, Schwalbach

p53 # OP09L

Maus monoklonal IgG, Klon PAb 1801, Lot D16772-3
Calbiochem, Schwalbach

p53 # OP03

Maus monoklonal IgG, Klon PAb 421, Lot D12031-20
Calbiochem, Schwalbach

c) Antikörper für ChIP

p53 sc-6243X

Kaninchen polyklonal IgG, Klon FL-393, Lot E0703
Santa Cruz, Heidelberg

Kaninchen IgG sc-2763

gekoppelt an Biotin, Lot B0305
Santa Cruz, Heidelberg

2.1.9 Primer

Die spezifischen Primer wurden von Wolfgang Weinig (Deutsches Krebsforschungszentrum, Abteilung Oligonukleotidsynthese/DNA-Sequenzierung) hergestellt. Nach der Synthese wurden am 5'-OH-Ende Dimethoxytritylgruppen entfernt und die Primer mittels HPLC aufgereinigt. Die spezifischen Primer für die p21 ChIP-PCR wurden freundlicherweise von Gilles Buchwalter (IGBMC, Illkirch, Frankreich) zur Verfügung gestellt. Als unspezifische Primer für die Vervielfältigung von RNA in RT-Reaktionen wurden Oligo (dT)-Primer der Firma Invitrogen, Karlsruhe verwendet.

Folgende Primer wurden in der PCR eingesetzt:

Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer (0,5 mg/mL)

Invitrogen, Karlsruhe

GAPDH	forward	5' -TGG ATA TTG TTG CCA TCA ATG ACC- 3'
	reverse	5' -GAT GGC ATG GAC TGT GGT CAT G- 3'
Anlagerungstemperatur: 65°C		
MCP-1	forward	5'-CAG ATG CAA TCA ATG CCC CAG T- 3'
	reverse	5'-ATA AAA CAG GGT GTC TGG GGA AAG C- 3'
Anlagerungstemperatur: 66°C		
MCP-1 (295 bp)	forward	5' -GCA GAA GTG GGA GGC AGA CA- 3'
	reverse	5' -GGC TTA TAG ACA TCC TGT GGC ATG A-3'
Anlagerungstemperatur: 66°C		
MCP-1 (nested)	forward	5' -TTC TGA TTC ATA CCC TTC ACC TTC C- 3'
	reverse	5' -GAT AAA GCC ACA ATC CAG AGA AGG- 3'
Anlagerungstemperatur: 64°C		
p21 ChIP-PCR	forward	5' -CAC CTT TCA CCA TTC CCC TA- 3'
	reverse	5' -GCA GCC CAA GGA CAA AAT AG- 3'
Anlagerungstemperatur: 61°C		

2.1.10 Oligonukleotide für DNA-Bindungsstudien (EMSA)

Die einzelsträngigen Oligonukleotide wurden von Wolfgang Weinig (Deutsches Krebsforschungszentrum, Abteilung Oligonukleotidsynthese/DNA-Sequenzierung) hergestellt. Nach der Synthese wurden am 5'-OH-Ende Dimethoxytritylgruppen entfernt und die Oligonukleotide mittels HPLC aufgereinigt.

AP-1 konsensus: 5' -CGC TTG ATG ACT CAG CCG CAA- 3'
5' -TTC CGG CTG AGT CAT CAA GCG- 3'

NF-κB konsensus: 5' -AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C- 3'
5' -GCC TGG GAA AGT CCC CTC AAC T-3'

MATERIAL UND METHODEN

Antikörper-Waschpuffer	1 x TBS-T
Bindepuffer für EMSA	50 % (w/v) Glycerin 60 mM HEPES pH 7,9 20 mM Tris pH 8,0 300 mM KCl 5 mM EDTA pH 8,0 100 µg/mL BSA Lagerung bei -20°C
Bindepuffer für p53 EMSA	25 mM Tris-HCl pH 8,0 5 mM EDTA pH 8,0 1 mM DTT 6 % (w/v) Glycerin Lagerung bei -20°C
Biogel-Suspension	1 x TE 5 mM Natriumchlorid 0,2 % (v/v) SDS 50 % (w/v) Biogel
Blockinglösung	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T Lagerung bei 4°C
2 x BBS	50 mM BES 280 mM NaCl 1,5 M Na ₂ HPO ₄ pH 6,95 mit NaOH einstellen
BSA	1 µg/mL in Wasser für die Protein- Eichgerade, Lagerung bei -20°C
BSA-Blockinglösung	5 % (w/v) BSA in TBS-T Lagerung bei -20°C
250 x Denhardt's	5 % (w/v) BSA 5 % (w/v) Ficoll 400 5 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon 25 Lagerung bei -20°C
Church I	0,25 % (w/v) Albumin 0,25 M NaCl 0,25 M Na ₂ HPO ₄ pH 7,4 1 mM EDTA pH 7,2 7 % (v/v) SDS 50 % Formamid
Church II	40 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,2 1 mM EDTA pH 7,2 5 % (v/v) SDS

MATERIAL UND METHODEN

Church III	40 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,2 1 mM EDTA pH 7,2 1 % (v/v) SDS
DEPC-Wasser	0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat in H ₂ O autoklavieren.
DTT	0,1 M Stocklösung immer frisch ansetzen
E-64	2,5 µg/mL Stocklösung in Ethanol/H ₂ O (1:1) Lagerung bei -20°C
EDTA	0,5 M EDTA pH 8.0
EGTA	0,25 M EGTA pH 7.9
Elutionspuffer für Oligonukleotide (EMSA)	10 mM Tris-HCl pH 7,5 100 mM NaCl 1 mM EDTA pH 7,2 2 mM DTT
Hybridisierungspuffer	50 % (w/v) Formamid 10 U/mL tRNA 5 x SSC 0,1 % (v/v) Denhardt's-Puffer 1 % (v/v) SDS
Hybridisierungspuffer für Oligonukleotide (p53 EMSA)	10 mM Tris-HCl pH 7,8 60 mM NaCl 2 mM DTT
Hybridisierungs-Waschpuffer	2 x SSC 0,1 % (v/v) SDS
10 x Laemmli-Laufpuffer	0,25 M Tris 1,9 M Glyzin 1 % (v/v) SDS
20 x MOPS	400 mM MOPS 100 mM Natriumacetat 20 mM EDTA in DEPC- H ₂ O ansetzen
Natriumphosphat-Puffer für Hybridisierungspuffer	3 Teile 1 M NaH ₂ PO ₄ 2 Teile 1 M Na ₂ HPO ₄

MATERIAL UND METHODEN

Pefabloc SC	23,8 mg/mL Stocklösung Lagerung bei -20°C
Poly (dl-dC)	1 mg/mL (10 U = 500 µg) in TNE-Puffer lösen 5 min bei 45°C erwärmen und auf Raumtemperatur abkühlen lassen Lagerung bei -20°C
Proteinase K	20 mg/mL Stocklösung 100 mg in 5 mL 20 mM Tris-HCl pH 7,5 lösen und für 30 min bei 37°C erwärmen Lagerung bei -20°C
Puffer A	10 mM HEPES pH 7,9 10 mM KCl 0,1 mM EDTA pH 8,0 0,1 mM EGTA pH 7,9 vor Gebrauch 0,5 mg/mL Pefablock SC, 5 µg/mL E-64, 200 mM Na ₃ VO ₄ und 1 mM NaF zusetzen. Lagerung bei -20°C
Puffer C	20 mM HEPES pH 7,5 400 mM NaCl 1 mM EGTA pH 7,9 vor Gebrauch 0,5 mg/mL Pefablock SC, 5 µg/mL E-64, 200 mM Na ₃ VO ₄ und 1 mM NaF zusetzen. Lagerung bei -20°C
RIPA	100 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % (v/v) Nonidet-P40 0,1 % SDS vor Gebrauch PMSF (10 µg/mL) zufügen (10 µL/mL RIPA) Lagerung bei 4°C
SDS-Probenpuffer	50 mM Tris-HCl pH 6,8 2 % (v/v) SDS 10 % (w/v) Glyzerol
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M tri-Natriumazetat-Dihydrat pH 7,0 mit Salzsäure einstellen

MATERIAL UND METHODEN

50 x TAE	2 M Tris-HCl, pH 8,0 0,25 M Natriumacetat 50 mM EDTA pH 8,0 pH 7,8 mit Essigsäure einstellen
10 x TBE	0,9 M Tris-HCl, pH 8,0 0,9 M Borsäure 20 mM EDTA pH 8,0
10 x TBS	0,1 M Tris-HCl pH 7,5 1 M NaCl
1 x TBS-T	10 mM Tris-HCl pH 7,5 0,1 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween 20
100 x TE	1 M Tris 0,1 M EDTA pH 8,0 mit HCl pH 7,8 einstellen
TNE	10 mM Tris 1 mM EDTA pH 8,0 0,1 M NaCl auf pH 7,2 bis 7,4 einstellen
TNE-SDS	10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 mM EDTA pH 8,0 100 mM NaCl 0,2 % (v/v) SDS
2 x TNE-SDS Blaumarker	20 mM Tris-HCl pH 8,0 2 mM EDTA pH 8,0 200 mM NaCl 0,4 % (v/v) SDS 0,1 % (w/v) Bromphenolblau 0,5 % (w/v) Dextranblau
TNF- α	100 U/ μ L Stocklösung 10 μ g (5×10^5 U) in 200 μ L DME- Basalmedium lösen und auf 5 mL mit DME- Basalmedium auffüllen. Lagerung bei -70°C in kleinen Portionen
10 x Towbin	0,25 M Tris 1,9 M Glyzin
1 x Towbin	25 mM Tris 0,19 M Glyzin 10 % (v/v) Methanol

5 x Western-Ladepuffer	10 % (v/v) SDS 300 mM Tris-HCl pH 6,8 12,5 % 2-Mercaptoethanol 5 mM EDTA pH 8,0 50 % (w/v) Glycerin zum Lösen auf 37°C erwärmen und in kleinen Portionen bei -20°C lagern
------------------------	---

2.1.13 Lösungen für die Zellkultur

DME-Kulturmedium	500 mL DME- Basalmedium 10 % (v/v) FKS 100 U/mL Penizillin 100 µg/mL Streptomycin
DME-Kulturmedium mit Puromycin	500 mL DME- Basalmedium 10 % (v/v) FKS 100 U/mL Penizillin 100 µg/mL Streptomycin 1,5 µg/mL Puromycin
Einfriermedium	10 % (v/v) DMSO 30 % (v/v) FKS 60 % (v/v) DME- Basalmedium Lagerung bei -20°C
Pifithrin- α	100 mM Stammlösung 10 mg in 272,3 µL DMSO lösen. Lagerung bei -20°C in kleinen Portionen.
Puromycin	10 mg/mL Stocklösung 10 mg in 10 mL sterilem H ₂ O Lösen. Lagerung bei -20°C in kleinen Portionen.
Trypanblau-Lösung	0,25 % (w/v) Trypanblau in PBS lösen und steril filtrieren

2.1.14 Zelllinien

A172	<i>Gewebe</i>	Glioblastom, human
	<i>Morphologie</i>	fibroblastenartig
	<i>Wachstumsmerkmal</i>	adhärent
	<i>p53-Status</i>	p53 positiv
	<i>Referenz</i>	Giard <i>et al.</i> , 1973

Saos-2	<i>Gewebe</i>	Osteosarkom, human
	<i>Morphologie</i>	epithelartig
	<i>Wachstumsmerkmal</i>	adhärent
	<i>p53-Status</i>	p53 negativ
	<i>Referenz</i>	Fogh und Orfeo, 1977

Saos-2-Tet-hp53 entstanden durch stabile Transfektion von Saos-2 Zellen mit tet-on System für humanes wtp53 (Ryan *et al.* 2000). Die Zellen wurden freundlicherweise von Karin Vousden, Glasgow, UK zur Verfügung gestellt.

Hep3B	<i>Gewebe</i>	hepatozelluläres Karzinom, human
	<i>Morphologie</i>	epithelartig
	<i>Wachstumsmerkmal</i>	adhärent
	<i>p53-Status</i>	p53 negativ
	<i>Referenz</i>	Knowles <i>et al.</i> ,1980

Temperatursensitives Zellsystem

4Bv entstanden durch stabile Transfektion von Hep3B Zellen mit murinem, temperatursensitivem p53val135 und einer Resistenz gegen Puromyzin. Die Zellen wurden freundlicherweise von Moshe Oren, Rehovot, Israel zur Verfügung gestellt (Friedman *et al.*, 1997).

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturtechniken

2.2.1.1 Auftauen von Zellen

In ein 15 mL-Zentrifugenröhrchen werden 8 mL vorgewärmtes DME-Kulturmedium vorgelegt (37°C). Die gefrorene Zellsuspension wird in der Hand rasch aufgetaut und nach Zugabe von 1 mL DME-Kulturmedium in das Zentrifugenröhrchen überführt. Durch Zentrifugation für 5 min bei 800 rpm und Raumtemperatur werden die Zellen von dem DMSO-haltigen Einfriermedium befreit und pelletiert. Der Überstand wird

verworfen, das Zellpellet in DME-Kulturmedium resuspendiert und in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt. Die Inkubation der Zellen erfolgt bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit über Nacht. Am nächsten Tag wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Kultivierung der 4Bv Zellen erfolgt ab diesem Zeitpunkt in DME-Kulturmedium mit Puromyzin.

2.2.1.2 Einfrieren von Zellen

Zur dauerhaften Lagerung werden Zellen bei -196°C über flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Für die Kryokonservierung werden die Zellen durch Trypsinierung vom Flaschenboden gelöst und die erhaltene Zellsuspension mit Einfriermedium auf einen Titer von 1×10^6 Zellen/mL eingestellt. Jeweils 1,0 mL dieser Zellsuspension wird in ein Kryoröhrchen überführt und 1 h auf Eis vorgekühlt, bevor es mit reichlich Zellstoff umwickelt zunächst über Nacht bei -70°C und dann über flüssigem Stickstoff gelagert wird.

2.2.1.3 Kultivierung von Zellen

Adhärent wachsende Zellen werden bei Erreichen der Konfluenz passagiert. Hierzu wird das Kulturmedium abgesaugt, der Zellrasen einmal mit 10 mL PBS gewaschen und je nach Flaschengröße mit 1-3 mL Trypsin/EDTA-Lösung bedeckt. Nach 3-5 min Inkubation im Brutschrank wird das Ablösen der Zellen mikroskopisch überprüft. Sind die Zellen vollständig abgelöst, wird die Reaktion durch Zugabe von DME-Kulturmedium gestoppt. Je nach Zelldichte und Teilungsrate werden die Zellen mit einer Split-Ratio von 1:5-1:12 ausgesät. Die ausgesäten Zellen werden in einem der Flaschengröße adäquaten Volumen (5-30 mL) DME-Kulturmedium versehen und resuspendiert. Die verwendeten stabilen Zelllinien werden im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.2.1.4 Aussaat von Zellen für Versuche

Zur Aussaat der Zellen für Versuche wird der Zellrasen zunächst einmal mit PBS gewaschen und die Zellen durch Zugabe von Trypsin/EDTA-Lösung, wie unter 2.2.1.3 beschrieben, vom Flaschenboden gelöst. Zur Bestimmung der Zellzahl sowie zur Unterscheidung lebender und toter Zellen, werden diese mit Trypanblau

angefärbt. Hierzu werden 50 µL Zellsuspension und 50 µL Trypanblaulösung vermischt und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit dieser Lösung wird eine Neubauer-Zählkammer vollständig befüllt und die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Die abgestorbenen Zellen erscheinen im Gegensatz zu den lebenden dunkelblau. Es werden 4 Großquadrate ausgezählt und die Zellen/mL nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellen} \cdot \text{ml}^{-1} = \frac{\text{Zellzahl}}{4} \cdot 2 \cdot 10^4$$

Je nach Versuchsplanung werden die Zellen nun in DME-Kulturmedium verdünnt und in verschiedenen Zellkulturgefäßen ausgesät. Die Zelldichte zum Zeitpunkt der Aussaat für die verwendeten Zelllinien kann aus der folgenden Tabelle entnommen werden:

Tabelle 2.2.1.4-1: Zelldichte [Zellen/cm²] der verschiedenen Zelllinien bei der Aussaat

Zelllinie	Zelldichte [Zellen/cm ²]
A172	1,3 x 10 ⁴ ; 5,3 x 10 ³ (Transfektion)
Saos-2	1,3 x 10 ⁴ ; 6,4 x 10 ³ (Transfektion)
4Bv	1,3 x 10 ⁴ ; 3,5 x 10 ⁴ (ChIP)

Für Versuche mit dem temperatursensitiven Zellsystem werden die 4Bv Zellen nach der Aussaat in DME-Kulturmedium (ohne Puromycin) zunächst über Nacht im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert, um den Zellen das Anhaften an die Oberfläche des Kulturgefäßes zu ermöglichen. Am nächsten Tag werden die Zellen nach einem Mediumwechsel für 3-12 h bei 32°C (permissive Temperatur), 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Hierdurch wird die temperaturabhängige Konformationsänderung von p53val135 erzielt. Die Zellen verbleiben während der Behandlung mit TNF-α (250 U/mL) bis zum Zeitpunkt der Ernte bei der permissiven Temperatur.

2.2.1.5 Behandlung der Zellen mit TNF-α

Am Tag nach der Aussaat der Zellen wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Anschließend werden die Zellen für unterschiedliche Inkubationszeiten mit 250 U/mL TNF-α behandelt.

2.2.1.6 Behandlung der Zellen mit Pifithrin- α

Am Tag nach der Zellaussaat wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Anschließend werden die Zellen für 3-5 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an Pifithrin- α in DME-Kulturmedium vorbehandelt. Abschließend erfolgt die Stimulation der Zellen mit TNF- α (250 U/mL) für verschiedene Inkubationszeiten ohne den Inhibitor von dem Zellrasen zu entfernen.

2.2.1.7 Transiente Transfektion von Zellen

2.2.1.7.1 Transiente Transfektion von Zellen mit Kalziumphosphat

Saos-2 Zellen werden mit Kalziumphosphat nach der Methode von Chen und Okayama transient transfiziert (Chen und Okayama, 1987). Hierbei nehmen die Zellen DNA in Form von Kalziumphosphat-DNA-Präzipitaten endozytotisch auf. Ein Teil der DNA gelangt in den Zellkern und wird dort transkribiert. Zur Transfektion von ca. 1×10^5 Zellen werden 6 μg DNA in 150 μL 300 mM CaCl_2 vorgelegt und anschließend mit 150 μL 2 x BBS vermischt. Der Transfektionsansatz wird für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor dieser tropfenweise auf die Zellen gegeben wird. Die Zellen werden über Nacht bei 35°C, 3 % CO_2 und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Am nächsten Tag wird der Zellrasen einmal mit DME-Basalmedium gewaschen, frisches Kulturmedium zugesetzt und die Zellen über Nacht unter Standardbedingungen weiter kultiviert. Am darauf folgenden Tag werden die Zellen, wie unter 2.2.1.5 beschrieben, mit TNF- α (250 U/mL) behandelt.

2.2.1.7.2 Transiente Transfektion von Zellen mit Effectene®

A172 Zellen werden mit dem Transfektionsreagenz Effectene® der Firma Qiagen nach Herstellerangaben transient transfiziert. Die Methode beruht darauf, dass in einem ersten Schritt die negativ geladene DNA durch die Interaktion mit dem positiv geladenen „Enhancer-Reagenz“ kondensiert und anschließend durch Ausbildung von Micellen von dem kationischen, nicht-liposomalen Lipids Effectene® umhüllt wird. Die Micellen können über Endozytose in die Zellen aufgenommen werden. Zur Transfektion von ca. $1,5 \times 10^5$ Zellen werden 1 μg DNA eingesetzt, bei 8 μL Enhancer- und 25 μL Effectene®-Reagenz. Die Zellen werden über Nacht mit dem Transfektionsansatz inkubiert. Am nächsten Tag wird das DME-Kulturmedium mit

dem Transfektionsansatz abgenommen, der Zellrasen mit DME-Basalmedium gewaschen und die Zellen für weitere 24 h unter Standardbedingungen weiter kultiviert. Anschließend erfolgt die TNF- α -Behandlung der Zellen (250 U/mL), wie unter 2.2.1.5 beschrieben.

2.2.2 Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren

2.2.2.1 Analytische und präparative Agarosegel-Elektrophorese

Zur Analyse oder Präparation von DNA-Fragmenten werden diese in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung von linearen, doppelsträngigen DNA-Fragmenten in einem elektrischen Feld beruht auf der Tatsache, dass die elektrophoretische Beweglichkeit der DNA antiproportional zum Logarithmus der Anzahl der Basenpaare ist (Sambrook *et al.*, 1989). Nach Zugabe von Ethidiumbromid, welches in G/C-Paare der DNA interkaliert, können DNA-Fragmente unter ultraviolettem (UV)-Licht aufgrund der Abgabe von Fluoreszenz sichtbar gemacht werden.

Der verwendete Agarosegehalt der Gele richtete sich nach der Größe der zu trennenden Fragmente und variierte zwischen 1 % (w/v) und 2 % (w/v). Die entsprechende Agarosemenge wird in 1 x TAE-Puffer bis zur Homogenität aufgekocht, nach dem Abkühlen auf 50-60 °C mit 0,75 μ g/mL Ethidiumbromid versetzt und in einem Gelschlitten mit Gelkamm gegossen. Die DNA-Proben werden mit 1/6 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt und zur Elektrophorese in die durch den Gelkamm geformten Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wird ein „1 kb“-Marker eingesetzt. Die angelegte Spannung während der Elektrophorese beträgt je nach der Größe des Gels 80-120 V. Die Banden werden anschließend zur Dokumentation im UV-Durchlicht bei 312 nm fotografiert.

2.2.2.2 Herstellung von spezifischen Gensonden für die Northern Blot Analyse

2.2.2.2.1 Schneiden von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen

Die Detektion spezifischer RNA in der Northern Blot Analyse erfordert die Herstellung von spezifischen DNA-Sonden. Diese DNA-Sonden werden mit Hilfe von bakteriellen Typ II-Restriktionsendonukleasen als Inserts aus den zugehörigen doppelsträngigen

Plasmiden ausgeschnitten. Für einen vollständigen Verdau werden 1 µg DNA in einem Ansatz von 10 µL Gesamtvolumen eingesetzt. Die in H₂O_{bidest.} gelöste DNA wird mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease und dem dazugehörigen Reaktionspuffer versetzt. Der Restriktionsansatz wird 1-3 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Die Berechnung der notwendigen Enzymmenge erfolgt in der Regel nach der Formel: 1 U spaltet 1 µg DNA pro Stunde. Die Reaktion wird mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese (2.2.2.1) überprüft und das Insert, wie unten beschrieben, aus dem Agarosegel eluiert.

2.2.2.2 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung der DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des „QIAquick® Gel Extraction Kits“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der selektiven und quantitativen Adsorption von DNA an Silicagel-Membranen unter Hochsalzbedingungen und einem schwach sauren pH (Vogelstein *et al.*, 1979). Die DNA bleibt während des Waschvorgangs auf der Silicagel-Säule gebunden und kann am Ende der Aufreinigung spezifisch abgelöst werden. Das gewünschte DNA-Fragment wird unter UV-Licht (312 nm) mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Pro 100 mg Gelgewicht werden 100 µL QG-Puffer zugegeben, und der Ansatz für 10 min bei 50°C inkubiert, wobei die Lösung alle 2 min gevortext wird. Die hohe Konzentration an chaotrophen Salz in dem QG-Puffer schwächt die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Zuckern im Agarosepolymer und erlaubt somit ein Auflösen des Gels. Um die DNA von der Agarose zu trennen, wird die Lösung auf eine QIAquick®- Säule gegeben und die DNA durch Zentrifugation (10000 rpm, 1 min, RT) an die Silicagel-Membran gebunden. Die DNA wird durch aufeinander folgende Waschschriffe mit je zweimal 750 µL PE-Puffer und Zentrifugation (10000 rpm, 1 min, RT) aufgereinigt. Um die gebundene DNA von der Silicagel-Membran zu eluieren werden 30 µL H₂O auf die Säule gegeben und diese anschließend 1 min bei 10000 rpm und RT zentrifugiert.

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der wässrigen Nukleinsäure-Lösungen wird spektralphotometrisch bestimmt, wobei die Absorption bei Wellenlängen von 260 und 280 nm gegen einen Blindwert von H₂O_{bidest.} oder DEPC-H₂O (bei RNA) in einer Quarzküvette gemessen

wird. Aus den erhaltenen Absorptionswerten wird die Konzentration der Nukleinsäure berechnet und ihre Reinheit abgeschätzt. Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine bei 280 nm. Bei einem Quotienten E_{260} / E_{280} von 1,8–2,0 beträgt die Reinheit der DNA 70-95 %.

Es gelten folgende Richtwerte:

DNA (doppelsträngig):	$OD_{260\text{ nm}} = 1,0$ entspricht etwa 50 $\mu\text{g DNA/mL}$
DNA (einzelnsträngig):	$OD_{260\text{ nm}} = 1,0$ entspricht etwa 40 $\mu\text{g DNA/mL}$
DNA (Oligonukleotide):	$OD_{260\text{ nm}} = 1,0$ entspricht etwa 20 $\mu\text{g DNA/mL}$
RNA (doppelsträngig) (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	$OD_{260\text{ nm}} = 1,0$ entspricht etwa 33 $\mu\text{g DNA/mL}$

2.2.2.4 RNA Isolierung mit dem RNeasy[®]-Kit der Firma Qiagen

Die Isolierung der RNA erfolgt mit Hilfe des RNeasy[®]-Kits der Firma Qiagen. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der selektiven und quantitativen Adsorption von RNA an Silicagel-Membranen unter Hochsalzbedingungen. Die RNA bleibt während des Waschvorgangs auf der Silicagel-Säule gebunden und kann am Ende der Aufreinigung spezifisch eluiert werden. Die Zellyse wird in einem Puffer, der Guanidin-Isothiocyanat enthält, durchgeführt. Guanidin-Isothiocyanat besitzt denaturierende Eigenschaften, wodurch RNasen rasch inaktiviert werden und die Isolierung von intakter RNA ermöglicht wird. In einem ersten Schritt werden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in RLT-Puffer (+ 10 $\mu\text{L/mL}$ 2-Mercaptoethanol) lysiert. Mit Hilfe einer Spritze mit Kanüle wird das Zelllysate mechanisch homogenisiert und die Viskosität herabgesetzt sowie genomische DNA geschert. Um Bedingungen zu erzeugen unter denen RNA selektiv an die Silicagel-Membran gebunden wird, werden dem Zelllysate 70 %-iges (v/v) Ethanol in DEPC-H₂O zugesetzt. Das Zelllysate wird auf RNeasy[®]-Säule aufgebracht und durch Zentrifugation bei 10 000 rpm für 1 min bei RT die RNA an die Silicagel-Membran gebunden. Kontaminationen werden durch aufeinander folgende Wasch- und Zentrifugationsschritte (10000 rpm, 1 min, RT) mit einmal 700 μL RW1-Puffer und zweimal mit 500 μL RPE-Puffer beseitigt. Die aufgereinigte RNA wird durch Zugabe von 50 μL RNase-freien H₂O von der Silicagel-Membran eluiert.

2.2.2.5 Northern Blot Analyse

Das Verfahren ermöglicht den spezifischen Nachweis von einzelnen, auf einer Membran fixierten RNA. Radioaktiv markierte DNA-Einzelstrangsonden hybridisieren mit ihrer komplementären Sequenz auf der Membran. Die Detektion der spezifischen Signale erfolgt mittels Autoradiographie.

2.2.2.5.1 Gelelektrophorese und Transfer von RNA (Sambroock *et al.*, 1989)

Elektrophoresekammer, Gelschlitten und Kamm werden für 20 min mit 5 M NaOH inkubiert um möglichen Kontaminationen mit RNasen zu vermeiden. Ein 1 %-iges (w/v) Agarosegel wird mit DEPC-H₂O in 1 x MOPS-Puffer, wie unter 2.2.2.1 beschrieben, hergestellt. Die RNA-Proben werden mit 1/6 Volumen RNA-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 65°C inkubiert, anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt und zur Elektrophorese in die, durch den Gelkamm geformten, Geltaschen pipettiert. Die angelegte Spannung während der Elektrophorese beträgt 75 V für 2,5 h. Das Gel wird anschließend zur Dokumentation im UV-Durchlicht bei 312 nm fotografiert und die ribosomalen Banden durch Einschneiden markiert. Zur Vorbereitung des Agarosegels auf den Transfer wird dieses, ebenso wie die zugehörige Nylonmembran, für 15 min in 20 x SSC-Puffer inkubiert. Der Blotaufbau verläuft nach folgendem Schema: auf ca. 80 Blatt Einmalpapiertücher werden luftblasenfrei zwei trockene 3 MM Whatman®-Papiere, zwei mit 20 x SSC-Puffer getränkte 3 MM Whatman®-Papiere, die Nylonmembran und abschließend das Agarosegel gelegt.

