

Aus dem Bereich
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Einfluss des Wachstumssuppressorproteins p53 auf die
Aktivität der p34^{cdc2} - Kinase**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
**der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2007

Vorgelegt von: Muhannad Ababneh
Geb. am: 10. April 1976 in Irbid (JOR)

Für Christine

Abkürzungsverzeichnis

Aa	Aminosäuren (Aminoacids)
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
Bq	Becquerel
cdk	Cyclin abhängige Kinase
cDNA	Komplementäre DNA
Ci	Curie (1Ci = 3.7×10^7 Bq)
CK2	Proteinkinase 2
C-Terminus	Carboxy - Terminus
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2` - Desoxyribonukleotidtriphosphat
DMEM	Dulbecco´s modified eagle´s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol – bis [β -Aminoethylether]-N,N,N',N'- tetraacetat
ELISA	enzyme - linked immunosorbent assay
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GTP	Guanosintriphosphat
Ig	Immunoglobulin
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kDa	Kilodalton
LB	Luria broth

MOPS	3 – Morpholino - 1 - propansulfonsäure
N - Terminus	Amino - Terminus
NET	Puffer aus NP40, EDTA und Tris
Ni ²⁺ -NTA	Ni ²⁺ - Nitrilotriacetic acid (Chelatkomplex)
OD	Optische Dichte
p34 ^{cdc2}	Cyclin abhängige Kinase 1
p53	Tumorsupressor - Protein p53
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PI	Propidiumjodid
PVDF	Polyvinylidene Fluorid
Pwo	<i>Pyrococcus woesei</i>
RB	Retinoblastoma Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda 9</i>
TAE	Puffer aus Tris, Acetat und EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N' - tetramethylendiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris - hydroxymethyl - aminomethan
U	Unit, Einheit
UV	Ultraviolett
(v/v)%	Volumenprozent
wt	Wildtyp
(w/v)%	Gewichtsprozent

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung / Summary.....	1
2. Einleitung.....	3
2.1 Zellzyklus.....	4
2.2 Cdks und Cycline.....	7
2.3 Cdk - Inhibitoren und p53.....	12
2.4 p53.....	15
2.5 Fragestellung.....	19
3. Materialien und Methoden	20
3.1 Materialien und Geräte.....	20
3.1.1 Chemikalien.....	20
3.1.2 Antikörper.....	21
3.1.3 Enzyme.....	22
3.1.4 Bakterienstämme.....	23
3.1.5 Plasmide und Baculovirusexpressionsvektoren.....	23
3.1.6 Geräte.....	24
3.1.7 Puffer und Lösungen.....	25
3.2 Methoden.....	27
3.2.1 Allgemeiner Teil.....	27
3.2.1.1 SDS - Polyacrylamidgel Herstellung.....	27
3.2.1.2 SDS – Polyacrylamid – Gel - Elektrophorese	28
3.2.1.3 Proteinmarker.....	29
3.2.1.4 Proteinfärbung.....	29
3.2.1.5 Proteinbestimmung	29
3.2.1.6 Herstellung von Zellextrakten.....	30
3.2.1.7 Westernblot – Analyse.....	30
3.2.1.8 <i>In vitro</i> - Kinaseassay (p34 ^{cdc2} - Histon H1 - Kinaseassay).....	31
3.2.1.9 Autoradiographie.....	32
3.2.1.10 Immunpräzipitation.....	32

3.2.1.11	<i>In vitro</i> Translation eines Proteins.....	33
3.2.1.12	Herstellung von LB – Agarplatten.....	34
3.2.2	Zellbiologischer – Teil.....	35
3.2.2.1	Zelllinien und Zellkultur.....	35
3.2.2.2	Tauen/Einfrieren von Zellen.....	35
3.2.2.3	Lysieren von Zellen.....	36
3.2.2.4	Infektion von Sf9 - Zellen mit Baculovirus und Ernten des überexprimierten Proteins.....	36
3.2.2.5	Herstellen von kompetenten <i>E. Coli</i> (BL21 /DE3) für die Transformation von DNA.....	37
3.2.2.6	Transformation von pET19b und pQE30 p53 in BL21(DE3) per Hitzeschock.....	37
3.2.2.7	Amplifikation und Reinigung einer Plasmid – DNA in <i>E.coli</i>	38
3.2.2.8	Bakterielle Expression und Reinigung von 6xHis – „tagged“ Proteinen aus <i>E. coli</i>	39
3.2.2.9	Optimierung der Expression rekombinanter Proteine.....	41
3.2.3	DNA – Methodik.....	42
3.2.3.1	PCR (Polymerase – Kettenreaktion).....	42
3.2.3.2	Restriktionsverdau.....	43
3.2.3.3	Horizontale Agarose – Gelelektrophorese.....	43
3.2.3.4	DNA – Mengenbestimmung.....	44
4.	Ergebnisse.....	45
4.1	Herstellung von p34 ^{cdc2} - Kinase und Cyclin B1 in Sf9 – Zellen.....	45
4.2	Darstellung des <i>in vitro</i> hergestellten, ³⁵ S - Methionin markierten, p53 – Proteins.....	47
4.3	Bakterielle Expression und Reinigung von verschiedenen p53 - Mutantan in <i>E. Coli</i>	48
4.4	Bindung des Wachstumssuppressorproteins p53 an die Cyclin - abhängige p34 ^{cdc2} – Kinase.....	51
4.5	Einfluss der Bindung von p53 auf die p34 ^{cdc2} –	

	Kinaseaktivität.....	55
4.5.1	p53 inhibiert die Aktivität der p34 ^{cdc2} – Kinase.....	55
4.5.2	Die Bindung zwischen p53 und der p34 ^{cdc2} - Kinase ist Voraussetzung für die Abnahme der p34 ^{cdc2} - Kinaseaktivität.....	57
4.5.3	Der hemmende Effekt von p53 an der p34 ^{cdc2} – Kinase-Aktivität ist kein kompetitiver Effekt und wird nicht nur durch die Bindung verursacht	58
4.5.4	Einfluss der Konformation von p53 auf die p34 ^{cdc2} - Kinaseaktivität.....	61
4.5.5	Der Einfluss von p53 auf die p34 ^{cdc2} - Kinaseaktivität <i>in vivo</i>	63
5.	Diskussion.....	66
6.	Literaturverzeichnis.....	73
7.	Danksagung / Puplication.....	80
8.	Lebenslauf	81

1. ZUSAMMENFASSUNG

Das Wachstumssuppressorprotein p53 wird bei Vorliegen eines DNA - Schadens während des Zellzyklus aktiviert. In der aktiven Form kann das p53 durch Bindung an die zelluläre DNA bestimmte Gene beeinflussen. Solche Gene können den Zellzyklus vorantreiben oder arretieren, bzw. DNA - Reparaturmechanismen aktivieren. Der eukaryotische Zellzyklus wird durch eine Gruppe von Cyclin- abhängigen Kinasen reguliert. Diese Kinasen sind primäre Ziele des Wachstumssuppressorproteins p53 und von Kinaseinhibitoren, die durch p53 transaktiviert werden. Für das Vollenden der G₂ - Phase und dem anschließenden G₂/M - Übergang ist die p34^{cdc2} - Kinase verantwortlich. Eine direkte Bindung zwischen p53 und der katalytischen Untereinheit der p34^{cdc2} - Kinase wurde Anfang der neunziger Jahre beschrieben . Zudem ist p53 ein Substrat der p34^{cdc2} - Kinase und wird von dieser an S315 phosphoryliert. In der vorliegenden Arbeit analysierten wir die funktionelle Bedeutung dieser Bindung für die Kinaseaktivität, und ob der Phosphorylierungszustand des p53 einen Einfluss auf diese Bindung hat. *In vitro* resultierte die Bindung zwischen Wildtyp - p53 und der p34^{cdc2} - Kinase in einer signifikanten Abnahme der Kinaseaktivität. Voraussetzung für diesen Effekt ist die Bindung von Wildtyp - p53 an die katalytische Untereinheit der Kinase, da ein mutiertes p53, welchem die Bindungsregion für p34^{cdc2} fehlt, ihre Aktivität nicht beeinflussen konnte. Verschiedene Mutanten des p53, die eine Bindung mit der p34^{cdc2} - Kinase eingehen konnten, haben ebenfalls keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität. Durch Untersuchungen mit C - terminalen Fragmenten des p53, welche durch die p34^{cdc2} - Kinase phosphoryliert werden konnten, zeigten wir, dass die Reduktion der Kinaseaktivität kein kompetitiver Effekt zwischen verschiedenen Kinasessubstraten, sondern ein spezifischer Effekt des p53 ist. Darüberhinaus zeigte sich in diesen Experimenten, dass auch andere strukturelle Elemente im N- Terminus des p53 und die Integrität seiner Konformation für die Inhibition der Kinaseaktivität notwendig sind. Mit dieser funktionellen Interaktion zwischen p53

und p34^{cdc2} – Kinase hat p53 einen weiteren, schnellen Einfluss auf die Zellzyklusprogression und eine direkte Möglichkeit, am G₂/M – Übergang einen Arrest zu erreichen.

SUMMARY

The tumor suppressor protein p53 gets activated through DNA damage during the cell cycle. p53 binds in his active form to the DNA and transactivates several genes, which leads to both, an arrest of the cell cycle and to the activation of DNA- repair mechanisms. The eukaryotic cell cycle is regulated by a group of cyclin dependent kinases. These represent a primary target of the tumor suppressor protein p53, primary by transactivation of kinase inhibitors.

An active p34^{cdc2} is necessary to leave the G₂ phase and to start mitosis. A DNA damage leads to the p53 – dependent transactivation of a group of cdk - inhibitors, which subsequently leads to a cell cycle arrest at the G₁/S - or G₂/M – transition. A possibility to immediately influence the activity of the mitosis promoting factor MPF is the direct interaction of p53 and p34^{cdc2}.

The ability of p53 to bind to the catalytic subunit of p34^{cdc2} is known since the early 1990s. On the other hand, p53 is a substrate of p34^{cdc2} and is phosphorylated at a serine residue at position 315. We describe the functional consequences of this interaction on the activity of p34^{cdc2}, and whether the phosphorylation of p53 influences the binding between both proteins. Wild - type p53 binds to the p34^{cdc2} kinase and causes a reduction of its kinase activity. This effect results from the binding of wild - type p53 to the catalytic subunit of the p34^{cdc2} – kinase. Mutants of p53, which do not bind to p34^{cdc2}, have no influence on its activity. By using C - terminal fragments of p53, which can be phosphorylated by p34^{cdc2}, we showed that this is not a competitive effect induced by different substrates of the kinases. It is a specific effect of wild - type p53. Furthermore, we suggest, that other structural elements within the N - terminus as well as an intact conformation of p53 are necessary for the inhibition effect of the p34^{cdc2} activity.

2. EINLEITUNG

Die kleinste Einheit des Lebens ist eine einzelne Zelle. Mehrere Zellen, welche in engen Wechselbeziehungen zueinander stehen und durch ergänzende Zusammenarbeit gewisse Funktionen erfüllen und Strukturen bilden, bilden ein Lebewesen mit bestimmten Eigenschaften und Fähigkeiten. Das Leben einer Zelle ist ein kompliziertes Zusammenspiel zwischen dem Inneren der Zelle und ihrer Umwelt, und zwischen strukturellen und funktionellen Elementen der Zelle selbst. Die Eigenschaften einer Zelle und schließlich die des einzelligen oder des mehrzelligen Organismus werden in ihrem Genom gespeichert. Das Genom enthält den Bauplan der verschiedenen zellulären Proteine und Enzyme, die wiederum das Zellgerüst aufbauen und die Funktionen der Zelle erfüllen.

Die Zellen eines lebenden Organismus können als ein im Fließgleichgewicht befindliches System angesehen werden. Es werden ständig Proteine hergestellt, welche die Funktionen der Zelle entfalten; gleichzeitig werden andere abgebaut und durch neue ersetzt. In manchen Zellverbänden werden die einzelnen Zellen durch Zellteilung ständig erneuert. Einer Zellteilung (Mitose) geht eine präzise Verdoppelung des Genoms voraus, damit bei der Teilung jede Tochterzelle über eine vollständige Kopie des Genoms verfügt und somit ihre Aufgaben erfüllen kann. Bei der Verdoppelung des genetischen Materials können sich durch Umweltfaktoren bzw. durch einen Fehler im Verdoppelungsapparat Fehler (Mutationen) einschleichen. Um eine Übertragung dieser Mutationen auf die Tochterzelle zu verhindern, sind in einer sich teilenden Zelle mehrere Kontrollmechanismen (Checkpoints) eingebaut. An ihnen kann die Zellteilung verzögert werden, um der Zelle die Gelegenheit zu geben, aufgetretene Fehler durch spezielle Reparaturmechanismen zu korrigieren (Morgan, D.O. 1995).

Gelingt dies nicht, wird normalerweise über weitere Kontrollprozesse der programmierte Zelltod, die Apoptose, eingeleitet (Lane et al., 1994).

Das intakte Weiterbestehen eines Lebewesens ist daher von der Fähigkeit seiner Zellen, sich zu teilen und dabei deren Identität und die Integrität ihres Genoms nicht zu verlieren, abhängig. Schliche sich ein Fehler in dieses Kontrollsystem, wäre der Baustein für eine unkontrollierte Zellteilung gelegt, und somit die Entstehung eines Tumors ermöglicht. Wir wissen heute, dass an der Entstehung eines Tumors Mutationen in zwei Arten von Genen involviert sind, die Proto - Onkogene und die Tumorsuppressorgene. Die Proto - Onkogene und deren Genprodukte fördern die Zellteilung und das Wachstum. Durch Mutationen können diese zu Onkogenen mutieren, die eine andauernde Zellteilung begünstigen. Die Tumorsuppressorgene sind ihrerseits für eine Inhibition des Wachstums und der Zellteilung verantwortlich. Durch Mutationen können diese ihre inhibierende Wirkung verlieren, und einem unkontrollierten Zellwachstum und einer übermäßigen Zellteilung stünde somit nichts mehr im Weg. So kann die Akkumulation von Mutationen in solchen Genen zu unkontrollierter und schneller Zellteilung und somit zur Entstehung eines Tumors führen (Lengauer et al., 1998).

2.1 Zellzyklus

Der Lebenszyklus einer Zelle wird in zwei aufeinanderfolgende Phasen unterteilt, eine Interphase und eine M - Phase. Die relativ längere Interphase wird wiederum in Stadien unterteilt, G_1 , S und G_2 [G für *engl. gap*= Lücke, d.h. keine DNA - Replikation; S für (DNA -)Synthese]. Die M - Phase (Mitose, Teilungsphase) wird wiederum in vier Unterphasen unterteilt: Prophase, Metaphase, Anaphase und zum Schluss die Telophase.

Zellen, die sich nicht mehr teilen, persistieren in der G_1 - Phase. In diesem Fall spricht man von G_0 - Phase. In der G_1 - und G_2 - Phase werden Makromoleküle der Zelle, nicht aber ihre DNA synthetisiert; in der S - Phase erfolgt die Genomreplikation durch DNA - Synthese. Die Teilung der Zelle erfolgt mit Hilfe des

Spindelapparats, des Zytoskeletts und weiterer Faktoren während der M - Phase. Ruhende Zellen in der G_0 - Phase können zur Teilung durch Wachstumsfaktoren stimuliert werden. Solch eine Wachstumsstimulation ist bis zu einem Zelltyp - abhängigen Zeitpunkt, etwa 30 Minuten vor der S - Phase, in der Regel rückgängig und wird „restriction point“ genannt. Tumorzellen und andere schnell proliferierende Zellen überschreiten direkt nach der Mitose diesen Punkt, und fangen einen neuen Teilungszyklus an (Novak et al., 2004).

Der Ablauf des Zellzyklus wird durch verschiedene Kontrollmechanismen bzw. Kontrollpunkte (Checkpoints) überwacht; hierdurch soll sichergestellt werden, dass die vorherige Zellzyklusphase richtig und vollständig abgeschlossen ist, und somit der Eintritt in die nächste Zellzyklusphase eingeleitet werden kann (Shackelford et al., 1999). Diese Kontrollpunkte entfalten hauptsächlich ihre Funktion an den Übergängen zwischen den einzelnen Zellzyklusphasen, und sind in der Lage, den Zellzyklus zu stoppen. Auf diese Weise wird garantiert, dass die Zelle ihren Chromosomensatz ein einziges Mal dupliziert und ihre DNA - Synthese korrekt vollendet, bevor sie mit der Teilung beginnt. Während der Mitose sorgt ein weiterer Kontrollpunkt am Spindelapparat für ein richtiges und gleichmäßiges Verteilen der Chromosomen an beide Tochterzellen (Nigg et al., 1996).

Die verschiedenen Faktoren, die den Verlauf des Zellzyklus stimulieren oder inhibieren können, sind entweder externe Signale, wie zum Beispiel die Stimulation durch Wachstumsfaktoren, oder die Inhibition durch Kontaktsignale zu extrazellulärer Matrix, oder es sind interne Signale, wie solche, welche die Integrität des Genoms garantieren (Oren et al., 1999).

Proliferierende Zellen, die nach der entsprechenden Stimulation in die G_1 - Phase eintreten, sind durch Größenwachstum und Synthese verschiedener für die DNA - Replikation notwendiger Komponenten charakterisiert. Anschließend tritt die Zelle in die S - Phase über, in der das genetische Material der Zelle verdoppelt wird. In der darauf folgenden G_2 - Phase wird nun festgestellt, ob die Verdoppelung des

genetischen Materials vollständig und korrekt abgeschlossen ist (Bates et al., 1998; Shackelford et al., 1999; Lane et al., 1994). Ist dies der Fall, darf die Zelle in die M - Phase eintreten und sich in zwei identische Tochterzellen teilen.

Der zeitliche Ablauf des Zellzyklus wird durch eine Gruppe von Cyclin - abhängigen Kinasen (cdk) kontrolliert. Die Übergänge zwischen den einzelnen Phasen des Zellzyklus werden über die Aktivierung bzw. Deaktivierung dieser Kinasen (cdk) bestimmt (Abb. 1) (Grana et al., 1995; Harada et al 2000).

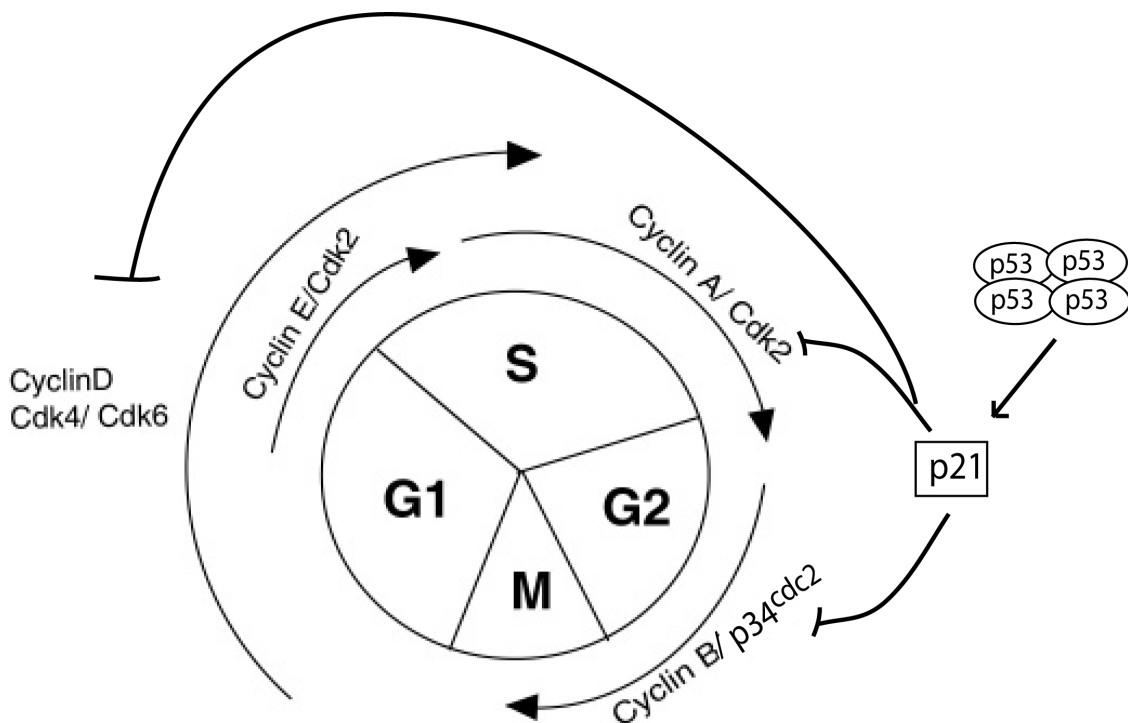


Abb. 1 Der Zellzyklus einer eukaryotischen Zelle

Das individuelle Leben einer Zelle beginnt unmittelbar nach der Mitose. Der Teilungszyklus einer Zelle wird in vier Stadien unterteilt: G1 - Phase, S - Phase, G2 - Phase, und die Mitose (M - Phase). Der Übergang zwischen den einzelnen Zellzyklusphasen wird durch eine Gruppe von Cyclin - abhängigen Kinasen kontrolliert; durch Interaktion der CDKs mit verschiedenen Reaktionspartnern werden sogenannte Checkpoints gebildet, die eine Zellteilung zum falschen Zeitpunkt oder mit fehlerhaften Komponenten verhindern können. Für jede Zellzyklusphase bzw. für jeden Übergang zwischen zwei Phasen sind bestimmte Kinasen und bestimmte Interaktionspartner typisch. Diese Abbildung bietet eine vereinfachte Darstellung hierfür.

2.2 Cdks und Cycline

Der zeitliche Ablauf des Zellzyklus wird durch eine Gruppe verschiedener Serin/Threonin – Protein - Kinasen kontrolliert, die sog. Cyclin - abhängigen Kinasen, cdks (*cyclin-dependent kinases*) (Abbildung 1) (Morgan D.O. 1995). Die Cyclin - abhängigen Kinasen bestehen jeweils aus einer regulatorischen Cyclin - Untereinheit und einer katalytischen cdk - Untereinheit. Der cdk - Gehalt der proliferierenden Zelle ist über den Zellzyklus mehr oder weniger konstant; der Gehalt der Cycline variiert jedoch durch eine periodische Synthese und den nachfolgenden Abbau und übernimmt damit eine regulatorische Kontrolle über die Kinase (Johnson et al., 1999). Die Aktivität, Lokalisation und Substratspezifität der Kinasen wird durch deren Assoziation mit verschiedenen Cyclinen bestimmt. Eine Cyclin - abhängige Kinase kann eine Bindung mit verschiedenen Cyclinen eingehen (Tabelle 1). Die einzelnen Cycline können verschiedene Kinasen aktivieren. Die exprimierte Menge an den einzelnen Cyclinen hängt wiederum von der jeweiligen Zellzyklusphase ab; somit wird die Aktivität der Cyclin- abhängigen Kinasen zu dem entsprechenden Zeitpunkt im Zellzyklus durch Bildung bzw. Abbau der Cycline kontrolliert . Ebenso sind Interaktionen zwischen einzelnen Cyclinen beschrieben worden, welche eine wichtige regulatorische Beteiligung haben (Kong et al., 2000). Involviert sind im eukaryotischen Zellzyklus bisher mehr als 9 Kinasen und 16 Cycline (Johnson et al., 1999).

