

**Molekularer Mechanismus der
Stickstoffmonoxid-vermittelten Akkumulation des
Tumorsuppressors p53**

Dissertation

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften

2002

vorgelegt von

Nicole Schneiderhan-Marra

Tag der mündlichen Prüfung: 23. September 2002

Dekan: Prof. Dr. Hansgeorg Probst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dieter Mecke

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Kai-Uwe Fröhlich

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Prof. Dr. B. Brüne als externe Dissertation der Universität Tübingen in den Nephrologischen Forschungslaboratorien der Medizinischen Klinik IV mit Poliklinik (Leitung: Prof. Dr. R. B. Sterzel bzw. Prof. Dr. R. E. Schmieder [kommissarisch]) der Universität Erlangen-Nürnberg erstellt. Einige Versuche wurden während eines Forschungsaufenthalts im Labor von Assistant Prof. Dr. Yanping Zhang am MD Anderson Cancer Center Houston, Department of Molecular and Cellular Oncology, Houston/ Texas, durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Prof. Bernhard Brüne für die Bereitstellung des Themas und die Finanzierung dieser Arbeit bedanken. Sein Interesse an der Arbeit und die ständige Bereitschaft zur Diskussion haben maßgeblich zum Gelingen beigetragen und werden mir immer in guter Erinnerung bleiben. Herzlichen Dank.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Dieter Mecke für die Begutachtung und Betreuung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Kai-Uwe Fröhlich danke ich ebenfalls für die Begutachtung und sein unerschöpfliches Wissen über die formellen Vorgänge einer Doktorarbeit, welches er mir zur Verfügung stellte.

Den Boehringer Ingelheim Fonds danke ich für die freundliche Unterstützung eines Forschungsaufenthalts am MD Anderson Cancer Center in Houston/ Texas, durch ein Reisestipendium.

Für die fachkundige und engagierte technische Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit danke ich Brigitte Rogge und Melanie Decker.

A huge thank-you goes to Dr. Andreja Budde, for her willingness to share with me her abundant knowledge in p53 and lab know-how. You showed me the light at the end of the long Ph.D. tunnel, when I could not see it any more.

I am very grateful to Dr. Yanping Zhang for putting me up in his lab, showing me the secrets of the heterokaryon assay and the exciting discussions during my stay. I also thank the members of the Zhang lab for the unforgettable time in Houston.

Für die kritische Durchsicht meiner Arbeit danke ich Andreja Budde, Barbara Fischer, Stephan Klemt, Hendrik Marra und Gabi Strabel.

Allen Mitgliedern (auch ehemaligen) der Arbeitsgruppe B. Brüne möchte ich für das gute Arbeitsklima und den Gedankenaustausch danken. Eure Hilfe hat zum Gelingen der Arbeit beigetragen und die Arbeit im Labor angenehm gemacht. Vielen Dank.

Für die moralische Unterstützung danke ich meinen Eltern und vor allem meinen Freunden/innen und WG-Mitstreitern, die meine Freude über kleine Erfolge teilten, aber auch immer ein tröstendes Wort fanden, wenn es mal wieder nicht so lief wie es sollte.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Hendrik für seine liebevolle und fortwährende Unterstützung und Freundschaft in den letzten 3 ½ Jahren bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Das Tumorsuppressorprotein p53	1
1.1.1. Struktur und Funktion des Tumorsuppressors p53	1
1.1.2. Regulation von p53	4
1.1.2.1. p53 wird über einen negativen Rückkopplungsmechanismus durch Mdm2 reguliert	4
1.1.2.2. Posttranslationale Modifikationen	6
1.1.2.3. Regulation der p53-Lokalisation	7
1.2. Der CRM1-vermittelte, nukleäre Export	9
1.3. Die Degradation von p53	11
1.3.1. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)	11
1.3.2. Calpain, eine p53-spaltende Cysteinprotease	15
1.4. Stickstoffmonoxid (NO)	16
1.4.1. Die NO-Biosynthese	17
kulturelle Ebene	21
1.4.4. Physiologie und Pathophysiologie von NO	22
1.4.4.1. NO und das kardiovaskuläre System	22
1.4.4.2. NO und das Nervensystem	23
1.4.4.3. NO und das Immunsystem	24
1.4.4.4. NO und Apoptose	25
2. Ziele der Arbeit	27
3e4.2. Aufreinigung von His-p53 aus Sf9-Zellen	30