Glasplatte
Agarosegel
Membran
2 x 3 MM-Papier (20 x SSC)
2 x 3 MM-Papier (trocken)
80 x Einmalhandtücher

Abbildung: 2.2.2.5.1-1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Northern Blots

Der Blotaufbau wird vollständig mit Frischhaltefolie umwickelt, um ein Austrocknen während des Transferprozesses zu verhindern. Der Transfer erfolgt dann unter dem Druck eines auf einer Glasplatte befindlichen Gewichts über Nacht. Nach Abschluss des Transfers werden die ribosomalen Banden auf der Membran eingezeichnet und für 5 min in 2 x SSC inkubiert. Abschließend wird die Nylonmembran auf einem 3 MM Whatman[®]-Papier getrocknet. Die Lagerung erfolgt bei 4°C.

2.2.2.5.2 Hybridisierung

Die radioaktive Markierung der einzusetzenden DNA-Sonde erfolgt mit Hilfe des HexaLabel Plus[™] DNA Labeling Kits der Firma MBI Fermentas. Das Prinzip dieses Kits beruht auf einem so genannten „random priming“ von Hexanukleotid-Primern an ein linearisiertes, denaturiertes DNA-Fragment. Der komplementäre Strang wird, beginnend vom 3'-Ende des Hexanukleotid-Primers, unter Verwendung der großen Untereinheit der DNA Polymerase I (Klenow-Fragment), synthetisiert. In die Markierungsreaktion werden 75 ng DNA in 10 x Hexanukleotidpuffer mit dem entsprechenden Nukleotiden (dATP, dGTP, dTTP), 25 µCi α -³²P-dCTP und 5 U Klenow-Fragment eingesetzt. Der Ansatz wird für 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend mit 4 µL dNTP- Mix (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) versetzt und weitere 5 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 1 x TNE-Puffer wird die Reaktion gestoppt. Nicht eingebaute Nukleotide werden durch Filtration mit Hilfe einer Biogel-Säule entfernt.

a) Standard-Hybridisierung (Feinberg und Vogelstein, 1983)

Die radioaktiv markierte DNA-Sonde wird für 10 min bei 99°C aufgekocht und anschließend für 5 min auf Eis abgekühlt. Dieser Ansatz wird nun zu der seit 2,5 h bei 42°C in Hybridisierungspuffer prähybridisierenden Nylon-Membran (0,1 mL/cm²) gegeben. Unspezifische Bindungen der DNA-Sonde an die Nylon-Membran werden durch Absättigung dieser mit tRNA aus dem Hybridisierungspuffer während der Prähybridisierung unterbunden. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht. Am darauf folgenden Tag wird die Nylon-Membran mehrmals mit Waschpuffer bei 68°C gewaschen, um unspezifisch gebundene DNA von der Nylon-Membran zu entfernen. Dieser Waschvorgang wird durch Messen des radioaktiven Signals zwischen den einzelnen Waschschrritten verfolgt.

b) Hybridisierung nach Church und Gilbert

Durch Hybridisierung nach Church und Gilbert (Church und Gilbert, 1984) kann ein geringeres Hintergrundsignal erreicht werden, als durch die Standard-Hybridisierung erzielt wird. Daher eignet sich dieses Verfahren insbesondere für die Detektion von intensitätsschwachen Signalen. Die radioaktiv markierte DNA-Sonde wird für 10 min bei 99°C aufgekocht und anschließend für 5 min auf Eis abgekühlt. Dieser Ansatz wird nun zu der seit 2,5 h bei 42°C in CHURCH I-Puffer prähybridisierenden Nylon-Membran (0,1 mL/cm²) gegeben. Unspezifische Bindungen der DNA-Sonde an die Nylon-Membran werden durch Absättigung dieser mit BSA aus dem CHURCH I-Puffer während der Prähybridisierung unterbunden. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht. Am darauf folgenden Tag wird die Nylon-Membran einmal mit CHURCH II-Puffer und zweimal mit CHURCH III-Puffer bei 65°C gewaschen um unspezifisch gebundene DNA von der Nylon-Membran zu entfernen. Dieser Waschvorgang wird durch Messen des radioaktiven Signals zwischen den einzelnen Waschschrritten verfolgt.

2.2.2.5.3 Autoradiographie

Die Autoradiographie ermöglicht es, das radioaktive Signal auf der Nylon-Membran sichtbar zu machen. Röntgenfilme bestehen aus AgBr-Kristallen, welche durch Exposition gegenüber radioaktiver Strahlung in einen „aktivierten“ Zustand versetzt werden. Durch Entwickeln des Films werden diese aktivierten Kristalle anschließend zu metallischem Silber reduziert. Die Autoradiographie erfolgt zwischen 12 h und 1 Woche je nach Intensität des Signals bei -70°C unter Verwendung von Verstärkerfolien.

2.2.2.6 Reverse Transkription von RNA (RT-PCR)

Die RT-PCR wird zur Untersuchung von schwach exprimierten RNA-Transkripten, die nicht durch Northern Blot Analyse nachgewiesen werden können, verwendet. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, mit Hilfe des viralen Enzyms Reverse Transkriptase (RT), die RNA in cDNA zu transkribieren. Die cDNA wird dann mittels spezifischer Primer in einer PCR (2.2.2.7) amplifiziert und in einem Agarosegel analysiert. In der Regel werden Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer für die RT-Reaktion verwendet die die Transkription aller in der Zelle zum Zeitpunkt der Ernte, befindlichen mRNAs

ermöglichen. In einer RT-Reaktion werden 2 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 20 µL eingesetzt. In einem ersten Schritt wird die RNA mit 500 ng Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primern vermischt und der Ansatz durch Erhitzen auf 70°C für 10 min und anschließender Inkubation of Eis denaturiert. Durch das Auflösen möglicher Sekundärstrukturen wird so eine Anlagerung der Primer an die Poly-A-Abschnitte der RNA erleichtert. Der Reaktionsansatz wird mit 4 µL 5 x Erststrangpuffer, 0,5 µL RNasin (40 U/µL), 2 µL DTT (0,1 M) und 0,4 µL dNTPs (25 mM) versetzt und für 2 min auf 42°C erhitzt. Die Reaktion wird durch die Zugabe der Reversen Transkriptase zum Reaktionsansatz gestartet. Nach einer einstündigen Inkubation bei 42°C wird durch Erhitzen auf 70°C für 15 min die Reverse Transkriptase denaturiert und dadurch die RT-Reaktion beendet. Durch Zugabe von 0,4 µl RNaseH und anschließender Inkubation für 20 min bei 37°C wird nicht-transkribierte RNA zerstört. Eine Lagerung der Ansätze erfolgt bei -20°C.

2.2.2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wird zur Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendet, die zwischen bekannten doppelsträngigen Sequenzbereichen liegen (Saiki *et al.*, 1988). Mittels der bekannten Sequenzinformation können zwei Oligonukleotide (Primer) synthetisiert werden, von denen der eine komplementär zum kodierenden Strang, der andere komplementär zum nicht-kodierenden Strang ist. Nach Denaturierung der Matrizen-DNA und Anlagerung der Primer an die DNA synthetisiert die Taq-Polymerase die komplementären Gegenstränge ausgehend von den 3'-Enden der Primer. Dann wird der synthetisierte DNA-Doppelstrang erneut denaturiert, so dass eine Anlagerung der Primer an weitere DNA-Fragmente ermöglicht wird. Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgt exponentiell. Das Standard-Volumen eines PCR-Ansatzes beträgt 50 µL. Die Zusammensetzung des Ansatzes ist abhängig von den eingesetzten Primern. Des Weiteren variieren die Polymerisationszeit, sowie die Anlagerungstemperatur je nach Größe des zu amplifizierenden Fragments und der Homologie der Primer.

MCP-1:

PCR-Ansatz:

1,0 µL	DNA
39,5 µL	H ₂ O _{bidest.}
0,8 µL	dNTPs (25 mM)
1,5 µL	MgCl ₂ (50 mM)
5,0 µL	10 x PCR-Puffer
1,0 µL	Forward-Primer (20 µM)
1,0 µL	Reverse-Primer (20 µM)
0,2 µL	Taq-Polymerase (5 U/µL)

PCR-Protokoll:

94 °C	3 min	} 35 Zyklen
94 °C	30 sec	
66 °C	30 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	10 min	

GAPDH:

PCR-Ansatz:

1,0 µL	DNA
39,5 µL	H ₂ O _{bidest.}
0,8 µL	dNTPs (25 mM)
1,5 µL	MgCl ₂ (50 mM)
5,0 µL	10 x PCR-Puffer
1,0 µL	Forward-Primer (20 µM)
1,0 µL	Reverse-Primer (20 µM)
0,2 µL	Taq-Polymerase (5 U/µL)

PCR-Protokoll:

94 °C	4 min	} 35 Zyklen
94 °C	30 sec	
65 °C	45 sec	
72 °C	30 sec	
72 °C	10 min	

MCP-1(295 bp):

PCR-Ansatz:

2,0 µL	DNA
38,5 µL	H ₂ O _{bidest.}
0,8 µL	dNTPs (25 mM)
1,5 µL	MgCl ₂ (50 mM)
5,0 µL	10 x PCR-Puffer
1,0 µL	Forward-Primer (20 µM)
1,0 µL	Reverse-Primer (20 µM)
0,2 µL	Taq-Polymerase (5 U/µL)

PCR-Protokoll:

94 °C	4 min	} 35 Zyklen
94 °C	45 sec	
66 °C	45 sec	
72 °C	1,15 sec	
72 °C	5 min	

MCP-1 nested-PCR:

PCR-Ansatz:

2,0 µL	DNA
37,5 µL	H ₂ O _{bidest.}
0,8 µL	dNTPs (25 mM)
1,5 µL	MgCl ₂ (50 mM)
5,0 µL	10 x PCR-Puffer
0,5 µL	Forward-Primer (20 µM)
0,5 µL	Reverse-Primer (20 µM)
0,2 µL	Taq-Polymerase (5 U/µL)

PCR-Protokoll:

94 °C	4 min	} 35 Zyklen
94 °C	45 sec	
64 °C	45 sec	
72 °C	50 sec	
72 °C	5 min	

p21-ChIP:

PCR-Ansatz:

2,0 µL	DNA
37,5 µL	H ₂ O _{bidest.}
0,8 µL	dNTPs (25 mM)
2,5 µL	MgCl ₂ (50 mM)
5,0 µL	10 x PCR-Puffer
1,0 µL	Forward-Primer (20 µM)
1,0 µL	Reverse-Primer (20 µM)
0,2 µL	Taq-Polymerase (5 U/µL)

PCR-Protokoll:

94 °C	4 min	} 35 Zyklen
94 °C	45 sec	
66 °C	45 sec	
72 °C	50 sec	
72 °C	5 min	

Die PCR-Reaktion werden in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) durchgeführt. Das erhaltene PCR-Fragment wird gelelektrophoretisch, wie unter 2.2.2.1 beschrieben, aufgetrennt.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Zellextrakten

2.2.3.1.1 RIPA-Extrakte (Helenius *et al.*, 1979)

Zur Proteinextraktion wird das Kulturmedium von dem Zellrasen (ca. 1×10^6 Zellen) entfernt und die Zellen anschließend einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 500 μ L RIPA-Puffer auf die Zellen, werden diese für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend mit einem Zellschaber abgelöst. Um die Zellmembranen zu zerstören und die DNA zu scheren, werden die Lysate ultraschallbehandelt (50 %-iger Arbeitspuls bei Leistungsstufe 3). Die Zellysate werden für 30 min bei 4°C inkubiert. Abschließend erfolgt eine Zentrifugation (13000 rpm, 5 min, 4°C), durch die Zelltrümmer aus den Proteinextrakten entfernt werden. Die Proteinkonzentrationsbestimmung wird, wie unter 2.2.3.2.1 beschrieben, durchgeführt. Die RIPA-Extrakte werden bei –70°C gelagert.

2.2.3.1.2 SDS-Extrakte (Laemmli, 1970)

Zur Herstellung von SDS-Extrakten wird das Kulturmedium von dem Zellrasen (ca. 1×10^6 Zellen) entfernt und die Zellen anschließend zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 500 μ L PBS auf die Zellen werden diese mit einem Zellschaber vom Kulturgefäß abgelöst und zentrifugiert (13000 rpm, 30 s, 4°C). Der Überstand wird vollständig abgenommen. Das Zellpellet wird in 500 μ L SDS-Proben-Puffer resuspendiert. Um die Zellmembranen zu zerstören und die DNA zu scheren, wird die Zellsuspension ultraschallbehandelt (50 %-iger Arbeitspuls bei Leistungsstufe 3). Da der SDS-Proben-Puffer ohne Zusatz von Protease-Inhibitoren verwendet wird, werden die Zellysate für 5 min bei 99°C inkubiert, um Proteasen durch Denaturierung zu deaktivieren. Abschließend erfolgt eine Zentrifugation (13000 rpm, 5 min, 4°C) durch die Zelltrümmer aus den Proteinextrakten entfernt werden. Für die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry (2.2.3.2.2) werden 30 μ L des SDS-Extraktes aliquotiert. Der Rest des SDS-Extraktes wird wie mit 22 μ L 2-Mercaptoethanol versetzt und bei –70°C gelagert.

2.2.3.2 Konzentrationsbestimmung der Proteine

2.2.3.2.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von RIPA-Proteinextrakten wird nach Bradford unter Verwendung des gleichnamigen Reagenz der Firma BioRad durchgeführt (Bradford, 1976). Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 an in einer Lösung enthaltene Proteine bindet. Es entstehen Farbkomplexe, die bei ihrem Absorptionsmaximum von 595 nm vermessen werden können. Zur Konzentrationsbestimmung werden 1–4 µL RIPA-Proteinextrakte mit 800 µL H₂O_{bidest.} aufgefüllt und mit 200 µL Bradford-Reagenz versetzt. Nach 2-minütiger Inkubation bei RT können die Absorptionen bei der Wellenlänge 595 nm am Spektralphotometer gemessen werden. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgt anhand einer Eichgeraden mit bovinem Serumalbumin (BSA) als Standard.

2.2.3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten nach Lowry

Die Konzentrationsbestimmung von SDS-Proteinextrakten erfolgt mit dem DC Protein Assay der Firma BioRad. Diese Methode beruht auf einer Folin-Reaktion nach Lowry (Lowry, 1951). Dabei reagieren die Proteine hauptsächlich über ihre Tyrosin- und Tryptophanreste im alkalischen Medium mit Kupfertartrat. Das Folin-Reagenz wird von dem Protein-Kupfer-Komplex reduziert, wobei charakteristische blaue Produkte mit einem Absorptionsmaximum bei 750 nm entstehen. Es wurden jeweils 10 µL der Proteinextrakte mit H₂O_{bidest.} in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß auf 200 µL aufgefüllt und mit 100 µL Reagenz A' (1 mL Reagenz A + 20 µL Reagenz S) versetzt. Die Farbreaktion wird durch Zugabe von 800 µL Reagenz B und Mischen auf dem Vortexer gestartet. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT kann die Farbentwicklung am Spektralphotometer bei 750 nm gemessen werden. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgt anhand einer Eichkurve mit bovinem Serumalbumin (BSA) als Standard.

2.2.3.3 Diskontinuierliche Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine durch Gelelektrophorese erfolgt nach einer modifizierten Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Bei dieser denaturierenden

Gelelektrophorese werden die aufgetragenen Proteine annähernd nach ihrer Größe aufgetrennt. Um die Sekundär- und Tertiärstrukturen zu zerstören, werden die Proteine vor dem Auftragen durch 2-Mercaptoethanol reduziert und mit Hilfe von SDS als Detergenz denaturiert. Um die optimale Auftrennung der unterschiedlichen Proteine zu ermöglichen, werden für das Trenngel verschiedene Konzentrationen von Acrylamid/Bisacrylamid gewählt. Bei großen Proteinen wird ein 10 %-iges Trenngel, bei kleineren Proteinen ein 12 %-iges Trenngel verwendet. Die Trenngellösung wird gemischt und nach der Induktion der Polymerisation mit Ammoniumperoxidisulfat (APS) und *N,N,N',N'*-Tetramethylethyldiamin (TEMED) zwischen zwei durch Abstandshalter getrennte Glasplatten gegossen. Das noch flüssige Trenngel wird mit Isopropanol überschichtet, um Luftblasen zu entfernen und eine Polymerisation unter Ausschluss von Sauerstoff zu gewährleisten. Nach der Aushärtung des Trenngels wird das Isopropanol entfernt, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm in das Sammelgel eingeführt. Nach dem Aushärten des Sammelgels wird der Kamm gezogen. Die Proteinproben werden mit 5 x Western-Ladepuffer versetzt, vor dem Auftragen auf das Sammelgel für 5 min zur Denaturierung bei 99°C erhitzt und anschließend einige Minuten auf Eis abgekühlt. Die Auftrennung erfolgte je nach Proteingröße 1-3 h bei 25-50 mA in 1 x Laemmli-Puffer bei Raumtemperatur. Zur Größenabschätzung der aufgetrennten Proteine werden 10 µL BenchMark™ Pre-Stained Protein-Leiter der Firma Invitrogen aufgetragen.

2.2.3.4 Western Blot Analyse

2.2.3.4.1 Transfer der Proteine auf eine Membran

Zur immunologischen Analyse werden die in einer diskontinuierlichen SDS-PAGE (2.2.3.3) aufgetrennten Proteine von einem Polyacrylamidgel auf eine Polyvinyliden-Fluorid- (PVDF) Membran übertragen („geblottet“). Hierbei wird das Halbtrockenblot-Verfahren nach Kyhse-Andersen (1984) angewandt. Für den Transfer wird die PVDF-Membran (0,45 µm, Immobilon™-P, Millipore) auf die Größe des Gels zugeschnitten, für 1 min in Methanol, 2 min in H₂O_{bidest.} und mindestens 5 min in 1 x Towbin-Puffer getränkt. Das zugeschnittene 3 MM Whatman® Papier wird ebenfalls in Towbin-Puffer inkubiert. Die Komponenten des Blots werden auf der

Anode des "semi-dry-Elektroblotters" der Firma Amersham Pharmacia wie folgt aufgebaut:

Kathode
9 x 3 MM-Papier
Polyacrylamidgel
Membran
9 x 3 MM-Papier
Anode

Abbildung 2.2.3.4-1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines „semi-dry“-Western Blots

Der Transfer erfolgt für 70 min bei 4°C. Die angelegte Stromstärke in mA wird aus der Membrangröße berechnet: Membranhöhe x Membranbreite x Stromstärke pro cm². Die Stromstärke pro cm² beträgt 1,2 mA.

2.2.3.4.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Nach erfolgtem Transfer der Proteine auf die Membran, wird die Membran zur Absättigung freier Bindungskapazitäten für mindestens 1 h in 5 %-igem Magermilchpulver/TBS-T (0,1 % Tween 20) bei RT oder über Nacht bei 4°C geblockt. Für den immunologischen Nachweis von bestimmten Proteinen wird ein spezifischer Erstantikörper über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Dabei wird der Antikörper nach den Herstellerangaben in 5 %-igem Magermilchpulver/TBS-T oder in 5 %-igem BSA/TBS-T verdünnt. Um die Membran von nicht gebundenem Erstantikörper zu befreien, wird diese 3 x 8 min mit TBS-T gewaschen. Es folgt die Inkubation mit einem in 5 %-igem Magermilchpulver/TBS-T verdünnten Meerrettich-Peroxidase- (HRP) gekoppelten Zweitantikörper für 1 h bei RT. Durch dreimaliges Waschen in TBS-T für je 8 min wird ungebundener bzw. unspezifisch gebundener Zweitantikörper entfernt. Durch die Chemilumineszenz-Reaktion (Western Lightning™, Perkin Elmer) lassen sich die membrangebundenen Proteine über ihre Erst- und Zweitantikörper auf einem geeigneten Autoradiographie-Film (Hyperfilm ECL, Amersham) nachweisen.

2.2.3.4.3 Entfernen von Antikörpern von einer Membran durch Strippen

Um nach erfolgter Detektion eines spezifischen Proteins die Präsenz eines zweiten Proteins nachzuweisen, kann die Membran von bereits gebundenen Antikörpern befreit („gestrippt“) werden, ohne die Epitope der Proteine zu verändern. Eine schon

getrocknete Membran wird vor dem Strippen erneut durch Methanol für 5 min bei RT äquilibriert und für 5 min mit H₂O_{bidest.} gewaschen. Anschließend wird die Membran der nachfolgenden Behandlung unterzogen:

5 min	TBS
5 min	H ₂ O _{bidest.}
5 min	0,2 M NaOH
5 min	H ₂ O _{bidest.}
5 min	TBS

Der Blot wird erneut mit 5%-igem Magermilchpulver/TBS-T geblockt und wie in 2.2.3.4.2 beschrieben mit Antikörpern behandelt. Für langfristige Lagerung bei 4°C wird die Membran zuvor getrocknet.

2.2.4 DNA-Bindungsstudien

Der Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) stellt die Standardmethode zur Identifizierung und Charakterisierung von Protein-DNA-Komplexen *in vitro* da. Hierzu wird ein radioaktiv markiertes Oligonukleotid mit dem zu analysierenden Protein inkubiert und die entstandenen Komplexe in einem nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Neben dem Signal des nicht komplexierten Oligonukleotids tritt bei der Ausbildung eines Protein-DNA-Komplexes eine zusätzliche Bande mit verändertem Laufverhalten auf („shift“). Um die Identität des an die DNA gebunden Proteins zu überprüfen, kann die Analyse in Gegenwart eines gegen das Protein gerichteten Antikörpers durchgeführt werden. Tritt hierbei eine zusätzliche Bande mit verzögertem Laufverhalten auf („supershift“), lässt sich das Protein spezifisch nachweisen.

2.2.4.1 p53-EMSA

Die p53-DNA-Bindungsstudien wurden in Zusammenarbeit mit Lisa Wiesmüller, Universität Ulm durchgeführt.

2.2.4.1.1 Herstellung von radioaktiv-markierten Substraten für p53-DNA-Bindungsstudien

Die radioaktive Markierung einzelsträngiger DNA erfolgt mit Hilfe von [γ - 32 P]-dATP. Dabei wird in einer durch das Enzym T₄-Polynukleotid-Kinase katalysierte Reaktion die γ -Phosphatgruppe des [γ - 32 P]-dATP auf die 5'-terminale Hydroxylgruppe des Oligonukleotids übertragen. Hierfür wird in einem Reaktionsansatz mit 40 μ L Gesamtvolumen 40 pmol des Oligonukleotids in 10 x Polynukleotid-Kinase-Puffer mit 20 U T₄-Polynukleotid-Kinase und 30 μ Ci [γ - 32 P]-dATP für 45 min bei 37°C inkubiert. Durch Erhitzen für 10 min bei 68°C wird die Reaktion durch Deaktivierung der Kinase beendet. Das nun radioaktiv markierte, einzelsträngige Oligonukleotid wird durch eine Ethanol-Fällung von freien Nukleotiden befreit und im äquimolaren Verhältnis mit seinem komplementären Strang in 25 μ L Hybridisierungspuffer hybridisiert. Dazu wird die Lösung für 10 min auf 60°C erhitzt und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Das hergestellte Substrat wird, wie unter 2.2.4.1.2 beschrieben, durch Diffusionselution aus einem 8 %-igem (w/v) nativem TBE-Polyacrylamidgel von Verunreinigungen getrennt.

2.2.4.1.2 Diffusionselution von Oligonukleotiden aus Polyacrylamidgelen

Durch Auftragen des radioaktiv markierten DNA-Substrates auf ein 8 %-iges (w/v) TBE-Polyacrylamidgel und anschließender einstündiger Elektrophorese bei 150 V wird dieses von überschüssigem [γ - 32 P]-dATP und einzelsträngiger DNA getrennt. Das DNA-Substrat wird durch Autoradiographie detektiert, die entsprechende Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 2 mL-Reaktionsgefäß überführt. Das Gelstück wird zerkleinert und nach Zugabe von 400 μ L Elutionspuffer über Nacht bei 4°C geschüttelt. Anschließend wird die Lösung bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das eluierte DNA-Substrat wird mit Ethanol gefällt und in 50 μ L Elutionspuffer aufgenommen.

2.2.4.1.3 p53-EMSA

In den durchgeführten p53-DNA-Bindungsstudien wird humanes wtp53, welches in High FiveTM Insekten Zellen exprimiert und aus diesen nach Dudenhöffer (Dudenhöffer *et al.*, 1998, 1999) isoliert wurde, eingesetzt. In einem 0,5 mL-Reaktionsgefäß werden 60 ng rekombinantes p53-Protein mit 20 nM tRNA in 25 mM

Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM EDTA, 1 mM DTT und 6 % (v/v) Glycerin für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden 20000 rpm des markierten Oligonukleotids zugefügt und für weitere 25 min inkubiert. Für „super-shift“-Analysen wird dem Reaktionsansatz der entsprechende Antikörper vor Zugabe des markierten Oligonukleotids zugesetzt und mit diesem für 30 min bei 4°C präinkubiert. Die Proben werden auf ein natives 4 %-iges (w/v) Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 150 V für 2,5 h in 1 x TAE-Puffer. Anschließend wird das Gel auf einem 3 MM Whatman® Papier unter Vakuum bei 80°C getrocknet und die retardierten Protein-DNA-Komplexe mittels Autoradiographie detektiert.

2.2.4.2 AP-1- und NF- κ B-EMSA

2.2.4.2.1 Gewinnung der zellulären Kernextrakte für AP-1 und NF- κ B-DNA-Bindungsstudien nach Schreiber

Die zellulären Kernextrakte werden nach Schreiber (Schreiber *et al.*, 1989) aus ca. 2.5×10^6 Zellen durch Kern-Zytoplasmentrennung isoliert. Die Zellen schwellen auf Grund der Zugabe eines hypotonischen Puffers an und die Zellmembran wird durch Zugabe eines milden Detergenz zerstört. In einem ersten Schritt wird zunächst der Zellrasen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und die Zellen in 1,2 mL hypotonischem Puffer A abgeschabt. Die Zellsuspension wird für 10 min bei 4°C inkubiert. Durch die anschließende Zugabe des nicht-ionischen Detergenz NP-40 (75 μ L) wird die Zellmembran zerstört. Die Trennung der zytoplasmatischen von der kernhaltigen Fraktion erfolgt durch Zentrifugation (14000 rpm, 1 min, 4°C). Der Überstand enthält die zytoplasmatischen Proteine, die in kleinen Portionen bei -70°C gelagert werden. Aus dem Pellet können nun die Kernproteine isoliert werden. Hierfür wird das Pellet in 150 μ L Puffer C resuspendiert. Die erhaltene Suspension wird alle 2 min gevortext und nach weiteren 15 min erneut für 5 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird verworfen und die zellulären Kernextrakte werden in kleinen Portionen bei -70°C aufbewahrt.

2.2.4.2.2 Herstellung von radioaktiv-markierten Substraten für AP-1- und NF- κ B-DNA-Bindungsstudien

In ein 0,5 mL-Reaktionsgefäß werden zur jeweils 2 μ g des „sense“ und des „anti-sense“ Oligonukleotids in TNE-Puffer für 10 min bei 85°C in einem Wasserbad

inkubiert. Anschließend wird der Reaktionsansatz im Wasserbad langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die radioaktive Markierung des hybridisierten Oligonukleotids erfolgt enzymatisch mittels T₄-Polynukleotid-Kinase und unter Verwendung von [γ -³²P]-dATP (2.2.4.1.1). Hierfür wird in einem Reaktionsansatz mit 10 μ L Gesamtvolumen 200 pmol des Oligonukleotids in 10 x Polynukleotid-Kinase-Puffer mit 5 U T₄-Polynukleotid-Kinase und 40 μ Ci [γ -³²P]-dATP für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 5 μ L 6 x DNA-Ladepuffer wird die Markierungsreaktion beendet. Das hergestellte Substrat wird, wie unter 2.2.4.1.2 beschrieben, durch Diffusionselution aus einem 15 %-igem (w/v) nativem TBE-Polyacrylamidgel von einzelsträngiger DNA getrennt.