Die Bindung einer Cyclin - abhängigen Kinase an ein Cyclin ist die Voraussetzung für ein intaktes Funktionieren dieser Kinase. Nach der Bindung an das Cyclin erfolgen weitere Aktivierungsschritte. Am Beispiel des Cyclin B1/p34^{cdc2} - Komplexes erfolgt dies durch die Phosphorylierung der katalytischen Untereinheit (p34^{cdc2}) an Thr 161 über eine Cdk - Aktivierungskinese (CAK), und durch die Dephosphorylierung an Tyr14 und Thr15 über die cdc25 - Phosphatase (Abbildung 2). Auch die intrazelluläre Lokalisation der Kinasen wird von dem Phosphorylierungszustand des jeweiligen Cyclin - Partners bestimmt (Gartel et al.,

1996; Harada et al., 2000). So scheint die Phosphorylierung des Cyclin B1 im Cyclin B1/p34^{cdc2} - Komplex durch seinen Interaktionspartner, p34^{cdc2}, für den intranukleären Transport der aktiven Kinase und den Eintritt in die Mitose unentbehrlich zu sein. (Gartel et al., 1996)

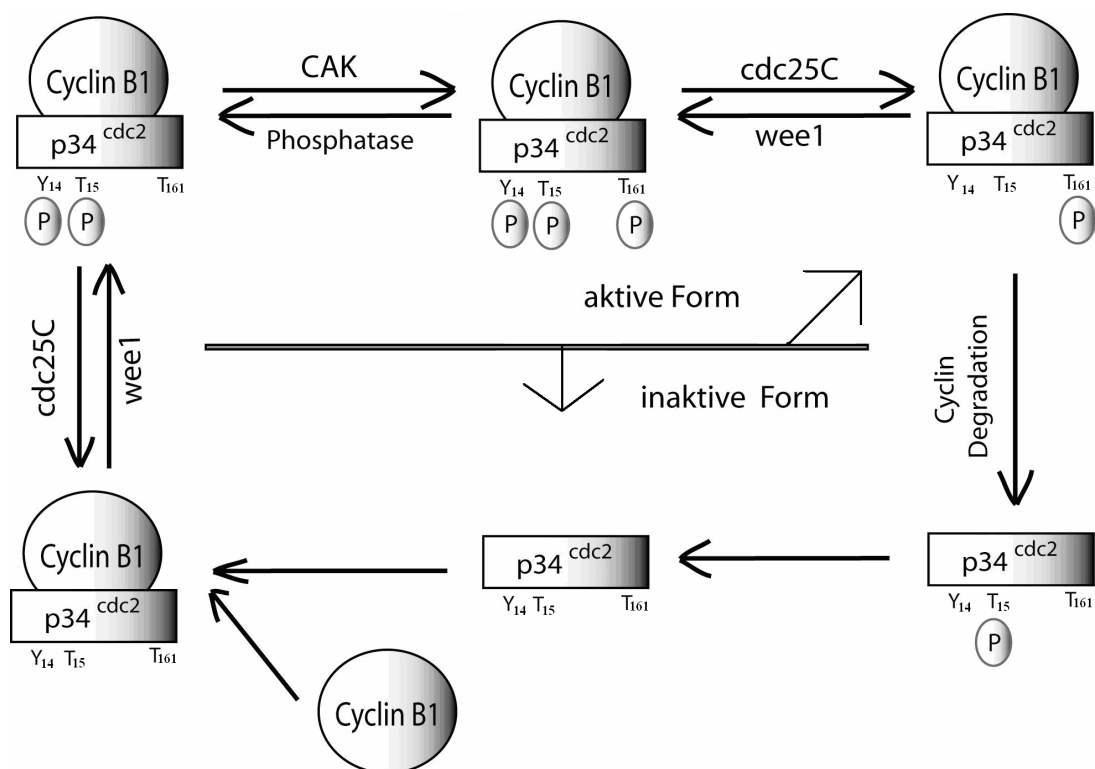


Abb. 2 Steuerung der p34^{cdc2} - Kinase während des Zellzyklus

Vor dem Eintritt in die Mitose erreicht die exprimierte Menge an Cyclin B1 ihr Maximum. Durch Bindung zwischen p34^{cdc2} und Cyclin B1 entsteht die aktivierbare Form der p34^{cdc2} - Kinase. Durch die Kinasen wee1 und CAK (cdk - Aktivierungskinasen) wird p34^{cdc2} an Tyr 14/Thr 15 und an Thr 161 phosphoryliert. Die cdc25 - Phosphatase kann zu Spaltung von inaktivierenden Phosphatgruppen an Tyr14/Thr15 führen. Durch die cdc25 - Phosphatase und durch die Ubiquitin - abhängige Cyclin - Degradation bzw. durch Bindung von Kinaseinhibitoren wird die Kinase deaktiviert.

Initiator für das Starten der Zellteilung sind i.d.R. Cycline der Gruppe D; die Synthese dieser wird unter normalen Umständen durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren stimuliert. Cycline der Gruppe D bleiben während des ganzen Teilungsprozesses vorhanden. Sie führen die Zelle aus der G_0 -Phase in die G_1 -Phase (Sherr et al., 1991). Die exprimierte Menge an Cyclin D und Cyclin E bestimmt die Ablaufgeschwindigkeit während der G_1 -Phase. Cyclin D reguliert die Kinasen Cdk4 und Cdk6. Cyclin E assoziiert mit Cdk2. Diese Kinasen begleiten die Zelle während der G_1 -Phase und ermöglichen den G_1/S -Übergang; kurz nach Eintritt in die S-Phase wird das Cyclin E degradiert, und somit die Cdk2 deaktiviert. Während der S-Phase nimmt die Menge an Cyclin A zu. Der Cyclin A/Cdk2-Komplex spielt eine wichtige Rolle bei der Replikation des Genoms. Während der Mitose übernimmt das Cyclin B die Kontrolle. Cyclin B assoziiert mit $p34^{cdc2}$ und bildet mit ihr die primäre Kinase der Mitose (MPF = „M-Phase/*maturation promoting factor*“). Während der Anaphase beginnt der Ubiquitin-abhängige Abbau von Cyclin B; so kann die Zelle die Mitose verlassen und wieder in die G_1 -Phase bzw. in die G_0 -Phase übergehen (Kotani et al., 1999; Zhang et al., 1998). Eine Verdeutlichung ist den ersten Abbildungen 1 - 4 zu entnehmen. Substrate der aktivierten Cyclin-abhängigen Kinasen können strukturelle oder regulatorische Proteine sein, die für die jeweilige Zellzyklusphase charakteristisch sind. Abbildung 3 bietet eine schematische Darstellung der $p34^{cdc2}$ -Kinase und eine Zusammenfassung ihrer wichtigsten Funktionen.

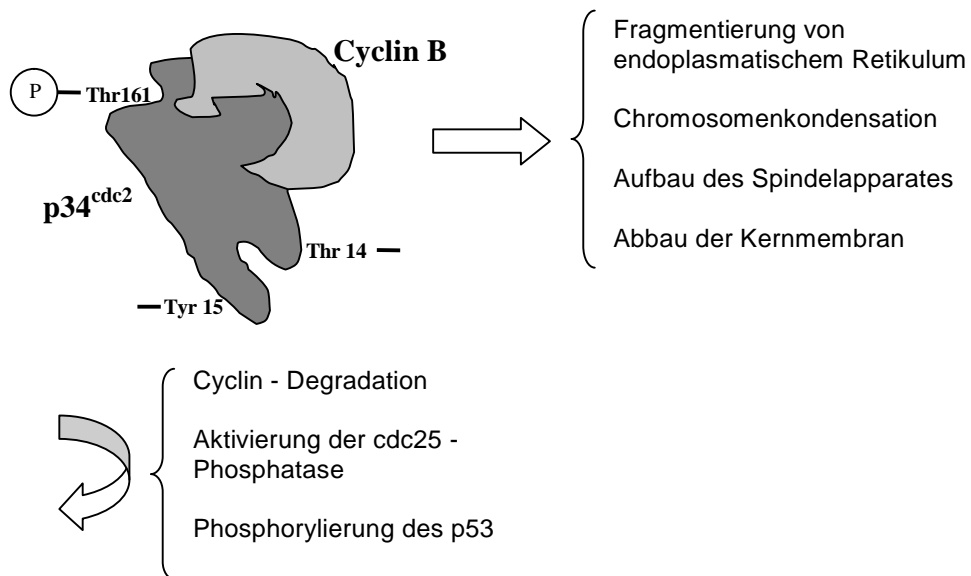


Abb. 3 Funktionen der aktiven p34^{cdc2} – Kinase

Die aktive p34^{cdc2} – Kinase wird nach ihrer Bindung mit dem Cyclin B an Thr 161 phosphoryliert und an Tyr 15, Thr 14 dephosphoryliert und somit aktiviert. Man teilt die Zielsubstrate der Kinase in zwei Gruppen. Die erste Gruppe enthält Proteine, die das Fortschreiten der Zellteilung begünstigen \Rightarrow . Die zweite Gruppe stellt eine Art Autoregulation „Feedback Loops“ der Kinase dar \Rightarrow . Mittels positivem Feedback kann die Wee 1- Kinase, welche die p34^{cdc2} - Kinase durch Phosphorylierung inaktiviert, umgekehrt durch aktive p34^{cdc2}- Kinase phosphoryliert und damit selbst inaktiviert werden. Die cdc25 - Phosphatase wird durch Phosphorylierung mittels p34^{cdc2} in ihrer Aktivität gefördert.

Zum Beispiel phosphoryliert der Cyclin B1/p34^{cdc2} - Komplex, auch p34^{cdc2} - Kinase genannt, während der Mitose das Histon H1- Protein, welches wiederum die chromosomale Kondensation erleichtert (Hohmann et al., 1990; Yasuda et al., 1993). Die Bildung des mitotischen Spindelapparates setzt den Abbau der Kernmembran voraus; dieser wird durch Phosphorylieren der in der Kernmembran

lokalisierten Lamine durch die gleiche Kinase ermöglicht (Dessev et al., 1991; Fields et al., 1995).

Während der S - Phase wird das Genom repliziert. Hierfür ist das Entfalten der DNA mit Hilfe des Cyclin E/Cdk2 - Komplexes notwendig (Heichman et al., 1994) . Durch das Phosphorylieren des Retinoblastom - Proteins (pRb) u.a durch die p34^{cdc2} - Kinase wird die S - Phase gestartet (DeCaprio et al., 1992; Hu et al., 1992; Lucas et al., 1992).

Folgende Tabelle stellt eine kurze Zusammenfassung verschiedener Cycline und ihrer Bindungspartner sowie deren Funktion dar (Tabelle 1) (Johnson et al., 1999).

Tabelle 1. Cycline und Cyclin - abhängige Kinasen in Säugerzellen

Cyclin	Cdk	Funktion
A	p34^{cdc2} (cdk1),cdk2	Starten der S - Phase
B1, B2	p34^{cdc2}	G ₂ /M - Übergang
C	cdk8	G ₁ /S - Übergang, Transkriptionsregulation
D1, D2, D3	cdk4/cdk6	Verlassen der G ₀ - Phase, G ₁ /S - Übergang
E	cdk2	G ₁ /S - Übergang, Chromosomenkondensation
F	-	G ₂ /M - Übergang
G1, G2	cdk5	Antwort auf DNA - Schaden
H	cdk7	Cdk - Aktivierung, Transkriptionsregulation, DNA - Reparatur
T1, T2	cdk9	Transkriptionregulation

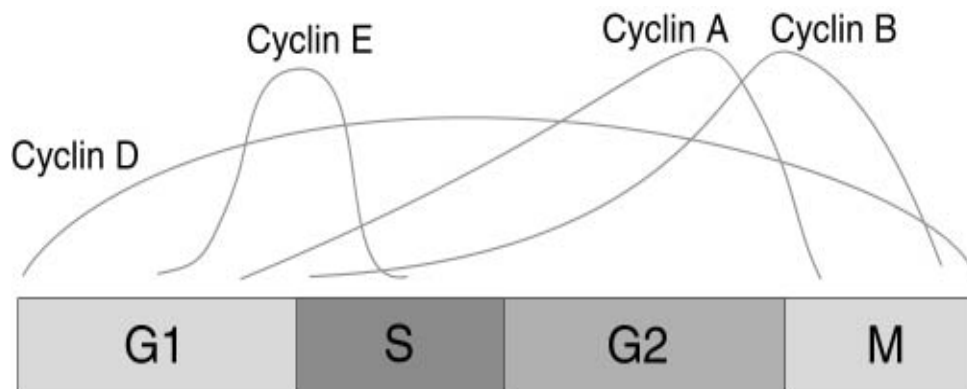


Abb.4 Die Menge der Cycline während des Zellzyklus

Die Menge eines Cyclins wird durch seine Transkriptionsrate erhöht und über eine Ubiquitin - abhängige Degradation vermindert. Cyclin D und Cyclin E aktivieren verschiedene Kinasen (cdk4, cdk6, cdk2) , welche den Verlauf der G₁ - Phase bis zum Eintreten in die S - Phase kontrollieren. Für den Verlauf der S - Phase ist die Aktivität der cdk2 unentbehrlich; diese wird durch eine zunehmende Menge an Cyclin A stimuliert. Für den G₂/M - Übergang ist die p34^{cdc2} - Kinase verantwortlich. Eine Inhibition der p34^{cdc2} - Kinaseaktivität arretiert die Zelle in der G₂ - Phase.

2.3 Cdk - Inhibitoren und p53

Neben der Gruppe der positiven Wachstumsregulatoren existiert eine Gruppe von negativen Regulatoren, welche bei Bedarf den Zellzyklus durch Deaktivieren der Cdks stoppen können. Cdk - Inhibitoren können die Aktivität der Cyclin - abhängigen Kinasen herabsetzen (Elledge et al., 1994; Harper et al., 1995). Cdk - Inhibitoren werden nach ihren Zielkinasen, Struktur oder Art der Inhibition in zwei Gruppen unterteilt. So spricht man von p21^{Waf1/Cip1} - ähnlichen Inhibitoren (im folgenden Text als p21^{WAF1} bezeichnet) und p16^{INK4A} - ähnlichen Inhibitoren. Die Gruppe der p21^{Waf1} - Kinaseinhibitoren (p27^{Kip1} und p57^{Kip2}) interagiert mit den

verschiedenen Cyclin/ Cdk - Komplexen bzw. mit anderen zellulären Kinasen und setzt ihre Aktivität herab. Die Gruppe der p21^{Waf1} - ähnlichen Inhibitoren ist in allen Zellzyklusphasen aktiv. Die Expression des p21^{Waf1/Cip1} wird u.a. durch das Wachstumssuppressorprotein p53 induziert, und kann außer der p34^{cdc2} - Kinase das PCNA (proliferating cell nuclear antigen) inhibieren (El Deiry et al., 1993; El Deiry et al., 1994). Das PCNA ist eine wichtige Komponente der DNA - Polymerase, ein wichtiges DNA – Replikations - Enzym. Bei einem DNA - Schaden bindet p21^{Waf1} an die p34^{cdc2} – Kinase, verhindert dadurch die aktivierende Phosphorylierung der Kinase an Thr 161 und blockiert außerdem die Bindungsstelle für ATP; ein weiterer Weg der Hemmung ist durch cdc25 und chk1 über ein inaktivierendes Phosphorylieren der p34^{cdc2} - Kinase an Thr14 und Tyr15 gewährleistet. Diese beiden Mechanismen, welche ein Fortschreiten der Mitose beim Vorliegen eines DNA - Schadens verhindern, laufen unabhängig voneinander, sodass eine effiziente Hemmung der Kinaseaktivität durch Dephosphorylierung (direkter Weg) oder durch Hemmung der Phosphorylierung (indirekter Weg) erfolgen kann.

p16^{INK4A} - ähnliche Inhibitoren (p16^{INK4a}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} und p19^{INK4D}) inhibieren bevorzugt Cdk's in der G₁ – Phase (cdk4 und cdk6). Inhibitoren dieser Gruppe binden an der für Cyclin vorgesehenen Bindungsstelle und kompetitieren mit der regulatorischen Untereinheit der Kinase.

Cdk - Inhibitoren sind an der Entdifferenzierung der Zellen und außerdem an der Induktion der Apoptose ebenso beteiligt (Dai et al., 2006; Munoz-Alonso et al., 2005).

Durch Hypoxie, chemische oder radioaktive Schädigung der zellulären DNS antwortet die Zelle mit Aktivieren der latenten Monomere des Wachstumssuppressorproteins p53, welches die Transkription des Cdk - Inhibitors p21^{Waf1/Cip1} verursacht (El Deiry et al., 1993; Prives et al., 1999; Ronai Z., 1999). Der Zellzyklus ist dann arretiert, und hat so die Zeit, über weitere Reparaturmechanismen diesen DNA - Schaden aufzuheben (Prives et al. 1999).

Anhand dieser Beispiele erkennt man, dass der Verlust einer dieser Inhibitoren oder der Verlust der Fähigkeit, sie zu exprimieren für die Zelle und schließlich für den gesamten Organismus fatale Folgen haben kann, und Grundlage für eine unkontrollierte Zellteilung bildet. Eine schematische Darstellung der Wirkung von p53 auf die einzelnen Zellzyklusphasen ist in Abbildung 5 vereinfacht dargestellt.

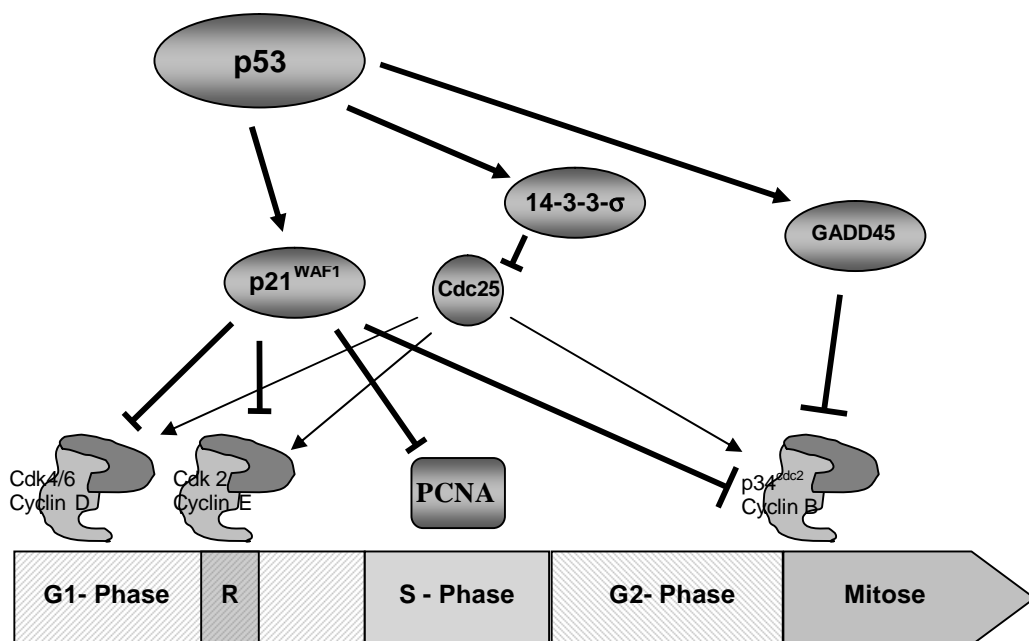


Abb. 5 Der Einfluss des p53 Tumorsuppressorproteins auf den Zellzyklus

Das aktive p53 Tumorsuppressorprotein transaktiviert bestimmte Gene, von denen manche einen direkten Einfluss auf den Zellzyklus haben. Hierunter zählen das p21^{WAF1}, auch als globaler Kinaseinhibitor bezeichnet, welcher die Aktivität der einzelnen Zellzykluskinasen und des PCNA herabsetzen kann. Durch das 14-3-3-σ Protein wird die Kinase-aktivierende Phosphatase, cdc25, inhibiert. Das GADD 45 Protein kann ebenso die Kinaseaktivität vor Eintritt in die Mitose herabsetzen. p53 kann außerdem die Transkription der p34^{cdc2}-Kinase und die Transkription des Cyclin B hemmen.

2.4 p53

Das Wachstumssuppressorprotein p53 ist für seine Fähigkeit, an DNA zu binden und über diese Bindung die Transkription verschiedener Proteine in Gang zu setzen, bekannt (Cox, Hupp et al.; Hupp, Lane; Hupp, Meek et al.; Juven, Barak et al.). Über diesen p53 - abhängigen Weg der Transkription werden u.a. der Proteinkinase - Inhibitor p21^{Waf1/Cip1} und die Familie der 14-3-3 σ - Proteine gebildet. 14-3-3 σ sind Phosphoserin - Bindungsproteine, die an der Regulation der zellulären Proliferation, an Zellzykluskontrollen und bei der Induktion von Apoptose beteiligt sind (Aitken et al., 1996). Außerdem kann das p53 die Transkription bestimmter Gene verhindern (Transrepression). In der Regel handelt es sich hierbei um wachstumsstimulierende Proteine (Ho et al., 2005).

Eine Abnormalität des p53 - Tumorsuppressorgens (Chromosom 17, kurzer Arm, 17p13) ist mit etwa 50% - igem Vorkommen als die häufigste molekulare Veränderung in humanen Neoplasien zu betrachten (Hainaut et al., 1997; Hollstein et al., 1994).

Die Polypeptid - Sequenz des p53 wird in drei Regionen bzw. Domänen unterteilt. Eine überwiegend saure N - terminale Region, eine hoch konservierte mittlere *Core* - Domäne und eine C - terminale Region, die überwiegend basisch und hydrophob ist (Abb. 6). Die N - terminale Region ist die funktionell wichtige Region des p53; sie enthält die Transaktivierungsdomäne des Proteins (Raycroft et al., 1990; Raycroft et al., 1991). Diese Domäne ist auch das Bindungsziel verschiedener viraler Proteine und des mdm2 - Proteins (Barak et al., 1992; Lin et al., 1994). In der N - terminalen Region befinden sich viele Phosphorylierungsstellen verschiedener Proteinkinasen, die die Aktivität und Stabilität des p53 Proteins regulieren (Prives et al., 1999; Ronai Z., 1999). Die mittlere Region (*Core* - Domäne) weist einen hohen Konservierungsgrad auf; sie enthält vier der fünf in eukaryotischen Zellen konservierten Domänen des p53. In der *Core* - Domäne kommen die meisten Mutationen des p53 - Proteins vor (Hollstein et al., 1994). Diese Domäne ist für die sequenzspezifische DNA -

Bindung verantwortlich (Bargonetti et al., 1993; Prives et al., 1994). Die C - terminale Region enthält die nukleären Lokalisationssignale, NLS1-3 (Shaulsky et al., 1990), welche durch Interaktion mit verschiedenen Proteinkinasen über die cytoplasmatische oder nukleäre Lokalisation des p53 entscheiden. Eine Polypeptid - Region um die Aminosäuren 323-355 im C - Terminus ist für die Tetramerisation der p53 - Moleküle verantwortlich (Wang et al., 1994). Die C - terminale Region ist auch Substrat verschiedener Zellzykluskinasen. Die p34^{cdc2} - Kinase und cdk2 phosphorylieren Ser315 (Bischoff et al., 1990), die Proteinkinase C phosphoryliert Ser378 und die Proteinkinase CK2 phosphoryliert Ser392 (Radhakrishnan et al., 2006; Yap et al., 2004). Diese Phosphorylierungen im C -Terminus begünstigen die Bindung an die DNA und spielen eine entscheidende Rolle bei seiner intrazellulären Lokalisation (Guerra et al., 1997; Wang et al., 1995). Auch andere Modifikationen in dieser Region scheinen die Bindung von p53 an die DNA zu beeinflussen; so kann die Bindung des p53 - Antikörpers, PAb421 oder der β - Untereinheit der CK2, welche auch an den C - Terminus des p53 binden kann, die DNA - Bindungsaktivität des p53 negativ beeinflussen (Murphy et al., 2001).