3.5. Bakterien-Zellkultur	30
3.5.1. Transformation und Kultivierung von <i>E. coli</i>	31
3.5.2. Plasmidisolierung	31
3.6. RNA-Analyse	31
3.6.1. Präparation von gesamter zellulärer RNA	31
3.6.2. Northern Blot-Analyse und Präparation einer Sonde	32
3.6.3. Herstellung einer ³² P-dCTP markierten DNA-Sonde	32
3.7. Proteinanalyse	33
3.7.1. Herstellung von Zelllysaten zur Proteinanalyse	33
3.7.2. Bestimmung der Proteinkonzentration und SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
3.7.3. Western Blot-Analyse	34
3.7.4. ‚Stripping‘ von Western Blots	35
3.8. Techniken zum Studium von Protein-Protein-Wechselwirkung	36
3.8.1. ‚Pull-down‘-Assay	36
3.8.2. Co-Immunopräzipitation von p53 oder/und CRM1 mit immobilisiertem anti-Mdm2-Antikörper	36
3.9. Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen	37
3.10. Luciferase-Assay	38
3.11. Heterokaryon-Assay	38
3.11.1. Virale Infektion von eukaryotischen Zellen	38
3.11.2. Verschmelzen der Zellen und Immunfluoreszenzfärbung	39
3.12. Immunfluoreszenzfärbung	40
3.13. Darstellung von ubiquitiniertem p53	41
3.13.1. Ubiquitinierung von transient exprimiertem HA-p53	41
3.13.2. Ubiquitinierung von endogenem p53	42
3.14. Zellfraktionierung	43
3.15. Proteasomaktivitätsmessung	44
3.16. Gekoppelte <i>in vitro</i> Transkription/Translation	45
3.17. Assay zur Spaltung von p53 durch Calpain	45

4. Ergebnisse	46
4.1. Die Stickstoffmonoxid-vermittelte Akkumulation von p53 ist zellinienspezifisch sowie zeit- und konzentrationsabhängig	46
4.2. Durch NO induziertes p53 ist nukleär lokalisiert und transkriptionell aktiv	47
4.3. p53-mRNA bleibt nach NO-Stimulation unverändert	51
4.4. Einfluss von NO auf den Abbau von p53	52
4.4.1. NO hemmt die 20S-proteasomale Aktivität nicht	52
4.4.2. NO hat keinen Einfluss auf die p53-Mdm2-Interaktion	55
4.4.2.1. ‚Pull-down‘ Assay von Mdm2 an immobilisiertem His-p53	55
4.4.2.2. Wechselwirkung von p53 mit exogenem Mdm2	56
4.4.2.3. Serin 15-phosphoryliertes p53 co-präzipitiert mit endogenem Mdm2	58
4.4.3. Die Ubiquitinierung von p53 unter dem Einfluss von NO	59
4.4.3.1. NO hat keinen Einfluss auf den Ubiquitinierungsstatus von exogenem HA-p53	60
4.4.3.2. Ubiquitinierung von endogenem p53	64
4.4.3.3. Ubiquitiniertes p53 befindet sich nach NO-Stimulation vorwiegend im Zellkern	65
4.5. Einfluss von NO auf den nukleären Export von p53	67
4.5.1. NO induziert die Phosphorylierung von p53 am Serin 15	67
4.5.2. Serin 15-phosphoryliertes p53 kann nicht mehr aus dem Zellkern exportiert werden	69
4.5.3. Mdm2 und CRM1 interagieren	71
4.6. Weitere Untersuchungen zur p53-Akkumulation nach NO-Behandlung	72
4.6.1. Hemmung cytosolischer Cystein-Proteasen	72
4.6.2. NO induziert die Akkumulation von hARF (p14) in Nukleoli	74
5. Diskussion	76
6. Zusammenfassung	87
7. Literaturverzeichnis	90

Abkürzungen

Ac	Acetat
ADP, ATP	Adenosindiphosphat, Adenosintriphosphat
AMC	Aminomethylcumarin
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	alternative reading frame
ATM	<i>ataxia-telangiectasia</i> Genprodukt
ATR	ATM-related polypeptide
BSA	Bovine Serum Albumin
bp	Basenpaare
CaM	Calmodulin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Chaps	3-[(3-Cholaminopropyl)-dimethylammonio]-1-propan-sulfonat
Ci	Curie
C-terminal	Carboxy-terminal
DEA-NO	Diethylamin-NO (Komplex)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoreceinisothiocyanat
GDP, GTP	Guanosindiphosphat, Guanosintriphosphat
GSH	Glutathion
GSNO	S-Nitrosoglutathion
Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunopräzipitation
IR	Infrarot
kDa	Kilodalton

LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
m-, μ -, n-	milli-, mikro-, nano-
MG 132	N-Benzoyloxycarbonyl-Leu-Leu-Leucinal
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mt	Mutante
NaOH	Natronlauge
NES	nukleäre Exportsequenz
Ni-NTA	Nickel-Nitriloacetat
NLS	Kern-Lokalisationssequenz
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
NP-40	Nonidet P-40
N-terminal	Amino-terminal
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
Ran	Ras associated nuclear protein
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
s-LLVY-AMC	Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-Aminomethylcumarin
SpNO	SperminNONOate
t	Zeit
T	Temperatur
TEMED	Tetramethyldiamin
Tris	α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
Ub	Ubiquitin
UV	Ultraviolett
V	Volt
wt	Wildtyp

1. Einleitung

1.1. Das Tumorsuppressorprotein p53

Das *p53* Tumorsuppressorgen weist in rund 50% aller humanen Tumore Mutationen auf und ist somit das am häufigsten veränderte Gen in Tumoren (Greenblatt *et al.*, 1994). In der Regel treten Punktmutationen auf, die zu Konformationsänderungen und/oder zum Verlust des funktionellen Phänotyps führen. Neuere Studien zeigen zudem, dass humane Tumore mit wt *p53* oft Defekte entweder in der Induktion oder in der Signalantwort von *p53* besitzen (Ryan *et al.*, 2001). Es wird angenommen, dass *p53* die Anhäufung von genetischen Veränderungen nach genotoxischem Stress durch Verminderung der Zellproliferation verhindert. Zwei prinzipielle Funktionen werden dabei von dem Tumorsuppressor *p53* ausgeführt: die Induktion des Zellzyklusarrests und die Aktivierung des apoptotischen Zelltods. Das 53 kDa große Phosphoprotein und seine Aktivität unterliegen aufgrund seiner Zellzyklus-regulierenden Eigenschaften einer strengen Kontrolle.

1.1.1. Struktur und Funktion des Tumorsuppressors p53

p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der aus 393 (humanes *p53*) bzw. 387 (murines *p53*) Aminosäuren aufgebaut ist. Das *p53* Protein kann in verschiedene Domänen eingeteilt werden (Abbildung 1): die N-terminale Transaktivierungsdomäne (Fields und Jang, 1990), die gleichzeitig auch die Mdm2-Bindestelle und vermutlich eine nukleäre Exportsequenz (NES) (Zhang und Xiong, 2001) enthält; den mittleren Bereich, mit den sequenzspezifischen DNA-bindenden Domänen; und den C-terminalen Bereich, welcher die Oligomerisierungs-domäne und die nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS) sowie eine NES enthält. Eine Domäne, die an der Regulation der sequenzspezifischen DNA-Bindung beteiligt ist, befindet sich im extremen C-terminalen Bereich und besteht aus überwiegend basischen Aminosäureresten (basische Region). Die in Abbildung 1 durch römische Ziffern gekennzeichneten Bereiche sind evolutionär konservierte Regionen (Soussi *et al.*, 1990).