2.2.4.2.3 AP-1- und NF- κ B-EMSA

In den durchgeführten AP-1- und NF- κ B-DNA-Bindungsstudien werden jeweils 5 μ g zelluläre Kernextrakte, welche, wie unter 2.2.4.2.1 beschrieben, aus den Zellen nach Schreiber (Schreiber *et al.*, 1989) isoliert wurden, eingesetzt. In einem 0,5 ml-Reaktionsgefäß werden die Kernextrakte mit 2 μ g Poly(dI-dC) in 5 x EMSA-Bindepuffer für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 10000 rpm des markierten Oligonukleotids zugefügt und für weitere 30 min inkubiert. Für „super-shift“-Analysen wird dem Reaktionsansatz der entsprechende Antikörper vor Zugabe des markierten Oligonukleotids zugesetzt und mit diesem für 60 min bei 4°C präinkubiert. Die Proben werden auf ein natives 5,5 %-iges (w/v) TBE-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 280 V für 2,5 h in 0,3 x TBE-Puffer bei 4°C. Anschließend wird das Gel auf einem 3 MM Whatman® Papier unter Vakuum bei 80°C getrocknet und die retardierten Protein-DNA-Komplexe mittels Autoradiographie detektiert.

2.2.5 Chromatin-Immunopräzipitations- (ChIP) Assay

Die Chromatin-Immunopräzipitations- (ChIP) Assays werden mit Hilfe des Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit der Firma upstate durchgeführt. Der Chromatin-Immunopräzipitations- (ChIP) Assay stellt eine Methode dar, mit deren Hilfe Protein-DNA-Interaktionen im Chromatin-Kontext lebender Zellen analysiert werden können (Kuo & Allis *et al.*, 1999). Dabei werden Protein-DNA- und Protein-Protein-Komplexe in der Zelle durch Formaldehyd durch eine Kondensationsreaktion

reversibel quervernetzt. Nach der Zelllyse und Scherung der chromosomalen DNA durch Ultraschall erfolgt die Anreicherung der DNA-Fragmente, die spezifisch von dem zu untersuchenden Protein gebunden wurden, durch selektive Immunopräzipitation (IP). Die DNA-Fragmente werden, nachdem sie durch Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt wurden, mittels PCR quantifiziert.

2.2.5.1 Optimierung der Scherungsbedingungen der chromosomalen DNA durch Ultraschall

Für Chromatin-Immunopräzipitations- (ChIP) Assays muss die chromosomale DNA in Fragmente zwischen 200 bp und 1500 bp mittels Ultraschall geschert werden. Für die Ultraschallbehandlung wurden die optimalen Bedingungen, die sowohl von der Zelllinie als auch von der Zellzahl abhängen, ausgetestet. Hierfür werden die DNA-Protein- und Protein-Protein-Komplexe von 1×10^6 Zellen durch die direkte Zugabe von Formaldehyd (1 % (v/v) Endkonzentration) in das DME-Kulturmedium und 10 min Inkubation bei 37°C quervernetzt. Das Medium wird entfernt und der Zellrasen in 500 µL Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche Diagnostics) abgeschabt und für 4 min bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 200 µL SDS-Lysis-Puffer mit Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche Diagnostics) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird die DNA durch eine Ultraschall-Behandlung auf Eis geschert. Durch die Zugabe von 8 µL 5 M NaCl und erwärmen der Probe auf 65°C für 4 h wird die Protein-DNA-Quervernetzung gelöst. Die DNA wird durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Hierfür werden 500 µL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zu den Proben gegeben, die Ansätze für 2 min über Kopf geschüttelt und die Phasen durch Zentrifugation (10000 rpm, 10 min, RT) voneinander getrennt. Die obere Phase wird abgenommen, mit 20 µg Glykogen und 1 mL Ethanol versetzt. Nach einer Zentrifugation bei 10000 rpm für 10 min bei RT wird der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 1 mL 70 %-igem (v/v) Ethanol aufgenommen. Nach einer erneuten Zentrifugation (10000 rpm, 10 min, RT) wird das Ethanol vollständig abgenommen, die DNA bei RT trocknen lassen und anschließend in 30 µL TE-Puffer gelöst. Die Effizienz der Scherung wird in einem 2 %-igem (w/v) Agarosegel überprüft.

2.2.5.2 p53-Chromatin-Immunopräzipitations- (CHIP) Assay

DNA-Protein- und Protein-Protein-Komplexe von 1×10^6 Zellen werden durch die direkte Zugabe von Formaldehyd (1 % Endkonzentration) in das DME-Kulturmedium und 10 min Inkubation bei 37°C quervernetzt. Das Medium wird entfernt und der Zellrasen in 500 µL PBS mit Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche Diagnostics) abgeschabt und für 4 min bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 200 µL SDS-Lysis-Puffer mit Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche Diagnostics) resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird die DNA mittels Ultraschall (je sechsmal 10 s bei einem 30 %-igem Arbeitspuls und Leistungsstufe 2) auf Eis zu einer Größe von 200 bp-1500 bp geschert. Die Proben werden für 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert und anschließend 1:10 in ChIP-Dilution-Puffer mit Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche Diagnostics) verdünnt. Zur späteren DNA-Quantifizierung werden 5 % (v/v) der Lösung abgenommen und als Input-Kontrolle bis zur Auflösung der DNA-Protein-Quervernetzung bei 4°C gelagert. Zur Reduktion des unspezifischen Hintergrunds werden die Proben mit 75 µL Protein A-Agarose-Suspension versetzt und mit dieser für 1 h bei 4°C unter Schütteln über Kopf inkubiert. Daraufhin wird die Protein A-Agarose sedimentiert (2000 rpm, 1 min, 4°C) und der Überstand abgenommen. Die Überstände mit den Protein-DNA-Komplexen werden zur Immunopräzipitation mit 8 µg polyklonalem Anti-p53-Antikörper (FL-393) und in den Kontrollen mit Kaninchen IgG oder ohne Antikörper über Nacht bei 4°C unter Schütteln über Kopf behandelt. Anschließend werden die Ansätze mit 60 µL Protein A-Agarose-Suspension versetzt und bei 4°C für 1 h unter Schütteln über Kopf inkubiert. Die Protein A-Agarose wird sedimentiert (2000 rpm, 1 min, 4°C). Der Überstand wird abgenommen und verworfen. Die Protein A-Agarose mit den daran gebundenen p53-DNA-Komplexen wird einmal mit 1 mL Niedrigsalz-Waschpuffer, einmal mit 1 mL Hochsalz-Waschpuffer, einmal in 1 mL LiCl-Waschpuffer Puffer und zweimal in 1 mL TE-Puffer gewaschen. Dazu wird die Protein A-Agarose nach jedem Waschschrift für 1 min bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand entfernt und im entsprechenden Puffer resuspendiert. Die p53-DNA-Komplexe werden durch Zugabe von 250 µL ChIP-Elutionspuffer 15 min bei RT unter Schütteln von der Protein A Agarose eluiert. Anschließend wird die Protein A-Agarose zentrifugiert (2000 rpm, 1 min, 4°C), das Eluat abgenommen und der Elutionsschritt ein weiteres Mal wiederholt. Die Protein-DNA-Quervernetzungen in den vereinigten Eluaten und den Input-Kontrollen

werden durch die Zugabe von 0,3 M NaCl und Erwärmen der Probe auf 65°C für 4 h gelöst. Danach werden die Proben mit 0,2 M NaCl, 40 mM Tris-HCl (pH 6,5) und 20 µg Proteinase K versetzt und die Reaktionsansätze 1 h bei 45°C inkubiert. Die DNA wird durch Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Hierfür werden 500 µL (100 µL) Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zu den ChIP-Proben (Input-Kontrollen) gegeben, die Ansätze für 2 min über Kopf geschüttelt und die Phasen durch Zentrifugation (10000 rpm, 10 min, RT) voneinander getrennt. Die obere Phase wird abgenommen, mit 20 µg Glykogen und 1 mL (500 µL) Ethanol versetzt. Nach einer Zentrifugation bei 10000 rpm für 10 min bei RT wird der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 1 mL (500 µL) 70 %-igem (v/v) Ethanol aufgenommen. Nach einer erneuten Zentrifugation (10000 rpm, 10 min, RT) wird das Ethanol vollständig abgenommen, die DNA bei RT trocknen lassen und anschließend in 30 µL TE-Puffer gelöst. Die DNA wird mittels PCR, wie unter 2.2.2.7 beschrieben, amplifiziert und anschließend in einem 2 %-igem (w/v) Agarosegel analysiert.

3 ERGEBNISSE

Bereits in früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Induktion des *MCP-1*-Gens durch $\text{TNF-}\alpha$ hauptsächlich auf der Ebene der Initiation der Transkription liegt und nicht posttranslational, etwa durch selektive Labilisierung der mRNA (Finzer *et al.*, 2000). Neben den Elementen des „core“-Promotors (Rollins *et al.*, 1989; Ueda *et al.*, 1994) wurde ein Enhancer charakterisiert, der etwa 2,2 bis 2,7 kb „upstream“ vor der Initiations-Startstelle liegt (Ueda *et al.*, 1994). Anhand transienter Transfektionen wurde gezeigt, dass die Induktion des Reportergens durch einen 5'-Enhancer mitgesteuert wird (Ueda *et al.*, 1994). Zusätzlich gehört dieser Sequenzbereich zu einer DNaseI-hypersensitive Region (Finzer *et al.*, 2000); dieses legt nahe, dass der 5'-Enhancer eine bedeutsame Rolle in der durch $\text{TNF-}\alpha$ -induzierte *MCP-1*-Genregulation spielt. Ueda und Mitarbeiter (Ueda *et al.*, 1994) konnten bereits zeigen, dass sich in dieser 5'-Region des *MCP-1*-Gens zwei Bindungsstellen für NF- κ B und eine für AP-1 befinden.

Um ein besseres Verständnis für die regulatorischen Mechanismen der *MCP-1*-Genregulation zu erlangen, wurde in Vorarbeiten die 11793 bp lange, humane *MCP-1*-Gensequenz (Y18933) mit Hilfe des Computerprogramms „TRANSFAC Version 3.3“ (Wingender *et al.*, 1997) nach weiteren möglichen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren durchsucht. Neben den bereits bekannten und charakterisierten zwei Bindungsstellen für NF- κ B und der Bindungsstelle für AP-1 in diesem regulatorischen Element des *MCP-1*-Gens wurde dort zusätzlich eine mögliche Bindungsstelle für p53 ermittelt (Abb. 3.-1). Das identifizierte p53-Bindungsmotiv zeigt eine hohe Homologie (18 bp von 20 bp) zu der von el-Deiry und Mitarbeitern (el-Deiry *et al.*, 1992) beschriebenen DNA-Konsensus-Sequenz für p53.

Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass p53 an der transkriptionellen Regulation des *MCP-1*-Gens durch $\text{TNF-}\alpha$ beteiligt sein könnte, was im Rahmen dieser Dissertation untersucht wurde.

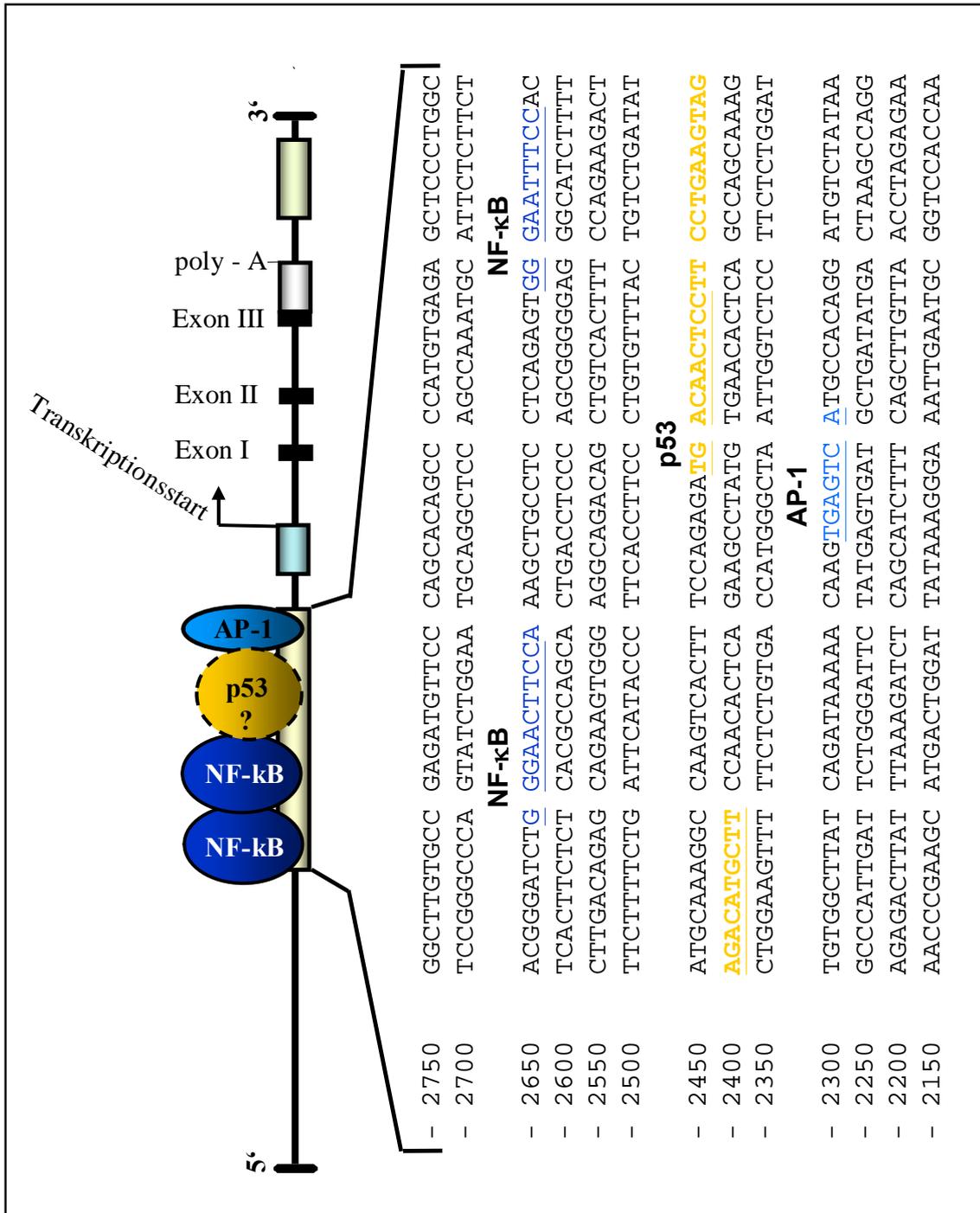


Abbildung 3.-1: Schematische Darstellung des humanen MCP-1-Gens: Sequenz der 5'-Enhancer-Region mit den möglichen Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. Das MCP-1-Gen wird hauptsächlich durch einen 5'-Enhancer reguliert, der sich 2750 bis 2150 bp „upstream“ von der Initiations-Startstelle befindet (Ueda *et al.*, 1994). In dieser regulatorischen 5'-Region sind zwei Bindungsstellen für NF-κB und eine Bindungsstelle für AP-1 lokalisiert. Neben diesen bereits charakterisierten Bindungsstellen wurde mittels bioinformatischer Analyse dort zusätzlich eine mögliche Bindungsstelle für p53 (-2422/-2391) identifiziert, die aus einem unperfekten (tGACAACTCC) und einem perfekten (AGACATGCTT) Dekamer getrennt durch einen 12 bp großen „spacer“ besteht. Die einzelnen Elemente des MCP-1-Gens sind als Kästen dargestellt: 5'-Enhancer (gelb), TATA-Box (blau), Exon (schwarz), Polyadenylierungssignal (weiß, poly-A), 3'-regulatorische Region (grün).

3.1 Einfluss der Suppression von p53 auf die TNF- α -vermittelte Induktion des MCP-1-Gens

Frühere Arbeiten zur transkriptionellen Regulation des *MCP-1*-Gens wurden unter anderem in der p53-positiven Glioblastoma-Zelllinie A172 (Weller *et al.*, 1998) durchgeführt (Ueda *et al.*, 1994, 1997): Hierbei zeigte sich, dass in A172 Zellen durch Zytokine, wie IL-1 β und TNF- α , sowie durch 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) das *MCP-1*-Gen stark induziert werden kann.

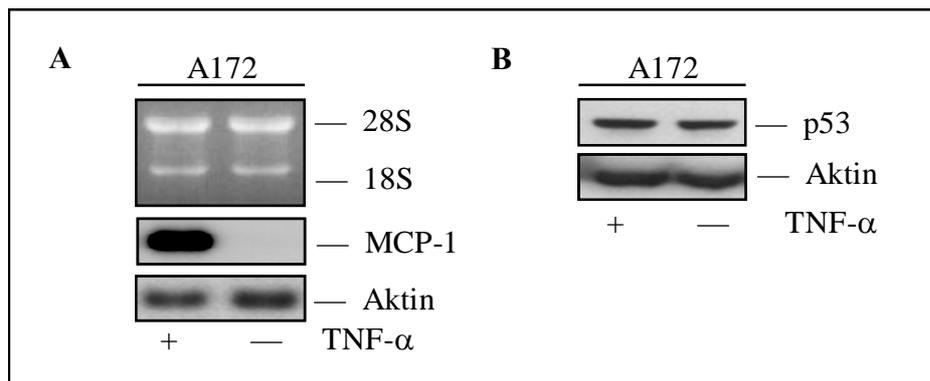


Abbildung 3.1-1: A172 Zellen als Modellsystem zur Untersuchung der MCP-1-Genregulation. A172 Zellen wurden mit TNF- α behandelt, geerntet und (A) 4 μ g RNA in einem 1 %-igem (w/v) Agarosegel aufgetrennt und auf eine „Gene seen Plus“-Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran zur Hybridisierung mit einer MCP-1- und Aktin-cDNA-Sonde eingesetzt. Die Positionen der 28S und 18S rRNA sind angegeben. (B) Expression von p53 in A172 Zellen. Gesamtproteinextrakte wurden in einem 12 %-igem (w/v) SDS-Gel aufgetrennt und die Membran mit Anti-p53 (DO-1) und Anti-Aktin zur Ladekontrolle inkubiert. (-): unbehandelte Kontrollen; (+): Zellen behandelt mit 250 U/mL TNF- α .

Wie in Abb. 3.1-1A gezeigt, wurden A172 Zellen für 5 h mit TNF- α stimuliert, geerntet und die RNA mittels Northern Blot analysiert. Die Transkription der MCP-1-mRNA konnte in A172 Zellen durch TNF- α im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle deutlich induziert werden. Eine gleichmäßige Beladung des Gels wurde durch Nachhybridisierung der Membran mit Aktin kontrolliert.

Ob p53 in den verwendeten A172 Zellen exprimiert wird und ob die Behandlung mit TNF- α die Expression moduliert, wurde durch einen Western Blot (Abb. 3.1-1B) überprüft. Dabei ließ sich p53 detektieren und die Expression an p53-Protein in A172 Zellen wurde durch die Behandlung mit TNF- α nicht beeinträchtigt. Die Membran wurde mit Anti-Aktin zur Kontrolle gleicher Proteinladungen nachinkubiert. Damit ist dieses Zellsystem zur weiteren Untersuchung des Zusammenhangs von p53 und der *MCP-1*-Expression sehr geeignet.

Zunächst wurde versucht in A172 Zellen p53 spezifisch zu hemmen und dadurch dessen Einfluss auf die TNF- α -vermittelte MCP-1-Genexpression zu untersuchen. Hierfür wurde zum einen der von Komerov und Mitarbeitern (Komerov *et al.*, 1999) entwickelte chemische p53-Inhibitor Pifithrin- α (p-fifty three inhibitor) eingesetzt, sowie p53 über RNAi-Experimente supprimiert.

3.1.1 Suppression von p53 durch Pifithrin- α in A172 Zellen

Pifithrin- α wurde durch „screening“ einer chemischen Bibliothek mit 10000 Verbindungen, die auf einem zellbasierenden „readout“-System beruhte, als eine Substanz identifiziert, durch die sowohl p53-abhängige Apoptose, als auch die Transaktivierung von p53-regulierten Genen gehemmt wird (Komarov *et al.*, 1999). Die Wirkungsweise von Pifithrin- α beruht auf der Hemmung des Transports von p53 aus dem Zytoplasma in den Zellkern (Komarov *et al.*, 1999).

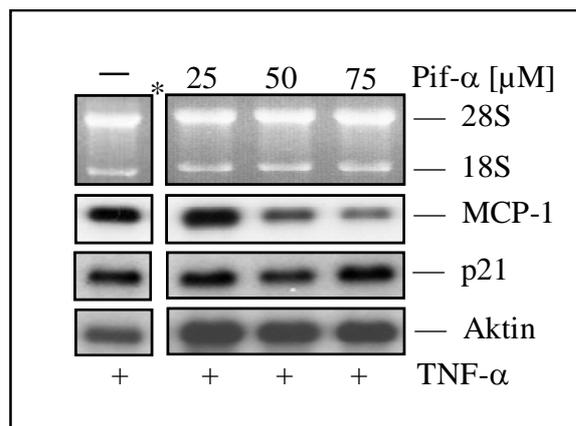


Abbildung 3.1.1-1: Pifithrin- α hemmt die Induktion des MCP-1-Gens durch TNF- α . A172 Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Pifithrin- α für 5 h vorbehandelt und mit TNF- α stimuliert. Die Zellen wurden geerntet und 4 μ g RNA in einem 1 %-igem (w/v) Agarosegel aufgetrennt und auf eine „Gene seen Plus“-Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran zur Hybridisierung mit einer MCP-1-, p21- und Aktin-cDNA-Sonde eingesetzt. Die Positionen der 28S und 18S rRNA sind angegeben. (25): 25 μ M; (50): 50 μ M; (75): 75 μ M; (Pif- α): Pifithrin- α ; (-): unbehandelte Kontrollen; (+): Zellen behandelt mit 250 U/mL TNF- α für 3 h; (*): alle 4 Abbildungen stammen von der gleichen Membran.

Um den Einfluss der p53-Hemmung auf die MCP-1-Induktion durch TNF- α zu untersuchen, wurden A172 Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Pifithrin- α behandelt und zusätzlich mit TNF- α stimuliert und geerntet. Northern Blot Analysen (Abb. 3.1.1-1) ergaben, dass in A172 Zellen behandelt mit 50 μ M und 75 μ M Pifithrin- α die TNF- α -vermittelte MCP-1-Transkription konzentrationsabhängig vermindert wird. Die unveränderte Expression des Aktin-Gens zeigt zusätzlich mit

dem Ethidiumbromid-gefärbten Gel gleiche Ladung der Gelspuren und die Selektivität der *MCP-1*-Hemmung.

Um die spezifische Wirkung von Pifithrin- α auf die p53-abhängige Transaktivierung eines Gens zu überprüfen, wurde zusätzlich die Expression des *p21*-Gens untersucht (Abb. 3.1.1-1). Die Expression an p21-mRNA blieb, unabhängig von den eingesetzten Konzentrationen an Pifithrin- α , unverändert. Eine Wirkung von Pifithrin- α ohne zusätzliche Behandlung der A172 Zellen mit TNF- α , sowie einen Einfluss von DMSO, in dem der p53-Inhibitor gelöst wurde, auf die Transkription des *MCP-1*-Gens konnte ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt). Höhere Konzentrationen und veränderte Behandlungszeiten an Pifithrin- α sowie variable Inkubationszeiten an TNF- α zeigten, dass durch Pifithrin- α die TNF- α -vermittelte Transkription des *MCP-1*-Gens in A172 Zellen herabgesetzt wurde.

Es lies sich jedoch kein eindeutiger, von der Konzentration des p53-Inhibitor abhängigen Effekt auf die verminderten Expression des *MCP-1*-Gens nach der Stimulation mit TNF- α demonstrieren (Daten nicht gezeigt). Auch aufgrund der noch ungeklärten Spezifität (Gary und Jensen, 2005; Walton *et al.*, 2005) der Pifithrin- α -vermittelten p53-Hemmung wurde nach einer Alternative gesucht, die es erlaubt, p53 spezifisch in A172 Zellen zu supprimieren.

3.1.2 Suppression von p53 in A172 Zellen mittels pSUPER-p53-siRNA

In einem zweiten Ansatz sollte die Expression an p53-Protein in A172 Zellen durch den Einsatz von so genannter „small interfering RNA“ gerichtet gegen p53-Transkripte, supprimiert werden (Brummelkamp *et al.*, 2002).

Hierfür wurden A172 Zellen mit dem pSUPER-Vektor oder mit dem pSUPER-p53-Plasmid, das die p53-spezifische siRNA codiert, transient transfiziert. Im direkten Anschluss an die Transfektion wurden die Zellen für 5 h mit TNF- α stimuliert und geerntet. Die Western Blot Analyse zeigte eine fast vollständige Suppression von p53 nach der pSUPER-p53-Transfektion im Vergleich zu A172 Zellen transfiziert mit dem pSUPER-Vektor (Abb. 3.1.2-1A).

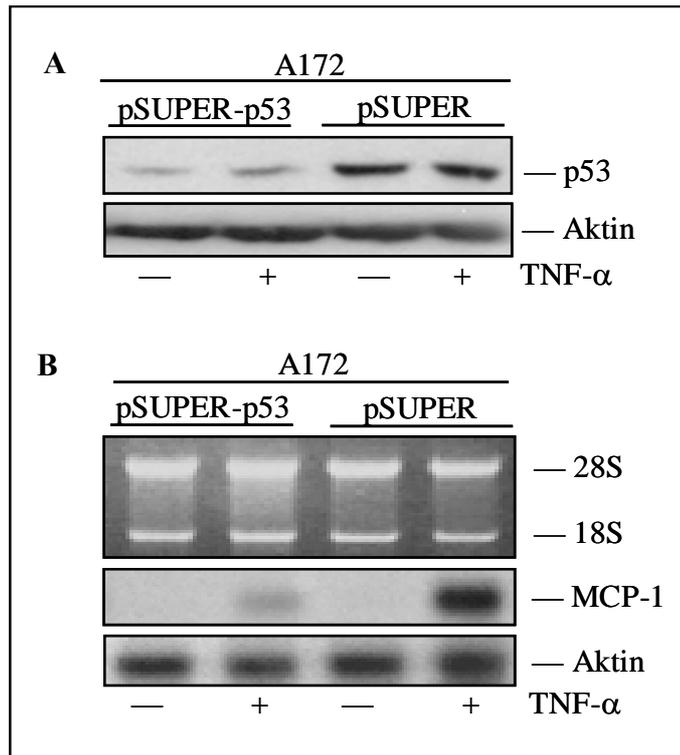


Abbildung 3.1.2-1: Effekt der p53-Suppression mittels pSUPER-p53 auf die Induktion des MCP-1-Gens durch TNF- α . A172 Zellen wurden transient mit pSUPER-p53 oder mit dem leeren pSUPER-Vektor transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte eine zusätzliche Behandlung mit TNF- α für 5 h. Die Zellen wurden geerntet und **(A)** die Expression von p53 im Western Blot unter Verwendung von Gesamtproteinextrakten detektiert. Der Western Blot wurde mit Anti-p53 (DO-1) und Anti-Aktin als Ladekontrolle inkubiert. **(B)** 4 μ g RNA wurden in einem 1 %-igem (w/v) Agarosegel aufgetrennt und auf eine „Gene seen Plus“-Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran zur Hybridisierung mit einer MCP-1- und Aktin-cDNA-Sonde eingesetzt. Die Positionen der 28S und 18S rRNA sind angegeben. (-): unbehandelte Kontrollen; (+): Zellen behandelt mit 250 U/mL TNF- α für 5 h.

Eine entsprechende Northern Blot Analyse ergab, dass *MCP-1* durch TNF- α in A172 Zellen transfiziert mit dem pSUPER-Vektor induzierbar war, jedoch die Induktion in den Zellen transfiziert mit pSUPER-p53 fast vollständig unterdrückt wurde (Abb. 3.1.2-1B). Die Nachhybridisierung der Membran mit Aktin-cDNA bzw. Inkubation der Membranen mit Anti-Aktin zeigt die Spezifität der beobachteten Regulation.