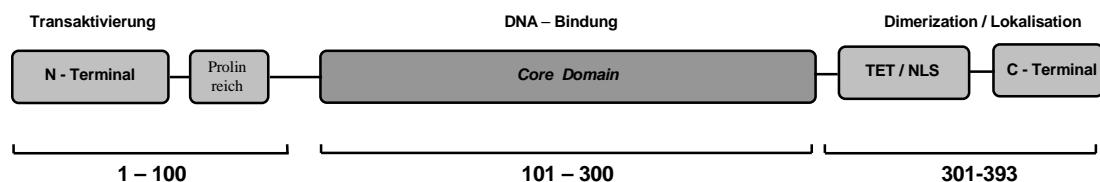


Abb. 6 Das humane p53 wird in drei Domänen unterteilt; jede Domäne hat ihre spezifische Funktion

I. Die Amino - terminale Region (N - Terminal, AA 1-42) enthält die saure Transaktivierungsdomäne und die Bindungsstelle des mdm2 - Proteins. Anschließend folgt eine hoch konservierte, prolin - reiche zweite Transaktivierungsdomäne.

II. Eine zentrale Region (*Core domain*, AA 101-306) enthält die DNA - Bindungsstelle und ist Ziel der meisten p53 - Mutationen, welche in humanen Tumoren zu finden sind.

III. Eine C - terminale Region wird wiederum in eine Oligomerisationsdomäne (AA 307-355, TET) und einen Carboxy - Terminus (AA 356-393) unterteilt. An der Oligomerisationsdomäne bilden p53 - Monomere die funktionell aktive Tetramer - Form. Im C - Terminus sind außerdem die nukleären Lokalisations - Signale (NLS) beherbergt. Die C - terminale Region stellt das Hauptziel der Zellzyklus - Kinasen dar; hier ist außerdem die Bindungsstelle der cdk's zu finden (AA 330-339 stellt die Bindungsstelle für die p34^{cdc2} - Kinase dar).

In normal proliferierenden Zellen liegt das p53 in seiner latenten inaktiven monomeren Form vor. Durch einen DNA - Schaden oder durch virale Onkogene wird die Aktivierung des p53 durch Bildung von p53 - Tetrameren induziert. Diese Aktivierung wird durch Stresssituationen, u.a. durch Hypoxie, Hyperoxie oder Wachstumsfaktoren induziert (Prives et al., 1999; Ronai Z., 1999).

Das p53 kann durch Interaktion mit verschiedenen Zellzyklus - Regulationsmechanismen schließlich das Wachstum der Zelle arretieren, die Reparatur des Schadens unterstützen und im Falle des Versagens dieser Aktivitäten zum Schutz des gesamten Organismus die Apoptose einleiten (Canman et al., 1995; Deguin-Chambon et al., 2000).

Um seine wachstumshemmenden Funktionen zu entfalten, akkumulieren p53 - Moleküle in der Zelle in der DNA - bindungsfähigen Tetramerform (Cho et al., 1994; Clore et al., 1994; Dell et al., 2000; Hupp et al., 1994). Das Stabilisieren der p53 - Menge in der Tetramerform ist alleine für seine Aktivität unzureichend. Damit das p53 eine transaktivierende Wirkung entfalten kann, müssen außerdem posttranslationelle Modifikationen an seiner Struktur erfolgen. Hierunter zählen zum einen die Acetylierung und/oder Phosphorylierung des Carboxy - Terminus, welche die DNA - Bindungsfähigkeit deutlich erhöht, zum anderen die Phosphorylierung des Amino -Terminus, welche seine Affinität für mdm2 verändert.

Unter Wirkung verschiedener Proteinkinasen und Phosphatasen und durch direkte Protein – Protein - Interaktionen wird das p53 aktiviert. Die aktive p53 - Tetramerform ist nun in der Lage, an bestimmte DNA – Sequenzen zu binden und die Transkription bestimmter Proteine zu induzieren (Prives et al., 1994). Unter anderem wird die Expression von Proteinkinase - Inhibitoren der Familie p21^{Waf1Cip1} durch p53 induziert; auch andere Moleküle, welche an DNA - Reparaturmechanismen beteiligt sind, können durch p53 transkribiert werden. Weiterhin wird die Transkription mancher Proteine gehemmt; so wird zum Beispiel

die Aktivität der p34^{cdc2} - Kinase durch Transrepression ihrer Aktivierungspartner, des Cyclin B1, gehemmt (Carrier et al., 1999; El Deiry et al., 1993; Kearsley et al., 1995; Zhan et al., 1999).

Die Aktivität von p53 wird über seine Menge, Lokalisation, posttranslationale Modifikation und über Protein – Protein - Interaktionen kontrolliert. Die Menge wird durch das Gleichgewicht zwischen Proteinsynthese und mdm2 - kontrollierte Degradation bestimmt (Haupt et al., 1997; Lin et al., 1994).

Das mdm2 bindet an den stabilitätsregulierenden N - Terminus des p53 und verhindert somit zum einen seine Interaktion mit dem transkriptionellen Apparat, zum anderen wird durch diese Bindung die Ubiquitin - abhängige p53 - Proteolyse in Gang gesetzt (Chen et al., 1995; Lin et al., 1994). Das mdm2 - Protein ist allerdings ein Transaktivierungsprodukt des p53 - Proteins; über diesen Weg reguliert das p53 durch einen feed - back Mechanismus seine eigene Menge / Aktivität in der Zelle (Haupt et al., 1997). Im Sinne der posttranslationalen Modifikation wird das p53 - Protein durch Interaktion mit verschiedenen Kinasen und Phosphatasen aktiviert und stabilisiert (Hecker et al., 1996; Jayaraman et al., 1999; Ko et al., 1997).

2.5 Fragestellung

Das Wachstumssuppressorprotein p53 wird durch verschiedene Zellzyklus - Kinasen an verschiedenen Aminosäuren in seiner C- und N - terminalen Region phosphoryliert (Fiscella et al., 1994; Jayaraman et al., 1999; Kapoor et al., 1998; Ko et al., 1997; Morgan D.O. 1995; Oren et al., 1999; Bischoff et al., 1990). Unter anderem ist an dieser Phosphorylierung die p34^{cdc2} – Cyclin - abhängige Kinase beteiligt (Bischoff et al., 1990; Sturzbecher et al., 1990).

Die p34^{cdc2} - Kinase phosphoryliert das p53 an Serin 315 (Bischoff et al., 1990; Wagner et al., 1998). In früheren Experimenten hatte P. Wagner gezeigt, dass p53 in Far Western Blot - Experimenten an p34^{cdc2} bindet (Wagner et al., 1998). Mit Hilfe von Deletionsmutanten war die Bindungsregion für p34^{cdc2} auf der Polypeptidkette im C - Terminus des p53 im Bereich der Aminosäuren 330-339 kartiert worden. In dieser Arbeit wollen wir analysieren, ob ein in Insektenzellen exprimiertes humanes p34^{cdc2} in der Lage ist, an p53 zu binden. Als Kontrolle haben wir ein p53 benutzt, dem die in früheren Experimenten definierte p34^{cdc2} - Bindungsstelle fehlte. Außerdem wollen wir überprüfen, ob durch diese Bindung *in vitro* und *in vivo* ein direkter Einfluss auf die p34^{cdc2} - Kinaseaktivität zu beobachten ist. Mit einer direkten Interaktion zwischen beiden Proteinen könnte p53 einen unmittelbaren und schnellen Einfluss auf die p34^{cdc2} – Kinase nehmen und einen schnellen Zellzyklusarrest herbeiführen.

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Bacto Agar	Difco, Hamburg
Benchmark™ Molekulargewichtsstandard	Gibco BRL, München
Complete™ - Proteaseinhibitor	Boehringer, Mannheim
Coomassie Brilliant blue G250	Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Dialyseschlauch (1800Da)	Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Dithiotreitol (DTT)	Sigma, München
EDTA	Sigma, München
EGTA	Sigma, München
Ethidiumbromid	Boehringer Ingelheim, Heidelberg
Filterpapier 3MM	Whatman, Maidstone, England
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, München
Guanidinhydrochlorid	Roth, Karlsruhe
IPTG	BTS, St. Leon-Roth
Kanamycin	Merck, Darmstadt
Kodak X-omat Film AR5	Sigma, München
Kodak SAFETY Film AR0	Sigma, München
LB-Medium	Gibco BRL, München
Ni ²⁺ - NTA - Agarose	Qiagen, Heidelberg
Protein A - Sepharose CL4B	Pharmacia, Heidelberg
Protein G - Sepharose CL4B	Pharmacia, Heidelberg
Protein - Molekulargewichtsstandard	Merck, Darmstadt

PVDF - Membran	Boehringer, Mannheim
Rinder - γ - Globulin	Sigma, München
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, München
Superfect™	Qiagen, Heidelberg
TEMED	Serva, Heidelberg
Triton X -100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Fluka, Neu-Ulm
^{32}P - γ - ATP	Hartmann Analytic, Braunschweig
^{35}S - Methionin	Hartmann Analytic, Braunschweig

3.1.2 Antikörper

Primäre Antikörper

folgende Antikörper wurden in den Experimenten benutzt:

- **PAb421**: p53 - spezifischer Antikörper. Monoklonaler Maus - Antikörper; erkennt ein Epitop zwischen den AS 370-378 auf der Polypeptidkette des p53 von Mensch, Maus, Esel und Ratte. (Harlow et al., 1981)
- **DO-1** : p53 - spezifischer Antikörper. Monoklonaler Maus - Antikörper, erkennt ein Epitop zwischen den AS 37-45 auf der Polypeptidkette des p53 von Rind, Primaten, Maus und Ratte. (Vojtesek et al., 1992)
- **p34^{cdc2} - Antikörper sc-54**: monoklonaler Maus - Antikörper (IgG_{2a}) (Santa Cruz); der Antikörper erkennt eine Sequenz aus 15 Aminosäuren im C - Terminus der von Mensch , Maus und *Xenopus* gebildeten p34^{cdc2} - Kinase.
- **p34^{cdc2} - Antiserum #338**: Antipeptidserum aus Kaninchen, das gegen ein Epitop aus 15 Aminosäuren zwischen 220-235 im C - Terminus der

p34^{cdc2} gerichtet ist. Das Serum wurde in unserer Arbeitsgruppe hergestellt.

- **Cyclin B1 - Antiserum #347:** Polyklonaler Antikörper, der in einem Kaninchen gewonnen wurde, das mit rekombinantem Cyclin B1 immunisiert wurde. Am stärksten erkannt wird ein Epitop zwischen den Aminosäuren 1-21. Der Antikörper wurde in unserer Arbeitsgruppe hergestellt.

Sekundäre Antikörper

Für Westernblot - Analysen:

- Gegen monoklonale Maus - Antikörper: Ziege – anti – Maus – Ig – Meerrettich - Peroxidase gekoppelter Antikörper (Dianova, Hamburg)
- Gegen polyklonale Kaninchenseren: Ziege – anti – Kaninchen – Ig – Meerrettich - Peroxidase gekoppelte Antikörper (Dianova, Hamburg)

3.1.3 Enzyme

p34 ^{cdc2} – Kinase	Promega, Mannheim
PWO - Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
Taq - Polymerase	MBI Fermentas, Heidelberg
Alkalische Phosphatase	MBI Fermentas, Heidelberg
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, Heidelberg

3.1.4 Bakterienstämme

E.coli Stamm BL21(DE3) (hsdS gal lclts857 ind1 Sam7 nin5 lac UV5-T7 gene 1), für Vektoren mit T7 – Promotor.

E.coli Stamm M15 (pRep4) wird für die Herstellung rekombinanter Proteine verwendet, deren cDNA in einen Vektor mit T5 - Promotor einkloniert ist.

Staphylococcus aureus (Stamm Cowan I)

Wird in Form einer Suspension inaktivierter Kokken für die Immunpräzipitation verwendet, da die Zellwände dieses Stammes Protein A enthalten, welches die Eigenschaft hat, Fc - Fragmente der Antikörper zu binden.

3.1.5 Plasmide und Baculovirusexpressionsvektoren

§ p34^{cdc2} - und Cyclin B1 - rekombinante Baculoviren, welche die cDNA für humane p34^{cdc2} und Cyclin B1 enthalten. Die cDNA wurde von D.O. Morgan in einen Vektor mit Polyhedrinpromotor einkloniert und in das Baculovirus *Autographa californica* (AcNPV) transferiert (D.O, Morgan, San Francisco).

§ pAchup53wt: Baculotransfervektor für die cDNA für Wildtyp - p53 (Michael Hoever)

§ *Autographa californica* nuclear polyhedrosis Virus: Wildtyp Baculovirus (Leervektor), wurde zu Kontrollzwecken benutzt (Smith et al., 1983).

§ p53: pET 19b-p53wt (Schneider et al., 1998), T7 - Promotor kontrollierter bakterieller Expressionsvektor.

- § p53_{R175H}: pET 19b-p53His175 (Schneider et al., 1998)
- § p53_{Δ293-343}: pET19b-p53_{Δ293-343}
- § p53_{C-Terminus}: pQE30-p53_{CT}, p53_{CT}S315A, p53_{CT}S315D (Guerra et al., 1994).

pET19b - Vektor (Novagen) und pQE30 - Vektor (Qiagen) erlauben die Proteinexpression unter der Kontrolle eines IPTG induzierbaren T7 - bzw. T5 - Polymerasepromotors.

Das Baculovirus - Expressionssystem ist für die Herstellung rekombinanter Proteine in Insektenzellen geeignet.

3.1.6 Geräte

Beckman J2-HS Kühlzentrifuge	Beckman, München
Sigma 4K10 Kühlzentrifuge	Sigma, Osterode
Eppendorf 5414 Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Ultrospec III Einstrahlphotometer	Pharmacia, Freiburg
Brutschrank mit CO ₂ - Begasung (Typ B6220)	Heraeus, Hanau
Brutschrank ohne CO ₂ - Begasung (Typ B6200)	Heraeus, Hanau
Bakterienbrutschrank	Heraeus, Hanau
Varioklav 400 Dampfsterilisator	H+P-Labortechnik, Oberschleisheim
Epifluoreszenzmikroskop Axioskop	Zeiss, Oberkochen
Inverses Mikroskop Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen
Ultraschall - Eisbad Transsonic 460 (Leistung 10 kHz)	Fa. Elma, Singen
Vakuum - Geltrockner	Fröbel Labortechnik, Lindau

3.1.7 Puffer und Lösungen

Proben - Puffer	(SDS - Probenpuffer nach Laemmli, 1970). 4% SDS; 200 mM DTT; 120 mM Tris-HCl (pH 6.8); 10 mM β -Mercaptoethanol; 20% Glycerin; 0.02% Bromphenolblau.
NET - Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 5 mM Na ₃ EDTA; 5% Saccharose; 0.03% NaN ₃ ; 1% NP40.
DNA - Ladepuffer	1 mM Na ₃ -EDTA; 10 mM Tris-HCl (pH 8.0); 0.1% SDS; 30% Glycerin; 0.25% Bromphenolblau.
Kinase - Lagerungspuffer	50 mM Tris-HCl (pH 7.5); 100 mM NaCl; 0.1 mM EDTA; 1 mM DTT; 0.01% Brij; 50% Glycerol.
Kinase - Aktivitätspuffer1	50 mM (0.606 g/100 ml) Tris-HCl; 100 mM (0.584g/100 ml) NaCl; 10 mM (0.203g/100 ml) MgCl ₂ ; 1mM (0.015g/100 ml) DTT.
Kinase - Aktivitätspuffer2	1 μ Ci [³² P- γ]-ATP; 50 mM Tris-HCl (pH 7.5); 10 mM MgCl ₂ ; 2 mM DTT; 1 mM EGTA; 0.01% Brij.
Bakterien - Lysepuffer	6 M Guanidinhydrochlorid; 50 mM NaH ₂ PO ₄ ; pH 8.0
Sf9 - Zellen - Lysepuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7.5); 130 mM NaCl; 1% Triton X 100; 10 mM NaF; 10 mM NaPi; 10 mM NaPPi.
Säugerzellen - Lysepuffer	10 mM Hepes/ KOH (pH 7,5); 150 mM NaCl; 0,5% Triton X 100.

Waschpuffer für ELISA	PBS, pH 7.1; 1% Triton X-100.
Probenverdünnungspuffer	PBS, pH 7.1; 1% BSA (für ELISA).
Dialyse - Puffer für p53	NaCl (0.877 g / 100 ml), MgCl ₂ (0.102 g / 100 ml), Tween 20 (0,5 ml /100 ml)
Coomassie - Färbelösung	0.1% Coomassie-Brillant-Blau; 25% Methanol; 7% Eisessig; 68% H ₂ O.
PBS (Phosphate buffered saline)	8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ ; 137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; pH 7.3.
SDS - Probenpuffer	4% SDS; 200 mM DTT; 120 mM Tris HCl (pH 6.8); 10 mM 2-Mercaptoethanol; 0.02% Bromphenolblau; 20% Glycerin.
TAE - Puffer	10 mM Na ₃ -EDTA; 200 mM Na-Acetat; 400 mM Tris- HCl (pH 7.4).
Waschpuffer für Westernblot	0.05% Tween 20 in PBS
SOB - Medium	2% (w/v) Bacto-Trypton; 0.5% (w/v) Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2.5 mM KCl; 10 mM MgSO ₄ ; 10 mM MgCl ₂
LB - Medium	10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; pH 7.5
Stop – Lade - Mix	1 mM Na ₃ -EDTA; 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.1% (w/v) SDS; 30% (v/v) Glycerin; 0.25% (w/v) Bromphenolblau

TB - Puffer	10 mM Pipes; 15 mM CaCl ₂ ; 250 mM KCl; 55 mM MnCl ₂ ; pH 6.7
Transfer - Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 8,3; 150 mM Glycin
Lösung 1 (DNA - Reinigung)	50 mM Glukose; 25 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM Na ₃ -EDTA ; 0.1% (w/v) Lysozym; 100 µg/ml RNase A
Lösung 2 (DNA - Reinigung)	0.2 M NaOH, 1% (w/v) SDS
Lösung 3 (DNA - Reinigung)	3 M K-Acetat, pH 4.8

3.2 Methoden:

3.2.1 Allgemeiner Teil

3.2.1.1 SDS – Polyacrylamidgel - Herstellung

Für die Herstellung von SDS - Polyacrylamidgelen werden folgende Lösungen verwendet:

Lösung A: Acrylamid - Stammlösung bestehend aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid im Verhältnis von 30 : 0.8

Lösung B (in Trenngel verwendet): 375 mM Tris-HCl (pH 8,8)

Lösung C (in Sammelgel verwendet): 125 mM Tris-HCl (pH 6,8)

Für die Polymerisation im Trenngel: 0.1% (w/v) APS; 0,2% (v/v) TEMED

Für die Polymerisation im Sammelgel: 0.05% (w/v) APS; 0.06% (v/v) TEMED

Für die Auftrennung von Proteinen werden SDS – Polyacrylamid - Gele mit einer Acrylamidkonzentration im Trenngel von 10%, 12.5% oder 15% verwendet.

Die Wahl der passenden Gelkonzentration hängt von den Molekulargewichten der zu untersuchenden Proteine ab, z.B. für Proteine im Bereich von 30-55 kDa eignen sich 12,5% Gele.

Das Sammelgel wird immer mit einer Acrylamidkonzentration von 4.3% hergestellt.

3.2.1.2 SDS – Polyacrylamid - Gel-Elektrophorese (SDS - PAGE)

In einer SDS - Polyacrylamidgel - Apparatur (Serva, Heidelberg) können Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Hierfür werden die Proteine mit dem SDS - Probenpuffer (4% SDS; 200 mM DTT; 120 mM Tris HCl (pH 6.8); 10 mM 2-Mercaptoethanol; 0.02% Bromphenolblau; 20% Glycerin) vermischt, 5 Minuten bei 95 °C inkubiert und in die Sammeltaschen des SDS - Polyacrylamidgels gebracht; die Elektrophoresenapparatur wird mit dem Elektrophoresenpuffer (22 mM Tris-HCl (pH 8.8); 192 mM Glycerin; 3.5 mM SDS) aufgefüllt; die Trennung der Proteine erfolgt anschließend im elektrischen Feld. Das Auftrennen der Proteine hängt vom Molekulargewicht und von der Größe der einzelnen Proteine ab. Je nach Matrixdurchlässigkeit des Trenngels, welche wiederum von der Acrylamidkonzentration abhängt, wandern kleinere und leichtere Proteine schneller durch das Gel als größere und schwerere Proteine. Die Elektrophorese wird beendet, wenn die Bromphenolblaufront den unteren Rand des Gels erreicht. Als Größenmarker wird ein Proteinmix mit bekannten Molekulargewichten verwendet.

Die auf diese Weise getrennten Proteine können direkt im Gel gefärbt (Coomassie - Blau Färbung) oder zum Zweck des Westernblotting auf eine

PVDF - Membran übertragen werden; radioaktiv markierte Proteine können nach Trocknen des Gels autoradiographisch auf einem Film dargestellt werden.

3.2.1.3 Proteinmarker

In dieser Arbeit wird ein Proteinmarker der Firma Merck verwendet; dieser Proteinmix enthält Markerproteine mit folgenden Molekulargewichten: 12 kDa, 16 kDa, 30 kDa, 43 kDa, 66 kDa, 78 kDa. Dieser Marker eignet sich für ein direktes Färben der Proben im SDS - Polyacrylamidgel. Darüber hinaus wurde ein Marker der Firma Gibco BRL (Prestained™) verwendet, welcher besonders geeignet ist für den Transfer von Proben vom SDS - Polyacrylamidgel auf eine PVDF - Membran. Prestained™ enthält Markerproteine mit folgenden Molekulargewichten: 9 kDa, 15 kDa, 21 kDa, 26 kDa, 39 kDa, 52 kDa, 64 kDa, 87 kDa, 120 kDa, 194 kDa. Das Markerprotein 39 kDa ist rot gefärbt.

3.2.1.4 Proteinfärbung

Die in einem SDS - Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine können in einer Coomassie - Färbelösung für 30 min. gefärbt werden; dadurch werden sie auch fixiert. Anschließend wird das Gel in einer Lösung aus 10% Eisessig, 20% Methanol und 70% H₂O entfärbt; somit werden die gefärbten Proteine sichtbar gemacht.

3.2.1.5 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Lösung wird die Methode nach Bradford verwendet (Bradford et al., 1976). Aus der zu bestimmenden Proteinlösung werden mehrere Proben entnommen und jeweils auf 100 μ l mit destilliertem Wasser aufgefüllt, dazu wird je 1 ml Bradfordlösung (auf Coomassie – Brillant - Blau - Basis hergestellt) gegeben. Nach 5 Minuten wird die Absorption der Proben mit dem Spektralphotometer bei 595 nm gemessen. Mit Hilfe einer Eichgeraden, die mit bekannten Konzentrationen des Rinder - γ - Globulins erstellt wurde, lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

3.2.1.6 Herstellung von Zellextrakten

Die Zellen werden dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 4°C mit 400 x g für 5 min abzentrifugiert. In einem geeigneten Lysepuffer werden die Zellen dreimal für 3 min im Ultraschall - Eisbad aufgeschlossen. Zum Trennen der Proteine von den restlichen Zelltrümmern werden die lysierten Zellen bei 15000 x g für 60 min bei 4°C abzentrifugiert.