3.2 Induktion des *MCP-1*-Gens durch TNF- α in p53-negativen Zellen

Nachdem, wie in Abschnitt 3.1 dargestellt, durch spezifische Suppression von p53 eine verminderte transkriptionelle Aktivität des *MCP-1*-Gens nach Stimulation mit TNF- α gezeigt wurde, ergab sich die Frage inwiefern das *MCP-1*-Gen durch TNF- α in p53-negativen Zellen induziert werden kann. Saos-2 Zellen sind p53-negativ

(Lukas *et al.*, 1994) und stellen eine bekannte, stabile Zelllinie dar, um den Einfluss von p53 auf die Transkription von Genen zu untersuchen (Ponchel und Milner, 1998).

3.2.1 Induktion des *MCP-1*-Gens durch TNF- α in p53-negativen Saos-2 Zellen im Vergleich zu p53-positiven A172 Zellen

Zunächst sollte die *MCP-1*-Induktion mittels TNF- α in Saos-2 Zellen im Vergleich zu p53-positiven A172 Zellen untersucht werden. Hierfür wurden Saos-2 und A172 Zellen mit TNF- α für 5 h stimuliert und nach der Ernte die Expression von *MCP-1*-mRNA mittels Northern Blot analysiert (Abb. 3.2-1A). Das *MCP-1*-Gen konnte in Saos-2 Zellen trotz Abwesenheit von p53 durch TNF- α induziert werden. Die Induktion erfolgte aber in einem deutlich geringeren Umfang, als dies in A172 Zellen zu beobachten war. Der p53-Status der Saos-2 und A172 Zellen wurde mittels Western Blot überprüft und bestätigt (Abb. 3.2.1-1B und Abb. 3.1.-1B).

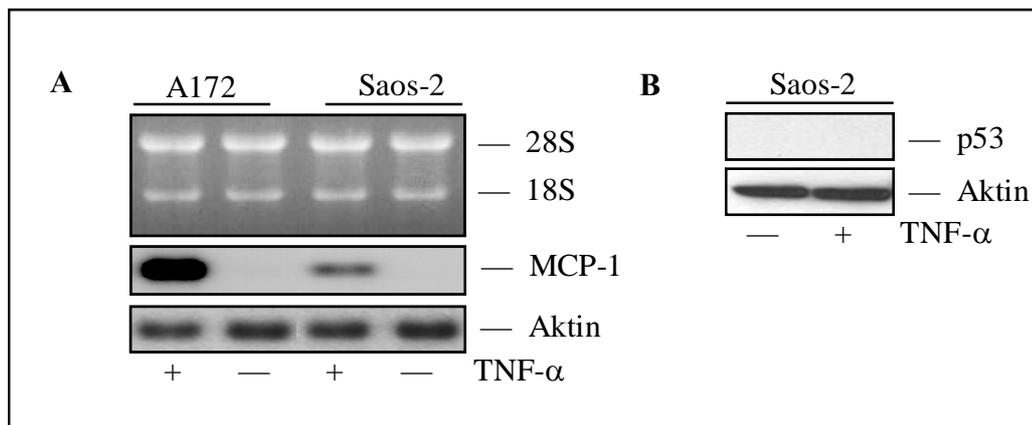


Abbildung 3.2.1-1: Induktion des *MCP-1*-Gens durch TNF- α in p53-negativen Saos-2 Zellen im Vergleich zu p53-positiven A172 Zellen. Saos-2 Zellen und A172 Zellen wurden mit TNF- α behandelt. Die Zellen wurden geerntet und (A) 4 μ g RNA in einem 1 %-igem (w/v) Agarosegel aufgetrennt und auf eine „Gene screen Plus“-Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran zur Hybridisierung mit einer *MCP-1*-cDNA und Aktin-cDNA-Sonde eingesetzt. Die Positionen der 28S und 18S rRNA sind angegeben. (B) Expression von p53 in Saos-2 Zellen: Gesamtproteinextrakte wurden in einem 12 %-igem (w/v) SDS-Gel aufgetrennt und die Membran mit Anti-p53 (DO-1) und Anti-Aktin als Ladekontrolle inkubiert. (-): unbehandelte Kontrollen. (+): Zellen behandelt mit 250 U/mL TNF- α für 5 h.

Wie in Abb. 3.2.1-1 gezeigt, kann in den p53-negativen Saos-2 Zellen *MCP-1* durch TNF- α -Behandlung induziert werden. Das deutet daraufhin, dass p53 als Kofaktor in der *MCP-1*-Regulation fungiert bzw. die *MCP-1*-Expression als Aktivator modulieren kann. Aufgrund der verminderten Induktion des *MCP-1*-Gens durch TNF- α in p53-negativen Saos-2 Zellen ergab sich die Frage, ob durch Einbringen von wtp53 eine Zunahme der Expression an *MCP-1*-mRNA in diesen Zellen erzielt werden

kann. Um dieses zu untersuchen, wurden Saos-2 Zellen mit dem pCMV-Vektor oder dem pCMVwtp53-Plasmid, das p53 codiert, transient transfiziert. Im direkten Anschluss an die Transfektion wurden die Zellen für 3 h mit TNF- α stimuliert und geerntet. Die Expression an exogenem p53-Protein in den Transfektanden wurde im Western Blot untersucht und die Induktion des *MCP-1*-Gens durch TNF- α mittels Northern Blot analysiert.

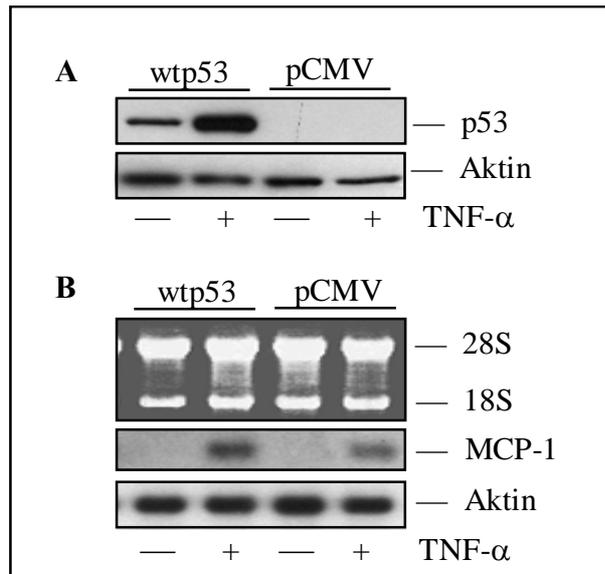


Abbildung 3.2.1-2: Induktion des *MCP-1*-Gens durch TNF- α in Saos-2 Zellen transient transfiziert mit wtp53. Saos-2 Zellen wurden mit pCMVwtp53-Plasmid oder mit dem leeren Vektor transient transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte eine Behandlung mit TNF- α . **(A)** Die Expression von p53 nach transienter Transfektion wurde unter Verwendung von Gesamtproteinextrakten im Western Blot detektiert. Der Western Blot wurde mit Anti-p53 (DO-1) und Anti-Aktin als Ladekontrolle inkubiert **(B)** 4 μ g RNA wurden in einem 1 %-igem (w/v) Agarosegel aufgetrennt und auf eine „Gene seen Plus“-Membran transferiert. Anschließend wurde die Membran zur Hybridisierung mit einer MCP-1- und Aktin-cDNA-Sonde eingesetzt. Die Positionen der 28S und 18S rRNA sind angegeben. (wtp53): Zellen transient transfiziert mit pCMVwtp53-Plasmid; (pCMV): Zellen transient transfiziert mit dem entsprechenden Leervektor; (-): unbehandelte Kontrollen; (+): Zellen behandelt mit 250 U/mL TNF- α für 3 h.

Wie aus Abb. 3.2.1-2A ersichtlich, exprimierten Saos-2 Zellen nach der transienten Transfektion mit pCMVwtp53-Plasmid exogenes p53-Protein. Durch die Behandlung mit TNF- α wurde die Expression an p53 in den transfizierten Saos-2 Zellen zusätzlich verstärkt. Dieses lässt sich damit erklären, dass durch TNF- α der CMV-Promotor stimuliert werden kann (Fietze *et al.*, 1994). Die Northern Blot Analyse (Abb. 3.2.1-2B) ergab, dass in den Saos-2 Zellen transfiziert mit pCMVwtp53-Plasmid im Vergleich zu den Zellen transfiziert mit dem Leervektor das *MCP-1*-Gen durch TNF- α stärker induziert wurde.

3.2.2 Expression und Phosphorylierung von p38 MAPK nach Stimulation mit TNF- α in Saos-2 und A172 Zellen

Die Unterschiede in beiden Zelllinien hinsichtlich der *MCP-1*-Induzierbarkeit könnten nicht nur auf p53 beruhen, sondern auch an der Aktivierbarkeit der Zellen durch das TNF- α -Signal. Um auszuschließen, dass in Saos-2 Zellen der TNF- α -Signaltransduktionsweg nicht intakt ist, wurden Saos-2 und A172 Zellen für unterschiedliche Zeitwerte mit TNF- α behandelt und anschließend die Expression der p38 MAPK sowie deren Phosphorylierung im Western Blot analysiert. Die p38 MAPK-Signaltransduktionskaskade stellt einen der wichtigsten Signaltransduktionswege dar, die durch TNF- α aktiviert werden können (Wajant *et al.*, 2003).

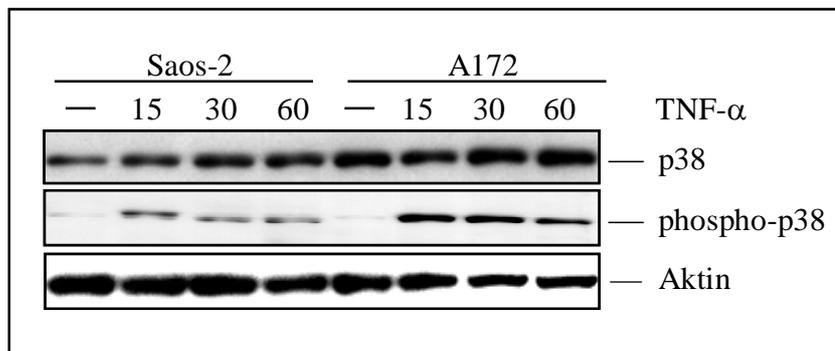


Abbildung 3.2.2-1: Expression und Phosphorylierung von p38 MAPK nach Stimulation mit TNF- α in Saos-2 und A172 Zellen. Expression und Phosphorylierung von p38 MAPK in Saos-2 Zellen und A172 Zellen behandelt mit TNF- α für die angegebenen Zeitwerte. Gesamtproteinextrakte wurden in einem 12 %-igem (w/v) SDS-Gel aufgetrennt und die Membran nach dem Elektotransfer mit einem Antikörper gegen p38 MAPK und an Thr/Tyr182 phosphoryliertem p38 MAPK inkubiert. Die Membran wurde mit Anti-Aktin zur Ladekontrolle gleicher Proteinmengen nachinkubiert. (-): unbehandelte Kontrollen; Zellen behandelt mit 250 U/mL TNF- α für (15): 15 min; (30): 30 min; (60): 60 min.

Die Western Blot Analyse (Abb. 3.2.2-1) zeigt, dass p38 MAPK in Saos-2 und A172 Zellen ähnlich exprimiert wird, jedoch in Saos-2 Zellen scheinbar ein geringerer Anteil an p38 MAPK nach der Behandlung mit TNF- α phosphoryliert vorlag. Somit könnte der beobachtete Unterschied in der TNF- α -vermittelten Induktion des *MCP-1*-Gens in Saos-2 im Vergleich zu A172 Zellen möglicherweise auf Unterschiede im TNF- α -Signaltransduktionsweg beruhen und nicht nur auf einen Effekt von p53. Ob jedoch der beobachtete Phosphorylierungsunterschied von p38 MAPK zwischen den Zelllinien funktionell hinsichtlich der *MCP-1*-Expression relevant ist, müssten weitere Experimente zeigen.

Diese Ergebnisse könnten möglicherweise aber einen ersten Hinweis liefern, dass nicht p53 alleine für die durch TNF- α -vermittelte Expression des *MCP-1*-Gens verantwortlich ist, sondern hierfür mehrere Faktoren benötigt werden, die komplexe Interaktionen miteinander eingehen.

3.3 Temperatursensitives Zellsystem zur Untersuchung der Rolle von p53 in der TNF- α -vermittelten Induktion des *MCP-1*-Gens

Als ein weiteres Modellsystem (Abb. 3.3-1) diente in dieser Arbeit die p53-negative hepatozelluläre Karzinom-Zelllinie Hep3B (Bressac *et al.*, 1990), die stabil mit murinem, temperatursensitivem p53val135 und einer Puromycin-Resistenz stabil transfiziert ist (Friedman *et al.*, 1997).

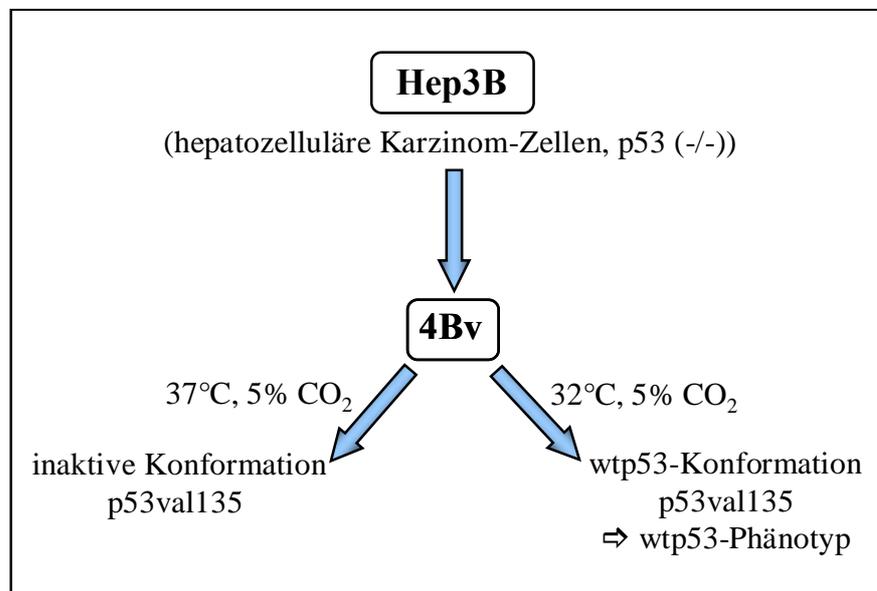


Abbildung 3.3-1: Temperatursensitives Zellsystem. Die p53-negative hepatozelluläre Karzinom-Zelllinie Hep3B wurde stabil mit murinem, temperatursensitivem p53val135 und einer Puromycin-Resistenz transfiziert. Die Kultivierung der 4Bv Zellen unter der permissiven Temperatur von 32°C bewirkt, dass p53val135 in der wtp53-Konformation vorliegt und einen wtp53-Phänotyp besitzt. Bei einer Kultivierungstemperatur der 4Bv Zellen von 37°C liegt p53val135 in seiner inaktiven Konformation vor. [Die Zellen wurden freundlicherweise von Moshe Oren, Rehovot, Israel zur Verfügung gestellt.]

p53val135 besitzt im Gegensatz zu murinem wtp53 an Position 135 statt der Aminosäure Alanin ein Valin (Finlay *et al.*, 1988). Dieser Aminosäureaustausch verleiht dem Protein eine temperaturabhängige, reversible Labilität in der Konformation und Aktivität: bei 37°C besitzt p53val135 eine funktionell inaktive Konformation, während es hingegen bei 32°C (permissive Temperatur) einen funktionell aktiven wtp53 Phänotyp aufweist (Michalovitz *et al.*, 1990). Der Wechsel zwischen der inaktiven und aktiven Konformation erfolgt *in vitro* innerhalb von zwei

Minuten nach dem Temperaturwechsel (Milner und Medcalf, 1990). Bei 37°C befindet sich p53val135 im Zytoplasma, während es bei der permissiven Temperatur im Zellkern vorliegt (Ginsberg *et al.*, 1991).

3.3.1 Aktivierung von p53 führt zur Induktion des *MCP-1*-Gens durch TNF- α

4Bv Zellen wurden bei 37°C oder unter der permissiven Temperatur kultiviert und für 5 h mit TNF- α stimuliert. Um zu überprüfen, ob p53val135 durch den Temperaturwechsel in den funktionell aktiven wtp53-Phänotyp übergeht, wurde die Expression von p21, welches durch p53 transkriptionell aktiviert wird, mittels Western Blot analysiert. Die Membran wurde mit Anti-Aktin zur Kontrolle gleicher Proteinladungen nachinkubiert. Wie in Abb. 3.3.1-1A ersichtlich, wurde die Expression von p21 durch den Temperaturwechsel auf 32°C im Vergleich zu 4Bv Zellen kultiviert bei 37°C stark induziert, unabhängig davon ob die Zellen mit TNF- α behandelt wurden oder nicht. Dieses zeigt, dass p53val135 in den 4Bv Zellen bei 32°C transkriptionell aktiv ist.

Um herauszufinden, ob p53 in 4Bv Zellen auch an der MCP-1-Genregulation beteiligt ist, wurden semiquantitative RT-PCR durchgeführt. In 4Bv Zellen kultiviert bei 32°C konnte durch die Behandlung mit TNF- α für 3 h, 4 h und 5 h das MCP-1-Gen deutlich induziert werden (Abb. 3.3.1-1B).

Um die Spezifität der beobachteten p53-abhängigen MCP-1-Induktion durch TNF- α in den 4Bv Zellen aufzuzeigen, wurde die Expression des „housekeeping“ Gens Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) unterer diesen Bedingungen untersucht. In 4Bv wurde *GAPDH* bei 37°C und 32°C unabhängig von einer Stimulation mit TNF- α exprimiert (Abb. 3.3.1-1B).

Aus diesen Versuchsreihen kann geschlossen werden, dass p53 an der Induktion von MCP-1 durch TNF- α in 4Bv Zellen beteiligt ist.

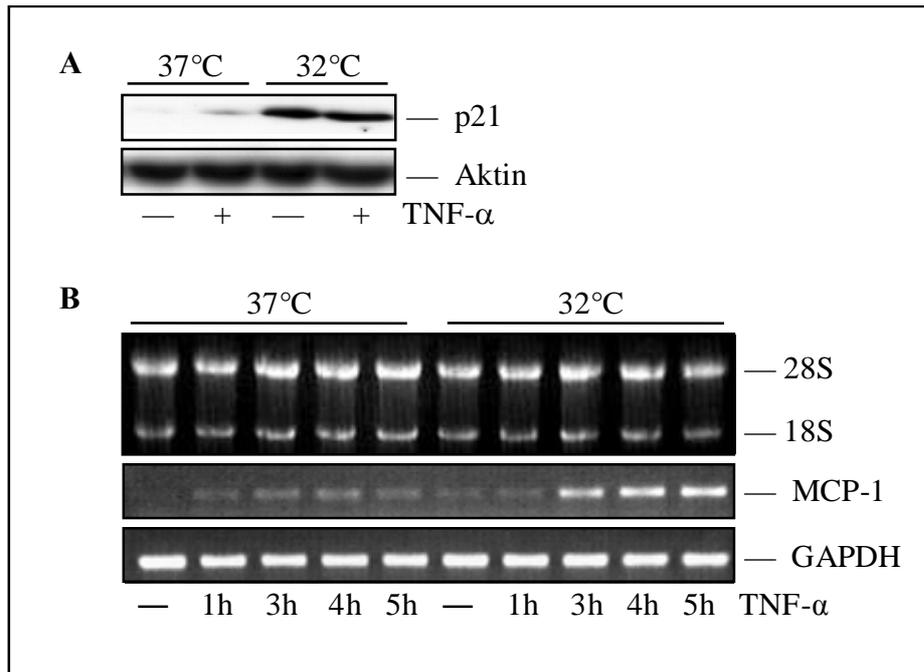


Abbildung 3.3.1-1: Analyse der Induktion des *MCP-1*-Gens durch *TNF-α* mit und ohne Rekonstitution der *wtp53*-Aktivität von *p53val135*. (A) 4Bv Zellen wurden über Nacht bei 37°C oder 32°C kultiviert und mit *TNF-α* für 5 h behandelt. Gesamtproteinextrakte wurden in einem 12 %-igem (w/v) SDS-Gel aufgetrennt und die Membran nach dem Elektotransfer mit einem Antikörper gegen p21 inkubiert. Die Membran wurde mit Anti-Aktin zur Ladekontrolle gleicher Proteinmengen nachinkubiert. (B) 4Bv Zellen wurden bei 37°C oder 32°C kultiviert und mit *TNF-α* für die angegebenen Zeitwerte behandelt. Die *MCP-1*-PCR wurde, wie unter Material und Methoden beschrieben, durchgeführt. (-): unbehandelte Kontrollen; (+): Zellen behandelt mit 250 U/mL *TNF-α* für 5 h; (1h)/(3h)/(4h)/(5h): Zellen behandelt mit 250 U/mL *TNF-α* für 1 h, 3 h, 4 h, 5 h.

3.3.2 Der *TNF-α*-Signaltransduktionsweg wird in 4Bv Zellen durch die Rekonstitution der *wtp53*-Aktivität von *p53val135* nicht beeinflusst

Die Bindung von *TNF-α* an dessen Rezeptoren, *TNFR1* und *TNFR2*, führt in Zellen zur Aktivierung entsprechender Signaltransduktionswege (Abschnitt 1.4) und schließlich zweier Haupttranskriptionsfaktoren: AP-1 und NF-κB (Wajant *et al.*, 2003).

3.3.2.1 *wtp53*-Aktivität von *p53val135* aktiviert nicht den MAPK-Signaltransduktionsweg durch *TNF-α*

Die Aktivität von AP-1 wird hauptsächlich durch MAPK-vermittelte Phosphorylierungsprozesse gesteuert (Karin *et al.* 1997).

Um zu untersuchen, ob dieser Signaltransduktionsweg in 4Bv Zellen durch den Temperaturwechsel und die dadurch resultierende Aktivierung von *p53val135* beeinflusst wird, wurden die Zellen bei 37°C oder 32°C kultiviert und für

unterschiedliche Zeitwerte mit TNF- α stimuliert. Anschließend wurde die Expression an p38 MAPK und die Phosphorylierung von p38 MAPK mittels Western Blot Analyse untersucht.

Wie der Western Blot in Abb. 3.3.2.1-1A zeigt, wird p38 MAPK in 4Bv Zellen exprimiert. Dies war unabhängig davon, ob die Zellen bei 37°C oder unter der permissiven Temperatur kultiviert und dann mit TNF- α behandelt wurden. Durch die Stimulation der 4Bv Zellen mit TNF- α wurde sowohl bei 37°C als auch bei 32°C eine Phosphorylierung von p38 MAPK mit einer ähnlicher Kinetik festgestellt (Abb. 3.3.2.1-1B). Die Inkubation der Membranen mit Anti-Aktin zeigt die Spezifität der beobachteten Regulation.

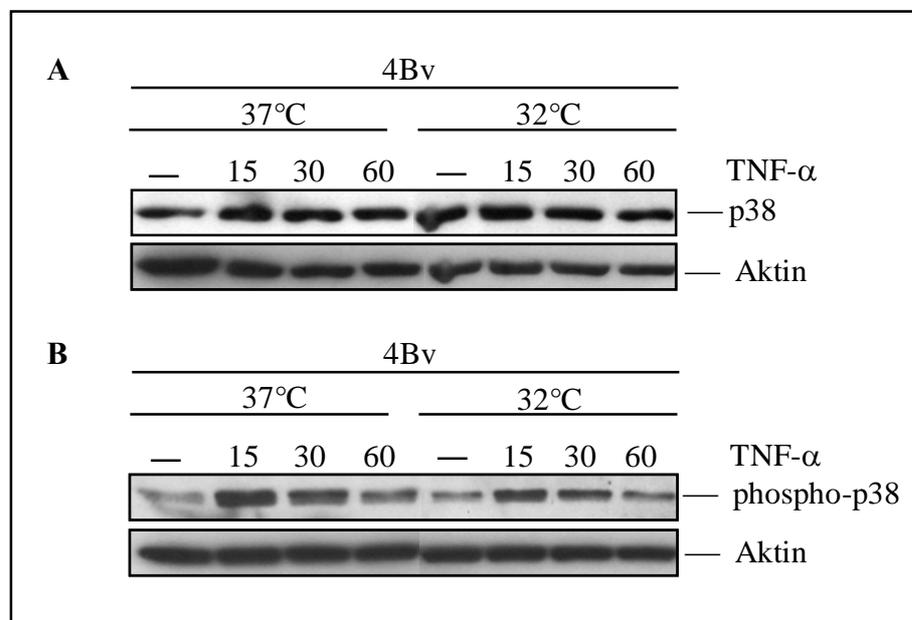


Abbildung 3.3.2.1-1: wtp53-Aktivität von p53val135 aktiviert nicht den MAPK-Signaltransduktionsweges in 4Bv Zellen durch TNF- α . (A) p38 MAPK-Expression und (B) Phosphorylierung von p38 MAPK in 4Bv Zellen (37°C und 32°C) behandelt mit TNF- α für die angegebenen Zeitwerte. Gesamtproteinextrakte wurden in einem 12 %-igem (w/v) SDS-Gel aufgetrennt und die Membranen nach dem Elektrotransfer mit einem Antikörper gegen p38 MAPK und an Position Thr/Tyr182 phosphorylierter p38 MAPK inkubiert. Die Membranen wurden mit Anti-Aktin zur Ladekontrolle gleicher Proteinmengen nachinkubiert. (-): unbehandelte Kontrollen; Zellen behandelt mit 250 U/mL TNF- α für (15): 15 min; (30): 30 min; (60): 60 min, (+): 5 h.

Durch AP-1-DNA-Bindungstudien konnte zusätzlich gezeigt werden, dass AP-1 aus 4Bv Zellen physikalisch mit der AP-1-DNA-Konsensussequenz (Lee *et al.*, 1987) wechselwirken kann (Daten nicht gezeigt). Es wird eine leichte Induktion der AP-1-DNA-Komplexbildung bei zellulären Kernextrakten, isoliert aus 4Bv Zellen kultiviert bei 32°C unabhängig von einer Stimulation mit TNF- α , beobachtet. Ob diese, in einem *in vitro* Experiment beobachtete, verstärkte AP-1-DNA-

Komplexbildung tatsächlich einen Einfluss auf die Induktion des *MCP-1*-Gens in 4Bv Zellen ausübt, müssen zum einen weitere DNA-Bindungsstudien, unter Verwendung der AP-1-DNA-Sequenz aus dem MCP-1-Enhancer, aber insbesondere *in vivo* Untersuchungen mittels Chromatin-Immunopräzipitations- (ChIP) Assays zeigen.

3.3.2.2 wtp53-Aktivität von p53val135 aktiviert nicht den NF- κ B-Signaltransduktionsweg in 4Bv Zellen durch TNF- α

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird im Wesentlichen durch die Phosphorylierung seiner inhibitorischen Proteine (I κ B- α , - β) reguliert (Abschnitt 1.4). Diese verhindern, dass NF- κ B in nicht-stimulierten Zellen das Zytoplasma verlässt, in den Zellkern eintritt und als Transkriptionsfaktor wirkt. Durch die Stimulation mit TNF- α werden diese inhibitorischen Proteine durch IKK phosphoryliert, was zu ihrer Ubiquitinierung und Degradation führt. Das nun ungebundene NF- κ B kann in den Zellkern translokalisieren und als Transkriptionsfaktor wirken (Hayden und Gosh, 2004).

Um eine mögliche Aktivierung des NF- κ B-Signaltransduktionsweges durch die permissive Temperatur in 4Bv Zellen zu untersuchen, wurden 4Bv Zellen bei 37°C oder 32°C über Nacht kultiviert, anschließend für unterschiedliche Zeitwerte mit TNF- α stimuliert und die Degradation von I κ B- α im Western Blot analysiert.

Wie Abb. 3.3.2.2-1A zeigt, wurde in 4Bv Zellen kultiviert bei 37°C oder unter der permissiven Temperatur eine Degradation und Resynthese von I κ B- α mit ähnlicher Kinetik beobachtet, so dass eine Aktivierung von NF- κ B unabhängig von der wtp53-Aktivität von p53val135 erfolgt. Eine zusätzliche Inkubation der Membran mit Anti-Aktin zeigt die Spezifität der untersuchten Regulation.

Es stellte sich außerdem die Frage, ob NF- κ B aus 4Bv Zellen physikalisch mit der NF- κ B-DNA-Konsensussequenz (Kunsch *et al.*, 1989) interagiert. Um dieses zu untersuchen, wurden 4Bv Zellen über Nacht bei 37°C oder 32°C kultiviert, anschließend für 5 h mit TNF- α behandelt und zelluläre Kernextrakte aus den Zellen gewonnen. Die zellulären Kernextrakte wurden in NF- κ B-DNA-Bindungsstudien (EMSA) untersucht. Wie aus Abb. 3.3.2.2-1B ersichtlich, wurde in 4Bv Zellen NF- κ B durch die Behandlung mit TNF- α , unabhängig von der Kultivierungstemperatur, induziert und wechselwirkte physikalisch mit der NF- κ B-DNA-Konsensussequenz. Die Spezifität der DNA-Komplexbildung wurde in homologen und heterologen Kompetitionsexperimenten gezeigt (Daten nicht gezeigt).

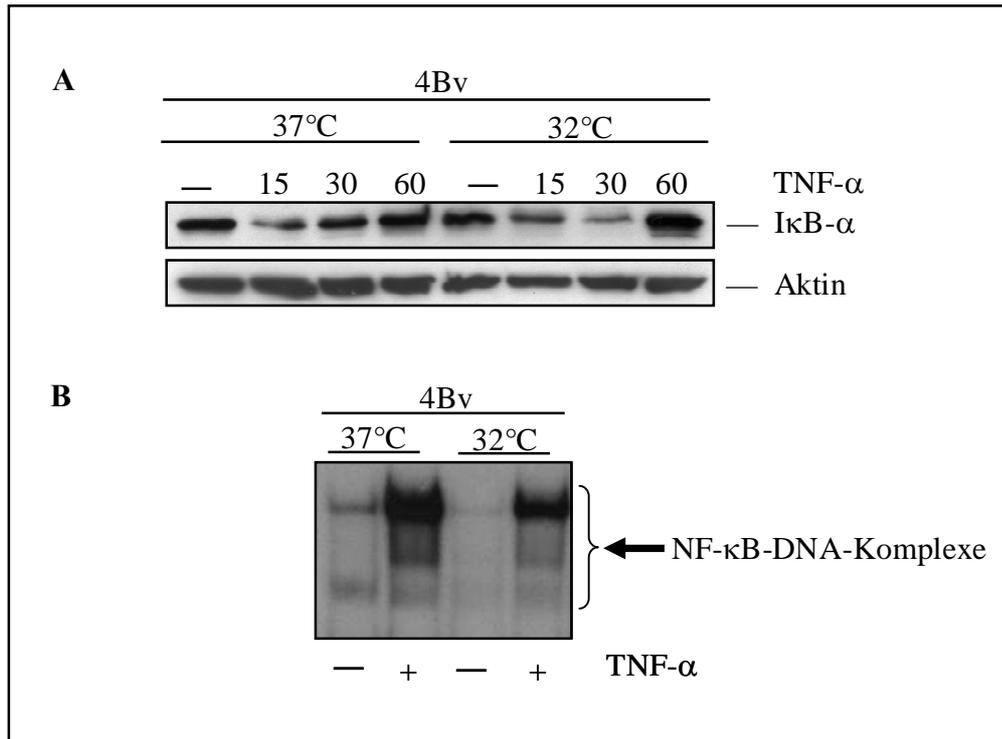


Abbildung 3.3.2.2-1: wtp53-Aktivität von p53val135 aktiviert nicht den NF-κB-Signaltransduktionsweges durch TNF-α in 4Bv Zellen. (A) Degradation von IκB-α in 4Bv Zellen (37°C und 32°C) behandelt mit TNF-α für die angegebenen Zeitwerte. Gesamtproteinextrakte wurden in einem 12 %-igem (w/v) SDS-Gel aufgetrennt und die Membran nach dem Elektrotransfer mit einem Antikörper gegen IκB-α inkubiert. Die Membran wurde mit Anti-Aktin zur Ladekontrolle gleicher Proteinmengen nachinkubiert. (B) NF-κB-EMSA: 5 µg zellulärer Kernextrakte aus 4Bv Zellen (37°C und 32°C) behandelt für 5 h mit 250 U/mL TNF-α wurden mit [³²P]-markierten doppelsträngigen Oligonukleotiden, die die NF-κB-DNA-Konsensussequenz beinhalteten, inkubiert. Die Positionen der NF-κB-DNA-Komplexe sind durch eine Klammer markiert. (-): unbehandelte Kontrollen; Zellen behandelt mit 250 U/mL TNF-α für (15): 15 min; (30): 30 min; (60): 60 min; (5h): 5 h.

3.4 *In vitro*-Untersuchungen zur physikalischen Interaktion von p53 mit der putativen MCP-1-p53-Bindungssequenz (p53-EMSA)

Nachdem gezeigt wurde, dass durch die Suppression von p53 die durch TNF-α-vermittelte Expression des MCP-1-Gens vermindert (Abschnitt 3.1) und durch die Reaktivierung von p53 die Induktion von MCP-1 durch TNF-α wieder hergestellt wird (Abschnitt 3.3), sollte überprüft werden, ob p53 direkt als Transkriptionsfaktor physikalisch mit der putativen Bindungsstelle (Abb.3.-1) am MCP-1-Enhancer, wechselwirkt.

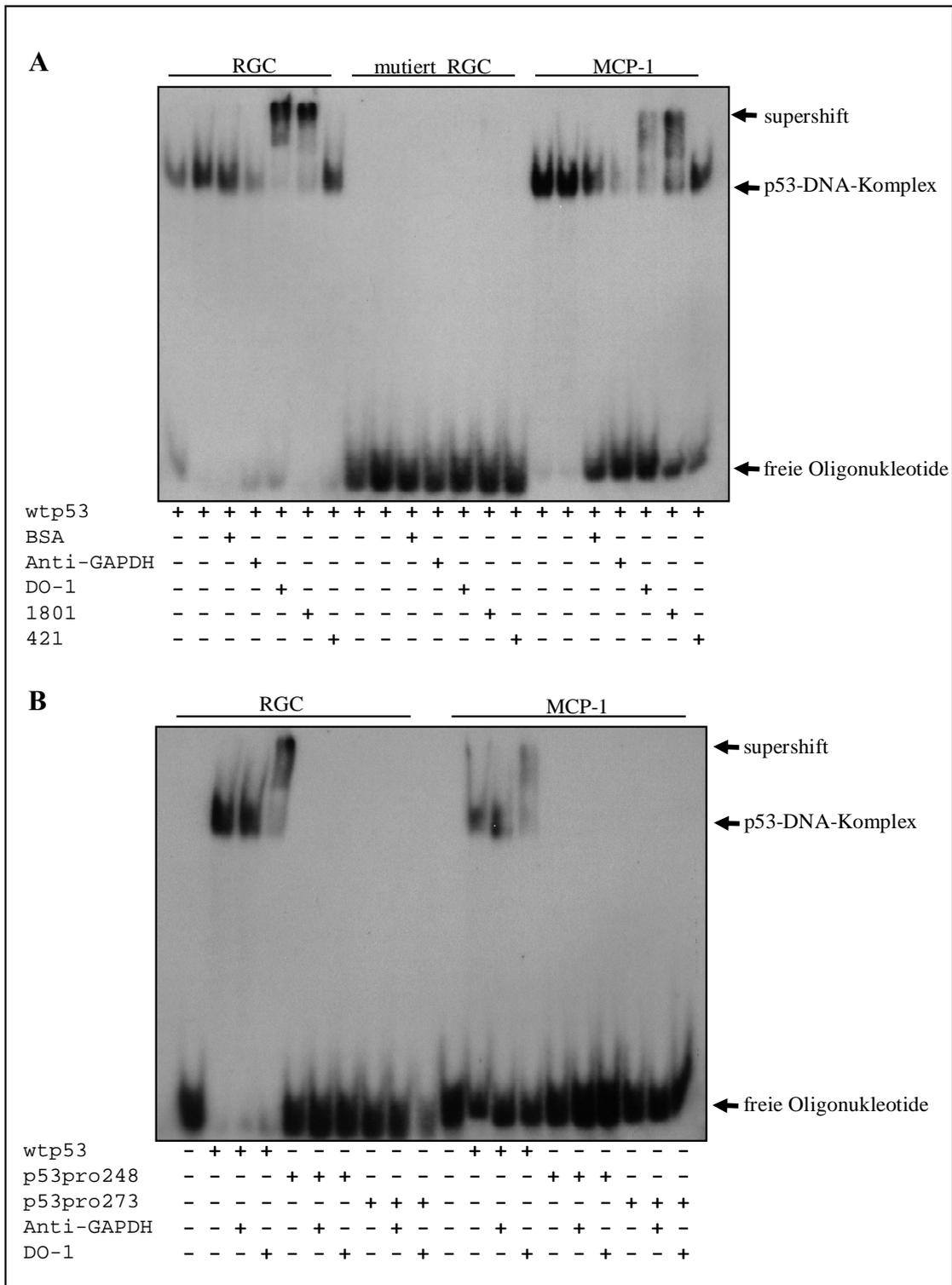


Abbildung 3.4-1: In-vitro-DNA-Bindungsaktivität von wtp53 an die MCP-1-p53-Bindungsstelle. 60 ng rekombinantes p53 humanen Ursprungs wurden mit [³²P]-markierten doppelsträngigen Oligonukleotiden, die zum einen die p53 spezifische RGC-, eine mutierte Version der RGC- oder die MCP-1-p53-Bindungsstelle beinhalteten, inkubiert. Des Weiteren wurden „supershift“-Analysen unter Verwendung folgender Antikörper durchgeführt: Anti-GAPDH, DO-1, PAb1801 oder PAb421. Die Positionen der ungebundenen Oligonukleotide, des p53-DNA- und des p53-DNA-Antikörper-Komplexes sind durch Pfeile gekennzeichnet. **(A)** Vergleichende Bindungsstudie für Wildtyp-p53 (wtp53) unter Verwendung von RGC-DNA, gegen mutierte RGC-DNA und MCP-1-DNA. **(B)** DNA-Bindungsaktivität von Wildtyp-p53 (wtp53) im Vergleich zu p53pro248 und p53pro273 unter Verwendung von RGC-DNA und MCP-1-DNA [in Zusammenarbeit mit Lisa Wiesmüller, Universität Ulm].

Hierzu wurden p53-DNA-Bindungsstudien (EMSA) mit 41 bp langen, doppelsträngigen Oligonukleotiden, welche die *MCP-1*-p53-DNA-Sequenz beinhalteten, durchgeführt. In den Bindungsstudien wurde humanes wtp53, isoliert aus mit baculovirus-infizierten Insektenzellen, eingesetzt. Als Kontrolle für die p53-DNA-Komplexbildung wurden parallel Ansätze mit der etablierten, sequenzspezifischen p53-DNA-Bindungsstelle des „ribosomalen gene cluster repeat“ (RGC) analysiert (Kern *et al.*, 1992).

In den Bindungsstudien mit *MCP-1*-DNA konnte gezeigt werden, dass die radioaktiv markierte Input-DNA in gleichem Maße im Gel retardiert wurde, wie dies für RGC-DNA der Fall war (Abb. 3.4-1A Spur 15 und 16). Daraus kann geschlossen werden, dass identische p53-DNA-Komplexe gebildet worden sind.

Um zu zeigen, dass sich p53 tatsächlich in diesen Komplexen befindet, wurden „supershift“-Analysen mit den monoklonalen p53-Antikörpern DO-1, PAb1801 und PAb421 durchgeführt. DO-1 und PAb1801 verursachen eine weitere Retardierung des p53-DNA-Komplexes mit RGC-DNA (Spur 5 und 6) und *MCP-1*-DNA (Spur 19 und 20), während hingegen die Kontrollen, Bovines Serum Albumin (BSA) und Anti-GAPDH, keinen „supershift“ verursachten (Spur 17 und 18). Im Vergleich zu der Anti-GAPDH Kontrolle verstärkt PAb421 leicht die p53-DNA-Komplexbildung, induziert aber keinen „supershift“ (Spur 21 vs. Spur 18). Mögliche Erklärungen für die Unterschiede zwischen DO-1 und PAb1801 gegenüber PAb421 könnte durch das Phosphorylierungsmuster des baculoviral-exprimierten p53 verursacht werden, da das PAb421-Epitop erst nach Dephosphorylierung von Serin376 exponiert wird (Waterman *et al.*, 1998). Das beobachtete Bild von „shift“- und „supershift“-Bildung tauchte nicht auf, wenn die Bindungsstudien mit Oligonukleotiden durchgeführt wurden, die eine mutierte *RGC*-Sequenz (Spur 8-14) beinhalteten (Kern *et al.*, 1992). Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass unspezifische DNA-Bindungsaktivitäten zu einer p53-*RGC*- oder p53-*MCP-1*-Komplexbildung führten.

In einem weiteren Schritt wurde die DNA-Bindung der onkogenen p53-Varianten p53pro248, einer DNA-Kontaktmutante, und p53pro272, einer Konformationsmutante, untersucht (Ory *et al.*, 1994). Beide eingesetzten Mutanten erzeugten keine Gelretardierung (Abb. 3.4-1B).

Aufgrund der *in vitro* Bindungscharakteristik der wildtyp und mutierten p53-Proteine kann geschlossen werden, dass wtp53 stabile Komplexe mit der *MCP-1*-Sequenz,

die aus einem unperfekten (tGACAACTCC) und einem perfekten (AGACATGCTT) Dekamer getrennt durch einen 12 bp großen „spacer“ besteht, ausbildet.

3.5 Untersuchungen zur Interaktion von p53 mit der identifizierten MCP-1-p53-Bindungssequenz *in vivo* (p53-ChIP)

Nachdem in Abschnitt 3.4 durch p53-DNA-Bindungsstudien gezeigt werden konnte, dass p53 mit der mit der Sequenz 5'-tGACAAcTCCxxxxxxxxxxxxAGACATGCTT-3', aus dem 5'-Enhancer des MCP-1-Gens physikalisch wechselwirkt, sollte in einem weiteren Schritt untersucht werden, ob p53 auch *in vivo* mit dieser Sequenz interagiert.

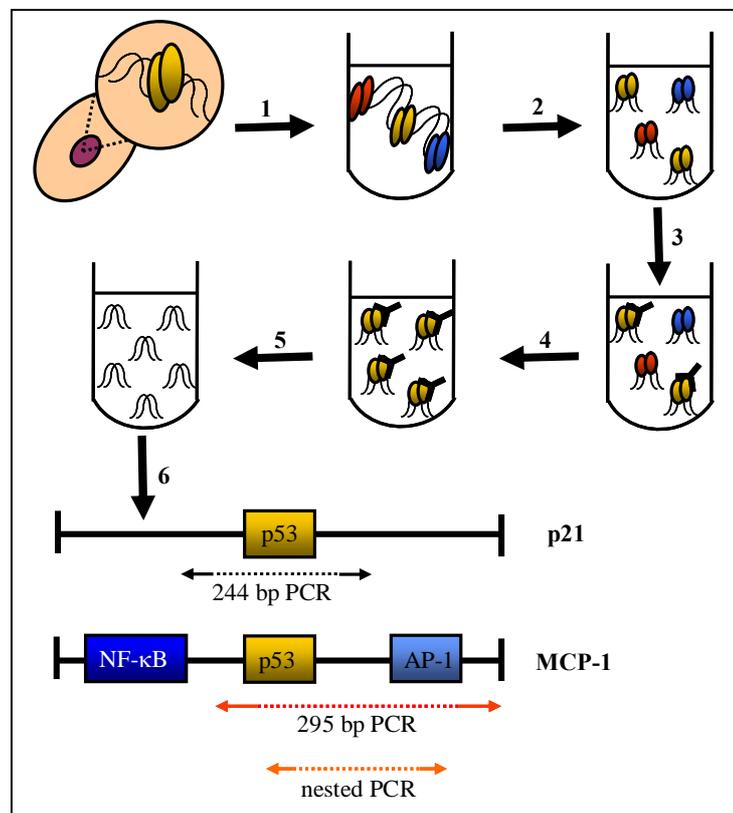


Abbildung 3.5-1: Schematische Darstellung des p53-Chromatin-Immunopräzipitations- (ChIP) Assays. (1) Die DNA-Protein- und Protein-Protein-Komplexe wurden durch Formaldehyd quervernetzt. (2) Anschließend wurden die Proben einer Ultraschallbehandlung unterzogen, um die DNA in Bruchstücke zu scheren. (3) Durch die Zugabe des p53-Antikörpers erfolgte die Immunopräzipitation. (4) Die Antikörper-gebundenen DNA-Protein- und Protein-Protein-Komplexe wurden mit Hilfe von Protein A-Agarose isoliert. (5) Die Quervernetzung der DNA-Protein-Komplexe wurde durch die Behandlung mit 5 M NaCl und Erwärmen der Proben aufgehoben und die ungebundenen Proteine durch die Zugabe von Proteinase K verdaut. (6) Die aufgereinigte DNA wurde in der PCR eingesetzt. (244 bp PCR): Als Positiv-Kontrolle diente eine PCR, die spezifisch für einen 244 bp großen Bereich um die p53-Bindungsstelle in dem p21-Enhancer ist; (295 bp PCR): PCR spezifisch für einen 295 bp großen Bereich um die p53-Bindungsstelle in dem MCP-1-Enhancer; (nested PCR): MCP-1 nested PCR.

Um diese Frage zu beantworten wurden p53-Chromatin-Immunopräzipitations- (ChIP) Assays durchgeführt, deren einzelne Schritte schematisch in Abbildung 3.5-1 dargestellt sind.

3.5.1 Optimierung der Scherungsbedingungen

Für Chromatin-Immunopräzipitations- (ChIP) Assays muss das isolierte Chromatin in Fragmente zwischen 200 bp und 1500 bp geschert werden (Abb. 3.5-1 Schritt 2). Dieses kann sowohl durch einen Verdau der chromosomalen DNA mit einem Enzymcocktail, als auch durch eine Ultraschallbehandlung erzielt werden. Für die hier gezeigten Chromatin-Immunopräzipitations- (ChIP) Assays wurde das zweite Verfahren gewählt. Um die optimalen Bedingungen für die Scherung des Chromatins mittels Ultraschall, die sowohl von der Zelllinie als auch von der Zellzahl abhängen, auszutesten, wurden 4Bv Zellen für 5 h bei 32°C kultiviert. Anschließend wurden die DNA-Protein- und Protein-Protein-Komplexe in den 4Bv Zellen durch Formaldehyd quervernetzt. Die 4Bv Zellen wurden geerntet, lysiert und anschließend wurde das Chromatin für unterschiedliche Zeitwerte einer Ultraschallbehandlung unterzogen.

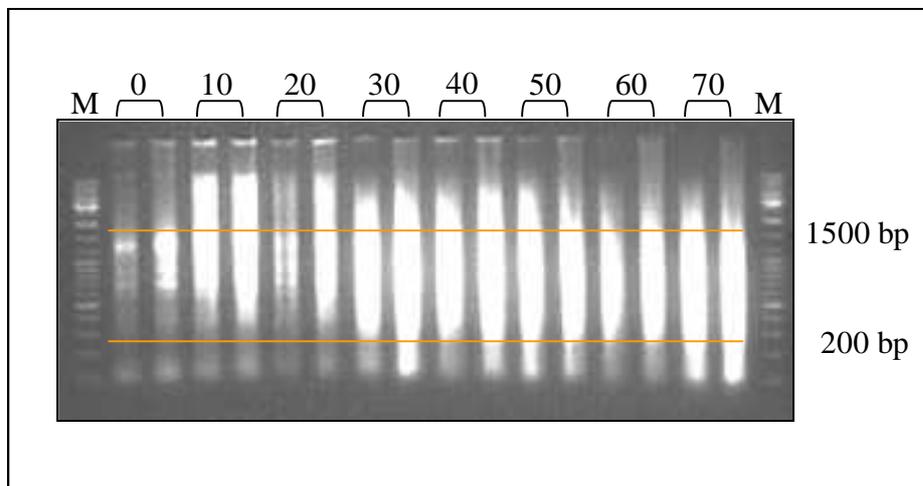


Abbildung 3.5.1-1: Optimierung der Scherungsbedingungen der chromosomalen DNA durch Ultraschall für Chromatin-Immunopräzipitations- (ChIP) Assays. 4Bv Zellen kultiviert für 5 h bei 32°C wurden nach der Fixierung der DNA-Protein- und Protein-Protein-Komplexe mittels Formaldehyd geerntet und für unterschiedliche Zeitwerte mit Ultraschall behandelt. Die DNA wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert und jeweils 20 % (v/v) und 40 % (v/v) der Gesamtmenge an DNA auf einem 2 %-igem (w/v) Agarosegel aufgetragen. Zellen behandelt mit Ultraschall (30 %-iger Arbeitspuls bei Leistungsstufe 2) für (0): 0 s; (10): 10 s; (20): 20 s, (30): 30 s, (40): 40 s, (50): 50 s, (60): 60 s, (70): 70 s; (M): DNA-Größenstandard.

Abb. 3.5.1-1 zeigt ein 2 %-iges (w/v) Agarosegel auf dem die DNA, nach der Ultraschallbehandlung und Auflösung der quervernetzten DNA-Protein- und Protein-

Protein-Komplexe aufgetragen wurde. Es lässt sich deutlich erkennen, wie die Größe der DNA Bruchstücke mit der Dauer der Ultraschallbehandlung abnimmt. Für einen Zeitwert von 60 s bei einem 30 %-igen Arbeitspuls der Leistungsstufe 2 wurde die DNA für die in den Chromatin-Immunopräzipitations- (ChIP) Assays benötigten Länge von 200 bp bis 1500 bp großen Fragmente gesichert. Für nachfolgende p53 Chromatin-Immunopräzipitations- (ChIP) Analysen wurden daher alle Ultraschallbehandlung unter diesen Bedingungen durchgeführt.

3.5.2 p53 bindet an die 5'-Enhancer-Region des *MCP-1*-Gens *in vivo*

Um zu untersuchen, ob p53 mit der MCP-1-Enhancer-Sequenz, die eine modifizierte p53-DNA-Bindungsstelle beinhaltet, *in vivo* interagiert, wurden 4Bv Zellen bei 37°C oder unter der permissiven Temperatur kultiviert, anschließend für 5 h mit TNF- α behandelt und in einem p53-Chromatin-Immunopräzipitations- (ChIP) Assay eingesetzt. Nach der Formaldehyd-Fixierung und Scherung des Chromatins mittels Ultraschall wurden die Proben mit einem polyklonalen Antikörper gegen p53 und die Kontrollen ohne Antikörper oder mit Kaninchen IgG immunopräzipitiert. Als Positiv-Kontrolle wurde eine PCR entwickelt, die ein 244 bp (-2628/-2872) großes Fragment um die p53-Bindungsstelle im humanen p21-Promotor generiert (Abb. 3.5.2-1A). Ein deutliches PCR-Signal für p21-Chromatin konnte nach Kultivierung der 4Bv Zellen bei 32°C beobachtet werden, unabhängig von einer Stimulation der Zellen mit TNF- α (Abb. 3.5.2-1B). Der Abgleich mit den input-Kontrollen zeigt, dass die Regulation von p21 spezifisch ist und das ChIP-Assay spezifische Signale generiert.

Abb. 3.5.2-1A gibt die Primer-Paare an, die in den p53-Chromatin-Immunopräzipitations- (ChIP) Assays für die Untersuchung der MCP-1-Enhancer-Sequenz eingesetzt wurden. Für den p53-ChIP-Assay des MCP-1-Enhancers wurde zuerst ein 295 bp (-2247/-2542) großes DNA-Fragment mit Hilfe der PCR generiert und anschließend eine nested-PCR (-2289/-2496) durchgeführt (Abb. 3.5-1 und Abb. 3.5.2-1A).

Wie aus Abb. 3.5.2-1B ersichtlich, wurde MCP-1-Chromatin nur mit p53-Antikörpern aus 4Bv Zellen kultiviert bei 32°C und stimuliert mit TNF- α spezifisch immunopräzipitiert.

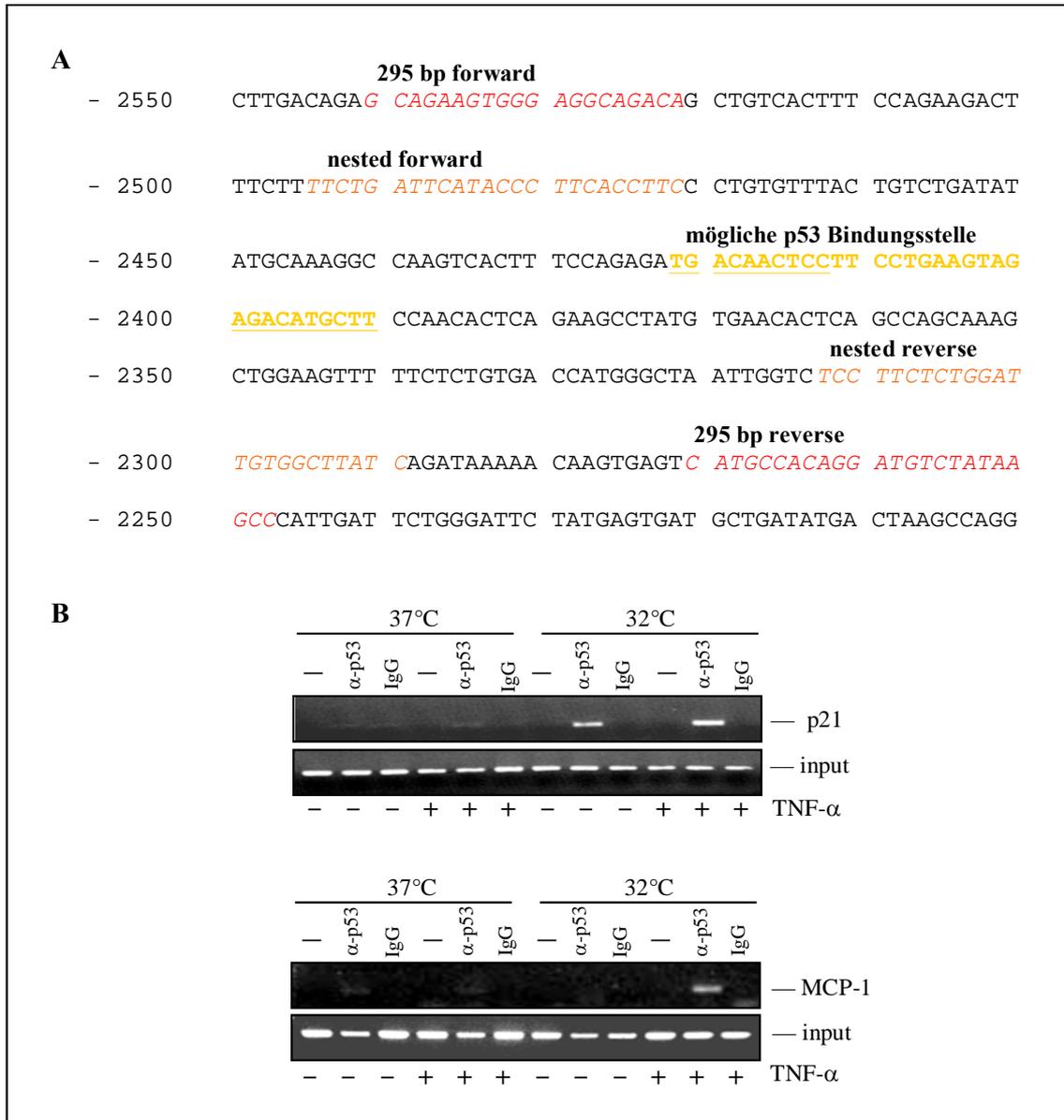


Abbildung 3.5.2-1: p53 bindet an die 5'-Enhancer-Region des *MCP-1*-Gens *in vivo*. (A) DNA-Sequenz der 5'-regulatorischen Region des *MCP-1*-Gens (-2550/-2250) mit den spezifische Primer-Paaren, die in dem Chromatin-Immunopräzitations-(ChIP) Assay eingesetzt wurden. (B) 4Bv Zellen (37°C und 32°C) wurden mit TNF- α für 5 h behandelt und, wie in Materialien und Methoden beschrieben, für Chromatin-Immunopräzitations-(ChIP) Assays geerntet. Die Proben wurden mit keinem Antikörper (-), p53-Antikörper (α -p53) oder Kaninchen IgG (IgG) immunopräzipitiert. Gesamtllysate wurden als Kontrolle für die PCR-Amplifikation eingesetzt (input). Bindung von p53 wurde unter der Verwendung von MCP-1-spezifischen Primern getestet. Als Positiv-Kontrolle diente eine p21-PCR, die spezifisch für einen 244 bp großen Bereich um die p53-Bindungsstelle in der 5'-Enhancer-Region des *p21*-Gen ist. (295 bp forward/295 bp reverse; rot): Primerpaar für die MCP-1-PCR, die spezifisch für einen 295 bp großen Bereich um die p53-Bindungsstelle in der 5'-Enhancer-Region des *MCP-1*-Gens ist (nested forward/nested reverse; orange): Primerpaar für die MCP-1 nested PCR; (-): unbehandelte Kontrollen; (+): Zellen behandelt für 5 h mit 250 U/mL TNF- α .

Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass p53 auch *in vivo* mit der im Enhancer des *MCP-1*-Gens identifizierten p53-Bindungsstelle nach Stimulation mit TNF- α interagiert.

4 DISKUSSION

Die fundamentale Rolle von MCP-1 und dessen Rezeptor CCR2 bei der Anlockung und Aktivierung von Monozyten in verschiedenen, durch entzündliche Prozesse hervorgerufenen Krankheiten, wie Multiple Sklerose (MS), Rheumatische Arthritis (RA) und Arteriosklerose, macht dieses Chemokin zu einem idealen Ziel für therapeutische Ansätze (Daly und Rollins, 2003). Für die Entwicklung einer anti-inflammatorischen Therapie ist insbesondere die Wechselwirkung des Chemokins mit seinem Rezeptor und die Chemokin/Glykoaminoglykan-Interaktionen, die für die durch Chemokine vermittelte Zellmigration wichtig sind, von Bedeutung (Johnson *et al.*, 2004; Wells *et al.*, 2006). Aus pharmazeutischer Sicht gibt es prinzipiell drei verschiedene Wege, diese Interaktionen zu unterbinden. Diese sind so genannte „small molecule“-Antagonisten, inhibitorische Peptide als auch Antikörper gerichtet gegen das entsprechende Chemokin und/oder dessen Rezeptor (Daly und Rollins, 2003). Zusätzlich erscheint es aber für einen therapeutischen Ansatz interessant zu sein, den Mechanismus der transkriptionellen Regulation des *MCP-1*-Gens zu verstehen (Ueda *et al.*, 1994). Hieraus würde sich die Möglichkeit ergeben, spezielle chemische Inhibitoren zu entwickeln, die in die transkriptionelle Regulation von MCP-1 eingreifen und dadurch dessen biologische Funktionen blockieren.

Bereits in früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Induktion des *MCP-1*-Gens durch TNF- α hauptsächlich auf der Ebene der Initiation der Transkription liegt und nicht posttranslational, etwa durch selektive Labilisierung der mRNA (Finzer *et al.*, 2000). Der 5'-regulatorische Bereich des *MCP-1*-Gens bis 3,8 kb „upstream“ zum Transkriptionsstart wurde bereits zum Teil charakterisiert (Ueda *et al.*, 1994). Anhand transienter Transfektionen wurde gezeigt, dass die Induktion des Reportergens durch einen 5'-Enhancer (2,2 bis 2,7 kb „upstream“ zur Initiations-Startstelle) mitgesteuert wird (Ueda *et al.*, 1994). Zusätzlich gehört dieser Sequenzbereich zu einer DNaseI-hypersensitive Region (Finzer *et al.*, 2000). Durch die bioinformatische Analyse, dieser für die Regulation bedeutsamen 5'-Region des *MCP-1*-Gens, wurde die Existenz der bereits bekannten und charakterisierten Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 bestätigt.

Die Sequenz, welche die beiden NF- κ B-Bindungsstellen beinhaltet, besitzt eine hohe Homologie in dem humanen und murinen *MCP-1*-Gen. Diese hohe Homologie der Sequenz weist darauf hin, dass die beiden NF- κ B-Bindungsstellen eine

bedeutsame Rolle für die MCP-1-Genregulation spielen. Ping und Mitarbeiter (Ping *et al.*, 1994) konnten zeigen, dass diese beiden Bindungsstellen von NF- κ B in murinen 3T3 Fibroblasten nach einer Stimulation mit TNF- α besetzt werden. Die Bedeutsamkeit der NF- κ B-Bindungsstellen für die Transkription des humanen MCP-1-Gens wurde in mit LPS stimulierten THP Zellen bestätigt (Ueda *et al.*, 1997). Untersuchungen an durch TNF- α -induzierbaren Genen ergaben, dass NF- κ B nicht alleine für die Transaktivierung verantwortlich ist, sondern NF- κ B zusätzliche, kooperative Interaktionen mit anderen Faktoren eingeht, welche für die Expression dieser Gene erforderlich sind (Mackman, 1995; Collins *et al.*, 1995).

Als einen solchen Faktor wurde AP-1 für das murine MCP-1-Gen, unter Verwendung von „antisense“-DNA oder Inhibitoren gerichtet gegen c-jun und c-fos, identifiziert (Hanazawa *et al.*, 1993, 1994). Martin und Mitarbeiter (Martin *et al.*, 1997) konnten zeigen, dass in humanen Endothelzellen die Expression des MCP-1-Gens nach der Stimulation mit Interleukin- β von einer kooperativen Interaktion zwischen AP-1 und NF- κ B abhängt. Neben diesen bereits bekannten und charakterisierten Bindungsstellen für NF- κ B und AP-1 in der 5'-Region des humanen MCP-1-Gens wurde im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich eine Bindungsstelle für p53 untersucht. El-Deiry und Mitarbeiter (el-Deiry *et al.*, 1992) zeigten, dass die Konsensussequenz der p53-DNA-Bindungsstelle aus zwei Kopien (Dekameren) der Sequenz 5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3' (Pu=Purin; Py=Pyrimidin) besteht, die durch 0 bis 13 Basenpaaren voneinander getrennt sind. Die Zusammensetzung der p53-Konsensussequenz lässt theoretisch eine Vielzahl von möglichen p53-DNA-Bindungsstellen zu, da nur zwei von zehn Basen (C an Position 4 und G an Position 7) konserviert sind. Ein Vergleich der „perfekten“ Sequenz mit der p53-DNA-Bindungsstelle in verschiedenen Promotoren von p53-Zielgenen verdeutlicht, dass diese von der Konsensussequenz erheblich abweichen. In vielen Promotoren entspricht nur ein Dekamer der p53-Konsensussequenz, wohingegen die übrigen Dekamere in unterschiedlichem Ausmaß von dieser Sequenz abweichen. Dieses ist für z.B. *bax1* und *msh2* der Fall (Miyashita und Reed, 1995; Scherer *et al.*, 1996). Zahlreiche p53-DNA-Bindungsstellen sind nicht nur aus zwei Dekameren, wie in den Promotoren der Gene *p21*, *pcna* und *msh2* (el-Deiry *et al.*, 1993; Morris *et al.*, 1996; Scherer *et al.*, 1996) zusammengesetzt, sondern bestehen aus mehreren Dekameren. Dieses trifft z.B. auf die Gene *mdm2* und *egf-r* zu (Juven *et al.*, 1993; Deb *et al.*, 1994). Der Grund für die Sequenzvariabilität innerhalb der p53-

DNA-Bindungsstellen und deren unterschiedlichen Zusammensetzung ist nicht vollständig geklärt, da diese Heterogenität nicht mit der hohen Spezifität der p53-DNA-Interaktion vereinbar ist. In verschiedenen Arbeiten (Kim *et al.* 1997, Espinosa und Emerson, 2001; Kim und Deppert, 2003) wurde jedoch diskutiert, ob diese Variabilität dazu beiträgt konformationell flexible p53-DNA-Bindungsstellen zu gewährleisten. Es wurde postuliert, dass nicht nur die Anwesenheit einer spezifischen Sequenz, sondern auch strukturelle Eigenschaften der p53-DNA-Bindungsstelle einen essentiellen Faktor für die Interaktion von p53 mit seinem spezifischen DNA-Bindungsmotiv darstellen (Kim *et al.*, 1997; Kim und Deppert, 2003).

Das im 5'-Enhancer des *MCP-1*-Gens identifizierte p53-Bindungsmotiv zeigt eine hohe Homologie (18 bp von 20 bp) zu der von el-Deiry und Mitarbeitern (el-Deiry *et al.*, 1992) beschriebenen DNA-Konsensussequenz für p53.

4.1 Einfluss der Suppression von p53 auf die TNF- α -vermittelte Induktion des *MCP-1*-Gens

Um eine mögliche Beteiligung von p53 an der durch TNF- α -induzierten MCP-1-Genexpression zu untersuchen, wurden in einem ersten Ansatz A172 Zellen für diese Fragestellung verwendet. In A172 Zellen kann durch LPS, IL-1 β , TPA sowie TNF- α die MCP-1-mRNA stark induziert werden. Ueda und Mitarbeiter (Ueda *et al.*, 1994) führten in diesen Zellen Untersuchungen durch, die zur Identifikation des 5'-regulatorischen Elements von *MCP-1* sowie zur Charakterisierung der beiden NF- κ B Bindungsstellen führte. Da in A172 Zellen bereits diese grundlegenden Mechanismen der MCP-1-Genregulation analysiert worden sind, stellten sie ein geeignetes Modellsystem dar, um weitere an der Regulation beteiligte Faktoren zu identifizieren und zu charakterisieren. A172 Zellen sind p53 positiv. Weller und Mitarbeiter (Weller *et al.*, 1998) zeigten, dass diese Zellen wtp53 exprimieren. In der Literatur werden aber auch A172 Zellen beschrieben, die p53 mit einer Mutation an Codon 242 (Cys/Phe) besitzen (Gomez-Manzano *et al.*, 1996). Durch Doxorubizin und Etoposid konnte, in den in dieser Arbeit verwendeten A172 Zellen, p53 induziert werden (Daten nicht gezeigt). Dieses liefert einen ersten Hinweis, dass in diesen A172 Zellen wtp53 exprimiert wird, da mutiertes p53 durch verschiedene Mechanismen stabilisiert wird (Selivanova *et al.*, 2005) und daher häufig durch

Chemotherapeutika, wie Doxorubizin und Etoposid nicht induziert werden kann (Bunz *et al.*; 1999; Geisler *et al.*, 2001). Einen genaueren Aufschluss über den p53-Status in den verwendeten A172 Zellen kann jedoch nur durch Sequenzanalysen erzielt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst p53 in A172 Zellen spezifisch supprimiert und dadurch dessen Einfluss auf die MCP-1-Genexpression nach Stimulation mit TNF- α aufgezeigt. Hierfür wurde zum einen der von Komerov und Mitarbeitern (Komaraov *et al.*, 1999) entwickelte chemische p53-Inhibitor Pifithrin- α eingesetzt. Pifithrin- α schützt wtp53 Zellen vor durch Bestrahlung und verschiedenen zytotoxischen Substanzen, wie Doxorubizin, Etoposid, Taxol und AraC, induzierte Apoptose. Ursprünglich wurde Pifithrin- α jedoch als eine Substanz isoliert, die die p53-abhängige transkriptionelle Aktivierung hemmt (Komarov *et al.*, 1999). Verschiedene Arbeiten zeigten, dass Pifithrin- α die Transaktivierung von p53-abhängigen Genen, wie *p21*, *mdm2*, *Cyclin G* und *Bax*, supprimiert (Komarov *et al.*, 1999, Tomasevic *et al.*, 1999, Tamagno *et al.*, 2003). Durch die Behandlung von A172 Zellen mit Pifithrin- α ließ sich zunächst die Induktion des MCP-1-Gens durch TNF- α vermindern, jedoch zeigte sich in weiteren Versuchsansätzen mit variablen Konzentrationen sowie veränderten Inkubationszeiten an Pifithrin- α und TNF- α , dass dieses Ergebnis nicht konsistent ist. Ein möglicher Grund hierfür kann die Instabilität von Pifithrin- α in Zellkulturmedien sein, da es sich in diesen rasch in sein planares, trizyklisches Derivat Pifithrin- β mit stark veränderten, strukturellen sowie physikochemischen Eigenschaften umlagert (Walton *et al.*, 2005). Des Weiteren bildet Pifithrin- α in den eingesetzten Konzentrationen in wässrigen Lösungen Präzipitate aus, so dass es hierdurch nicht mehr in einer ausreichend hohen Dosis vorliegt, um die p53-abhängige Transaktivierung zu beeinflussen (Gary und Jensen, 2005, Walton *et al.*, 2005). Interessanterweise konnte unter Bedingungen, unter denen es zu einer herabgesetzten Induktion des MCP-1-Gens durch TNF- α nach der Behandlung mit Pifithrin- α kam, keine verminderte *p21*-Expression erzielt werden, wodurch ein spezifischer, inhibitorischer Effekt von Pifithrin- α auf die p53-abhängige Transaktivierung des MCP-1-Gens zusätzlich fraglich erscheint. Ebenfalls keinen Einfluss von Pifithrin- α auf die p53-abhängige Transkription des *p21*-Gens wurde von Walton und Mitarbeiter (Walton *et al.*, 2005) in wtp53-positiven A2780 und HCT116 Zellen, behandelt mit UV-Strahlung, beobachtet. Zusätzlich wurde berichtet, dass

Pifithrin- α keinen Einfluss auf die Aktivierung von NF- κ B durch TNF- α ausübt (Komarova *et al.*, 2003), so dass die verminderte Induktion des *MCP-1*-Gens durch TNF- α nach der Behandlung mit dem p53-Inhibitor dadurch nicht erklärt werden kann.

Daher wurde alternativ zu der Inhibierung von p53 in A172 Zellen mittels Pifithrin- α , die Expression an p53-Protein spezifisch durch den Einsatz von so genannter „small interfering RNA“, gerichtet gegen p53-Transkripte, gehemmt. Hierbei wurde das von Brummelkamp und Mitarbeitern (Brummelkamp *et al.*, 2002) entwickelte pSUPER-Vektorsystem, das die direkte Synthese von siRNA in Säugetierzellen ermöglicht, verwendet. Die durch den pSUPER-Vektor vermittelte Expression von siRNA verursachte eine effiziente und spezifische Suppression der p53-Genexpression, wodurch eine funktionelle Inaktivierung deren Zielgene erreicht werden kann. Durch die transiente Transfektion der A172 Zellen mit p53siRNA wurde die Expression an p53-Protein fast vollständig gehemmt. Diese Inhibierung der p53-Transkription durch pSUPER-siRNA führte zu einer signifikanten Abnahme der Induktion des *MCP-1*-Gens durch TNF- α , so dass daraus geschlossen werden konnte, dass p53 an der Regulation des *MCP-1*-Gens beteiligt ist.

4.2 Induktion des *MCP-1*-Gens durch TNF- α in p53-negativen Zellen

Nachdem durch die Suppression von p53 eine deutlich verminderte transkriptionelle Aktivität des *MCP-1*-Gens nach Stimulation mit TNF- α gezeigt wurde, ergab sich die Frage, wie sich die Induktion des *MCP-1*-Gens durch TNF- α in p53-negativen Zellen verhält.

Ein Vergleich der *MCP-1*-Induktion mittels TNF- α in p53-negativen Saos-2 Zellen zu p53-positiven A172 Zellen ergab, dass das *MCP-1*-Gen in diesen Zellen durch TNF- α induzierbar ist, aber deutlich schwächer, als dieses in A172 Zellen zu beobachten war.

Durch das Einbringen von wtp53 mittels transiente Transfektion konnte die Expression des *MCP-1*-Gens durch TNF- α in Saos-2 Zellen nur schwach erhöht werden. Saos-2 Zellen exprimierten nach der transienten Transfektion wtp53; fraglich bleibt, ob das eingebrachte p53 in den Zellen zu seiner transkriptionell aktiven Form prozessiert wird.

Um auszuschließen, dass das exogen exprimierte p53 in den Saos-2 Zellen möglicherweise transkriptionell nicht aktiv war, und dadurch die Induktion des *MCP-1*-Gens mittels TNF- α nicht beeinflussen konnte, wurden Saos-2-Tet-hp53 Zellen (Ryan *et al.*, 2000) ebenfalls getestet. In diesen, mit einem Tetrazyclin- (Tet) abhängigen Expressionssystem für humanes wtp53-stabil transfizierten, Saos-2 Zellen kann durch die Zugabe von Doxycyclin die exogene Expression an p53 spezifisch induziert werden. In Saos-2-Tet-hp53 Zellen wurde durch die Aktivierung von p53 die TNF- α -vermittelte Induktion des *MCP-1*-Gens nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt).

Zahlreiche Arbeiten zum Einfluss von p53 auf die p53-abhängige Transkription von Genen wurden in Saos-2 Zellen erstellt (Morimoto *et al.*, 2002; Schwartzberg-Bar-Yoseph *et al.*, 2003), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Signaltransduktionswege, die benötigt werden, um die grundlegende transkriptionelle Aktivität über die Phosphorylierung des N-Terminus und Acetylierung der carboxyterminalen Domäne von p53 zu steuern, intakt sind. Espinosa und Mitarbeiter (Espinosa *et al.*, 2003) haben gezeigt, dass die Rekrutierung von Faktoren der basalen transkriptionellen Maschinerie, die für die p53-abhängige Transkription benötigt werden, sowohl stress- wie auch promotorspezifisch sind. Daher besteht die Möglichkeit, dass in Saos-2 Zellen ein wichtiger Faktor für die p53-abhängige durch TNF- α -vermittelte *MCP-1*-Genexpression fehlt und dadurch p53 keinen Einfluss auf die Transkription des *MCP-1*-Gens in diesen Zellen ausübt.

p53 kann durch TNF- α über die p38 MAPK am N-Terminus an Serin389 phosphoryliert werden, wodurch die DNA-Bindungsfähigkeit sowie die transkriptionelle Aktivität von p53 verstärkt wird (Sayed *et al.*, 2000). Des Weiteren erfolgt durch TNF- α über p38 MAPK die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1, der für die *MCP-1*-Genexpression essentiell ist (Hanazawa *et al.*, 1993, 1994; Baud und Karin, 2001). Ein Vergleich der Expression von p38 MAPK und deren Phosphorylierung nach der Stimulation mit TNF- α in Saos-2 Zellen zu A172 Zellen zeigte auf, dass in beiden Zellen gleiche Mengen an p38 MAPK exprimiert, p38 MAPK aber in Saos-2 Zellen scheinbar in geringerem Umfang phosphoryliert wurde. Möglicherweise könnte daher eine Störung des TNF-Signaltransduktionsweges vorliegen und damit erklären, warum in Saos-2 Zellen im Gegensatz zu A172 Zellen *MCP-1* durch TNF- α in geringerem Maße

induziert wurde und durch die exogene Expression von p53 in diesen Zellen die *MCP-1*-Transaktivierung nicht beeinflusst wurde.

4.3 Temperatursensitives Zellsystem zur Untersuchung der Rolle von p53 in der TNF- α -vermittelten Induktion des *MCP-1*-Gens

Um einen tieferen Einblick in die p53-vermittelte Induktion des *MCP-1*-Gens durch TNF- α zu erhalten, wurden in dieser Arbeit als ein weiteres Zellsystem p53-negative Hep3B Zellen (Bressac *et al.*, 1990) verwendet, die mit einer temperatursensitiven p53-Variante (p53val135) stabil transfiziert sind (Friedman *et al.*, 1997): In 4Bv Zellen kultiviert unter der permissiven Temperatur von 32°C, liegt p53val135 in seinem funktionell aktiven wtp53-Phänotyp vor, welches durch die Induktion der p53-abhängigen Expression des p21-Proteins unabhängig von einer Stimulation der Zellen mit TNF- α nachgewiesen wurde. Diese Regulation wurde in unserer Arbeitsgruppe durch Northern Blot Analysen auch auf transkriptioneller Ebene bestätigt (Hacke *et al.*, in preparation). Durch die Aktivierung des wtp53-Phänotyps in 4Bv Zellen konnte eine selektive Induktion des *MCP-1*-Gens durch TNF- α beobachtet werden. Die Expression des „housekeeping“-Gens *GAPDH* wurde weder durch die Aktivierung von p53val135 noch durch die Behandlung mit TNF- α beeinflusst.

Da die Wildtyp-Aktivität von p53 in diesen Zellen für die TNF- α -abhängige *MCP-1*-Genexpression erforderlich ist, stellte sich die Frage, ob diese Funktion ein direkter oder indirekter Effekt des Tumorsuppressors p53 mit seinen vielseitigen Funktionen in der transkriptionellen Regulation, der Zellzykluskontrolle, der Apoptose und der DNA-Reparatur ist (Vogelstein *et al.*, 2000; Gatz und Wiesmüller, 2006). Insbesondere kann durch die Aktivierung von p53 ein Wachstumsarrest in der G1-Phase sowie auch in der G2-Phase des Zellzyklus induzieren (Ko und Prives, 1996). Dieses hängt hauptsächlich mit der transkriptionellen Aktivierung des *p21*-Gens zusammen, welches einen Inhibitor für Cyclin-abhängigen Kinasen („cyclin-dependent kinases“, CDK) codiert (el-Deiry *et al.*, 1993). Durch die Induktion von p21 durch p53 wird das Retinoblastoma Protein (pRB) hypophosphoryliert. Hierdurch kann der Transkriptionsfaktor E2F nicht von pRB dissoziieren und steht daher der Transaktivierung von Genen, die für den Eintritt in die S Phase des Zellzyklus und für die DNA-Synthese benötigt werden, nicht zur Verfügung (Nevins, 1992; Weinberg,

1996). Zusätzlich wird die Expression von p21-mRNA vom Zellzyklus abhängig reguliert (Li *et al.*, 1994). *MCP-1* gehört zu der Gruppe von „immediate early“-Genen (Rollins, 1991), welche von Säugerzellen exprimiert werden, wenn diese durch Stimulation mit Mitogenen aus der G0/G1 Phase in die S-Phase des Zellzyklus übergehen (Thomson *et al.*, 1999). Um auszuschließen, dass die durch TNF- α -vermittelte p53-abhängige Expression des *MCP-1*-Gens in 4Bv Zellen durch solch einen Effekt verursacht wurde, wurde in unserer Arbeitsgruppe die Expression des „immediate early“-Gens *c-myc*, das mit einer ähnlichen Kinetik wie das *MCP-1*-Gen induziert wird (Timmers *et al.*, 1990), untersucht. *c-myc* wurde in 4Bv Zellen unabhängig von der wtp53-Aktivität von p53val135, als auch von einer Stimulation mit TNF- α exprimiert (Hacke *et al.*, in preparation). Dass trotz der massiven Expression von p21 in 4Bv Zellen kein Wachstumsarrest und Apoptose ausgelöst wird, wurde bereits von Friedman und Mitarbeitern gezeigt (Friedman *et al.*, 1997). Eine zusätzliche Zellzyklusanalyse, die ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurde, ergab keinen signifikanten Unterschied in der prozentualen Verteilung der 4Bv Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklus, unter den Bedingungen in denen das *MCP-1*-Gen hoch reguliert wurde (Hacke *et al.*, in preparation). Daher kann die Induktion des *MCP-1*-Gens durch TNF- α in 4Bv Zellen kultiviert unter 32°C, nicht der Akkumulation von Zellen in der G1-Phase zugeschrieben werden. Das Ausbleiben eines Wachstumsarrests kann durch ein nicht-funktionelles Retinoblastoma Protein (pRb) in den parentalen Hep3B erklärt werden. Das Fehlen von Apoptose nach der Aktivierung des wtp53-Phäntoyps von p53val135 wird durch die nicht-Aktivierung von bax bedingt (Friedman *et al.*, 1997), wobei in einigen Zelllinien p53 unabhängig von bax Apoptose induzieren kann (Knudson *et al.*, 1995).

Einen Effekt der Wildtyp-Aktivität von p53val135 auf den TNF- α -Signaltransduktionsweg konnte nicht gezeigt werden. Die p38 MAPK wurde in 4Bv Zellen, unabhängig von der Aktivierung von p53, exprimiert und nach der Behandlung mit TNF- α phosphoryliert. Durch AP-1-DNA-Bindungstudien konnte zusätzlich demonstriert werden, dass AP-1 aus 4Bv Zellen physikalisch mit der AP-1-DNA-Konsensussequenz (Lee *et al.*, 1987) wechselwirken kann (Daten nicht gezeigt). Es wurde eine leichte Induktion der AP-1-DNA-Komplexbildung bei zellulären Kernextrakten isoliert aus 4Bv Zellen kultiviert bei 32°C unabhängig von einer Stimulation mit TNF- α beobachtet. Ob diese, in einem *in vitro*-Experiment

beobachtete, induzierte AP-1-DNA-Komplexbildung tatsächlich einen Einfluss auf die Induktion des *MCP-1*-Gens in 4Bv Zellen ausübt, müssen zum einen weitere DNA-Bindungsstudien, unter Verwendung der AP-1-DNA-Sequenz aus dem MCP-1-Enhancer (Ueda *et al.*, 1994), aber insbesondere *in vivo* Untersuchungen mittels Chromatin-Immopräzipitations- (ChIP) Assays zeigen. AP-1-DNA-Bindungsstudien spiegeln nicht die tatsächliche transkriptionelle Aktivität von AP-1 wider (Karin, 1995). Die Behandlung von 4Bv Zellen mit TNF- α führte sowohl bei 37°C, als auch unter Bedingungen bei denen p53 aktiv ist, zu einer Degradation und Neu-Synthese von I κ B- α . Eine Bindung von NF- κ B aus 4Bv Zellen an die NF- κ B-DNA-Konsensussequenz wurde in NF- κ B-DNA-Bindungsstudien (EMSA) demonstriert.

4.4 Untersuchungen zur physikalischen Interaktion von p53 mit der identifizierten *MCP-1*-p53-Bindungssequenz

Da die Komplexbildung von p53 mit seiner DNA-Konsensussequenz die Voraussetzung für die transkriptionelle Transaktivierung von p53-induzierten Genen ist (Vogelstein *et al.*, 2000) wurde untersucht, ob der direkte Effekt von p53 auf die transkriptionelle Aktivierung von *MCP-1* auf eine physikalische Interaktion von p53 mit der möglichen p53-Erkennungssequenz in dem MCP-1-Enhancer angewiesen ist.

In p53-DNA-Bindungsstudien (EMSA) konnte tatsächlich gezeigt werden, dass wtp53, jedoch nicht mutiertes p53, *in vitro* an die *MCP-1*-p53-Sequenz bindet. Durch „supershift“-Analysen mit verschiedenen p53-Antikörpern DO-1, PAb1801 und PAb421 wurde p53 als das in den Protein-DNA-Komplexen vorhandene Protein identifiziert. Interessanterweise wurde durch PAb421 eine verstärkte p53-DNA-Komplexbildung, jedoch kein „supershift“ beobachtet. Eine mögliche Erklärung hierfür stellt das Phosphorylierungsmuster des baculoviral-exprimierten p53 dar, da das PAb421-Epitop erst nach Dephosphorylierung von Serin376 exponiert wird (Waterman *et al.*, 1998). Ein Vergleich der Intensitäten der „supershift“-Banden weist daraufhin, dass die Affinität von p53 zu der p53-DNA-Bindungsstelle aus dem „ribosomalen gene cluster repeat“ (RGC) etwas größer war, als zu der *MCP-1*-p53-Sequenz. Dieses könnte durch die Sequenzunterschiede im p53-DNA-Bindungsmotiv bedingt sein, da die *MCP-1*-p53-Bindungsstelle sich in 2 bp von der el-Deiry-Sequenz unterscheidet (el-Deiry *et al.*, 1992). Dies beinhaltet ein Austausch

in dem zentralen C(A/T)(T/A)G p53-Submotiv, während hingegen das RGC-Element sich nur in einem flankierenden Nukleotid von der el-Deiry-Sequenz unterscheidet.

Aufgrund der *in vitro* Bindungscharakteristik der wildtyp und mutierten p53-Proteine konnte vermutet werden, dass wtp53 auch stabile Komplexe mit der MCP-1-Sequenz, die aus einem unperfekten (tGACAACTCC) und einem perfekten (AGACATGCTT) Dekamer getrennt durch einen 12 bp großen „spacer“ besteht, ausbildet.