3.2.1.7 Westernblot - Analyse

Diese Methode eignet sich zum spezifischen Nachweis bestimmter Proteine im Zellextrakt. In einem Zellextrakt sind die gelösten Proteine enthalten. Um einen Westernblot durchzuführen, werden die Proteine im Zellextrakt über SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF - Membran transferiert. Um unspezifische Bindungen an der transferierten Membran zu vermindern, wird diese in einem Block - Puffer (0,05% (v/v) Tween 20 in PBS; 5% (w/v) Trockenmilchpulver) für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wird die Membran über Nacht bei 4°C (oder bei Raumtemperatur für eine Stunde) mit einer geeigneten Antikörper - Konzentration im Inkubationspuffer (0,05% (v/v) Tween 20 in PBS; 1% Trockenmilchpulver) gegen das nachzuweisende Protein inkubiert. Anschließend wird überschüssiger Antikörper gewaschen, und die Membran wird mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Der sekundäre Antikörper soll von einer anderen Spezies als der primäre stammen, muss gegen das Fc - Fragment des primären gerichtet und mit Meerrettich - Peroxidase gekoppelt sein, was ihn durch Zugabe von ECL - Reagenz (Amersham) lumineszierend macht und so einen Nachweis ermöglicht.

3.2.1.8 *In vitro* Kinaseassay (p34^{cdc2} - Histon H1 - Kinaseassay)

In geeigneter Umgebung kann man die Phosphorylierungsaktivität einer Kinase anhand ihrer Substrate überprüfen. Als Phosphatgruppendonator wird ³²P - γ -ATP verwendet. Durch Einbau der radioaktiv - markierten Phosphatgruppe in das Substrat kann die Aktivität der Kinase sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurden gereinigte p34^{cdc2} - Kinase der Firma Promega, immunpräzipitierte p34^{cdc2} - Kinase oder Zellextrakte für die Kinaseassay - Untersuchungen benutzt. Die gereinigte p34^{cdc2} - Kinase wird in Kinasepuffer verdünnt, sodass eine Endkonzentration von 1 Einheit pro 10 μ l erreicht wird. Die immunpräzipitierte Kinase und Zellextrakte werden in gleichen Mengen Kinasepuffer eingesetzt. 1 mg Histon H1 wird in 100 μ l bidestilliertem H₂O gelöst, auf eine Konzentration von 10 μ g/ μ l. Pro Ansatz werden je 10 μ g Histon H1 eingesetzt. Je nach Experiment wird die Kinase verschiedenen Bedingungen ausgesetzt. Zum Darstellen der Inhibition der Kinase durch p53 wird sie mit verschiedenen Mengen p53 bei 4°C vorinkubiert. Dann wird zu den einzelnen Kinase - Ansätzen jeweils 1 μ l Histon H1 - Lösung (=10 μ g Histon H1) zupipetiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von ³²P - γ -ATP bei 37°C

gestartet. Nach 30 min. wird dann die Reaktion durch Zusatz von je 10 µl eines fünffach - konzentrierten Probenpuffers gestoppt. Die Proben werden auf einem 12.5%igem SDS - Gel per SDS - PAGE getrennt; anschließend wird das Gel gefärbt. Nach Entfärben des Gels wird dies getrocknet. Mittels Autoradiographie kann man die Phosphorylierung des Histon H1 sichtbar machen und seine relative Intensität messen.

3.2.1.9 Autoradiographie

Radioaktiv markierte Proteine werden über SDS - PAGE aufgetrennt; das Gel wird über eine Stunde bei 95 °C getrocknet und anschließend mit einem Röntgenfilm (Xomat AR, Kodak) inkubiert; je nach Intensität der Strahlung kann die notwendige Expositionszeit zwischen Sekunden und Tagen betragen. Bei ³⁵S - Methionin als Strahlenquelle wird das Bandenmuster durch Inkubation bei -80°C schärfer dargestellt.

3.2.1.10 Immunpräzipitation

Das Protein A des Staphylococcus aureus (Stamm Cowan I) bindet spezifisch Fc - Fragmente der verschiedenen Antikörper. Benutzt man einen bestimmten Antikörper, welcher im Zellextrakt an ein bestimmtes Protein bindet, kann man diesen Antigen - Antikörper - Komplex mit Hilfe des Protein A in Staphylokokken - Membran herausfischen. Das gleiche kann man mit an Sepharose - gekoppeltem Protein A erreichen.

1 ml inaktivierte Staphylokokken - Suspension bzw. 2 mg Protein A - gekoppelte Sepharose werden über eine Stunde auf Eis mit dem Zellextrakt vorinkubiert, um unspezifische Bindungen zwischen Lysat und der Sepharose zu verhindern. Dies kann man mehrmals wiederholen; dabei wird das letzte Vorpräzipitat als

Kontrolle aufbewahrt. Diese Zellextrakt – Sepharose - Suspension wird dabei bei 14000 rpm in einer Eppendorf - Tischzentrifuge abzentrifugiert, und zu dem Überstand wird neue Sepharose gegeben. Der vorpräzipitierte Zellextrakt wird anschließend mit dem Antikörper für 1 h auf Eis vorinkubiert und dann wird für eine weitere Stunde 40 µl Protein A / Sepharose zugegeben; danach wird wie bei der Vorpräzipitation die Sepharose vom Zellextrakt abgetrennt und bis zur Anwendung auf Eis gelagert.

Um die durch Immunpräzipitation gewonnenen Proteine aus deren Bindung mit der Sepharose zu eluieren, werden die Immunpräzipitate dreimal mit NET - Puffer gewaschen und abzentrifugiert, schließlich in Probenpuffer resuspendiert und bei 95 °C gekocht. Dann wird die Sepharose bzw. die Staphylokokken abzentrifugiert. Proteine im Überstand können dann über SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt werden.

3.2.1.11 *In vitro* Translation eines Proteins

Humanes Wildtyp p53 und p53_{Δ293-343} wurden in dieser Arbeit in Anwesenheit von ³⁵S - Methionin *in vitro* translatiert; dafür wurde das *in vitro* Translationskit, TNT[®] T7 Rabbit Reticulocyte Lysate System, der Firma Promega verwendet. Die Reagenzien wurden bei -80 °C aufbewahrt. Die RNA - Polymerase wird zum Auftauen einfach auf Eis gestellt, das Retikulozytenlysat wird bei 37 °C aufgetaut und dann auf Eis gelegt.

In einem 1.5ml Reaktionsgefäß werden folgende Komponenten zusammengemischt:

TNT[®] Rabbit Retikulozyten Lysat (25 µl)

TNT[®] Reaktionspuffer (2 µl)

TNT[®] RNA T7 - Polymerase (1 µl)

Aminosäuren Mixtur, ohne Methionin, 1 mM, 1 µl

³⁵S - Methionin (10 mCi/ml), 2 µl

RNasin® Ribonuklease Inhibitor (40 U/µl) 1 µl

p53 DNA template (0.5 µg/µl) jeweils 2 µl

Nuclease - freies Wasser wird zu einem Endvolumen von 50 µl zugegeben.

Die Reagenzien werden für 90 Minuten bei 30 °C inkubiert.

Das Lysat kann man dann über SDS - PAGE mit den entsprechenden Kontrollen auf Translationserfolg überprüfen. Um die Menge des gebildeten Proteins zu bestimmen, werden auf einem 12.5%igem SDS - Polyacrylamidgel zweimal jeweils 5 µl vom Retikulozytenlysat aufgetragen; auf dem gleichen Gel werden sieben Proben einer Suspension mit definiertem p53 - Gehalt in aufsteigenden Konzentrationen mit aufgetragen. Nach Trennen der Proben über SDS - PAGE, wird das Gel mit Coomassie - blau gefärbt. Nach densitometerischem Vermessen der Farbstärke des p53 in den Proben mit bekannten Konzentrationen kann man aus der Relation zwischen der Farbstärke und der Konzentration die Konzentration des p53 im Retikulozytenlysat ausrechnen.

3.2.1.12 Herstellung von LB - Agarplatten

In geeigneter Menge LB - Medium wird Bactoagar im Verhältnis 2 Gramm Agar/100 ml Medium aufgelöst. Diese Lösung wird durch Autoklavieren sterilisiert und auf 50 –60 °C abgekühlt. Bei Erreichen dieser Temperatur werden dann steril filtrierte Antibiotikastammlösungen zugefügt. Bei Ampicillin soll die Endkonzentration in den Selektionsplatten 50 µg/ml betragen; Kanamycin mit einer Endkonzentration von 25 µg/ml ist ausreichend. Die immer noch flüssige Lösung aus Agar, Medium und Antibiotikum wird nun in 10 cm Petrischalen gegossen und gekühlt. Nur Bakterien, die ein Resistenzgen gegen das jeweilige Antibiotikum enthalten, können auf diesen Platten wachsen.

3.2.2 Zellbiologischer Teil

3.2.2.1 Zelllinien und Zellkultur

Sf9 - Zellen

Eukaryotische Insektenzelllinie aus *Spodoptera frugiperda*. Die Zellen sind stabil und lassen sich leicht mit Baculoviren infizieren. In der vorliegenden Arbeit wurden sie daher mit rekombinanten Baculoviren zur Herstellung rekombinanter Proteine infiziert.

Die Sf9 - Zellen werden bei 27°C in 25 cm³ Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zellen haben eine Generationszeit von etwa 20 Stunden. Das Kulturmedium besteht aus Sf900 Medium (Gibco, Lifetechnologies) und 10 Vol.% FCS (fetal calf serum). Zum Splitten der Zellen werden diese durch Abklopfen der Kulturflasche mobilisiert und im Verhältnis 1:5 auf neue Flaschen verteilt.

SÄUGERZELLEN (SAOS - Zellen)

Säugerkzellen werden bei 37 °C kultiviert und der Brutschrank mit 5%igem CO₂ – Luft - Gas - Gemisch begast. Als Nährmedium wird DMEM - Medium mit 10 Vol.% FCS verwendet. Zum Splitten der Zellen werden diese mit einer Trypsin/ EDTA - PBS Lösung abgelöst und auf weitere Kulturschalen in Abhängigkeit ihrer Dichte im Verhältnis von 1:5 bis 1:10 verteilt.

3.2.2.2 Tauen/Einfrieren von Zellen

In flüssigem Stickstoff lassen sich Zellen über längere Zeit aufbewahren. Zum Einfrieren werden die Zellen erst durch Abklopfen bzw. Abschaben von der Kulturschale abgelöst, anschließend bei 400 x g abzentrifugiert. Unter ständigem sanften Schütteln wird FCS - freies Nährmedium zu den Zellen gegeben. Die suspendierten Zellen werden nun in der Gasphase des Stickstoffs eingefroren und im flüssigen Stickstoff aufbewahrt.

Das Auftauen der Zellen erfolgt rasch bei 37°C, dann wird das alte Medium durch Abzentrifugieren (400 x g) entfernt; frisches Medium mit 10% FCS wird dann langsam zugeführt, und die Zellen in Kulturschalen bzw. Flaschen eingebracht, wo sie nun wachsen dürfen.

3.2.2.3 Lysieren von Zellen

Zum Herstellen von Gesamtzellextrakten werden die Zellen in der Kulturschale drei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen und von der Kulturschale abgeklopft bei Sf9 – Zellen bzw. abgeschabt bei Saos - Zellen. Bei 4°C werden die Zellen anschließend für 10 min. bei 900 rpm (Sigma - Kühlzentrifuge, Rotor 11140) abzentrifugiert. Die Zellen werden dann im entsprechenden Lysepuffer [Sf9 - Zellen - Lysepuffer: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5); 130 mM NaCl; 1% Triton X-100; 10 mM NaF; 10 mM NaPi; 10 mM NaPPi. und 10 µl Complete™] im Ultraschall - Eisbad bei maximaler Leistung dreimal über 3 min. zertrümmert. Die Zelltrümmer werden dann für eine Stunde bei 15000 x g und 4°C abzentrifugiert. Aliquots definierter Mengen (hängt von der Gesamtproteinkonzentration ab) werden bei -20 °C für eine Stunde mit Aceton ausgefällt; dann bei 4°C für ½ Stunde bei 15000 x g abzentrifugiert. Das so erhaltene Proteinpellet wird luftgetrocknet, anschließend schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.2.4 Infektion von Sf9 - Zellen mit Baculovirus und Ernten des überexprimierten Proteins

Das *Baculovirus Expression Vector System* (BEVS) wird für die Transfektion von Insektenzellen mit fremder DNA verwendet (Weiss S.A. et al., 1991). In dieser Arbeit sind rekombinante humane p34^{cdc2} – Kinase und Cyclin B1 über dieses

System in *Spodoptera frugiperda* Zellen exprimiert worden. Die dafür kodierenden rekombinanten Baculoviren stammen von D.O. Morgan, San Francisco.

In 25 ml Kulturflaschen werden Sf9 - Zellen in SF900 - Medium (+10% FCS) bei 27°C bis zu einer 50% Konfluenz kultiviert. Das Medium wird dann abgesaugt, und die Zellen werden mit 75 µl Virussuspension in 2 ml Sf900 - (+10% FCS) Medium infiziert. Nach 3 Stunden werden weitere 3 ml Medium (+10% FCS) zugegeben. Die Zellen werden dann nach drei Tagen geerntet und in Lysepuffer aufgeschlossen. Die Proteinproduktion wird über Westernblot bestätigt. Das Zellysats wird bei –80 °C aufbewahrt.

3.2.2.5 Herstellen von kompetenten *E. Coli* (BL21 /DE3) für die Transformation von DNA

Die Bakterien werden auf einer Selektionsagarplatte kultiviert; eine einzelne Kolonie wird dann in 250 ml SOB - Medium überimpft, und bei 18°C auf dem Schüttler inkubiert. Erreichen die Zellen eine optische Dichte bei 600nm von 0.6 bis 0.8 , werden sie für zehn Minuten auf Eis inkubiert; anschließend werden diese bei 4°C zehn Minuten lang mit 8000 rpm (Rotor JA10, Beckman) abzentrifugiert. Das Pellet wird in eiskaltem TB - Puffer resuspendiert und weitere zehn Minuten auf Eis inkubiert. Schließlich werden die Bakterien abzentrifugiert und in 20 ml TB - Puffer plus 1.4 ml DMSO unter leichtem Schütteln vermischt und weitere zehn Minuten auf Eis gelegt. Nun sind die Bakterien für die Transformation bereit. Zur späteren Anwendung werden die Bakterien bei –80°C aufbewahrt.

3.2.2.6 Transformation von pET19b und pQE30 p53 in BL21(DE3) per Hitzeschock

pET19b - Vektor (Novagen) und pQE30 - Vektor (Qiagen) erlauben die Proteinexpression unter der Kontrolle eines Promotor -/Repressor - Systems (T7 - Polymerase Promotor in den pET19b -, und T5 - Polymerasepromotor in den pQE30 - Vektor; beide Vektoren enthalten einen lac - Repressor). Durch Zusatz von IPTG wird die durch den lac - Repressor gehemmte Proteinexpression in Gang gesetzt. In dieser Arbeit werden folgende Vektoren verwendet: pET 19b-p53wt, pET 19b-p53His175, pET19b-p53 Δ 293-343, pQE30-p53_{CT}, p53_{CT}S315A, p53_{CT}S315D.

Kompetente *E. coli* Bakterien (Stamm BL21 / DE3) werden in LB - Medium kultiviert. Für die Transformation der DNA werden 10 μ l DNA und 200 μ l Bakteriensuspension in einem Eppendorf - Röhrchen zusammengemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wird das Gemisch in einem auf 42°C vorgewärmten Wasserbad für 90 Sekunden inkubiert, dann wieder für zwei Minuten auf Eis inkubiert. Zum Schluss wird ein Milliliter LB - Medium zugegeben und bei 37 °C für eine weitere Stunde geschüttelt. Nach Ablauf dieser Zeit wird die Bakteriensuspension abzentrifugiert und das Pellet auf einer mit Ampicillin - beimpften LB - Agar Platte aufgetragen. Bei 37°C dürfen die Bakterien über Nacht wachsen. Für die Proteinexpression wird dann eine der Bakterienkolonien in 800 ml LB - Ampicillin - Flüssigmedium bei 37°C zur Herstellung einer Flüssigkultur eingebracht.

3.2.2.7 Amplifikation und Reinigung einer Plasmid - DNA in *E.coli*

Die Plasmid - DNA wird zuerst in einen geeigneten *E.coli* Stamm transformiert. Das Plasmid enthält u.a. ein bestimmtes Antibiotikum - Resistenzgen. Auf geeigneter Selektionsagar - Platte werden die Bakterien kultiviert, und nach 24 Stunden wird aus einer Kolonie eine Kultur in 250 ml LB - Medium (+

Antibiotikum) angelegt. Die Bakterienkultur wird unter ständigem Schütteln bei 37°C kultiviert, bis sie eine optische Dichte OD₆₀₀ zwischen 0.6-1.0 erreicht. Die Bakterien werden bei 4°C, 5000 rpm (Rotor JA10, Beckman) abzentrifugiert und in 4 ml Lösung 1 resuspendiert. Dazu werden weitere 4 ml der Lösung 2 zugesetzt, und anschließend für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann werden 4 ml der Lösung 3 zugegeben; das Gemisch wird dann für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension beinhaltet die Plasmid - DNA, genomische DNA und Zelltrümmer. Um die genomische DNA und die Zelltrümmer von der Plasmid - DNA abzutrennen, wird die Suspension bei 15000 rpm (Rotor JA20, Beckman), 4°C für 30 Minuten abzentrifugiert. Das Plasmid wird aus dem Überstand über das Qiagen Tip-100[®] DNA - Reinigungssystem nach dem Herstellerprotokoll gereinigt. Die Plasmid - DNA wird zum Schluss mit 70%igem Ethanol gewaschen, abzentrifugiert und nach dem Trocknen in bidestilliertem Wasser aufgenommen und auf eine Konzentration von 1 µg/ µl eingestellt. Nach dem Restriktionsverdau mit den entsprechenden Restriktionsnukleasen wird über horizontale Agarose - Gelelektrophorese der Erfolg der Reinigung kontrolliert.

3.2.2.8 Bakterielle Expression und Reinigung von 6xHis - „tagged“ Proteinen aus *E. coli*

In den *E. coli* Stamm BL21(DE3) wird der Vektor pET19b p53 transformiert. Die Bakterien werden auf dem Selektionsagar LB - Ampicillin (150 µg/ml) ausplattiert. Nach 24 Stunden bei 37°C wird mit einer Kolonie in 100 ml LB - Medium + Ampicillin eine Vorkultur angefertigt. Nach weiteren 24 Stunden wird eine Hauptkultur durch Zusatz von 800 ml LB - Medium + Ampicillin hergestellt. Die Bakterien werden bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert, bis sie eine optische Dichte (OD₅₅₀) von 0,6 erreicht haben. Zu diesem Zeitpunkt wird 1 ml der Bakteriensuspension als Induktionskontrolle abgenommen.

Die Proteinexpression wird mit 0.9 ml IPTG (1 M Stammlösung wird im Verhältnis 1/1000 eingesetzt) induziert; nach 3 Stunden bei 37°C werden die Bakterien durch Zentrifugation bei 2000 x g für 15 Minuten geerntet, das Pellet wird in sterilem Wasser resuspendiert und wieder abzentrifugiert. Das gewaschene Pellet wird jetzt in 20 ml einer 10%igen Glycerinlösung (steril, 4 °C) resuspendiert und bei 4000 x g abzentrifugiert. Schließlich wird das Pellet in einem Milliliter Glycerinlösung resuspendiert und für die Proteinreinigung bereitgestellt.

Proteinreinigung mit Ni²⁺ - NTA - Affinitätschromatographie

Ni²⁺ - NTA - Agarose (1 ml Agarose/ 1 Liter Kulturvolumen; Qiagen) wird 2x mit 10 ml bidest. Wasser gewaschen, dann mit 100 mM NiSO₄ (5 ml) und anschließend wieder 2x mit 10 ml bidest. Wasser. Mit dem Bakterien - Lysepuffer (6 M Guanidin-HCl; pH 8.0; 50 mM Na₂HPO₄) wird die Agarose equilibriert. Das Bakteriensediment wird in 12 ml (pro Liter Kulturvolumen) des Lysepuffers resuspendiert und eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler aufgeschlossen. Der so entstandene Zellextrakt wird bei 5000 x g für 30 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Das nun aufgeschlossene Proteinpellet wird dann mit 500 µl Ni²⁺ - NTA - Agarose für eine Stunde auf dem Schüttler bei 4°C inkubiert; danach lässt man den Überstand durchlaufen; dabei bleiben 6x His - „tagged“ Proteine an der Ni²⁺ - Agarose hängen. Für 10 Minuten bei 400 x g wird das Gemisch (Agarose und Proteinpellet) abzentrifugiert. Das Sediment wird mit einem Lysepuffer (pH 8) zweimal, und mit einem Lysepuffer (pH 6) einmal gewaschen. Die Elution des Proteins von der Agarose - Matrix erfolgt dann in einer Säule mit dem Elutionspuffer (Lysepuffer mit einem pH - Wert von 4.0); dafür wird solange mit dieser Lösung gewaschen, bis das Eluat eine optische Dichte O.D.₂₈₀ von weniger als 0,01 erreicht. Durch Zusatz von Imidazol zu dem Elutionspuffer wird das gebundene p53 schrittweise eluiert; dabei wird die Konzentration an Imidazol von 50 mM, 150 mM und zum Schluss auf 250 mM erhöht.

Bei 280 nm werden die Eluate auf deren Proteingehalt getestet; Eluate mit einer OD von mehr als 0.2 werden über Nacht in Dialysepuffer (hier haben wir den Kinasepuffer als Dialysepuffer benutzt) umdialysiert. Das Dialysat wird über SDS - PAGE auf Reinheit und über Westernblot mit dem p53 - Antikörper PAb421 überprüft und für weitere Anwendungen bei -80°C aufbewahrt.

3.2.2.9 Optimierung der Expression rekombinanter Proteine

Nach Transformation der *E. coli* /BL21 Bakterien mit dem entsprechenden Plasmid werden diese auf Selektionsagar gezüchtet. Mit einer Kolonie aus dem Transformationsansatz werden 1.5 Milliliter Medium (LB - Medium + Antibiotikum) angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. 8.75 Milliliter Medium mit Antibiotikum werden mit 1.25 Milliliter aus der Vorkultur angeimpft und für 30 Minuten bei 37°C wachsen gelassen. Die Bakterienkultur sollte zu diesem Zeitpunkt eine optische Dichte bei 600 nm von 0.7-0.9 haben. Wäre dies nicht der Fall, würde man die Kultur weiter wachsen lassen. Durch Zusatz von 20 μl einer 1 M IPTG - Stammlösung wird die Proteinexpression induziert. Zur Aufnahme der Induktionskinetik wird zu den Zeitpunkten $t=0$ h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h und 5 h je ein Milliliter entnommen, abzentrifugiert, und die Pellets bei -20°C aufbewahrt. Die gesammelten Proben werden nun in je 200 μl Lyse - Puffer resuspendiert und auf 50 μl einer mit Lyse-Puffer vorgewaschenen Ni^{2+} - Agarose - Suspension zugegeben. Nach 30 Minuten Schütteln bei Raumtemperatur wird die Agarose abzentrifugiert. Der Überstand wird als Kontrolle aufgehoben. Die Proteine werden nach Waschen der Ni^{2+} - Agarose eluiert (siehe Proteinreinigung über Nickel - Agarose). Die Eluate werden mit je 5 μl eines 5fachen Probenpuffers vermischt, bei 95°C für sieben Minuten inkubiert und schließlich auf ein SDS - Gel aufgetragen und über SDS - PAGE aufgetrennt. Nach Färben des Gels mit Coomassie - Blau kann man die Menge und die Reinheit der Eluate beurteilen. Unter den Bedingungen, welche die bestmögliche Expression des Proteins erlauben, wird eine Kultur in großem Maßstab angelegt.