4.5 Untersuchungen zur Interaktion von p53 mit der identifizierten MCP-1-p53-Bindungssequenz *in vivo*: hypothetisches Modell der MCP-1-Genregulation

Nachdem durch p53-DNA-Bindungsstudien (EMSA) eine physikalische Wechselwirkung von p53 mit der identifizierten MCP-1-p53-Bindungsstelle *in vitro* bestätigt wurde, wurde in Chromatin-Immunopräzipitations- (ChIP) Assays untersucht, ob p53 auch *in vivo* mit dem Promotor des MCP-1 Gens interagiert. Interessanterweise wurde MCP-1-Chromatin nur von 4Bv Zellen spezifisch immunopräzipitiert, die mit TNF- α stimuliert wurden. Dieses weist daraufhin, dass der TNF- α -Signaltransduktionsweg nicht nur für die Aktivierung der beiden Haupttranskriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B der MCP-1-Transaktivierung verantwortlich ist, sondern auch in die Bindung von p53 an den MCP-1-Enhancer involviert ist. Dieses wirft die Frage auf, welche Kinase des TNF- α -Signaltransduktionsweges die p53-Bindung vermittelt. In diesem Zusammenhang scheint die p38 MAPK ein interessanter Kandidat darzustellen, da diese wie von Sayed und Mitarbeitern (Sayed *et al.*, 2000) beschrieben, an der TNF- α -vermittelten Aktivierung von p53 beteiligt ist.

Bereits in früheren Studien wurde die Rolle von Koaktivatoren, die Acetylierung von Histonen und die damit verbundenen Veränderungen in der lokalen Chromatinstruktur des MCP-1-Promotors nach der Stimulation mit TNF- α untersucht (Boekhoudt *et al.*, 2003). Bevor das MCP-1-Gen aktiviert wird, ist die 5'-regulatorische Region zugänglich und eine Bindung von NF- κ B möglich, jedoch befindet sich NF- κ B im Zytoplasma. Nach der Behandlung mit TNF- α werden die inhibitorischen Proteine (I κ B), die NF- κ B im Zytoplasma zurückhalten, durch den I κ B Kinase- (IKK) Komplex phosphoryliert, anschließend durch E3 Ubiquitin-Ligase

ubiquitiniert und über das 26S Proteasom degradiert. NF- κ B wird nun in den Nukleus transportiert und kann dort an seine DNA-Konsensussequenzen binden. Die Rekrutierung von NF- κ B an den MCP-1-Promotor wird zusätzlich über die Phosphorylierung und Phosphoacetylierung der inneren „core“-Histone H3 und H4 durch p38 MAPK verstärkt (Cohen, 1997; Saccani *et al.*, 2002). An dem MCP-1-Promotor gebunden, rekrutiert und interagiert NF- κ B mit Koaktivatoren oder Koaktivator-Komplexen, wie CBP/p300. CBP/p300 besitzt eine Histon-Acetyltransferase- (HAT) Aktivität (Gerritsen *et al.*, 1997), durch die die inneren „core“-Histone H4 in der 5'-Enhancerregion des *MCP-1*-Gens acetyliert werden. Dadurch wird das Chromatin geöffnet und die Zusammenlagerung der beteiligten regulatorischen Faktoren zu Multiproteinkomplexen wird ermöglicht (Abb. 4.5-1). Der Koaktivator CBP/p300 kann neben NF- κ B auch mit AP-1 (Rahman *et al.*, 2004) und p53 (Gu *et al.*, 1997) interagieren. Interessanterweise kann p53 durch CBP/p300 an der C-terminalen regulatorischen DNA-Bindungsdomäne acetyliert und dadurch die p53-Bindungsaktivität reguliert werden (Gu und Roeder, 1997). Zusätzlich verstärkt die N-terminale Phosphorylierung von p53 an Serin15 die Bindung zu dem CBP/p300 Koaktivator-Protein (Lambert *et al.*, 1998). Bisher ist nichts über den Einfluss der durch p38 MAPK-vermittelten Phosphorylierung von p53 auf CBP/p300 Interaktionen bekannt. Jedoch wurde eine Aktivierung von p53 durch die p38 MAPK vermittelte Phosphorylierung auf p53-induzierte Gene wie *p21* beschrieben (Kishi *et al.*, 2001). Da die Phosphorylierung von CBP/p300 durch MAPK dessen HAT-Aktivität moduliert (Ait-Si-Ali *et al.*, 1999, Huang und Chen, 2005), könnte dieser Koaktivator-Komplex das Hauptziel der Kinasen des TNF- α -Signaltransduktionsweges sein und über diesen die DNA-Bindung von p53 an den MCP-1-Enhancer gesteuert werden. Insofern könnte p53 eine Komponente eines Multienzymkomplexes sein, welcher als „enhanceosome“ bezeichnet wird und bereits für andere NF- κ B-vermittelte Genexpressionen diskutiert wurde (Thanos und Maniatis, 1992) (Abb. 4.5-1). Ein Zusammenwirken von NF- κ B und p53 auf die transkriptionelle Aktivierung eines Gens wurde kürzlich für Cyclooxygenase-2 (COX-2) beschrieben (Benoit *et al.*, 2006). Die Ausbildung eines „enhanceosome“-Komplexes wurde bereits für die Chemokine CXCL8 (IL-8) und CXCL1 (GRO- α) demonstriert (Richmond, 2002).

Eine p53-abhängige transkriptionelle Regulation eines Chemokins wurde bisher nur für das CX3C-Chemokin Fraktalin, aufgezeigt (Shiraishi *et al.*, 2000).

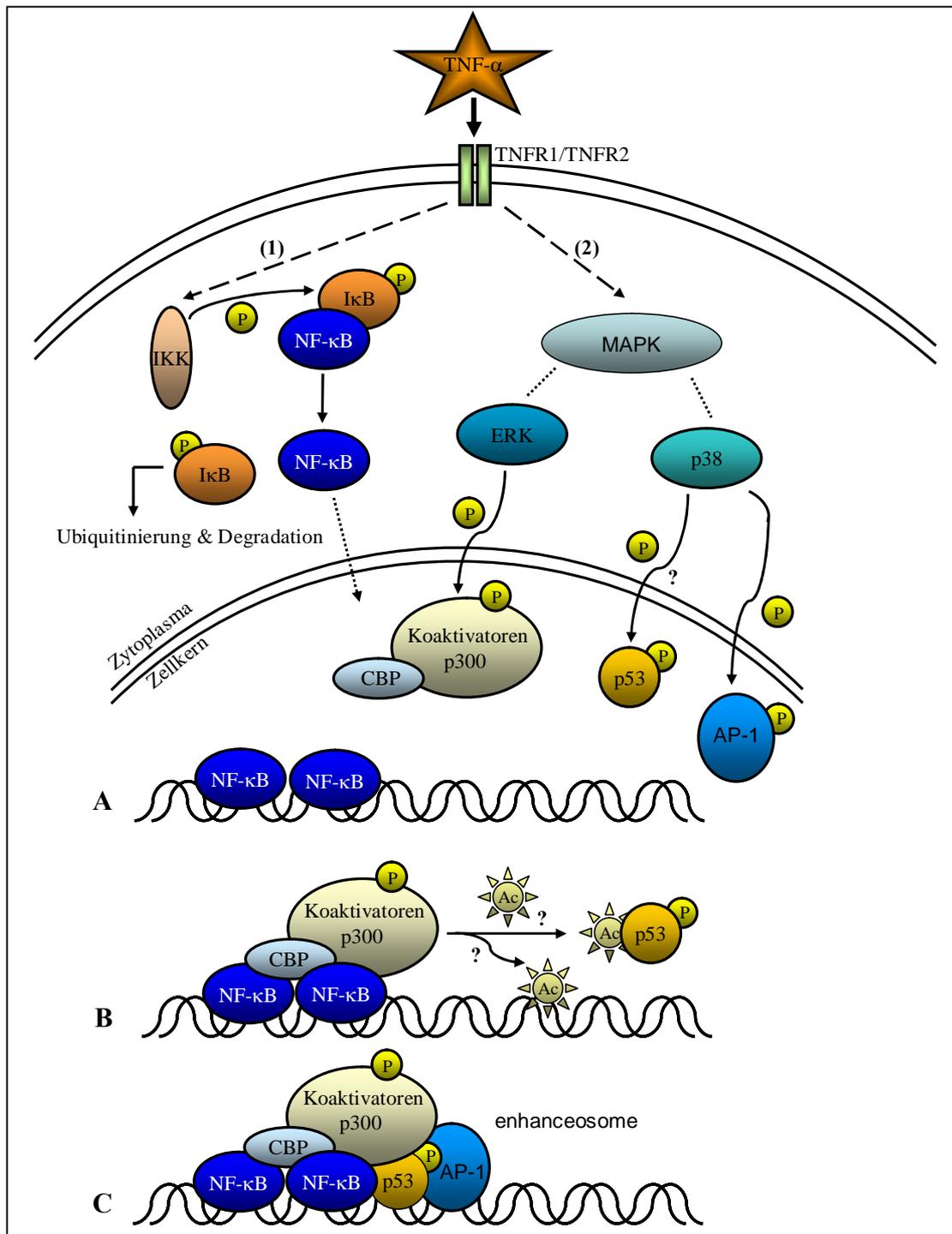


Abbildung 4.5-1: Hypothetisches Modell der Transkriptionsregulation des *MCP-1*-Gens. TNF- α stimuliert über seinen Rezeptoren TNFR1/TNFR2 den IKK- (1) und MAPK- (2) Signaltransduktionsweg. Dieses hat die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 und p53 zur Folge. NF- κ B wird, nach der Phosphorylierung seiner inhibitorischen Proteine (I κ B) durch den I κ B Kinase (IKK) Komplex und deren Ubiquitinierung und Degradation über das Proteasom, aus dem Zytosol in den Zellkern transportiert. (A) Dort bindet NF- κ B an seine DNA-Erkennungssequenzen und rekrutiert CBP/p300. (B) NF- κ B interagiert mit dem Koaktivator-Komplex CBP/p300. CBP/p300 wird durch ERK-MAPK phosphoryliert, wodurch dessen intrinsische Histon-Acetyltransferase- (HAT) Aktivität moduliert werden kann. Der rekrutierte Koaktivator-HAT-Komplex acetyliert „core“-Histone H4, wodurch das Chromatin lokal geöffnet und die Zusammenlagerung von Multiprotein-Komplexen ermöglicht wird. Die DNA-Bindungsaktivität von p53 wird durch die Acetylierung durch CBP/p300 ebenfalls beeinflusst. (C) Ausbildung eines Multiprotein-Komplexes mit p53 als Komponente, welcher als „enhanceosome“ bezeichnet und bereits für andere NF- κ B-vermittelte Genexpressionen beschrieben worden ist [modifiziert nach Rahman *et al.*, 2004].

Die Tatsache, dass das *MCP-1*-Gen direkt von p53 reguliert wird, liefert nicht nur ein neues Modell wie der Tumorsuppressor p53 möglicherweise an der Immunantwort beteiligt ist, sondern liefert auch ein nützliches Modell, um die Vernetzung zwischen p53 und dem TNF- α -Signaltransduktionsweg im Detail zu verstehen.

5 LITERATUR

- Ait-Si-Ali, S., Carlisi, D., Ramirez, S., Upegui-Gonzalez, L.C., Duquet, A., Robin, P., Rudkin, B., Harel-Bellan, A., and Trouche, D.** 1999. Phosphorylation by p44 MAP kinase/Erk1 stimulates CBP histone acetyl transferase activity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **262**: 157-162.
- Alam, R., Lett-Brown, M.A., Forsythe, P.A., Anderson-Walters, D.J., Kenamore, C., Kormos, C., and Grant, J.A.** 1992. Monocyte chemotactic and activating factor is a potent histamine-releasing factor for basophils. *J Clin Invest* **89**: 723-728.
- An, W., Kim, J., and Roeder, R.G.** 2004. Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. *Cell* **117**: 735-748.
- Ard, P.G., Chatterjee, C., Kunjibettu, S., Adside, L.R., Gralinski, L.E., and McMahon, S.B.** 2002. Transcriptional regulation of the mdm2 oncogene by p53 requires TRRAP acetyltransferase complexes. *Mol Cell Biol* **22**: 5650-5661.
- Avantaggiati, M.L., Orgryzko, V., Gardner, K., Giordano, A., Levine, A.S., and Kelly, K.** 1997. Recruitment of p300/CPB in p53-dependent signal pathway. *Cell* **89**: 1175-1184.
- Bakalkin, G., Yakovleva, T., Selivanova, G., Magnusson, K.P., Szekely, L., Kiseleva, E., Kashuba, E., Klein, G., Terenius, L., and Wiman, K.G.** 1995. p53 binds single-stranded DNA ends through the C-terminal domain and internal DNA segments via the middle domain. *Nucleic Acids Res* **23**: 362-369.
- Baldwin, A.S.** 1996. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* **14**: 649-683.
- Balkwill, F.** 2003. Cancer and the chemokine network. *Nature Rev Cancer* **4**: 540-550.
- Baptiste, N., Friedlander, P., Chen, X., and Prives, C.** 2002. The prolin-rich domain of p53 is required for cooperation with anti-neoplastic agents to promote apoptosis of tumor cells. *Oncogene* **21**: 9-21.
- Barlev, N.A., Liu, L., Chehab, N.H., Mansfield, K., Harris, K.G., Halazonetis, T.D., Berger, and Berger, S.L.** 2001. Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell* **8**: 1243-1254.
- Barnes, P. J., and Karin, M.** 1997. Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *New Engl J Med* **336**: 1066-1071.
- Baud, V., Liu, Z.G., Bennet, B., Suzuki, N., Xia, Y., and Karin, M.** 1999. Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev* **13**: 1297-1308.
- Baud, V. and Karin, M.** 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *TRENDS Cell Biol* **11**: 372-377.
- Benoit, V., de Moraes, E., Dar, N.A., Taranchon, E., Bours, V., Hautefeuille, A., Tariere, P., Chariot, A., Scoazec, J.Y., de Moura Gallo, C.V., Merville, M.P., and Hainault, P.** 2006. Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 by tumor suppressor p53 requires NF- κ B. *Oncogene* **25**: 5708-5718.
- Bernardi, R., Scaglioni, P.P., Bergmann, S., Horn, H.F., Vousden, K.H., and Pandolfi, P.P.** 2004. PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol* **6**: 665-672.
- Bernardi, R., and Pandolfi P.P.** 2003. Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death. *Oncogene* **22**: 9048-9057.

- Bernardini, G., Ribatti, D., Spinetti, G., Morbidelli, L., Ziche, M., Santoni, A., Capogrossi, MC, and Napolitano, M.** 2003. Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. *J Immunol Methods* **273**: 83-101.
- Beutler, B., and Grau, G.E.** 1993. Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. *Crit Care Med* **21**: 423-435.
- Bischoff, S.C., Krieger, M., Brunner, T., and Dahinden, C.A.** 1992. Monocyte chemotactic protein-1 is a potent activator of human basophils. *J Exp Med* **125**: 1271-1275.
- Boekhoudt, G.H., Guo, Z., Beresford, G.W., and Boss, J.M.** 2003. Communication between NF- κ B and Sp1 controls histone acetylation within the proximal promoter of the monocyte chemoattractant protein 1 gene. *J Immunol* **170**: 4139-4147.
- Bogdanov, V.Y., Poon, M., and Taubman, M.B.** 1998. Platelet-derived growth factor-specific regulation of the JE promoter in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* **273**: 24932-24938.
- Boisvert, F.M., Kruhlak, M.J., Box, A.K., Hendzel, M.J., and Bazett-Jones, D.P.** 2001. The transcription coactivator CPB is a dynamic component of the promyelocytic leukemia nuclear body. *J Cell Biol* **152**: 1099-1106.
- Bond, G.L., Hu, W., and Levine, A.J.** 2005. Mdm2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting. *Curr Cancer Drug Targets* **5**: 3-8.
- Boyd, S., Tsai, K.Y., and Jacks T.,** 2000. An interact HDM2 RING-finger domain is required for nuclear exclusion of p53. *Nat Cell Biol* **2**: 563-568.
- Bradford, M.M.,** 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-275.
- Bressac, B., Galvin, K.M., Liang, J.T., Isselbacher, K.J., Wands, J.R., and Ozturk, M.** 1990. Abnormal structure and expression of p53 gene in human hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* **87**: 1973-1977.
- Broxmeyer, H.E., and Kim, C.H.,** 1999. Regulation of hematopoiesis in a sea of chemokine family members with a plethora of redundant activities. *Exp Hematol* **27**: 1113-1123.
- Broxmeyer, H.E., Kim, C.H., Cooper, S.H., Hangoc, G., and Hromas, R.** 1999. Effects of CC, CXC, C, and CX3C chemokines on proliferation of myeloid progenitor cells, and insights into SDF-1-induced chemotaxis of progenitors. *Ann NY Acad Sci* **872**: 142-162.
- Brummelkamp, T.R., Bernards, R., and Agami, R.** 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**: 550-553.
- Bulavin, D.V., Saito, S., Hollander, M.C., Sakaguchi, K., Anderson, C.W., Appella, and Formace, A.J.** 1999. Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J* **18**: 845-854.
- Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J.P., Sedivy, J.M., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B.** 1998. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* **282**: 1497-1501.
- Bunz, F., Hwang, P.M., Torrance, C., Waldman, T., Zhang, Y., Dillehay, L., Williams, J., Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B.** 1999. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J Clin Invest* **104**: 263-269.

- Burger, M., Burger, J.A., Hoch, R.C., Oades, Z., Takamori, H., and Schraufstatter, I.U.** 1999. Point mutation causing constitutive signaling of CXCR2 leads to transforming activity similar to Kaposi's sarcoma herpesvirus-G protein-coupled receptor. *J Immunol* **163**: 2017-20022.
- Carr, M.W., Roth, S.J., Luther, E., Rose, S.S., and Springer, T.A.** 1994. Monocyte chemoattractant protein-1 acts as a T-Lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 3652-3656.
- Chan, H.M., and La Thangue, N.B.** 2001. p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds. *J Cell Sci* **114**: 2363-2373.
- Chen, J., Marechal, V., and Levine, A.J.** 1993. Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol* **13**: 4107-4114.
- Chen, C., and Okayama, H.** 1987. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* **8**: 2745-52.
- Church, G.M., and Gilbert, W.** 1984. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci* **81**: 1991-1995.
- Clinton, S.K., and Libby, P.** 1992. Cytokines and growth factors in atherogenesis. *Arch Pathol Lab Med* **116**: 1292-1300.
- Cochran, B.H., Reffel, A.C., and Stiles, C.D.** 1983. Molecular cloning of a gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. *Cell* **33**: 939-947.
- Cohen, P.** 1997. The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends Cell Biol* **7**: 353-361.
- Collins, T., Read, M.A., Neish, A.S., Whitley, M.Z., Thanos, D., and Maniatis, T.** 1995. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine inducible enhancers, *FASEB J* **9**: 899-909.
- Cooper, S., Mantel, C., and Broxmeyer, H.E.** 1994. Myelosuppressive effects *in vivo* with very low dosages of monomeric recombinant murine macrophage inflammatory protein-1 alpha. *Exp Hematol* **22**: 186-193.
- Coutts, A.S., and La Thangue, N.B.** 2005. The p53 response: Emerging levels of co-aktivator complexity. *Biochem Biophys Res Commun* **331**: 778-785.
- Daly, C., and Rollins, B., J.** 2003. Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies. *Microcirculation* **10**: 247-257.
- D'Ambrosio, D., Parina-Bordignon, P., and Sinigaglia, F.** 2003. Chemokine receptors in inflammation: an overview. *J Immunol Methods* **273**: 3-13.
- De Guzman, R.N., Liu, H.Y., Martinez-Yamout, M., Dyson, H.J., and Wright, P.E.** 2000. Solution structure of the TAZ2 (CH3) domain of the transcriptional adaptor protein CBP. *J Mol Biol* **303**: 243-253.
- Deb, S.P., Munoz, R.M., Brown, D.R., Subler, M.A., and, Deb S.** 1994. Wild-type human p53 activates the human epidermal growth factor receptor promotor. *Oncogene* **9**: 1341-1349.
- Dempsey, P.W., Doyle, S.E., He, J.Q., and Cheng, G.** 2003. The signalling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth factor Rev* **14**: 193-209.
- Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M., and Liu, Z.** 2000. The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity* **12**: 419-429.
- Dohmen, R.J.** 2004. SUMO protein modification. *Biochim Biophys Acta* **1695**: 113-131.
- Donato, N.J., and Perez, M.** 1998. Tumor necrosis factor-induced apoptosis stimulates p53 accumulation and p21WAF1 proteolysis in ME-180 cells. *J Biol Chem* **273**: 5067-5072.

- Dornan, D., Wertz, I., Shimizu, H., Arnott, D., Frantz, G.D., Dowd, P., O'Rourke, K., Koeppen, H., and Dixit, V.M.** 2004. The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature* **429**: 86-92.
- Dreyfus, D.H., Nagasawa, M., Gelfand, E.W., and Ghoda, L.Y.** 2005. Modulation of p53 activity by I κ B- α : evidence suggesting a common phylogeny between NF- κ B and p53 transcription factors. *BMC Immunol* **21**: 6-12.
- Dudenhoffer, C., Rohaly, G., Will, K., Deppert, W., and Wiesmuller, L.** 1998. Specific mismatch recognition in heteroduplex intermediates by p53 suggests a role in fidelity control of homologous recombination. *Mol Cell Biol* **18**: 5332-5342.
- Dudenhoffer, C., Kurth, M., Janus, F., Deppert, W., and Wiesmuller, L.** 1999. Dissociation of recombination control from the sequence-specific transactivation function of p53. *Oncogene* **18**: 5773-5784.
- EI-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B.** 1992. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* **1**: 45-49.
- EI-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.
- Espinosa, J.M., and Emerson, B.M.**, 2001. Transcriptional regulation by p53 through intrinsic DNA/chromatin binding and site-directed cofactor recruitment. *Mol Cell* **8**: 57-69.
- Espinosa, J.M., Verdun, R.E., and Emerson, B.M.** 2003. p53 function through stress- and promoter-specific recruitment of transcription initiation components before and after DNA damage. *Mol Cell Biol* **12**: 1015-1027.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B.**, 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**: 6-13.
- Feng, L., Lin, T., Uranishi, H., Gu, W., and Xu, Y.** 2005. Functional analysis of the roles of post-translational modifications at the p53 stability and activity. *Mol Cell Biol* **25**: 5389-5395.
- Fernandez, E.J., and Lolis, E.** 2002. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **42**: 469-499.
- Finlay, C.A., Hinds, P.W., Tan, T.H., Eliyahu, D., Oren, M., and Levine, A.J.**, 1988. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* **8**: 531-539.
- Finzer, P., Soto, U., Delius, H., Patzelt, A., Coy, J.F., Pouska, A., zur Hausen, H., and Rosl, F.** 2000. Differential transcriptional regulation of the monocyte-chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene in tumorigenic and non-tumorigenic HPV 18 positive cells: the role of the chromatin structure and AP-1 composition. *Oncogene* **19**: 3235-3244.
- Fietze, E., Prosch, S., Reinke, P., Stein, J., Docke, W.D., Staffa, G., Loning, S., Devaux, S., Emmrich, F., and von Baehr, R.** 1994. Cytomegalovirus infection in transplant recipients. The role of tumor necrosis factor. *Transplantation* **58**: 675-680.
- Fogh J.M., and Orfeo, T.** 1977. One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* **59**: 221-226.
- Foord, O.S., Bhattacharya, P., Reich, Z., and Rotter, V.A.**, 1991. A DNA binding domain is contained in the C-terminus of wild type p53 protein. *Nucleic Acids Res* **19**: 5191-5198.
- Forster, R., Mattis, A.E., Kremmer, E., Wolf, E., Brem, G., and Lipp, M.**, 1996. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell* **87**: 1037-1047.

- Freter, R.R., Alberta, J.A., Hwang, G. Y., Wrentmore, A.L., and Stiles, C.D.** 1996. Platelet-derived growth factor induction of the immediate-early gene MCP-1 is mediated by NF- κ B and a 90-kDa Phosphoprotein Coaktivator. *J Biol Chem* **271**: 17417-17424.
- Friedman, S.L., Shaulian, E., Littlewood, T., Resnitzky, D., and Oren, M.** 1997. Resistance to p53-mediated growth arrest and apoptosis in Hep 3B hepatoma cells. *Oncogene* **15**: 63-70.
- Fuentes, M.E., Durham, S.K., Swerdel, M.R., Lewin, A.G., Barton, D.S., Megill, J. R., Bravo, R., and Lira, S.A.**, 1995. Controlled recruitment of monocytes/macrophages to specific organs through transgenic expression of MCP-1. *J Immunol* **155**: 5769-5776.
- Gary, R.K., and Jensen, D.A.**, 2005. The p53 inhibitor pifithrin- α forms a sparingly soluble derivative via intramolecular cyclization under physiological conditions. *Mol Pharm* **2**: 462-474.
- Gatz, S.A., and Wiesmuller, L.** 2006. p53 in recombination and repair. *Cell Death Differ.* **13**:1003-1016.
- Gerard, C., and Rollins, B.J.** 2001. Chemokines and diseases. *Nat Immunol* **2**: 108-115.
- Gerritsen, M.E., Williams, A.S., Neish, A. S., Moore, S., Shi, Y., and Collins, T.** 1997. CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc Natl Acad Sci* **94**: 2927-2932.
- Ghoda, L., Lin, X., and Greene, W.C.** 1997. The 90-kDa ribosomal S6 kinase (pp90rsk) phosphorylates the N-terminal regulatory domain of I κ B α and stimulates its degradation in vitro. *J Biol Chem* **272**: 21281-2188.
- Giard, F., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dorsik, H., and Parker, W.P.** 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **51**: 1417-1423.
- Ginsberg, D., Michael-Michalovitz, D., Ginsberg, D., and Oren, M.** 1991. 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.
- Gomez-Manzano, C., Fueyo, J., Kyritsis, A.P., Steck, P.A., Roth, J.A., McDonnell, T.J., Steck, K.D., Levin, V.A., and Yung, W.K.A.** 1996. Adenovirus-mediated transfer of the p53 gene produces rapid and generalized death of human glioma cells via apoptosis. *Cancer Res* **56**: 694-699.
- Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S. E., Scheffner, M., and Del Sal, G.**, 1999. Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO J* **18**: 6462-6471.
- Greenberger, M.J., Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Danforth, J.M., Godman, R.E., and Standiford, T.J.** 1995. Neutralization of Il-10 increases survival in a murine model of Klebsiella pneumonia. *J Immunol* **155**: 722-729.
- Gu, J., Kawai, H., Nie, L., Kitao, H., Wiederschain, D., Jochemsen, A.J., Parant, J., Lozano, G., and Yuan, Z.M.** 2002. Mutual dependence of Mdm2 and Mdmx in their functional inactivation of p53. *J Biol Chem* **277**: 19251-19254.
- Gu, W., and Roeder, R.G.** 1997. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**: 595-606.
- Gu, W., Shi, X. L., and Roeder, R.G.** 1997. Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* **387**: 819-822.
- Guo, A., Salomoni, P., Luo, J., Shih, A., Zhong, S., Gu, W., and Pandolfi, P.P.** 2000. The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* **2**: 730-736.

- Hainaut, P., Hernandez, T., Robinson, A., Rodriguez-Tome, P., Flores, T., Hollstein, M., Harris, C.C., and Montesano, R.** 1998. IARC database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: Updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic Acids Res* **26**: 205-213.
- Halazonetis, T.D., and Kandil, A.N.**, 1993. Conformational shifts propagate from the oligomerization domain of p53 to its tetrameric DNA binding domain and restore DNA binding to select p53 mutants. *EMBO J* **12**: 1021-1028.
- Hanazawa, S., Takeshita, A., Amano, S., Semba, T., Nirazuka, T., Katoh, H., and Kitano, S.** 1993. Tumor necrosis factor- α induces expression of monocyte chemoattractant JE via *fos* and *jun* genes in clonal osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem* **268**: 9526-9532.
- Hanazawa, S., Takeshita, A., and Kitano, S.** 1994. Retinoic acid suppression of *c-fos* gene inhibits expression of tumor necrosis factor- α -induced monocyte chemoattractant JE/MCP-1 in clonal osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem* **269**: 21379-21384.
- Handel, T.M., and Domaille, P.J.** 1996. Heteronuclear (^1H , ^{13}C , ^{15}N) NMR assignments and solution structure of the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) dimer. *Biochemistry* **35**: 6569-6584.
- Harms, K., Nozel, S., and Chen, X.** 2004. The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell Mol Life Sci* **61**: 822-842.
- Hasegawa, H., Nomura, T., and Kohno, M.** 2000. Increased chemokine receptor CCR7/EB11 expression enhances the infiltration of lymphoid organs by adult T-cell leukaemia cells. *Blood* **95**: 30-38.
- Hayden, M.S., and Gosh S.**, 2004. Signalling to NF- κ B. *Genes and Development* **18**: 2195-2224.
- Helenius, A., McCaslin, D., Fries, E., and Tanford, C.** 1979. Properties of detergents. *Methods Enzymol* **56**: 734-749.
- 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.
- Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G., and Goeddel, D.V.** 1996. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* **84**: 299-308.
- Huang, W.C., and Chen, C.C.** 2005. Akt phosphorylation of p300 at Ser-1834 is essential for its histone acetyltransferase and transcriptional activity. *Mol. Cell. Biol* **25**: 6592-6602.
- Hupp, T.R., and Lane D.P.** 1994. Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Curr Biol* **4**: 865-875.
- Hupp, T.R., Meek, D.W., Midgley, C.A., and Lane, D.P.** 1992. Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell* **71**: 875-886.
- Janus, F., Albrechtsen, N., Kruppschild, U., Wiesmuller, L., Grosse, F., and Deppert, W.** 1999. Different regulation of the p53 core domain activities 3'-to-5' exonuclease and sequence specific DNA binding. *Mol Cell Biol* **10**: 2155-2168.
- Jiang, Y., Beller, D.L., Frendl, G., and Graves, D.T.** 1992. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol* **148**: 2423-2428.
- Johnson, Z., Power, C.A., Weiss, C., Rintelen, F., Ji, H., Ruckle, T., Camps, M., Wells, T.N.C., Schwarz, M.K., and Proudfoot, A.E.I.** 2004. Chemokine inhibition – why, when, where, which and how? *Biochem Soc Trans* **32**: 366-376.

- Juven, T., Barak, Y., Zauberman, A., and George, D.L.** 1993. Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene. *Oncogene* **8**: 3411-3416.
- Karin, M.** 1995. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **270**: 16483-16486.
- Karin, M., and Ben-Neriah, Y.** 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* **18**: 621-663.
- Karin, M., Liu, Z., and Zandi, E.** 1997. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* **9**: 240-246.
- Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Craig, R.W.** 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* **51**: 6304-6311.
- Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Thiagalingam, S., Seymour, A., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B.** 1992. Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science* **256**: 827-830.
- Kim, E., Albrechtsen, N., and Deppert, W.** 1997. DNA-conformation is an important determinant of sequence-specific DNA binding by tumor suppressor p53. *Oncogene* **15**: 857-869.
- Kim, E., and Deppert, W.**, 2003. The complex interactions of p53 with target DNA: we learn as we go. *Biochem Cell Biol* **81**: 141-150.
- Kishi, H., Nakagawa, K., Matsumoto, M., Suga, M., Ando, M., Taya, Y., and Yamaizumi, M.** 2001. Osmotic shock induces G1 arrest through p53 phosphorylation at Ser33 by activated p38MAPK without phosphorylation at Ser15 and Ser20. *J Biol Chem* **276**: 39115-39122.
- Knowles B.B., Howe, C.C., and Aden, D.P.** 1980. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* **209**: 497-499.
- Knudson, C.M., Tung, K.S., Tourtellotte, W.G., Brown, G.A., and Korsmeyer, S.J.** 1995. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* **270**: 96-99.
- Ko, L.J., and Prives, C.** 1996. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* **10**: 1054-1072.
- Koch, A.E., Kunkel, S.L., Harlow, L.A., Johnson, B., Evanoff, H., Haines, G.K., Burdick, M.D., Pope, R.M., and Strieter, R.M.** 1992. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* **90**: 772-779.
- Koch, A.E., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Harlow, L.A., DiPietro, L.A., Elner, V.M., Elner, S.G., and Strieter, R.M.** 1992. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* **258**: 1798-1801.
- Komarov, P.G., Komarova, E.A., Kondratov, R.V., Christov-Tselkov, K. Coon, J.S., Chernov, M.V., and Gudkov, A.V.** 1999. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. **285**: 1651-1653.
- Komarova, E.A., Neznanov, N., Komarov, P.G., Chernov, M.V., Wang, K., and Gudkov, A.V.** 2003. p53 inhibitor Pifithrin- α can suppress heat shock and glucocorticoid signaling pathways. *J Biol Chem* **278**: 15465-15468.
- Koshiba, T., Hosotani, R., and Miyamoto, Y.** 2000. Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin Cancer Res* **6**: 3530-3535.
- Kuo, M., and Allis, C.D.** 1999. In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic protein:DNA associations in a chromatin environment. *Methods* **19**: 425-433.

- Kunsch, C., Ruben, S.M., and Rosen, C.A.** 1989. Selection of optimal kappaB/RelDNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF-kappaB with DNA is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **12**: 4412-4421.
- Kyhse-Andersen J.**, 1984. Electroblotting of multiple gels: simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**: 203-209.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laing, K.,J., and Secombes, C.J.** 2004. Chemokines. *Develop Comp Immunol* **28**: 443-460.
- Lambert, P.F., Kashanchi, F., Radonovich, M.F., Shieckhattar, R., and Brady, J.N.** 1998. Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP. *J Biol Chem* **273**: 33048-33053.
- Lane, D.P., and Crawford, L.V.** 1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* **278**: 261-263.
- Lane, D.P.** 1992. Cancer. p53, guardian of the genome [news; comment]. *Nature* **358**: 15-16.
- Le, Y., Zhou, Y., Iribarren, P., and Wang, J.M.** 2004. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cell Mol Immun* **1**: 95-104.
- Lee, W., Mitchell, W. and Tjian, R.** 1987. Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* **49**: 741-752.
- Legube, G., Linares, L.K., Tyteca, S., Caron, C., Scheffner, M., Chevillard-Briet, M., and Trouche, D.** 2004. Role of the histone acetyltransferase Tip60 in the p53 pathway. *J Biol Chem* **279**: 44825-44833.
- Leng, P.R., Lin, Y., Ma, W., Wu, H., Lemmers, B, Chung, S., Parant, J.M., Lozano, G., Hakem, R., and Benchimol, S.,** 2003. Pirh2, a p53-induced ubiquitin-protein ligase, promotes p53 degradation. *Cell* **112**: 779-791.
- Li Y., Jenkins, C.W., Nichols, M.A., and Xiong, Y.** 1994. Cell cycle expression and p53 regulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *Oncogene* **9**: 2261-2268.
- Li, M., Brooks, C. L., Wu-Baer, F., Chen, D., Baer, R., and Gu, W.** 2003. Mono-versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by mdm2. *Science* **302**: 1972-1975.
- Liang, S.H., and Clarke, M.F.** 2001. Regulation of p53 localization. *Eur J Biochem* **268**: 2779-2783.
- Linzer, D.I., and Levine, A.J.** 1979. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* **17**: 43-52.
- Liu, G., Xia, T., and Chen, X.** 2003. The activation domains, the proline-rich domain, and the C-terminal basic domain in p53 are necessary for acetylation of histones on the proximal p21 promotor and interaction with p300/CREB-binding protein. *J Biol Chem* **278**: 33134-33141.
- Liu, G., and Chen, X.** 2006. Regulation of the p53 transcriptional activity. *J Cell Biochem* **97**: 448-458.
- Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V., and Karin, M.** 1996. Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death. *Cell* **87**: 565-576.
- Lu, H., and Levine, A.J.** 1995. Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 5254-5158.

- Lubkowsky, J., Bujacz, C., Domaille, P. J., Handel, T. M., and Wlodawer, A.** 1997. The structure of MCP-1 in two crystal forms provides a rare example of variable quaternary interactions. *Nat Struct Biol* **4**: 64-69.
- Lukas, J., Muller, H., Bartkova, J., Spitkovsky, D., Kjerulff, A., Jansen-Durr, P., Strauss, M., and Bartek, J.**, 1994. *J. Cell Biol* **15**: 625-638.
- Luo, J., Li, M., Tang, Y., Laskowska, M., Roeder, R.G., and Gu, W.** 2004. Acetylation of p53 augments its site-specific DNA binding both in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 2259-2264.
- Luster A. D.** 1998. Chemokines – chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N. Engl. J. Med* **338**: 436-445.
- Locksley, R.M., Killeen, M., and Lenardo, M.J.** 2001. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**: 487-501.
- Louria-Hayon, I., Grossman, T., Sionov, R. V., Alsheich, O., Pandolfi, P.P., and Haupt, Y.**, 2003. The promyelocytic leukemia protein protects p53 from mdm2-mediated inhibition and degradation. *J Biol Chem* **278**: 33134-33141.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A., L., and Randall, R.J.** 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- Mackman, N.** 1995. Regulation of the tissue factor gene. *FASEB J* **9**: 883-889.
- Martin, T., Cardarelli, P.M., Parry, G.C., Felts, K.A., and Cobb, R.R.** 1997. Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NF- κ B and AP-1. *Eur J Immunol* **27**: 1091-1097.
- Matsushima, K., Larsen, C.G., DuBois, GC, and Oppenheimer, J.J.** 1989. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J Exp Mol* **169**: 1485-1490.
- McKinney, K., and Prives, C.** 2005. Regulation of p53 DNA Binding. 25 years of p53 research. 27-51.
- McManus, G., Berman, J.W., Brett, F.M., Staunton, H., Farell, M., and Brosnan, C.F.**, 1998. MCP-1, MCP-2, and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Neuroimmunol* **86**: 20-29.
- Michalovitz, D., Halvey, O., and Oren, M.** 1990. Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by temperature-sensitive mutant p53. *Cell* **62**: 671-680.
- Milner, J., and Medcalf, E.A.** 1990, Temperature-dependent switching between “wild-type” and “mutant” forms of p53-Val135. *J Mol Biol* **210**: 481-484
- Miyashita T., and Reed, J.C.** 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**: 293-299.
- Mohle, R., Failenschmid, C., Bautz, F., and Kanz, L.**, 1999. Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Leukemia* **13**: 1954-1959.
- Morimoto, I. Sasaki, Y., Ishida, S., Imai, K., and Tokino, T.** 2002. Identification of the osteopontin gene as a direct target of TP53. *Genes Chromosomes Cancer* **33**: 270-278.
- Morris, G.F., Bischoff, J.R., and Mathews, M.B.** 1996. Transcriptional activation of the human proliferating-cell nuclear antigen promoter by p53. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 895-899.
- Moser, B., Wolf, M., Walz, A., and Loetscher, P.** 2004. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *TRENDS immunol* **25**: 74-84.

- Mummenbrauer, T., Janus, F., Muller, B., Wiesmuller, L., Deppert, W., and Grosse, E.** 1996. p53 protein inhibits 3'-to 5' exonuclease activity. *Cell* **15**: 1089-1096.
- Murphy, P.M., Baggolini, M., and Charo, I.F.** 2000. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* **52**: 145-176.
- Nakano, K., and Vousden, K.H.** 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* **7**: 683-694.
- Nelken, N.A., Coughlin, S.R., Gordon, D., and Wilcox, J.N.** 1991. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* **88**: 1121-1127.
- Nevins, J.R.** 1992. E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and the viral oncoproteins. *Science* **258**: 424-429.
- Okamoto, K., and Beach, D.** 1994. Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *EMBO J* **13**: 4816-4822.
- Ory, K., Legros, Y., Auguin, C., and Soussi, T.** 1994. Analysis of the most representative tumour-derived p53 mutants reveals that changes in protein conformation are not correlated with loss of transactivation or inhibition of cell proliferation. *EMBO J* **13**: 3496-3504.
- Palecek, E., Brazda, V., Jagelska, E., Pecinka, P., Karlovska, L., and Brazdova, M.** 2004. Enhancement of p53 sequence-specific binding by DNA supercoiling. *Oncogene* **23**: 2119-2127.
- Panta, G.R., Kaur, S., Cavin, L.G., Cortes, M.L., Mercurio, F., Lothstein, L., Sweatman, T.W., Israel, M., and Arsura, M.** 2004. ATM and the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase activate NF- κ B through a common MEK/extracellular signal-regulated kinase/p90(rsk) signaling pathway in response to distinct forms of DNA damage. *Mol Cell Biol* **24**: 1823-1835.
- Ping, D., Jones, P.L., and Boss, J.M.** 1994. TNF regulates the in vivo occupancy of both distal and proximal regulatory regions of the MCP-1/JE gene. *Immunity* **4**: 455-469.
- Ponchel F., and Milner J.** 1998. Temperature sensitivity of human wild-type and mutant p53 proteins expressed in vivo. *Brit J Cancer* **77**: 1555-1561.
- Rahman, I., Marwick J., and Kirkham P.** 2004. Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF- κ B and pro-inflammatory gene expression. *Biochem Pharmacol* **68**: 1255-1267.
- Ransohoff, R.M., Hamilton, T.A., Tani, M., Stoler, M.H., and Shick, H.E.** 1993. Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB J* **7**: 592-600.
- Ransohoff, R.M., Glabinski, A., and Tani, M.** 1996. Chemokines in immune-mediated inflammation of the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev* **7**: 35-46.
- Richmond, A.** 2002. NF- κ B, Chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat Rev Immuno* **2**: 664-674.
- Rodriguez, M.S., Desterro, J.M., Lain, S., Midgley, C.A., Lane, D.P., and Hay, R.T.** 1999. SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO J* **18**: 6455-6461.
- Rollins, B.J., Morrison, E.D., and Stiles, C.D.** 1988. Cloning and expression of JE, a gene inducible by platelet-derived growth factor and whose product has cytokine-like properties. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 3738-3742.
- Rollins, B. J., Stier, P., and Ernst, T.** 1989. The human homolog of the JE gene encodes a monocyte secretory protein. *Mol Cell Biol* **9**: 4687-4695.

- Rollins, B.J.** 1991. JE/MCP-1: an early-response gene encodes a monocyte-specific cytokine. *Cancer Cells* **3**: 517-524.
- Rollins, B.J., and Pober, J.S.** 1991. Interleukin-4 induces the synthesis and secretion of MCP-1/JE by human endothelial cells. *Am J Pathol* **138**: 1315-1319.
- Rollins, B.J., and Sunday, M.E.** 1991. Suppression of tumor formation *in vivo* by expression of the JE gene in malignant cells. *Mol Cell Biol* **11**: 3125-3131.
- Rollins, B.J., Walz, A., and Baggiolini, M.** 1991. Recombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood* **78**: 1112-1116.
- Rollins, B.J.** 1996. Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. *Mol Med Today* **2**: 198-204.
- Rollins, B.J.** 1997. Chemokines. *Blood* **90**: 909-928.
- Rossi, D., and Zlotnik, A.** 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* **18**: 217-242.
- Rot, A., and von Andrian, U.H.,** 2004. Chemokines in innate and adaptive host defense: Basic chemokine grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* **22**: 891-928.
- Rothe, M., Wong, S.C., Henzel, W.J., and Goeddel, D.V.** 1994. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **78**: 681-692.
- Ryan, K.M., Ernst, M.K., Rice, N.R., and Vousden, K.H.** 2000. Role of NF- κ B in p53-mediated programmed cell death. *Nature* **404**: 892-897.
- Saccani, S., Pantano, S., and Natoli, G.** 2002. p38-dependent marking of inflammatory genes for increased NF- κ B recruitment. *Nat Immunol* **3**: 69-75.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sakaguchi, K., Herrera, J.E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C.W., and Apella, E.,** 1998. DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev* **12**: 2831-2841.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** 1989. *Molecular cloning. A laboratory Manual*. 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Prieto, R., Rojas, J.M., Taya, J., and Gutkind, J.S.** 2000. A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents. *Cancer Res* **60**: 2464-2472.
- Sayed, M., Kim, S.O., Salb, B.S., Issinger, O.G., and Pelech S.L.** 2000. Stress-induced activation of protein kinase CK2 by direct interaction with p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **275**: 16569-16573.
- Scherer, S.J., Welter, C., Zang, K.D., and Dooley, S.** 1996. Specific *in vitro* binding of p53 to the promoter region of the human mismatch repair gene hMSH2. *Biochem Biophys Res Commun* **221**: 722-728.
- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M., and Schaffner, W.** 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* **17**: 6419.
- Schwartzberg-Bar-Yoseph, F., Armoni, M. and Karnieli, E.** 2003. The tumor suppressor p53 down-regulates glucose transporters GLUT1 and GLUT4 gene expression. *Cancer Res* **64**: 2627-2633.

- Scolnick, D.M., Chehab, N.H., Stavridi, E.S., Lien, M. C., Caruso, L., Moran, E., Berger, S.L., and Halazonetis, T.D.** 1997. CREB-binding protein and p300/CBP-associated factor are transcriptional coactivators of the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res* **57**: 3693-3696.
- Scotton, S.C., Wilson, J.L., Millikin, D., Stamp, G., and Balkwill, F.R.** 2001. Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors? *Cancer Res* **61**: 4961-4965.
- Selivanova, G., Bykov, V.J.N., and Wiman, K.G.** 2005. Mutant p53 reactivation as a novel strategy for cancer therapy. 25 years of p53 research. 399-421.
- Shaulsky, G., Goldfinger, N., Ben-Ze'ev, A., and Rotter, V.** 1990. Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Mol Cell Biol* **10**: 6565-6577.
- Shiraishi, K., Fukuda, S., Mori, T., Matsuda, K., Yamaguchi, T., Tanikawa, C., Ogawa, M., Nakamura, Y., and Arakawa, H.** 2000. Identification of fractalkine, a CX3C-type chemokine, as a direct target of p53. *Cancer Res* **60**: 3722-3726.
- Simpson, J.E., Newcombe, J., Cuzner M.L., and Woodroffe, M.N.** 1998. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines by resident glia and inflammatory cells in multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol* **84**: 238-249.
- Soussi, T.** 2005. Analysis of p53 gene alterations in cancer: a critical view. 25 years of p53 research. 255-292.
- Sozzani, S., Introna, M., Bernasconi, S., Polentarutti, N., Cinque, P., Poli, G., Sica, A., and Mantovani, A.** 1997. MCP-1 and CCR2 in HIV infection: regulation of agonist and receptor expression. *J Leukoc Biol* **62**: 30-33.
- Standiford, T.J., Strieter, R. M., Lukas, N., and Kunkel, S.L.** 1995. Neutralization of IL-10 increases lethality in endotoxemia. Cooperative effects of macrophage inflammatory protein-2 and tumor necrosis factor. *J Immunol* **155**: 2222-2229.
- Strieter, R.M., Kunkel, S.L., and Elner, V.M.,** 1992. Interleukin-8. A corneal factor that induces neovascularization. *Am J Pathol* **141**: 1279-1801.
- Tamagno, E., Parola, M., Guglielmotto, M., Santoro, G., Bardini, P., Marra, L., Tabaton, M., and Danni, O.** 2003. Multiple signaling events in amyloid beta-induced, oxidative stress-dependent neuronal apoptosis. *Free Radic Biol Med* **35**: 45-58.
- Tergaonkar, V., Pando, M., Vafa, O., Wahl, G., and Verma, I.** 2002. p53 stabilization is decreased upon NF- κ B activation: a role for NF- κ B in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell* **1**: 493-503.
- Thanos, D., and Maniatis, T.** 1992. Virus induction of human IFN- β gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell* **83**: 1091-1100.
- Thomson, S, Mahadevan, L.C., and Clayton, A.L.** 1999. MAP-kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. *Cell Develop Biol* **10**: 205-214.
- Timmers, H.T.M., Pronk, G.J., Bos, J.L., and van der Eb, A.J.** 1990. Analysis of the rat JE gene promoter identifies an AP-1 binding site essential for basal expression but not for TPA induction. *Nucleic Acids Research* **18**: 23-33.
- Tomasevic, G., Kamme, F., Stubberod, P., Wieloch, M., and Wieloch, T.** 1999. The tumor suppressor p53 and its response gene p21WAF1/cip1 are not markers of neuronal death following transient global cerebral ischemia. *Neuroscience* **90**: 781-92.
- Tracey, K.J., and Cerami, A.** 1993. Tumor necrosis factor, other cytokines and diseases. *Annu Rev Cell Biol* **9**: 317-343.

- Tsai, W.C., Strieter, R.M., Wilkowski, J.M., Bucknell, K.A., Burdick, M.D., Lira, S.A., and Standiford, T.J.** 1998. Lung-specific transgenic expression of KC enhances resistance to *Klebsiella pneumoniae* in mice. *J Immunol* **161**: 2435-2440.
- Ueda, A., Okuda, K., Ohno, S., Shirai, A., Igarashi, T., Matsunaga, K., Fukushima, J., Kawamoto, S., Ishigatsubo, Y., and Okubo, T.** 1994. NF- κ B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *J Immunol* **153**: 2052-2063.
- Ueda, A., Ishigatsubo, Y., Okubo, T., and Yoshimura, T.** 1997. Transcriptional regulation of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. Cooperation of two NF κ B sites and NF κ B/Rel, subunit specificity. *J Biol Chem* **272**: 31092-31099.
- van der Voorn, P., Tekestra, J., Beelen, R.H., Tensen, C. P., van der Valk, P., and De Groot, C.J.** 1999. Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol* **154**: 45-51.
- van Otteren, G.M., Strieter, R.M., Kunkel, S.L. Paine, R., Greenberger, M.J., Danforth, J.M., Burdick, M.D., and Standiford, T.J.** 1995. Compartmentalized expression of RANTES in a murine model of endotoxemia. *J Immunol* **154**: 1900-1908.
- van Zee, K.J., DeForge, L.E., Fischer, E. Marano, M.A., Kenney, J.S., Remick, D.G., Lowry, S.F., and Moldawer, L.L.** 1991. IL-8 in septic shock, endotoxemia, and after IL-1 administration. *J Immunol* **146**: 3478-3482.
- Valente, A.J., Graves, D.T., Vialle-Valentin, C.E., Delgado, R., and Schwartz, C.J** 1988. Purification of a monocyte chemotactic factor secreted by nonhuman primate vascular cells in culture. *Biochemistry* **27**: 4162-4168.
- Valente, A.J., Xie, J.F., Abramova, M. A., Wenzel, U.O., Abboud, H.E., Graves, and Graves, D.T.** 1998. A complex element regulates IFN-gamma-stimulated monocyte chemoattractant protein-1 gene transcription. *J Immunol* **161**: 3719-3728.
- Vandenabeele, P., Declercq, W., Beyaert, R., and Fiers, W.** 1995. Two Tumor necrosis factor receptors: structure and function. *TRENDS Cell Biol* **5**: 392-399.
- Verma, I.M., Stevenson, J.K., and Schwarz, E.M.** 1995. Rel/NF-kappaB/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* **9**: 2723-2735.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J.** 2000. Surfing the p53 network. *Nature* **408**: 307-310.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K.W.** 1992. p53 function and dysfunction. *Cell* **70**: 523-526.
- Vousden, K.H.** 2002. Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim Biophys Acta* **1602**: 47-59.
- Wahl, G.M., Stommel, J.M., Krummel, K., and Wade, M.** 2005. Gatekeepers of the guardian: p53 regulation by post-translational modification, mdm2 and mdmx. 25 years of p53 research. 73-113.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P.** 2003. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* **10**: 45-65.
- Walker, K.K., and Levine, A.J.** 1996. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 15335-15340.
- Walton, M.I., Wilson, S.C., Hardcastle, I.R., Mirza, A.R., and Workman, P.** 2005. An evaluation of the ability of pifithrin- α and - β to inhibit p53 function in two wild-type p53 human tumor cell lines. *Mol Cancer Ther* **4**: 1369-1377.

- Wang, T., Kobayashi, T., Takimoto, R., Denes, A.E., Snyder, E.L., el Deiry, W.S., and Branchmann, R.K.** 2001. hADA3 is required for p53 activity. *EMBO J* **20**: 6404-6413.
- Wang, X.W., Zhan, Q., Coursen, J.D., Khan M. A., Kontny, H.U., Yu, L., Hollander, M.C., O'Connor, P.M., Fornace, and A.J., Harris, C.C.** 1999. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 3706-3711.
- Wang, Y., Reed, M., Wang, P., Stenger, J.E., Mayr, G., Anderson, M.E., Schwedes, J.F., and Tegtmeyer, P.** 1993. p53 domains: identification and characterization of two autonomous DNA-binding regions. *Genes Dev* **7**: 2575-2586.
- Waterman, M.J., Stavridi, E.S., Waterman, J.L., and Halazonetis, T.D.** 1998. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet* **19**: 175-178.
- Weinberg, R.A.** 1996. E2F and cell proliferation: a world turned upside down. *Cell* **85**: 457-459.
- Weller, M., Rieger, J., Grimm, C., van Meir, E.G., De Tribolet, N., Krajewski, S., Reed, J.C., von Deimling, A., and Deichgans, J.** 1998. Predicting chemoresistance in human malignant glioma cells: the role of molecular genetic analyses. *Int J Can* **79**: 640-644.
- Wells, T.N.C., Power, C.A., Shaw, J.P., and Proudfoot, E.I.** 2006. Chemokine blockers – therapeutics in the making? *Trends Pharmacol Sci*: **27**: 41-47.
- Wingender, E., Kel, A.E., Kel, O.V., Karas, H., Heinemeyer, T., Dietze, P., Knüppel, R., Romaschenko, A.G., and Kolchanov, N. A.** 1997. TRANSFAC, TRRD and COMPEL: towards a federated database system on transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res* **25**: 265-268.
- Wu, G.S., Burns, T.F., McDonald, E.R., Jiang, W., Meng, R., Krantz, I.D., Kao, G., Gan, D.D., Zhou, J.Y., Muschel, R., Hamilton, S.R., Spinner, N.B., Markowitz, S., Wu, G., and el Deiry, W.S.** 1997. KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet* **17**: 141-143.
- Wu, H., and Lozano, G.** 1994. NF- κ B activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress. *J Biol Chem* **269**: 20067-20074.
- Ylä-Herttuala, S., Lipton, B.A., Rosenfeld, M.E., Sarkioja, T., Yoshimura, T., Leonard, E.J., Witztum, J.L., and Steinberg, D.** 1991. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci* **88**: 5252-5256.
- Yoshimura, T., Robinson, A.E., Tanaka, S., Appella, E., Kuratsu, J., and Leonard, E.J.** 1989. Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants. *J Exp Med* **169**: 1449-1459.
- Zlotnik A., Morales J., and Hedrick J.A.,** 1999. Recent advances in chemokines and chemokine receptors. *Crit Rev Immunol* **19**: 1-47.

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Frank Rösl für die Möglichkeit in seiner Abteilung zu promovieren und für die Überlassung des Themas. Bei Prof. Dr. Lutz Gissmann bedanke ich mich für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit in seiner Abteilung fortzusetzen und für seine stetige Unterstützung. Prof. Dr. Rainer Zawatzky danke ich für seine Diskussionsbereitschaft und Geduld.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Ulrich Hilgenfeldt danke ich für seine Bereitschaft diese Dissertation vor der Biowissenschaftlichen Fakultät der Universität Heidelberg zu vertreten.

Sehr herzlich danke ich Prof. Dr. Lisa Wiesmüller für ihr Engagement bei der Generierung der p53-EMSA und für die Übernahme des Zweitgutachtens, aber insbesondere für ihre uneingeschränkte Unterstützung bei allen kleineren und größeren Unwegsamkeiten.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. Dr. Patrick Finzer für die stetige Diskussionsbereitschaft und uneingeschränkte Unterstützung sowie die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Bei Simone Siehler bedanke ich mich für ihre tatkräftige Hilfe bei der Durchführung der p53-EMSA und für eine sehr schöne Zeit im Labor in Ulm.

Prof. Dr. Bohdan Wasylyk und Dr. Gilles Buchwalter danke ich für die Einführung in die Methode des p53-Chromatinimmunopräzipitations- (ChIP) Assays.

Rainer Schmidt danke ich für seine zahlreichen praktischen Tipps für die Laborarbeit. Bei Nadine Seibert und Corinna Klein möchte ich mich für ihre Hilfestellungen bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der Abteilungen „Virale Transformationsmechanismen“ und „Genomveränderung und Karzinogenese“ des DKFZ, für die kamaradschaftliche Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft, insbesondere aber bei Theresia, Regina, Tina, Angelika und Ute für ihr stets „offenes Ohr“.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die diese Arbeit mit viel Geduld begleitet hat und mich immer wieder ermutigte voranzugehen.

Nicht zu vergessen sind die beiden „Doktor-Pferde“, Sokki und Borodin sowie ihre Besitzer, die mir viele unvergessliche Augenblicke fernab von Labor und Schreibtisch geschenkt haben.