3.2.3 DNA - Methodik

3.2.3.1 PCR (Polymerase - Kettenreaktion; *engl. Polymerase chain reaction*)

Mit der Polymerase - Kettenreaktion kann man direkt spezifische DNA - Sequenzen amplifizieren, sofern die Sequenzen beider Enden bekannt sind. Doppelsträngige DNA wird durch Erhitzen auf 94°C für 2 min. in Einzelstränge überführt. Zwei komplementäre synthetische DNA - Oligonukleotide, die an den Enden der zu amplifizierenden Oligonukleotid - Sequenz binden, werden hinzugegeben. Durch Abkühlen auf 54 °C treffen die abgespaltenen DNA - Abschnitte aufeinander. Dadurch, dass die komplementäre DNA im Überschuss vorhanden ist, ist ihre Bindung zur komplementären Sequenz höher als die, die durch das Schmelzen zuvor getrennt wurde. Die Oligonukleotide dienen als Starter (Primer) für die DNA - Polymerisation. Über die Primer werden gleichzeitig Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingeführt. Zu dem Gemisch aus denaturierter DNA und den zwei Primern werden das dNTP - Gemisch und die Taq – Polymerase im Überschuss zugesetzt. Das ganze wird auf 54 °C gekühlt, wodurch die beiden Primer an den passenden DNA - Enden angelagert werden. Die Taq – Polymerase ist eine temperaturresistente DNA - Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus.*, die bei Temperaturen bis 72°C arbeitet. Durch Erhitzen auf 72°C wird die DNA - Polymerisation gestartet und fortgesetzt. Man lässt die Polymerisation für 90 Sekunden laufen und erhitzt wieder auf 94°C. Durch mehrmaliges Wiederholen dieser Prozedur vermehrt sich das durch beide Primer eingeschlossene Oligonukleotid exponentiell zur Anzahl der Wiederholungen.

Bei der Pwo - Polymerase (aus *Pyrococcus woesei*) wird nach 10 Zyklen die Polymerisationszeit (72°C) je Zyklus um zehn Sekunden verlängert. Die Pwo - Polymerase hat den Vorteil, dass sie eine Korrekturlesefunktion hat.

Ein PCR - Ansatz besteht aus der zu untersuchenden DNA (DNA - Template), Polymerasepuffer (10X der Firma MBI), 10 mM dNTP - Lösung (MBI), 25 mM

MgCl₂, einer U - Polymerase, 1 µl BSA , 1 µl von jedem Primer und 100 µl reinem Wasser (bidestilliert, steril, RNase - und mineralfrei).

In dieser Arbeit wurden verschiedene pET19b - und pQE30 - Vektoren der verschiedenen p53 Konstrukte, mittels PCR amplifiziert und anschließend in den Experimenten zur Herstellung dieser Proteine eingesetzt. (Ergebnisse 4.3)

3.2.3.2 Restriktionsverdau

Bestimmte Sequenzen in der DNA werden von bestimmten Restriktionsenzymen erkannt, und an diesen Stellen wird die DNA hydrolytisch gespalten. 2-5 µg DNA werden mit 10fach konzentriertem Nukleasepuffer (von MBI Fermentas) aufgenommen. Dazu wird das Restriktionsenzym (MBI) gegeben (2 U/1 µg DNA) und mit sterilem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Ausreichender Verdau der DNA erfolgt je nach Enzym in ein bis drei Stunden; danach wird die Reaktion durch Zugabe von 20 µl eines Stop – Lade - Mixes gestoppt.

3.2.3.3 Horizontale Agarose - Gelelektrophorese

Die Agarose - Gelelektrophorese wird zum Trennen von DNA - Fragmenten nach ihrem Molekulargewicht verwendet. Agarosegele werden durch Aufkochen einer 1%igen Agaroselösung (1 g Agarose in 100 ml TAE - Puffer) auf 50°C und Zusetzen von Ethidiumbromid hergestellt. Nach der Polymerisation wird das Gel in die passende horizontal - aufgebaute Gelapparatur eingelegt und mit TAE - Puffer überdeckt. Die durch Restriktionsverdau getrennten DNA - Fragmente werden auf der Kathodenseite des Gels in die Sammeltaschen eingebracht; über 60 Minuten bei 200 mA werden diese durch ihre Wanderung zur Anode voneinander getrennt. Als Molekulargewichtsstandard werden 25 µg eines mit HindIII/ EcoRV (für 20 Stunden bei 37°C) gespaltenen λ - DNA – Standards mit aufgetragen.

Sichtbar sind die mit Ethidiumbromid - gefärbten DNA - Fragmente dann, wenn sie UV - Licht ausgesetzt werden. Auf einem Transilluminator mit UV - Licht der Wellenlänge 254 nm kann man das erhaltene Bandenmuster sehen und fotografisch dokumentieren.

3.2.3.4 DNA - Mengenbestimmung

Um die Konzentration und den Reinheitsgrad von Nukleinsäuren zu bestimmen, wird die Absorption dieser Lösung bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Nukleinsäuren haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine dagegen bei 280 nm. Aus dem Quotienten OD_{260} / OD_{280} kann man eine Aussage über die Reinheit der DNA bzw. RNA treffen. Für die Konzentration der Nukleinsäure gilt, $1 OD_{260} = 50 \mu\text{g/ml DNA}$, bzw. $30 \mu\text{g/ml RNA}$.

4. ERGEBNISSE

4.1 Herstellung von p34^{cdc2} - Kinase und Cyclin B1 in Sf9 - Zellen

Die Interaktion zwischen p34^{cdc2} und p53 war bislang nur mit bakteriell exprimierten Proteinen untersucht worden, die nicht über die in Säugerzellen vorkommende posttranslationelle Modifikation verfügen. Darüber hinaus zeigte die bakteriell exprimierte Kinase keine enzymatische Aktivität. Wir entschlossen uns daher zur Herstellung der Proteine in Insektenzellen (Sf9), die mit entsprechenden rekombinanten Baculoviren infiziert wurden. Diese produzieren die in Säugerzellen vorkommenden sehr ähnlichen Proteine, die volle biologische Aktivität entfalten.

Spodoptera frugiperda - Zellen, nachfolgend Sf9 - Zellen, wurden mit rekombinanten Baculoviren (*Autographa californica*), welche für p34^{cdc2} und Cyclin B1 kodieren, infiziert (Desai et al., 1992; Wagner et al., 1998).

In einer 25 cm³ Kulturflasche wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 50% kultiviert und dann mit jeweils 75 µl des Virusstocks infiziert. Die infizierten Zellen lösten sich mit der Zeit vom Boden der Flasche ab. Das Ernten der Zellen erfolgte innerhalb von zwei bis drei Tagen. Dann wurden die Zellen durch Klopfen der Kulturflasche von dieser abgelöst, und anschließend abzentrifugiert. In Sf9 - Lysepuffer wurden die Zellen lysiert. Die Zelltrümmer und Membranreste wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Das Zelllysate wurde auf eine erfolgreiche Produktion von p34^{cdc2} und Cyclin B1 mit Hilfe einer Westernblot - Analyse kontrolliert (Abb. 7). Dafür wurden je 20 µl der Zellextrakte mit 10 µl Probenpuffer auf einem 12.5%igem SDS - Polyacrylamidgel aufgetragen, über

SDS - PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF - Membran transferiert. Nach Inkubation mit den primären Antikörpern gegen p34^{cdc2} und Cyclin B1 wurden diese mit dem sekundären Meerrettich - Peroxidase - gekoppelten Antikörper erfasst und durch Zugabe des ECL - Reagenz sichtbar gemacht. Die Lumineszenz konnte man dann auf einem Film sichtbar machen. Der Westernblot wurde mit anti - p34^{cdc2} - und anti - Cyclin B1- monoklonalen Maus - Antikörpern durchgeführt. In der Abbildung 7 ist das Ergebnis des Westernblots gezeigt. In Spur 1 wurde der Molekulargewichtsstandard aufgetragen. In Spur 2 sind Extrakte der Zellen aufgetragen, die nur mit dem rekombinanten Baculovirus, das für p34^{cdc2} codiert, infiziert wurden. Spur 3 ist eine Kontrolle aus einer anderen p34^{cdc2} - Präparation. Spur 4 ist das hergestellte Cyclin B1 und Spur 5 ist die Kontrolle des Cyclin B1 aus anderen Präparationen. In Spur 6 stammen die Lysate aus Zellen, die mit beiden Viren infiziert waren. In Spur 7 sind als Kontrolle die Extrakte von Zellen dargestellt, die mit dem Wildtyp - Virus infiziert waren.

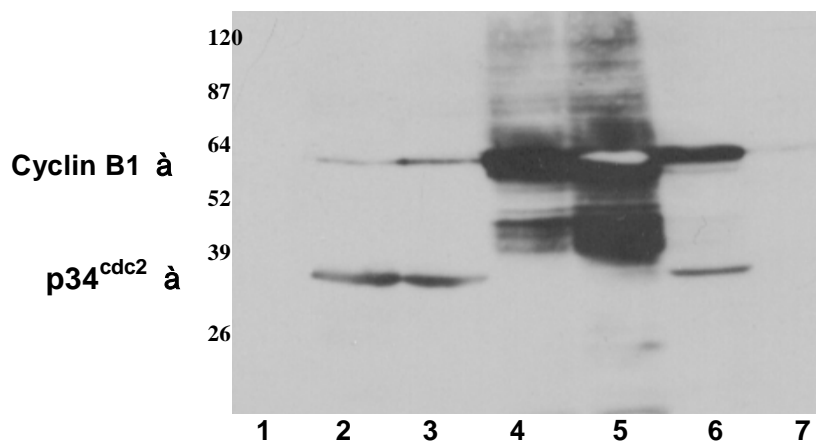


Abb. 7 Westernblotanalyse von p34^{cdc2} und Cyclin B1 aus Sf9 - Zellen

Je 10 µl Zellextrakt aus, mit verschiedenen Baculoviren infizierten, Sf9 - Zellen wurden auf ein 12,5%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und in der SDS - PAGE aufgetrennt. Nach Transfer auf eine PVDF - Membran erfolgte die Westernblotanalyse mit Antikörpern gegen p34^{cdc2} und Cyclin B1. 1. Molekulargewichtsmarker; 2. Sf9 - Zellextrakt nach Infektion mit p34^{cdc2} - Baculovirus; 3. p34^{cdc2} - Positivkontrolle; 4. Sf9 - Zellextrakt nach Infektion mit Cyclin B1 - Baculovirus; 5. Cyclin B1 - Positivkontrolle; 6. Sf9 - Zellextrakt nach Infektion mit beiden Baculoviren (p34^{cdc2} und Cyclin B1); 7. Sf9 - Zellen nach Infektion mit dem Wildtyp - Baculovirus (Negativkontrolle)

4.2 Darstellung des *in vitro* hergestellten, ^{35}S - Methionin markierten, p53 - Proteins.

p53 - Proteine wurden im Retikulozytenlysat *in vitro* hergestellt (Abb. 8). Dafür haben wir das *TNT[®] T7 Rabbit Reticulocyte Lysate System* der Firma *Promega* benutzt. Da das Retikulozyten - Lysat keine weiteren Nukleinsäuren enthält, ist keine weitere Proteinexpression zu erwarten. Der Nachweis der exprimierten Proteine erfolgte durch den Einbau von ^{35}S - Methionin. Die exprimierten Proteine wurden autoradiografisch, nach Auftrennen über SDS - PAGE, dargestellt. Zur Kontrolle haben wir in Spur 3 einen mit ^{14}C - markierten Molekulargewichtsstandard der Firma Merck aufgetragen. In Spur 1 ist die Deletionsmutante p53 ($\Delta_{293-343}$) und in Spur 2 das Wildtyp p53 zu erkennen.

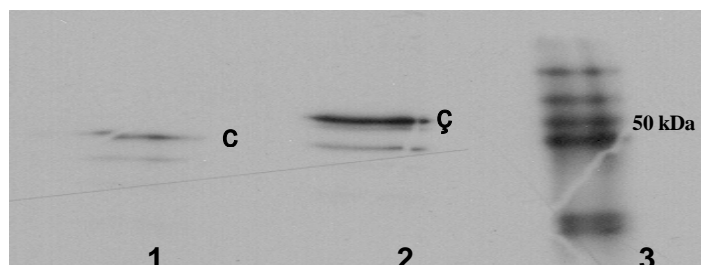


Abb. 8 Autoradiographie der im Retikulozytensystem exprimierten p53 - Proteine

Wildtyp p53 und die Deletionsmutante p53($\Delta_{293-343}$) wurden *in vitro* in Retikulozytenlysat in Anwesenheit von ^{35}S - Methionin hergestellt. Es wurden je 10 μl des Retikulozytenlysats auf einem 12.5%igen SDS - Polyacrylamidgel aufgetragen und über SDS - PAGE aufgetrennt. Spur 1 stellt die Mutante p53($\Delta_{293-343}$) dar, Spur 2 das Wildtyp p53. Spur 3 enthält den ^{14}C - markierten Molekulargewichtsstandard.

4.3 Bakterielle Expression und Reinigung von verschiedenen p53 Mutanten in *E. coli*

In dieser Arbeit wurden Wildtyp p53, p53_{R175H} (Arginin 175 wurde gegen Histidin ausgetauscht), p53 ($\Delta_{293-343}$) und verschiedene Mutanten des p53 C - Terminus verwendet. Die zur Herstellung dieser Eiweiße verwendeten pET - und pQE - Vektoren wurden mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Nach Amplifikation der Vektoren wurden die verschiedenen p53 - Konstrukte in *E. Coli* (Stamm BI21 DE3) hergestellt und über Ni²⁺ - Agarose - Affinitäts-Chromatographie gereinigt. Die pET19b - Vektoren, die die cDNA des Wildtyp p53 (pET 19b-p53wt), die Mutante p53_{R175H} (pET 19b-p53His175) bzw. den pQE30 - Vektor mit der cDNA des p53 C - Terminus (pQE30-p53_{CT}, pQE30-p53_{CT}S315A, pQE30-p53_{CT}S315D) enthielten, wurden in *E.coli* Bakterien, Stamm BI21, amplifiziert. Die Konstrukte für die Deletionsmutante des p53 (p53 ($\Delta_{293-343}$)) wurden freundlicherweise von Dr. Norbert Schuster bereitgestellt. Die DNA - Konstrukte wurden in die Bakterien per Hitzeschock transferiert. Nach Transformation der Vektoren in die Bakterien, kultivierten wir diese in 250 ml LB -Medium (+Antibiotikum) bei 37°C unter ständigem Schütteln, bis sie eine optische Dichte OD₆₀₀ von ~0.8 erreichten. Dann wurden die Bakterien geerntet; die Plasmide wurden dann isoliert und gereinigt. Die DNA - Konstrukte wurden auf eine Endkonzentration von 1 µg DNA pro µl steriles Wasser verdünnt. Zur Kontrolle der Amplifikation haben wir jeweils eine Probe von 3 µg DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (s.u.), auf Agarose - Gel aufgetragen und aufgetrennt und schließlich unter Einwirkung von UV - Licht sichtbar gemacht. pET19b - Plasmide enthalten jeweils eine Schnittstelle für die BamH1 - und Nde1 - Endonukleasen. Abbildung 9 zeigt eine Photographie der Agarose - Gele unter Einwirkung von UV - Licht. Im oberen Teil des Bildes wurde der amplifizierte pET 19b-p53His175 - Vektor mit BamH1 und mit Nde1 geschnitten. Auf das Gel wurden dann in den Spuren 3 und 4 die behandelten Plasmide aufgetragen. Als Kontrolle wurde in Spur 2 ein unbehandeltes Plasmid

neben einer λ -DNA - Probe als Molekulargewichtsmarker in Spur 1 aufgetragen.

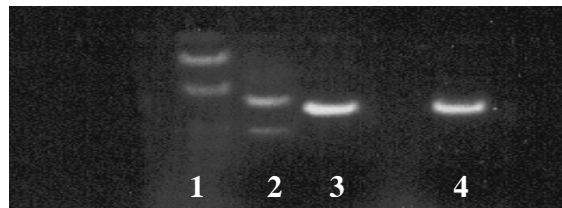


Abb. 9 Photographie des p53_{H175} - plasmidhaltigen Agarose - Gels unter Einwirkung von UV – Licht

Der amplifizierte pET 19b-p53His175 - Vektor wird über Restriktionsverdau an seinen Ligationsstellen geschnitten. Die entstandenen linearen DNA - Fragmente wurden auf ein Ethidiumbromid - Agarose Gel aufgetragen und unter Einwirkung von UV - Licht sichtbar gemacht. Im Bild ist die Photographie dieses Gels zu sehen. Spur 1 enthält eine λ - DNA (Molekulargewichtsmarker), Spur 2 ein unbehandeltes Plasmid als Kontrolle. Spur 3 ist das durch den Verdau mit dem BamH1 und Spur 4 mit dem Nde1 entstandene lineare DNA - Fragment des amplifizierten Vektors.

In Abbildung 10 wurden die Konstrukte aus dem pQE30 - Vektor nach Doppelverdau mit den BamH1, EcoR1 - Endonukleasen in den Spuren 1, 2 und 3 aufgetragen. λ - DNA wurde in Spur 4 als Marker aufgetragen.

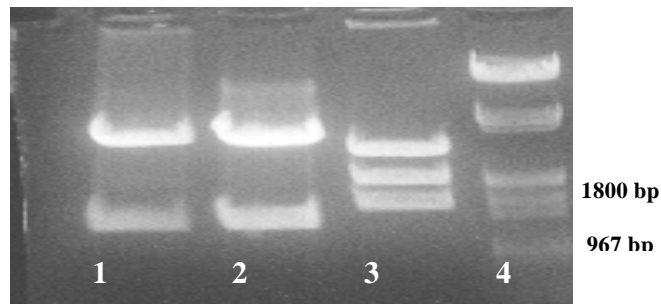


Abb. 10 Photographie der amplifizierten p53_{CT} - Plasmide unter Einwirkung von UV - Licht

Im Bild sind die Plasmide dargestellt, die für die C - terminalen Fragmente des p53 kodieren. Nach dem Doppel - Restriktionsverdau (mit BamH1 und EcoR1) wurden die DNA - Fragmente auf einem Ethidiumbromid - Agarose - Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. In Spur 1 ist das Plasmid pQE30-p53_{CT}S315A, in Spur 2 pQE30-p53_{CT}S315D und in Spur 3 pQE30-p53_{CT}wt nach dem Restriktionsverdau dargestellt, in Spur 4 ist λ - DNA als Marker aufgetragen.

Wildtyp p53, die Mutante p53_{H175} und die Deletionsmutante p53 (Δ 293- 343) wurden in *E.coli* (BL21 DE3) exprimiert und über Ni²⁺ - Agarose - Affinitätschromatographie gereinigt. Die Proteine wurden in der SDS - PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF - Membran transferiert. Diese wurde, um den Erfolg der Proteinreinigung darstellen zu können, mit Coomassie - Blau gefärbt. Auf der PVDF - Membran konnten wir anschließend mit dem DO -1 - Anti-p53 - Antikörper mittels Westernblotanalyse das p53 in allen Präparationen nachweisen. In Abbildung 11a ist das gefärbte Gel zu sehen. Die Darstellung des Westernblots ist Abbildung 11b zu entnehmen.

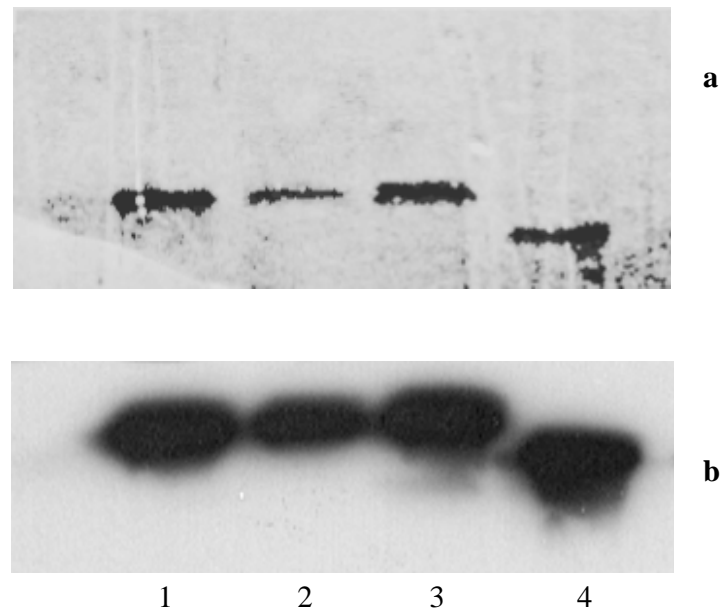


Abb. 11 Nachweis der gereinigten p53 - Proteine. Teil a stellt eine Coomassie - Blau - Färbung dar, Teil b der Nachweis über Westernblot.

Nach Ni^{2+} - Agarose - Reinigung wurden die verschiedenen p53 - Präparationen auf ein SDS - Polyacrylamidgel aufgetragen und mit Coomassie - Blau gefärbt (a), mit DO-1 - Antikörper im Westernblot nachgewiesen (b). Spur 1 ist eine p53 - Kontrolle, Spur 2 Wildtyp p53, Spur 3 die p53H175 - Mutante, Spur 4 die Deletionsmutante p53 $_{\Delta 293-343}$.

4.4 Bindung des Wachstumssuppressorproteins p53 an die Cyclin - abhängige p34^{cdc2} - Kinase

Eine Bindung zwischen p53 und der Zellzykluskinase p34^{cdc2} wurde von Dr. P. Wagner in Far Westernblot - Analysen mit bakteriell exprimierten Proteinen genauer analysiert (Wagner et al., 1998). Da wir in unseren Experimenten mit Proteinen anderen Ursprungs arbeiteten, mussten wir vorher feststellen, ob unter unseren Bedingungen diese Bindung ebenfalls nachweisbar ist. p34^{cdc2} - Kinase wurde in *Spodoptera frugiperda* - Zellen hergestellt, welche zuvor mit einem rekombinanten, für p34^{cdc2} - kodierenden Baculovirus infiziert wurden (Quelle des Baculovirus: D.O. Morgan, San Francisco). Zellextrakte dieser

infizierten Zellen wurden mit humanem, *in vitro* translatiertem p53 gemischt. Als Kontrolle für die Bindung haben wir neben dem Wildtyp - p53 (wt-p53) eine Deletionsmutante des p53 verwendet, welcher die Aminosäuren 293 bis 343 fehlten (p53_(Δ293-343)). Diese Deletionsmutante kann keine Bindung mit der p34^{cdc2} - Kinase eingehen, da die Bindungssequenz 330-339 fehlt.

Gleiche Mengen an SF9 - Zellextrakten wurden mit gleichen Mengen an Retikulozytenlysate, welches wt-p53 und p53_{Δ293-343} beinhaltet, gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die p34^{cdc2} - Kinase mit einem monoklonalen Antikörper immunpräzipitiert (sc-54, Santa Cruz). Dieser Antikörper bindet an ein Epitop zwischen den Aminosäuren 221-235 der katalytischen Untereinheit der p34^{cdc2} - Kinase. Nach Waschen der Immunkomplexe haben wir sie über SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt. Die autoradiographische Darstellung des Ergebnisses erfolgte durch Exponieren des getrockneten Gels auf einen Film. Das ko - immunpräzipitierte ³⁵S - Methionin - markierte p53 kann man auf Abbildung 12 sehen. Die Spuren 1 und 2 stellen die *in vitro* translatierten p53 und p53_{Δ293-343} dar. Die Spuren 3 und 4 zeigen die Immunpräzipitate mit p34^{cdc2}. Aus dieser Abbildung erkennt man, dass nur Wildtyp - p53 eine Bindung mit der p34^{cdc2} - Kinase eingehen konnte; die Deletionsmutante zeigte erwartungsgemäß keine Bindung an p34^{cdc2}. Dieses Experiment zeigt auch, dass unter den gewählten experimentellen Bedingungen eine Bindung von *in vitro* translatiertem p53 an ein in Insektenzellen exprimiertes p34^{cdc2} erfolgt.

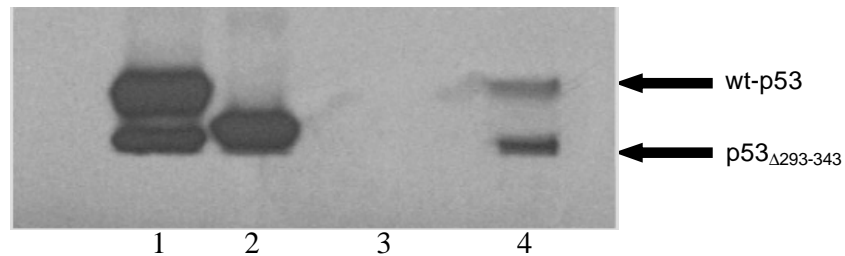


Abb. 12 Ko - Immunpräzipitation von p53 mit p34^{cdc2}

Wildtyp - p53 und p53_{Δ293-343} wurden in Anwesenheit von ³⁵S - Methionin *in vitro* translatiert. Die p53 - Präparationen wurden mit der p34^{cdc2} - Kinase für 30 min. inkubiert. Anschließend wurde mit p34^{cdc2} - spezifischen Antikörpern immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden dann auf ein 12.5%iges SDS - Polyacrylamidgel aufgetragen und über SDS - PAGE getrennt. Der Nachweis der radioaktiv markierten Proteine erfolgte über Autoradiographie. In Spur 1 ist Wildtyp - p53 und in Spur 2 p53_{Δ293-343} aufgetragen. In Spur 3 wurde das Immunpräzipitat aus dem p53_{Δ293-343} - und p34^{cdc2} - Gemisch aufgetragen. In Spur 4 ist das Immunpräzipitat aus dem Gemisch von wt-p53 und der Kinase aufgetragen worden.

Mit einem bakteriell exprimierten p53 wurden gleiche Ergebnisse erzielt (Abbildung 13). Außerdem konnten wir auch eine Bindung zwischen p53 und der regulatorischen Untereinheit der p34^{cdc2} - Kinase, dem Cyclin B1, ausschließen. Hierfür haben wir das p53 - Protein mit der p34^{cdc2} - Kinase und mit dem Cyclin B1 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen p34^{cdc2} und Cyclin B1 wurden die Immunpräzipitate über SDS - Polyacrylamidgelelektrophorese auf einem 12.5%igen Gel getrennt und auf eine PVDF - Membran transferiert. Eine Westernblot - Analyse mit dem p53 - Antikörper DO-1 konnte nun zeigen, dass Immunpräzipitate aus dem Gemisch p53 und p34^{cdc2} das p53 - Protein enthalten (Abbildung 13). Mit monoklonalen Maus - Antikörpern gegen p34^{cdc2} und gegen Cyclin B1 haben wir auf der gleichen PVDF - Membran p34^{cdc2} und Cyclin B1 in unseren Immunpräzipitaten nachgewiesen. Das p53 wurde nur in dem Gemisch p53 und p34^{cdc2} immunpräzipitiert (Spur 4). Spur 5 zeigt die Immunpräzipitate aus dem Gemisch p53 und Cyclin B1. Als Kontrollen sind Zellextrakte aufgetragen, die in Spur 1

(Teil b) p34^{cdc2} und in Spur 2 (Teil c) Cyclin B1 enthalten. In Spur 3 (Teil a) wurde bakteriell exprimiertes p53 als Kontrolle aufgetragen.

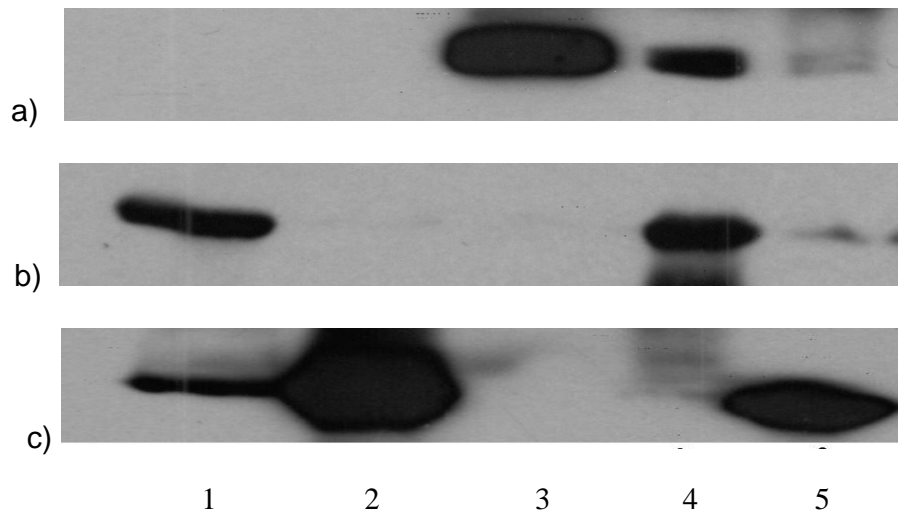


Abb. 13 Westernblot - Analyse des immunpräzipitierten p53 nach Inkubation mit p34^{cdc2} und mit Cyclin B1

p53 wurde mit Zellextrakten, welche p34^{cdc2} und Cyclin B1 enthalten, inkubiert und anschließend mit polyklonalen Kaninchen - Antikörpern gegen p34^{cdc2} und gegen Cyclin B1 immunpräzipitiert. Die vorliegende Westernblot - Analyse wurde mit Maus - Antikörpern gegen p53 (a), p34^{cdc2} (b) und gegen Cyclin B1 (c) durchgeführt. Nach Inkubation mit dem sekundären Anti - Maus - Ig - Meerrettich - Peroxidase - gekoppelten Antikörper wurde dieser durch Zusatz des ECL - Reagenz sichtbar gemacht. Spur 1 enthält p34^{cdc2} - und Spur 2 Cyclin B1 - haltige Zellextrakte. Spur 3 enthält gereinigtes p53. In den Spuren 4 und 5 sind die Immunpräzipitate aufgetragen, wobei in Spur 4 die Immunpräzipitate von dem Gemisch aus p53 und p34^{cdc2} und in Spur 5 von dem Gemisch aus p53 und Cyclin B1 aufgetragen sind.

Die vorliegenden Bedingungen sind für die nachfolgenden Experimente geeignet, da wir unter diesen Bedingungen die Bindung zwischen p53 und der p34^{cdc2} - Kinase bestätigen können. Ebenfalls konnten wir zeigen, dass die katalytische Untereinheit der Kinase diese Bindung mit p53 eingeht. Die hier verwendeten Proteine unterschieden sich von den bisherigen Arbeiten hinsichtlich ihrer posttranslationalen Modifikation, da diese in eukaryotischen Zellen hergestellt worden waren.

4.5 Einfluss der Bindung von p53 auf die p34^{cdc2} - Kinaseaktivität

Nachdem wir die Bindung zwischen der humanen p34^{cdc2} - Kinase und p53 in unserem Versuchssystem bestätigen konnten, wollten wir die Bedeutung dieser Bindung für die Kinaseaktivität untersuchen. Dafür haben wir die Aktivität der Kinase nach einer einstündigen Inkubation mit verschiedenen p53 - Präparationen gemessen. Die Aktivität der Kinase wurde in allen Experimenten über ihre Fähigkeit, Histon H1 zu phosphorylieren, dargestellt.

4.5.1 p53 inhibiert die Aktivität der p34^{cdc2} - Kinase

Bakteriell hergestelltes humanes p53 wurde in steigenden Konzentrationen mit je einer Einheit (1U) der p34^{cdc2} - Kinase /des Cyclin B1 - Komplexes für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität der p34^{cdc2} /Cyclin B1 - Kinase mit Histon H1 als Substrat und ³²P - γ - ATP als Phosphatgruppendonator bestimmt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C wurde durch Gabe von 10 μ l eines 5fachen Probenpuffers und Erhitzen auf 95°C für 5 Minuten die Reaktion gestoppt. Die gleiche Reaktion wurde einmal ohne Vorinkubation mit p53 und ein weiteres Mal ohne Zusatz von Histon H1 als Kontrolle durchgeführt. Die Proben wurden dann auf ein 12.5%iges SDS - Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Phosphoryliertes Histon H1 wurde durch eine Autoradiographie des getrockneten Gels nachgewiesen (Abbildung 14). Die Aktivität der p34^{cdc2} - Kinase, dargestellt über ihre Fähigkeit, Histon H1 zu phosphorylieren, ist in Anwesenheit des p53 reduziert; mit zunehmenden Mengen an p53 nahm die Aktivität der p34^{cdc2} - Kinase ab. Um die Aktivitätsminderung objektiv zu erfassen, wurde der Film densitometrisch analysiert und in Abbildung 14 als Säulendiagramm dargestellt. Wird die relative Aktivität der p34^{cdc2} - Kinase ohne p53 Zusatz auf 100% normiert, so nimmt diese durch Zusatz von 450 ng p53 um 10 % ab.

Verdoppelt man die p53 - Menge, nimmt die Aktivität der p34^{cdc2} - Kinase um 30% ab; von der ursprünglichen Aktivität der Kinase bleibt hier weniger als 60% erhalten. Die Phosphorylierung von p53 durch die p34^{cdc2} - Kinase wurde hier vernachlässigt, da sie nur sehr gering war.

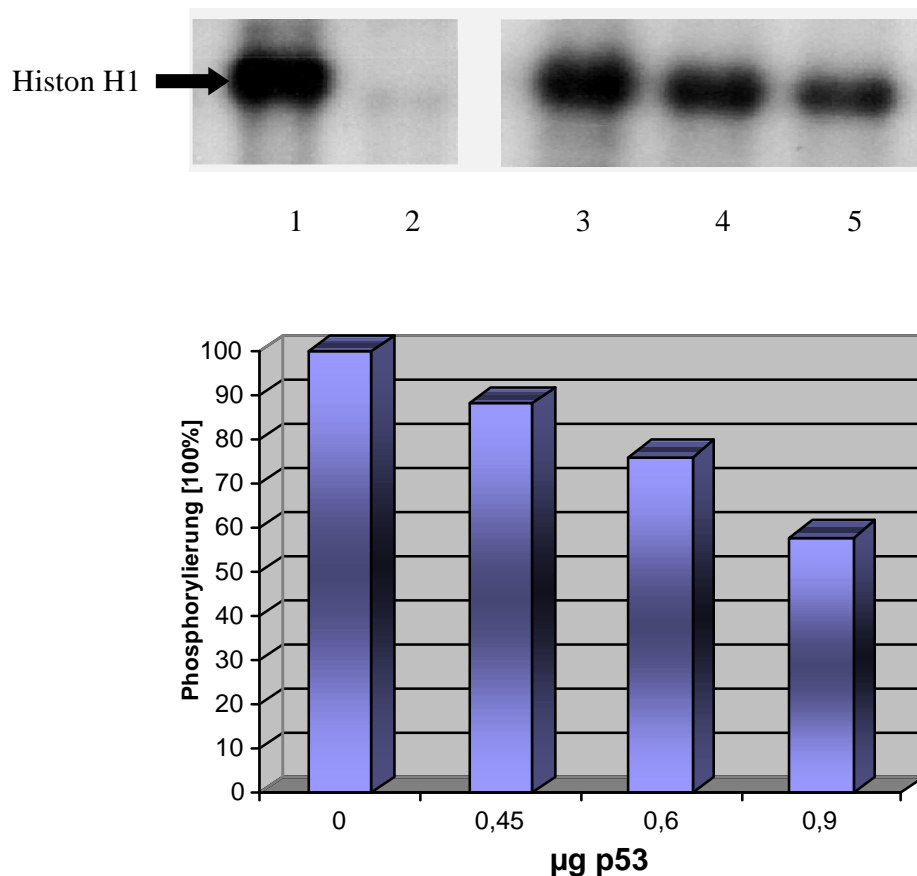


Abb. 14 Histon H1 - Phosphorylierung durch die p34^{cdc2} - Kinase in Ab - und Anwesenheit von steigenden Mengen p53

Im oberen Teil des Bildes ist das Autoradiogramm des phosphorylierten Histon H1 zu sehen, welches die p34^{cdc2} - Kinaseaktivität unter dem Einfluss steigender Mengen des p53 widerspiegelt. Nach Inkubation der Kinase mit verschiedenen p53 - Konzentration haben wir einen Kinaseassay mit Histon H1 als Substrat und ³²P - γ - ATP als Phosphatgruppendonator angefertigt. Spur 1 stellt die Histon H1 - Phosphorylierung in Abwesenheit von p53 dar, Spur 2 nur die p34^{cdc2} - Kinase und p53, kein Histon H1. In den Spuren 3, 4 und 5 wurde die Kinase mit je 0,45 µg, 0,6 µg und 0,9 µg Wildtyp p53 vorinkubiert. Im unteren Teil des Bildes haben wir den oberen Film densometrisch analysiert. Die relative Abschwächung der Histon H1 - Phosphorylierungsaktivität der p34^{cdc2} - Kinase ist im Verhältnis zu der p53 - Menge als Säulendiagramm dargestellt, was eine deutliche Abnahme der Kinaseaktivität in Abhängigkeit von der p53 - Konzentration darstellt.

4.5.2 Die Bindung zwischen p53 und der p34^{cdc2} - Kinase ist Voraussetzung für die Abnahme der p34^{cdc2} - Kinaseaktivität.

Um festzustellen, ob die inhibierende Wirkung des p53 auf die p34^{cdc2} - Kinase durch die Bindung verursacht ist, oder ob diese Inhibition auch ohne Bindung stattfinden kann, führten wir einen Kinase - Aktivitätsassay in Anwesenheit gleicher Mengen des *in vitro* translatierten Wildtyp p53 bzw. der Deletionsmutante von p53 (p53_(Δ293-343)) durch. Nach Inkubieren der p34^{cdc2} - Kinase mit diesen p53 - Konstrukten wurde ein Kinase - Aktivitätsassay durchgeführt. Dafür wurde die p34^{cdc2} - Kinase mit Histon H1 und ³²P - γ - ATP bei 37°C inkubiert. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion durch Zusatz eines 5fach konzentrierten Probenpuffers gestoppt. Die Proben wurden dann auf einem 12.5%igen SDS - Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Das Gel wurde anschließend getrocknet. Die Phosphorylierung des Histon H1 wurde dann autoradiographisch dargestellt (Abbildung 15).

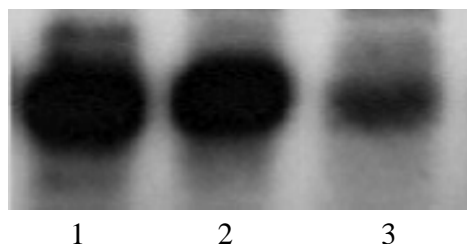


Abb. 15 Histon H1- Phosphorylierung in An- und Abwesenheit von Wildtyp p53 oder der Deletionsmutante p53_{Δ293-343}

Histon H1 wurde in Anwesenheit von ³²P - γ - ATP durch die p34^{cdc2} - Kinase phosphoryliert. Wildtyp p53 und p53_{Δ293-343} wurden im Retikulozytenlysat *in vitro* hergestellt. Die Kinase wurde mit der Deletionsmutanten p53_{Δ293-343} (Spur 2) bzw. mit Wildtyp p53 (Spur 3) vorinkubiert. Zur Kontrolle wurde in Spur 1 die Kinase mit der gleichen Menge aus dem nativen Retikulozytenlysat vorinkubiert. Das radioaktiv markierte Histon H1 wurde anschliessend autoradiographisch nachgewiesen.

Wie in der Abbildung 15 zu sehen ist, ist eine Reduktion der Kinaseaktivität durch die Deletionsmutante $p53_{\Delta 293-343}$, welcher die Bindungsstelle für die $p34^{cdc2}$ - Kinase fehlt, nicht zu beobachten; Im Gegensatz dazu ist die Hemmung durch das Wildtyp $p53$ deutlich sichtbar. Daraus können wir schließen, dass dieser inhibierende Effekt des $p53$ auf die Kinaseaktivität eine Bindung zwischen beiden Proteinen voraussetzt.

4.5.3 Der hemmende Effekt von $p53$ an der $p34^{cdc2}$ –

Kinaseaktivität ist kein kompetitiver Effekt und wird nicht nur durch die Bindung verursacht

Da das $p53$ selbst ein Substrat der $p34^{cdc2}$ - Kinase darstellt, liegt die Vermutung nahe, dass die Inhibition der Kinaseaktivität durch Konkurrenz beider Substrate, $p53$ und Histon H1, an das aktive Zentrum der Kinase entsteht. Deswegen haben wir unter gleichen Bedingungen wie in anderen Experimenten eine weitere Präparation des $p53$ - Proteins angewendet, die nur aus einem C - terminalen Fragment des $p53$ besteht. Dieses C – terminale Fragment aus den Aminosäuren 264-393 des humanen $p53$ - Proteins enthält die Phosphorylierungsstelle der $p34^{cdc2}$ - Kinase an Serin 315. Dieses C - terminale Fragment bindet wie das Wildtyp $p53$ an die $p34^{cdc2}$ - Kinase und wird auch durch diese phosphoryliert (Wagner et al., 1998). Mit diesem Fragment wurde das gleiche Experiment durchgeführt wie in Kapitel 4.5.2 beschrieben. Hier führten wir einen Kinase - Aktivitätsassay in Anwesenheit gleicher Mengen des Wildtyp $p53$ bzw. des C - terminalen Fragmentes durch. Nach Inkubieren der $p34^{cdc2}$ - Kinase mit diesen $p53$ - Konstrukten wurde ein Kinase - Aktivitätsassay durchgeführt. Dafür wurde die $p34^{cdc2}$ - Kinase mit Histon H1 und ^{32}P - γ - ATP bei $37^{\circ}C$ inkubiert. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion durch Zusatz eines 5fach konzentrierten Probenpuffers gestoppt. Die Proben wurden dann auf einem 12.5%igen SDS - Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Das Gel wurde

anschließend getrocknet. Die Phosphorylierung des Histon H1 wurde dann autoradiographisch dargestellt (Abbildung 16).

Wie in der Abbildung 16 zu sehen ist, hat die gleiche Menge an C - terminalem Fragment des p53 wie die Menge des Wildtyp p53, welche zu einer 50%igen Reduktion der Kinaseaktivität führte, keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität gezeigt. Außerdem erfolgt die Phosphorylierung dieses Fragments parallel zur Phosphorylierung des Histon H1, ohne dieses zu beeinträchtigen (Abb.16 Spur 5).

Um die Frage zu beantworten, ob der Phosphorylierungszustand des p53 an S315 einen Einfluss auf die Aktivität der Kinase hat, haben wir die p34^{cdc2} - Kinaseaktivität unter dem Einfluss zweier Mutanten des C - terminalen Fragmentes des humanen p53 untersucht. Serin 315 des p53 wurde mit Alanin (S315A - Mutante) und Asparaginsäure (S315D - Mutante) ersetzt. Dies stellt eine dauerhafte (S315A) bzw. eine fehlende (S315D) Phosphorylierung dar. Unter dem Einfluss beider Mutanten war keine bedeutende Änderung der p34^{cdc2} - Kinaseaktivität zu beobachten. In der Abbildung ist dies den Spuren 3 und 4 zu entnehmen.

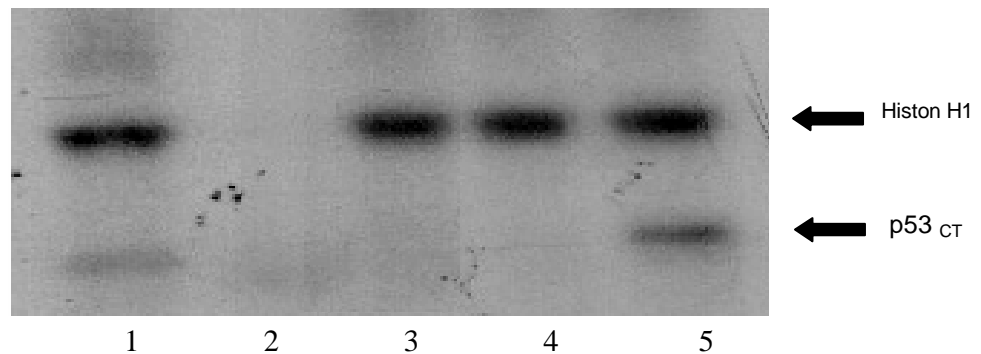


Abb. 16 Autoradiographie des Histon H1 nach seiner Phosphorylierung durch die $p34^{cdc2}$ - Kinase in An- und Abwesenheit verschiedener C - terminaler Fragmente des p53

Die C - terminalen Fragmente, (Aminosäuren 264-393) wurden in *E.coli* (M15) hergestellt. In Spur 1 und 2 sind die Kontrollen, bestehend aus Histon H1 und der Kinase in Spur 1 und der Kinase ohne Histon H1 in Spur 2, dargestellt. In den Spuren 3, 4 und 5 ist die Histon H1 - Phosphorylierung in Anwesenheit der verschiedenen C - terminalen Fragmente des p53 gezeigt. Die Phosphorylierung des Histon H1 erfolgte in Spur 3 unter Einfluss der Mutante S315D, in Spur 4 der S315A Mutante und in Spur 5 des wt- C - terminalen Fragmentes. Die Präparate wurden auf ein 12,5%iges SDS - Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Nach Trocknen des Gels wurde die Phosphorylierung des Histon H1 über Autoradiographie sichtbar gemacht.

In diesen Versuchen können wir beschreiben, dass eine Inhibition der $p34^{cdc2}$ - Kinaseaktivität durch p53 nur unter bestimmten Bedingungen erfolgen kann. Zum einen kann nur das Wildtyp p53 eine Aktivitätsminderung verursachen, wobei die Phosphorylierung von p53 durch die $p34^{cdc2}$ - Kinase keinen Einfluss auf diesen Effekt hatte, was gegen eine kompetitive Hemmung der Kinaseaktivität durch p53 (ebenfalls Substrat der Kinase) spricht. Zum anderen ist eine Bindung zwischen beiden Proteinen, p53 und $p34^{cdc2}$ - Kinase, für diesen Effekt Voraussetzung. Ebenfalls sind N - terminale Regionen des p53 und seine Konformation für diesen Effekt notwendig.

4.5.4 Einfluss der Konformation von p53 auf die p34^{cdc2} - Kinaseaktivität

In diesem Kapitel wollen wir feststellen, ob bindungsfähiges, konformationsverändertes p53 im Vergleich zum Wildtyp p53 einen Einfluss auf die Kinaseaktivität hat.

Die p53_{H175} - Mutante ist durch eine veränderte Konformation gekennzeichnet und wird häufig in menschlichen Tumoren nachgewiesen (Hollstein et al., 1994). Die DNA - Transaktivierungsfähigkeit des p53 ist bei dieser Mutation verloren gegangen (Ory et al., 1994). Ist die Inhibition der Kinaseaktivität ein spezifischer Effekt des Wildtyp p53, würde diese Mutante keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität haben. Daher haben wir *in vitro* einen Kinaseassay unter dem Einfluss von Wildtyp p53 und p53_{H175} durchgeführt.

Eine weitere Konformationsänderung des p53 konnten wir durch Aufkochen des Wildtyp p53 auf 95°C für 5 Minuten erzeugen. Hierdurch wird eine völlige Denaturierung und Auflösung der nativen Konformation des Proteins erreicht. In dem gleichen Kinaseassay haben wir auch den Einfluss dieses hitze - denaturierten p53 untersucht. Die Kinase wurde in Sf9 - Zellen hergestellt und wurde in diesem Experiment als Gesamt - Zellextrakt eingesetzt. Wildtyp - p53 und p53_{H175} wurden in *E.coli* hergestellt und über Ni²⁺- Agarose gereinigt. Es wurden jeweils 20 µl des kinasehaltigen Sf9 - Extraktes mit gleichen Mengen p53 für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zusatz von Histon H1 und ³²P - γ - ATP gestartet. Das Gemisch haben wir bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zusatz von 10µl eines 5fach konzentrierten Probenpuffers. Um die Phosphorylierung des Histon H1 zu zeigen, wurden die Proben über SDS - PAGE auf einem SDS - Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Autoradiographie des Gels sieht man in der Abbildung 17. In Spur 7 ist die Kontrolle aufgetragen; sie enthält zusätzlich zu der p34^{cdc2} - Kinase nur Histon H1 und die gleiche Menge des Puffers, in dem

p53 im Vollansatz gelöst ist. Als weitere Kontrolle stellt Spur 1 die Phosphorylierung des Histon H1 unter dem Einfluss der Deletionsmutante des p53 dar. In Spur 2 und 4 wurde die p53_{H175} - Mutante, in Spur 3 das hitze - denaturierte p53 zugesetzt. In den Spuren 5 und 6 wurde das Wildtyp p53 in verschiedenen Mengen zugesetzt. Die Menge an p53 entspricht in den Spuren 1, 2, 3, und 5 0,75 µg (+/- 0,1), in den Spuren 4 und 6 entspricht die Menge an p53 0,37 µg.

In Spur 5 und 6 (Wildtyp p53) ist eine Abnahme der Kinaseaktivität zu beobachten. Unter dem Einfluss gleicher Mengen der Mutante p53_{H175} (Spur 2 und 4) und des hitze - denaturierten p53 (Spur 3) war keine Reduktion der Kinaseaktivität zu beobachten.

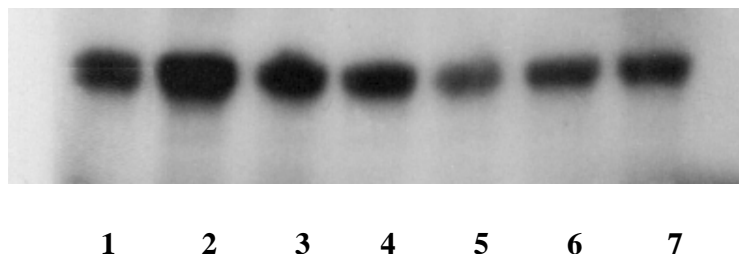


Abb. 17 Histon H1 - Phosphorylierung durch die p34^{cdc2} - Kinase in Anwesenheit von Wildtyp p53, Mutante p53_{H175} , Mutante p53_{Δ293-343} bzw. hitze - denaturiertem p53.

Die Abbildung stellt die Autoradiographie des mit ³²P - γ - ATP phosphorylierten Histon H1 durch die p34^{cdc2} - Kinase dar. Die Phosphorylierung erfolgte unter dem Einfluss verschiedener p53 - Präparationen. Spur 1 enthält p53_{Δ293-343} (0,75 µg) , Spur 2 und 4 enthalten p53_{H175} mit je 0,75, 0,37 µg, Spur 3 enthält 0,75 µg hitze - denaturiertes p53, Spur 5 und Spur 6 enthalten das Wildtyp p53 (0,75 µg und 0,37 µg), Spur 7 enthält kein p53.

Aus diesem Experiment können wir schließen, dass die Konformation des p53 für den inhibierenden Effekt auf die Kinase, zumindest *in vitro*, von entscheidender Bedeutung ist.

Wir haben in den vorherigen Experimenten den Einfluss des p53 auf die Aktivität der p34^{cdc2} - Kinase *in vitro* untersucht. In allen Experimenten versuchten wir unter Bedingungen zu arbeiten, die so weit wie möglich einer physiologischen Umgebung entsprachen. Um die Verwendbarkeit dieser Ergebnisse unter den intrazellulären Bedingungen, *in vivo*, zu überprüfen, mussten wir die p34^{cdc2} - Kinaseaktivität in p53 - haltigen Zellen messen.

4.5.5 Der Einfluss von p53 auf die p34^{cdc2} - Kinaseaktivität *in vivo*

Um die Frage zu beantworten, ob die Inhibition der p34^{cdc2} - Kinaseaktivität durch p53 *in vivo* eine Bedeutung hat, mussten wir die Kinaseaktivität aus p53 - haltigen Zellen messen. Dafür haben wir Sf9 - Zellen simultan mit drei rekombinanten Baculoviren infiziert, welche für Cyclin B1, p34^{cdc2} und für Wildtyp p53 kodieren. Als Kontrolle haben wir die Infektion mit für Cyclin B1 -, p34^{cdc2} - kodierenden Baculoviren und dem Wildtyp - Baculovirus durchgeführt. Zwei Tage nach Infektion wurden die Zellen geerntet. Mit dem gesamten Zellextrakt haben wir einen Histon H1 - Kinaseassay durchgeführt. Das phosphorylierte Histon H1 wurde auf einem 12.5%igen SDS - Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die autoradiographische Darstellung des phosphorylierten Histon H1 ist in den Spuren 5, 6 und 7 in Abbildung 18 zu sehen. In Spur 5 stammt die Kinase aus Sf9 - Zellen, die mit p34^{cdc2} - und Cyclin B1 - kodierenden Baculoviren und mit Wildtyp - Baculovirus, *Autographa californica*, infiziert waren; als Kontrolle wurde zu diesem Zellextrakt *in vitro* bakteriell hergestelltes Wildtyp p53 zugesetzt. Spur 7 stellt die Aktivität der Kinase dar, die bei der simultanen Infektion mit Cyclin B1, p34^{cdc2} und Wildtyp p53 - rekombinanten Baculoviren exprimiert wurde. Die Aktivität der p34^{cdc2} - Kinase aus den Kontrollzellen, ohne p53 - rekombinantes Baculovirus, ist in Spur 6 zu sehen. Man kann der Abbildung entnehmen, dass in Zellextrakten, die p53 exprimiert hatten, die Kinaseaktivität schwächer ist als in den Kontrollzellen. Als Vergleich hierfür dient die in Spur 5

dargestellte Inhibition der $p34^{cdc2}$ - Kinaseaktivität nach Zusatz von bakteriell hergestelltem p53.

Wir haben die Experimente auch mit immunpräzipitierter $p34^{cdc2}$ - Kinase aus Saos2tsp53 – Zellen durchgeführt. Saos2tsp53 - Zellen exprimieren temperatursensitives humanes p53; nach Inkubation der Zellen bei 32°C exprimieren sie funktionsfähiges Wildtyp p53 (Hirano et al., 1995). Die hier benutzten Saos2tsp53 - Zellen wurden die letzten 24 Stunden vor dem Experiment bei 32°C oder 37°C kultiviert.

Aus diesen Saos2 - Zellen haben wir nach Lyse die $p34^{cdc2}$ - Kinase mit polyklonalen Kaninchen - Antikörpern immunpräzipitiert. Mit der immunpräzipitierten Kinase wurde ein Histon H1 - Kinaseassay durchgeführt. Das phosphorylierte Histon H1 wurde über SDS - PAGE auf einem 12.5%igen SDS - Polyacrylamidgel aufgetrennt und über Autoradiographie dargestellt (Abbildung 18). Die Spuren 1 und 2 enthalten Kinasekontrollen, die aktive $p34^{cdc2}$ - Kinase (Promega) in Spur 1 mit Histon H1 und in Spur 2 ohne Histon H1. In Spur 3 stammt die Kinase aus Saos2tsp53 - Zellen, die bei 37°C kultiviert waren. In Spur 4 wurden die Saos2tsp53 - Zellen bei 32°C kultiviert.

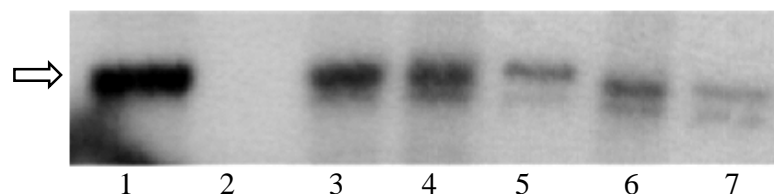


Abb.18 Autoradiographie der Histon H1 - Phosphorylierung durch die $p34^{cdc2}$ - Kinase in Saos2 - Zellen und in Sf9 - Zellen

In den Spuren 1 und 2 ist jeweils eine Einheit der gereinigten $p34^{cdc2}$ - Kinase als Kontrolle aufgetragen, jedoch in Spur 1 mit und in Spur 2 ohne Histon H1. In den Spuren 3 und 4 wurde die Kinase aus Saos2tsp - Zellen immunpräzipitiert. Spur 3 reflektiert die Kinaseaktivität bei 32°C - Zellen (Wildtyp-p53), Spur 4 in 37°C - Zellen (mutiertes p53). In den Spuren 5, 6 und 7 wurden Zellextrakte aus mehrfach infizierten Insektenzellen eingesetzt; in Spur 5 Cyclin B1, $p34^{cdc2}$ und bakteriell - hergestelltes p53, in Spur 6 Cyclin B1, $p34^{cdc2}$ und Wildtyp – Baculovirus; in Spur 7 war die Infektion mit Cyclin B1, $p34^{cdc2}$ und Wildtyp - p53 rekombinanten Baculoviren durchgeführt worden.

Der Aktivitätsunterschied der Kinase unter Einfluss des in Saos - Zellen exprimierten p53 war unter unseren Untersuchungsbedingungen nicht ausreichend, um hier ein klares Ergebnis präsentieren zu können. Im Vergleich ist bei der simultanen Infektion der Insektenzellen mit p53 und p34^{cdc2} - Kinase eine vergleichbare Abnahme der Kinsaseaktivität feststellbar, wie wir es in dieser Arbeit *in vitro* unter Einfluss des p53 beobachteten.

5. DISKUSSION

Die Zellteilung ist ein dynamischer Prozess, verbunden mit funktionellen und strukturellen Veränderungen in der sich teilenden Zelle. Ein wesentlicher Teil dieses Prozesses ist die Replikation des Genoms. Während der Genom - Replikation sind die Integrität und Zellidentität durch verschiedene Fehlerquellen bedroht. Dagegen ist in der Zelle ein eigens dafür entwickeltes System vorhanden, welches bei solchen Fehlern die Zellteilung aufhält bzw. die Apoptose einleitet. Hierdurch soll garantiert werden, dass sich die teilende Zelle in zwei identische Tochterzellen aufteilt, wobei der Erhalt der genetischen Integrität des ganzen Organismus angestrebt wird.

Eine zentrale Rolle hierbei spielt das Wachstumssuppressorprotein p53 (Lane et al., 1992). Als Antwort auf genotoxischen Stress kann das p53 auf unterschiedlichen Wegen den Ablauf des Zellzyklus beeinflussen. Es kann durch Aktivierung bestimmter Kinaseinhibitoren bzw. durch Unterdrückung der Synthese von Zellzykluskinasen den Zellzyklus arretieren. Außerdem werden u.a. p53 - vermittelt DNA - Reparaturmechanismen aktiviert. Bleibt der Schaden unbehoben, tritt p53 - vermittelt der programmierte Zelltod (Apoptose) ein (Lane et al., 1992).

Das aktive p53 - Tetramer kann durch Bindung an die zelluläre DNA bestimmte Zielgene und deren Genprodukte beeinflussen, zum einen durch eine Transaktivierung und Steigerung von deren Expression, zum anderen durch Repression und Hemmung der Transkription (El Deiry et al., 1992; Kern et al., 1991). Über eine Minderung der mRNA - Expression und der anschließenden Transkription von p34^{cdc2} und Cyclin B1 kann das funktionell aktive p53 - Protein die Menge und somit die Aktivität der p34^{cdc2} - Kinase herabsetzen (Azzam et al., 1997; de Toledo et al., 1998; Innocente et al., 1999; Krause et al., 2000; Park et al., 2000). Neben der Expressionsminderung der Cyclin B1 -

mRNA vermittelt das p53 eine Minderung der p34^{cdc2} - Transkription via CCAAT - Bindung – NF - Y - Transkriptionsfaktor (Yun et al., 1999).

Neben der direkten Regulation über Hemmung der mRNA - Expression bestimmter Gene (Transrepression) kann das p53 über das Transaktivieren weiterer Gene mit negativem regulatorischen Effekt auf den Zellzyklus seine Funktion erfüllen. Eines dieser Gene ist das GADD45 - Gen, dessen Genprodukt an der DNA - Reparatur beteiligt ist (Carrier et al., 1999; Kearsey et al., 1995). Außerdem kann das GADD45 die Aktivität der p34^{cdc2} - Kinase durch Assoziation mit ihrer regulatorischen Untereinheit, dem Cyclin B1, und durch Abbau des p34^{cdc2}/Cyclin B1 - Komplexes die Aktivität der p34^{cdc2} - Kinase herabsetzen (Zhan et al., 1999).

Darüberhinaus transaktiviert das p53 das WAF1 - Gen.(El Deiry et al., 1993). P21^{WAF1} ist einer der wichtigsten und effizientesten Cyclin - abhängigen Kinaseinhibitoren, welche im Zellzyklus eine wesentliche Rolle spielen. (El Deiry et al., 1993). Es ist damit an einem genotoxisch - bedingten Wachstumsarrest in der G₁ - oder G₂ - Phase beteiligt (El Deiry WS, 1998;Gartel et al., 1996).

In jüngerer Zeit gibt es jedoch auch Hinweise, dass p53 durch direkte Interaktion mit Proteinen deren Funktionen beeinflussen kann. (Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zu CK2, cdc25C, CAK, aber auch z.B. Dobner T über E4orf6).

Sollte es kurz vor dem Eingang in die Mitose zu einer DNA - Schädigung kommen, ist ein rascher Zellzyklusarrest erforderlich, da sonst die Integrität des Genoms in den Tochterzellen nicht garantiert ist. Die Transaktivierung inhibitorischer Gene mit Hilfe des Wachstumssuppressorproteins p53 ist bei solchen Situationen relativ langsam. Der Weg über Gen - Transaktivierung und anschließender Proteinsynthese ist im Vergleich zum zeitlichen Eintritt in die Mitose recht lang. Daher sind andere Wege der Zellzyklushemmung anzunehmen. Wird dieser Transaktivierungsweg durch eine rasche Hemmung

der p34^{cdc2} - Kinase, durch direktes Binden bestimmter Inhibitoren oder direktes Inaktivieren der CAKs ergänzt, kann die Wirkung des p53 als Notbremse des Zellzyklus noch potenziert werden.

Stürzbecher *et al.* und Milner *et al.* beschrieben im Jahr 1990 die Komplexbildung zwischen p53 und der katalytischen Untereinheit der p34^{cdc2} - Zellzykluskinase (Milner *et al.*, 1990; Stürzbecher *et al.*, 1990). Stürzbecher *et al.* bewiesen *in vitro*, dass das p53 ein Substrat der p34^{cdc2} - Kinase ist und durch diese phosphoryliert wird. *In vivo* konnten sie den Komplex aus beiden Molekülen kopräzipitieren (Sturzbecher *et al.*, 1990). Milner *et al.* hatten diese Bindung nur in nicht mitotischen Zellen beobachten können (Milner *et al.*, 1990). Ihre Ergebnisse ließen vermuten, dass diese Interaktion einen regulatorischen Einfluss in inhibierendem oder stimulierendem Sinne auf den Zellzyklus haben müsse (Milner *et al.*, 1990; Sturzbecher *et al.*, 1990).

In unserem Arbeitskreis wurde die genaue Bindungssequenz für die p34^{cdc2} - Kinase auf die Polypeptidkette des p53 untersucht und in der Nähe der p34^{cdc2} - Phosphorylierungsstelle an S315 beschrieben. Die Bindung erfolgt über die Aminosäuren 330-339 (LQIRGRERFE), eine Region, an die auch eine Reihe anderer Proteine binden kann (Wagner *et al.*, 1998; Schuster *et al.*, 2001).

Ein durch p53 - bedingter Wachstumsarrest lässt sich durch Überexpression von p34^{cdc2} oder Cyclin B1 überwinden, was eine funktionelle Interaktion der beiden Proteine vermuten lässt (Innocente *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 1991).

Es ist daher anzunehmen, dass p53 über einen direkten oder indirekten Weg die Menge und/oder die Aktivität der p34^{cdc2} - Kinase bzw. des Cyclin B1 negativ beeinflusst.

Nach heutigem Wissensstand liegen reichlich Beweise dafür vor, dass das p53 direkt mit den zellulären Kinasen und Phosphatasen interagiert und deren Aktivität beeinflussen kann. Verschiedene Arbeiten zeigen, dass p53 eine direkte Bindung zu zwei Untereinheiten des CAK - Komplexes, Cyclin H und Mat1

eingehen kann, die regulatorische Untereinheit und der „assembly factor“ des cdk - aktivierenden Kinasekomplexes, CAK. (Ko et al., 1997; Lu et al., 1997; Schneider et al., 1998). Durch die Bindung von p53 an Cyclin H wird die Aktivität des cdk - aktivierenden Kinasekomplexes reduziert. (Schneider et al., 1998). Cyclin H/cdk7/Mat1 phosphoryliert die p34^{cdc2} - Kinase an Threonin 161 und ist daher für ihre Aktivierung unentbehrlich (Fesquet et al., 1993). Eine Verminderung der Aktivität der CAK durch p53 bedeutet damit auch gleichzeitig eine fehlende Aktivierung des p34^{cdc2}/Cyclin B1 – Komplexes. Da CAK die aktivierende Phosphorylierung auch an anderen Cyclin - abhängigen Kinasen des Zellzyklus vornehmen kann, stellt sie die „master kinase“ im Zellzyklus dar. Sie ist ebenso für die Aktivierung der RNA - Polymerase unabdingbar; p53 kann somit auch auf einer übergeordneten Ebene in den Fortgang des Zellzyklus eingreifen.

p53 geht auch eine Bindung zu einem weiteren für die Zellzyklusprogression wichtigen Enzym ein, nämlich der cdc25C - Phosphatase (Rief et al., 2000). Cdc25C ist eine dualspezifische Phosphatase, die die inhibitorische Phosphorylierung von p34^{cdc2} an Threonin 14 und Tyrosin 15 beim Übergang in die M - Phase entfernt, und damit auch zur Aktivierung von p34^{cdc2} beiträgt (Honda et al., 1993). Erste Experimente aus unserem Labor zeigen eine negative Beeinflussung der Phosphataseaktivität durch p53 *in vitro*. *In vivo* konnten wir ebenfalls eine physische Interaktion zwischen beiden Proteinen nachweisen; der Nachweis einer funktionellen Interaktion, die zu einer Verminderung der cdc25C - Aktivität *in vivo* führt, steht noch aus (Ruppenthal et al., 2007). Mit der cdc25C steht dem p53 - Protein ein weiteres Zielobjekt zur Verfügung mit dessen Hilfe es die Aktivität der p34^{cdc2} auf indirektem Wege beeinflussen und somit den Zellzyklus arretieren könnte.

Mit der gleichen Region, die für die Bindung an p34^{cdc2} verantwortlich ist, kann p53 auch die ubiquitär vorkommende Proteinkinase CK2 binden (Götz et al., 1999). Dies ist eine Kinase, die in diversen Ereignissen der Proliferation und Apoptose involviert ist. Schuster *et al.* haben gezeigt, dass das p53 die

enzymatische Aktivität der CK2 hemmen kann (Schuster et al., 2001). Es ist schon seit längerer Zeit bekannt, dass CK2 die p34^{cdc2} - Kinase an Serin 39 phosphorylieren kann (Russo et al., 1992). Die Phosphorylierung erfolgt während der G₁ - Phase des Zellzyklus und beeinflusst möglicherweise die Bindung an die regulatorische Cyclin – Untereinheit. Durch diese Phosphorylierung könnte demnach die zeitliche Dynamik der Bildung des p34^{cdc2}/ Cyclin – Komplexes reguliert werden, was ebenfalls einen Einfluss auf die Aktivität der p34^{cdc2} hätte. Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen an p34^{cdc2} kommt es durch Bindung eines C - terminalen Fragmentes des p53 an der CK2 - Kinase zu einer Stimulation der Kinase - Aktivität (Schuster et al., 2001). Da die Proteinkinase CK2 eine Kinase ist, der eine Beteiligung an Prozessen der neoplastischen Transformation nachgesagt wird (Ahmed et al., 2000), stehen hier möglicherweise die onkogenen Eigenschaften des C - Terminus von p53 im Vordergrund (Shaulian et al., 1992), die für die p34^{cdc2} nicht von Bedeutung zu sein scheinen.

Wir haben die Bindung zwischen p53 und p34^{cdc2} mit Hilfe von *in vitro* translatierten sowie im Sf9 - System produzierten Proteinen verifizieren können. Insbesondere letztere stellen Proteine dar, die – im Gegensatz zu den ursprünglich verwendeten bakteriell exprimierten Proteinen - den im Säugerzellsystem vorkommenden Proteinen hinsichtlich der Konformation und posttranslationalen Modifikationen am ähnlichsten sind. Mit Hilfe einer Deletionsmutante von p53 (p53_{Δ293-343}) haben wir feststellen können, dass C - terminale Bereiche für die Interaktion notwendig sind. Eine Bindung an die regulatorische Untereinheit des MPF, Cyclin B1, konnten wir ebenfalls nicht detektieren. Unser System stellt somit eine geeignete Basis dar, um den Einfluss der Interaktion auf die Kinaseaktivität zu testen. Es stellte sich heraus, dass p53 *in vitro* in der Lage ist, die Aktivität von p34^{cdc2} signifikant zu reduzieren. Da die Deletionsmutante p53_{Δ293-343} dazu nicht in der Lage ist, können wir rückschließen, dass die Bindung zwischen den beiden Proteinen Voraussetzung für die funktionelle Interaktion ist. Obwohl die Bindung von p34^{cdc2} an C -

terminale Bereiche des p53 erfolgt, reichen diese allein nicht aus, um die enzymatische Aktivität zu hemmen. Die verwendeten C - terminalen Fragmente von Aminosäure 264 – 393 sind zwar in der Lage, an p34^{cdc2} zu binden, dienen auch als Substrat, können jedoch die Aktivität der Kinase nicht beeinflussen. Darüber hinaus ist die intakte Struktur des p53 für den Hemmeffekt notwendig. Eine solche Fragestellung kann mit Hilfe von Strukturmutanten analysiert werden, die gegenüber dem Wildtyp p53 eine veränderte dreidimensionale Struktur haben und nicht mehr in der Lage sind, alle biologischen Funktionen eines nativen Proteins, wie z.B. DNA - Bindung, zu erfüllen. Der Einfluss einer intakten Struktur kann auch mit Hilfe eines Wildtyp p53 überprüft werden, das durch Erhitzen denaturiert wurde. In unseren Experimenten konnte sowohl eine Strukturmutante (p53His175), als auch ein hitzedenaturiertes p53 keinen inhibitorischen Einfluss auf die Kinaseaktivität der p34^{cdc2} ausüben. Ein funktionelles Wildtyp p53 kann also die für den G₂/M - Übergang wichtige Kinase p34^{cdc2} binden und ihre Aktivität hemmen und somit *in vivo* an einer weiteren Schaltstelle möglicherweise den Zellzyklus beeinflussen. Erste Hinweise dazu liefern, neben den Hefestudien, Analysen im Sf9 – System, das mit entsprechenden rekombinanten Baculoviren infiziert wurde. Erste Experimente im Säugerzellsystem erbrachten noch keine Ergebnisse. Hier müssen zunächst noch geeignete Bedingungen für die Aktivierung des p53 etabliert werden, was im zeitlichen Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht möglich war.

Aus den vorliegenden Ergebnissen können wir einen weiteren Weg der Selbstkontrolle des Zellzyklus vermuten. Über direktes Binden von p53 an die p34^{cdc2} - Kinase und der daraus resultierenden Hemmung ihrer Aktivität ist eine schnelle Einflussnahme auf den Kontrollpunkt am G₂/M - Übergang des Zellzyklus möglich. Da ein Übergang in die Mitose ohne den „Mitosis – Promoting - Faktor“ (p34^{cdc2} / Cyclin B1 - Komplex) nicht möglich ist, wird durch diese direkte Interaktion ein Zellzyklusarrest verwirklicht. Darüber hinaus inhibiert p53 eine Reihe weiterer Phosphatasen und Kinasen, die ihrerseits in der Lage sind, die p34^{cdc2} - Kinase zu aktivieren, sodass auf direkten und indirekten Wegen der

Zellzyklus am G₂/M – Übergang zu einem Arrest kommt. Solange die Schädigung, welche die Aktivierung des p53 herbeiführte, nicht behoben ist, ist ein Eintreten in die Mitose mittels dieser direkten und indirekten Mechanismen verhindert. Im Falle der Unmöglichkeit, die Schädigung zu beheben, wird die Zelle, mit dem größeren Ziel, die Integrität des Genoms des ganzen Organismus aufrechtzuerhalten, p53 - vermittelt in die Apoptose geleitet.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ahmed K, Davis AT, Wang H, Faust RA, Yu S, Tawfic S (2000) Significance of protein kinase CK2 nuclear signaling in neoplasia. *J.Cell Biochem.Suppl. Suppl 35:130-5.:130-135*
2. Aitken A (1996) 14-3-3 and its possible role in co-ordinating multiple signalling pathways. *Trends Cell Biol. 6:341-347*
3. Azzam EI, de Toledo SM, Pykett MJ, Nagasawa H, Little JB (1997) CDC2 is down-regulated by ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Cell Growth Differ. 8:1161-1169*
4. Barak Y, Oren M (1992) Enhanced binding of a 95 kDa protein to p53 in cells undergoing p53-mediated growth arrest. *EMBO J. 11:2115-2121*
5. Bargonetti J, Manfredi JJ, Chen X, Marshak DR, Prives C (1993) A proteolytic fragment from the central region of p53 has marked sequence-specific DNA-binding activity when generated from wild-type but not from oncogenic mutant p53 protein. *Genes Dev. 7:2565-2574*
6. Bates S, Ryan KM, Phillips AC, Vousden KH (1998) Cell cycle arrest and DNA endoreduplication following p21Waf1/Cip1 expression. *Oncogene 17:1691-1703*
7. Bischoff JR, Friedman PN, Marshak DR, Prives C, Beach D (1990) Human p53 is phosphorylated by p60-cdc2 and cyclin B-cdc2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 87:4766-4770*
8. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem. 72:248-54.:248-254*
9. Canman CE, Gilmer TM, Coutts SB, Kastan MB (1995) Growth factor modulation of p53-mediated growth arrest versus apoptosis. *Genes Dev. 9:600-611*
10. Carrier F, Georgel PT, Pourquier P, Blake M, Kontny HU, Antinore MJ, Gariboldi M, Myers TG, Weinstein JN, Pommier Y, Fornace AJ, Jr. (1999) Gadd45, a p53-responsive stress protein, modifies DNA accessibility on damaged chromatin. *Mol.Cell Biol. 19:1673-1685*
11. Chen J, Lin J, Levine AJ (1995) Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the mdm-2 oncogene. *Mol.Med. 1:142-152*
12. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science. 265:346-355*
13. Clore GM, Omichinski JG, Sakaguchi K, Zambrano N, Sakamoto H, Appella E, Gronenborn AM (1994) High-resolution structure of the oligomerization domain of p53 by multidimensional NMR. *Science. 265:386-391*
14. Cox LS, Hupp T, Midgley CA, Lane DP (1995) A direct effect of activated human p53 on nuclear DNA replication. *EMBO J. 14:2099-2105*

15. Dai Y, Grant S (2006) CDK inhibitor targets: a hit or miss proposition?: cyclin-dependent kinase inhibitors kill tumor cells by downregulation of anti-apoptotic proteins. *Cancer Biol. Ther.* 5:171-173
16. de Toledo SM, Azzam EI, Keng P, Laffrenier S, Little JB (1998) Regulation by ionizing radiation of CDC2, cyclin A, cyclin B, thymidine kinase, topoisomerase IIalpha, and RAD51 expression in normal human diploid fibroblasts is dependent on p53/p21Waf1. *Cell Growth Differ.* 9:887-896
17. DeCaprio JA, Furukawa Y, Ajchenbaum F, Griffin JD, Livingston DM (1992) The retinoblastoma-susceptibility gene product becomes phosphorylated in multiple stages during cell cycle entry and progression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:1795-1798
18. Deguin-Chambon V, Vacher M, Jullien M, May E, Bourdon JC (2000) Direct transactivation of c-Ha-Ras gene by p53: evidence for its involvement in p53 transactivation activity and p53-mediated apoptosis. *Oncogene.* 19:5831-5841
19. Dell KR, Turck CW, Vale RD (2000) Mitotic phosphorylation of the dynein light intermediate chain is mediated by cdc2 kinase. *Traffic.* 1:38-44
20. Desai D, Gu Y, Morgan DO (1992) Activation of human cyclin-dependent kinases in vitro. *Mol.Biol.Cell* 3:571-582
21. Dessev G, Iovcheva-Dessev C, Bischoff JR, Beach D, Goldman R (1991) A complex containing p34cdc2 and cyclin B phosphorylates the nuclear lamin and disassembles nuclei of clam oocytes in vitro. *J.Cell Biol.* 112:523-533
22. El Deiry WS (1998) p21/p53, cellular growth control and genomic integrity. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 227:121-137
23. El Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, . (1994) WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 54:1169-1174
24. El Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B (1992) Definition of a consensus binding site for p53. *Nat.Genet.* 1:45-49
25. El Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817-825
26. Elledge SJ, Harper JW (1994) Cdk inhibitors: on the threshold of checkpoints and development. *Curr.Opin.Cell Biol.* 6:847-852
27. Fesquet D, Labbe JC, Derancourt J, Capony JP, Galas S, Girard F, Lorca T, Shuttleworth J, Doree M, Cavadore JC (1993) The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. *EMBO J.* 12:3111-3121
28. Fields AP, Thompson LJ (1995) The regulation of mitotic nuclear envelope breakdown: a role for multiple lamin kinases. *Prog.Cell Cycle Res.* 1:271-286
29. Fiscella M, Zambrano N, Ullrich SJ, Unger T, Lin D, Cho B, Mercer WE, Anderson CW, Appella E (1994) The carboxy-terminal serine 392 phosphorylation site of human p53 is not required for wild-type activities. *Oncogene.* 9:3249-3257

30. Gartel AL, Serfas MS, Tyner AL (1996) p21--negative regulator of the cell cycle. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 213:138-149
31. Götz C, Scholtes P, Prowald A, Schuster N, Nastainczyk W, Montenarh M (1999) Protein kinase CK2 interacts with a multi-protein binding domain of p53. *Mol.Cell Biochem.* 191:111-120
32. Grana X, Reddy EP (1995) Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* %20;11:211-219
33. Guerra B, Gotz C, Wagner P, Montenarh M, Issinger OG (1997) The carboxy terminus of p53 mimics the polylysine effect of protein kinase CK2-catalyzed MDM2 phosphorylation. *Oncogene* 14:2683-2688
34. Hainaut P, Soussi T, Shomer B, Hollstein M, Greenblatt M, Hovig E, Harris CC, Montesano R (1997) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines: updated compilation and future prospects. *Nucleic Acids Res.* 25:151-157
35. Harada K, Ogden GR (2000) An overview of the cell cycle arrest protein, p21(WAF1). *Oral Oncol.* 36:3-7
36. Harlow, E., Lane, D. (1998) *Antibodies.* Cold Spring Harbour Laboratory
37. Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E, . (1995) Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol.Biol.Cell* 6:387-400
38. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature.* 387:296-299
39. Hecker D, Page G, Lohrum M, Weiland S, Scheidtmann KH (1996) Complex regulation of the DNA-binding activity of p53 by phosphorylation: differential effects of individual phosphorylation sites on the interaction with different binding motifs. *Oncogene.* 12:953-961
40. Heichman KA, Roberts JM (1994) Rules to replicate by. *Cell.* 79:557-562
41. Hirano, Y., Yamato, K., Tsuchida, N. (1995) A temperature sensitive mutant of the human p53, Val138, arrests rat cell growth without induced expression of *cip1/waf1/sdi1* after temperature shift-down. *Oncogene*, 10: 1879-1885
42. Ho JS, Ma W, Mao DY, Benchimol S (2005) p53-Dependent transcriptional repression of c-myc is required for G1 cell cycle arrest. *Mol.Cell Biol.* 25:7423-7431
43. Hohmann P, Greene RS (1990) Identification of mitotic (CDC2) and interphase histone H1 kinases by nondenaturing gel electrophoresis and peptide assays. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 168:763-770
44. Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, Harris CC (1994) Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* 22:3551-3555
45. Honda R, Ohba Y, Nagata A, Okayama H, Yasuda H (1993) Dephosphorylation of human p34cdc2 kinase on both Thr-14 and Tyr-15 by human cdc25B phosphatase. *FEBS Lett.* 318:331-334

46. Hu QJ, Lees JA, Buchkovich KJ, Harlow E (1992) The retinoblastoma protein physically associates with the human cdc2 kinase. *Mol.Cell Biol.* 12:971-980
47. Hupp TR, Lane DP (1994a) Allosteric activation of latent p53 tetramers. *Curr.Biol.* 4:865-875
48. Hupp TR, Lane DP (1994b) Regulation of the cryptic sequence-specific DNA-binding function of p53 by protein kinases. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 59:195-206.:195-206
49. Hupp TR, Meek DW, Midgley CA, Lane DP (1992) Regulation of the specific DNA binding function of p53. *Cell.* 71:875-886
50. Innocente SA, Abrahamson JL, Cogswell JP, Lee JM (1999a) p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:2147-2152
51. Innocente SA, Abrahamson JL, Cogswell JP, Lee JM (1999b) p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:2147-2152
52. Jayaraman L, Prives C (1999) Covalent and noncovalent modifiers of the p53 protein. *Cell Mol.Life Sci.* 55:76-87
53. Johnson DG, Walker CL (1999) Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 39:295-312.:295-312
54. Juven T, Barak Y, Zauberman A, George DL, Oren M (1993) Wild type p53 can mediate sequence-specific transactivation of an internal promoter within the mdm2 gene. *Oncogene.* 8:3411-3416
55. Kapoor M, Lozano G (1998) Functional activation of p53 via phosphorylation following DNA damage by UV but not gamma radiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 95:2834-2837
56. Kearsey JM, Shivji MK, Hall PA, Wood RD (1995) Does the p53 up-regulated Gadd45 protein have a role in excision repair? *Science* 270:1004-1005
57. Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, Vogelstein B (1991) Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science.* 252:1708-1711
58. Ko LJ, Shieh SY, Chen X, Jayaraman L, Tamai K, Taya Y, Prives C, Pan ZQ (1997b) p53 is phosphorylated by CDK7-cyclin H in a p36MAT1-dependent manner. *Mol.Cell Biol.* 17:7220-7229
59. Kong M, Barnes EA, Ollendorff V, Donoghue DJ (2000) Cyclin F regulates the nuclear localization of cyclin B1 through a cyclin-cyclin interaction. *EMBO J.* 19:1378-1388
60. Kotani S, Tanaka H, Yasuda H, Todokoro K (1999) Regulation of APC activity by phosphorylation and regulatory factors. *J.Cell Biol.* 146:791-800
61. Krause K, Wasner M, Reinhard W, Haugwitz U, Dohna CL, Mossner J, Engeland K (2000) The tumour suppressor protein p53 can repress transcription of cyclin B. *Nucleic Acids Res.* 28:4410-4418
62. Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 358:15-16

63. Lane DP, Lu X, Hupp T, Hall PA (1994) The role of the p53 protein in the apoptotic response. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 345:277-280
64. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643-649
65. Lin J, Chen J, Elenbaas B, Levine AJ (1994) Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein. *Genes Dev.* 8:1235-1246
66. Lu H, Fisher RP, Bailey P, Levine AJ (1997) The CDK7-cycH-p36 complex of transcription factor IIH phosphorylates p53, enhancing its sequence-specific DNA binding activity in vitro. *Mol.Cell Biol.* 17:5923-5934
67. Lucas JJ, Terada N, Szepesi A, Gelfand EW (1992) Regulation of synthesis of p34cdc2 and its homologues and their relationship to p110Rb phosphorylation during cell cycle progression of normal human T cells. *J.Immunol.* 148:1804-1811
68. Milner J, Cook A, Mason J (1990) p53 is associated with p34cdc2 in transformed cells. *EMBO J.* 9:2885-2889
69. Morgan DO (1995) Principles of CDK regulation. *Nature.* 374:131-134
70. Munoz-Alonso MJ, Acosta JC, Richard C, Delgado MD, Sedivy J, Leon J (2005) p21Cip1 and p27Kip1 induce distinct cell cycle effects and differentiation programs in myeloid leukemia cells. *J.Biol.Chem.* 280:18120-18129
71. Murphy D, Detjen KM, Welzel M, Wiedenmann B, Rosewicz S (2001) Interferon-alpha delays S-phase progression in human hepatocellular carcinoma cells via inhibition of specific cyclin-dependent kinases. *Hepatology* 33:346-356
72. Nigg EA, Blangy A, Lane HA (1996) Dynamic changes in nuclear architecture during mitosis: on the role of protein phosphorylation in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp.Cell Res.* 229:174-180
73. Novak B, Tyson JJ (2004) A model for restriction point control of the mammalian cell cycle. *J.Theor.Biol.* 230:563-579
74. Nurse P (1994) Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell* 79:547-550
75. Oren M, Rotter V (1999) Introduction: p53--the first twenty years. *Cell Mol.Life Sci.* 55:9-11
76. Ory K, Legros Y, Auguin C, 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
77. Park M, Chae HD, Yun J, Jung M, Kim YS, Kim SH, Han MH, Shin DY (2000) Constitutive activation of cyclin B1-associated cdc2 kinase overrides p53-mediated G2-M arrest. *Cancer Res.* 60:542-545
78. Prives C, Bargonetti J, Farmer G, Ferrari E, Friedlander P, Wang Y, Jayaraman L, Pavletich N, Hubscher U (1994b) DNA-binding properties of the p53 tumor suppressor protein. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 59:207-213

79. Prives C, Bargonetti J, Farmer G, Ferrari E, Friedlander P, Wang Y, Jayaraman L, Pavletich N, Hubscher U (1994a) DNA-binding properties of the p53 tumor suppressor protein. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 59:207-213
80. Prives C, Hall PA (1999) The p53 pathway. *J.Pathol.* 187:112-126
81. Radhakrishnan SK, Gartel AL (2006) CDK9 phosphorylates p53 on serine residues 33, 315 and 392. *Cell Cycle.* 5:519-521
82. Raycroft L, Schmidt JR, Yoas K, Hao MM, Lozano G (1991) Analysis of p53 mutants for transcriptional activity. *Mol.Cell Biol.* 11:6067-6074
83. Raycroft L, Wu HY, Lozano G (1990) Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science.* 249:1049-1051
84. Rief N, Herges H, Prowald A, Götz C, Montenarh M (2000) Binding of the growth suppressor p53 protein to the cell cycle regulator phosphatase cdc25C. *Int.J.Oncol.* 17:189-195
85. Ronai Z (1999) Deciphering the mammalian stress response - a stressful task. *Oncogene* 18:6084-6086
86. Ruppenthal SL, Noll A, Götz C, Montenarh M (2007) Interference between p53 and cdc25C in cell cycle regulation. *Int.J.Oncol.* 31:345-352
87. Russo GL, Vandenberg MT, Yu IJ, Bae YS, Franza BR, Jr., Marshak DR (1992) Casein kinase II phosphorylates p34cdc2 kinase in G1 phase of the HeLa cell division cycle. *J.Biol.Chem.* 267:20317-20325
88. Schneider E, Montenarh M, Wagner P (1998a) Regulation of CAK kinase activity by p53. *Oncogene.* 17:2733-2741
89. Schuster N, Götz C, Faust M, Schneider E, Prowald A, Jungbluth A, Montenarh M (2001) Wild-type p53 inhibits protein kinase CK2 activity. *J.Cell Biochem.* 81:172-183
90. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS (1999) Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ.Health Perspect.* 107 Suppl 1:5-24.:5-24
91. Shaulian E, Zauberman A, Ginsberg D, Oren M (1992) Identification of a minimal transforming domain of p53: negative dominance through abrogation of sequence-specific DNA binding. *Mol.Cell Biol.* 12:5581-5592
92. Shaulsky G, Goldfinger N, Ben Ze'ev A, 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
93. Sherr CJ, Matsushime H, Roussel MF (1992) Regulation of CYL/cyclin D genes by colony-stimulating factor 1. *Ciba Found.Symp.* 170:209-219
94. Smith, G., Fraser, M., und Summers, M. Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: Deletion mutants within the polyhedrin gene. *J. Virol.*, 46: 584-593, 1983.

95. Sturzbecher HW, Maimets T, Chumakov P, Brain R, Addison C, Simanis V, Rudge K, Philp R, Grimaldi M, Court W, . (1990) p53 interacts with p34cdc2 in mammalian cells: implications for cell cycle control and oncogenesis. *Oncogene* 5:795-81
96. Vojtesek, B., Bártek, J., Midgley, C.A., Lane, D.P. (1992) An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J. Immunol. Methods*, 151:237-244
97. Wagner P, Fuchs A, Gotz C, Nastainczyk W, Montenarh M (1998) Fine mapping and regulation of the association of p53 with p34cdc2. *Oncogene* 16:105-111
98. Wagner P, Simanis V, Maimets T, Keenan E, Addison C, Brain R, Grimaldi M, Sturzbecher HW, Jenkins J (1991) A human tumour-derived mutant p53 protein induces a p34cdc2 reversible growth arrest in fission yeast. *Oncogene* 6:1539-1547
99. Wang P, Reed M, Wang Y, Mayr G, Stenger JE, Anderson ME, Schwedes JF, Tegtmeyer P (1994) p53 domains: structure, oligomerization, and transformation. *Mol.Cell Biol.* 14:5182-5191
100. Wang Y, Prives C (1995) Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. *Nature* 376:88-91
101. Yap DB, Hsieh JK, Zhong S, Heath V, Gusterson B, Crook T, Lu X (2004) Ser392 phosphorylation regulates the oncogenic function of mutant p53. *Cancer Res.* 64:4749-4754
102. Yasuda H, Kamijo M, Ohba Y (1993) [The characterization of human cdc2 kinase and CDK2]. *Yakugaku Zasshi* 113:829-846
103. Yun J, Chae HD, Choy HE, Chung J, Yoo HS, Han MH, Shin DY (1999) p53 negatively regulates cdc2 transcription via the CCAAT-binding NF-Y transcription factor. *J.Biol.Chem.* 274:29677-29682
104. Zhan Q, Antinore MJ, Wang XW, Carrier F, Smith ML, Harris CC, Fornace AJ, Jr. (1999) Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene* 18:2892-2900
105. Zhang Y, Wang Z, Liu DX, Pagano M, Ravid K (1998) Ubiquitin-dependent degradation of cyclin B is accelerated in polyploid megakaryocytes. *J.Biol.Chem.* 273:1387-1392

7. DANKSAGUNG und PUPLIKATION

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universität des Saarlandes unter der Leitung von Prof. Dr. Mathias Montenarh und Priv. Doz. Dr. Claudia Götz, denen ich für die stete Diskussionsbereitschaft und die engagierte Betreuung herzlich danke. Prof. Dr. Montenarh danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Labors und für das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere danke ich Priv. Doz. Dr. Götz für die ausgezeichnete Betreuung und die vielzähligen wertvollen Impulse während und nach der experimentellen Phase dieser Arbeit.

Ferner gilt mein Dank allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Montenarh, vor allem Dr. Michael Faust für die stete Diskussionsbereitschaft und Frau Sabine Cartarius für die technische Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Für die angenehme und lehrreiche Zusammenarbeit möchte ich außerdem allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, danken.

Puplication

Ababneh M, Götz C, Montenarh M (2001) Downregulation of the cdc2/cyclin B protein kinase activity by binding of p53 to p34^{cdc2}.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 283:507-512

8. LEBENS LAUF

Name, Vorname: Ababneh, Muhannad
Geburtsdatum: 10.04.1976
Geburtsort: Irbid (JOR)
Familienstand: Verheiratet, drei Kinder

1982 – 1992	Besuch der Grundschule in Irbid
1992 – 1994	Besuch des städtischen Gymnasiums in Irbid
Mai 1994	Abitur
08/1994 – 03/1995	Besuch der pharmazeutischen Fakultät der jordanischen Universität für Wissenschaft und Technik
03/1995 – 08/1996	Besuch des Studienkollegs der Universität des Saarlandes mit abschließender Prüfung
10/1996 – 03/2003	Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes
September 1998	medizinische Vorprüfung (Physikum)
03/1999 – 04/2000	Ableistung des experimentellen Teils der vorliegenden Doktorarbeit in der medizinischen Molekularbiologie und Biochemie; die Arbeit wurde im Rahmen des dortigen Graduiertenkollegs finanziert.
10/1999 – 07/2000	Studentische Hilfskraft im Praktikum der medizinischen Biochemie (Homburg/ Saar)
10/2000 – 02/2001	Studentische Hilfskraft im Präparierkurs (Homburg/ Saar)
März 2002	1. Staatsexamen
März 2003	2. Staatsexamen
04/2003 – 03/2004	Praktisches Jahr im Klinikum Mannheim
24. Mai 2004	3. Staatsexamen
Seit August 2004	Assistenzarzt der Inneren Medizin im Bethanien-Krankenhaus in Heidelberg