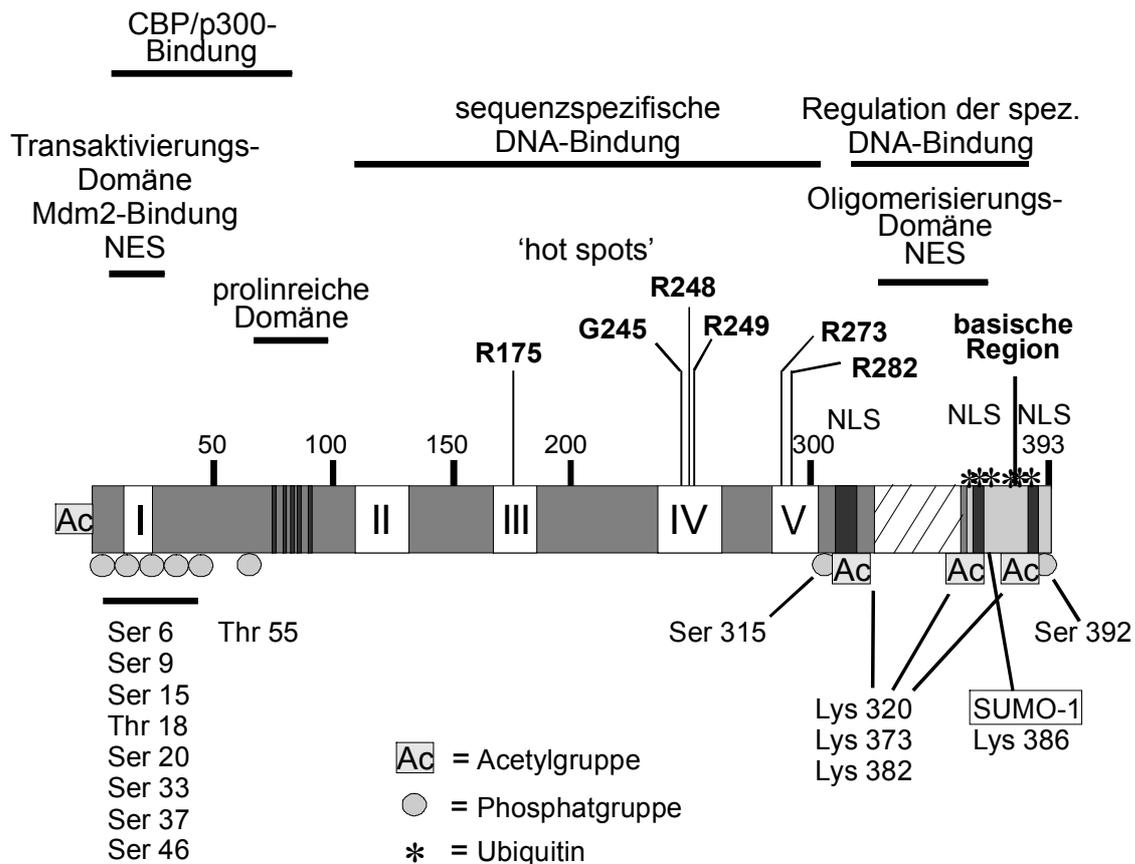


Abbildung 1: Die Struktur des humanen p53-Proteins. p53 wird in verschiedene Domänen eingeteilt. Im N-terminalen Bereich befindet sich die Transaktivierungs-Domäne und der Mdm2-bindende Bereich. Im mittleren Bereich des Proteins ist die DNA-bindende Domäne mit den ‚hot spots‘ (am häufigsten mutierte Aminosäuren) lokalisiert. Im C-terminalen Bereich befinden sich die Oligomerisierungs-Domäne und regulatorische Sequenzen für die DNA-Bindung und die zelluläre Lokalisation. p53 wird an zahlreichen Aminosäuren posttranslational modifiziert. Wichtige Modifikation im N- und C-terminalen Bereich sind eingezeichnet (weitere Erklärungen im Text).

Die Aktivierung von p53 kann zu verschiedenen Antworten in Zellen führen, wie Differenzierung, Alterung, DNA-Reparatur und Verhinderung der Angiogenese. Am besten verstanden sind die p53-vermittelte Induktion des Zellzyklusarrests (von G1 nach S oder von G2 nach M) und die Induktion des p53-vermittelten apoptotischen Zelltods (Vogelstein *et al.*, 2000). Beide Signalwege erlauben p53, das Wachstum gestresster Zellen zu kontrollieren. Dies geschieht entweder durch Zellzyklusarrest, welcher irreversibel oder transient sein kann, um DNA-Reparatur durchzuführen, bevor weitere Replikationszyklen

stattfinden, oder durch endgültiges Entfernen von Zellen aus dem Organismus durch Apoptose (Polyak *et al.*, 1997). Damit schützt p53 die Zelle vor onkogenetischen Veränderungen und verhindert somit die Tumorentstehung. p53 kontrolliert den Übergang von der G1- in die S-Phase (p21-abhängig), ist aber auch in der Lage, den Zellzyklus im Übergang von der G2- in die M-Phase zu arretieren (Agarwal *et al.*, 1995).

Der sequenzspezifische Transkriptionsfaktor p53 (Kern *et al.*, 1991) bindet in Form eines Tetramers an die DNA (Stenger *et al.*, 1992; Lane, 1992; Friedman *et al.*, 1993) und durch Aktivierung oder Repression von Zielgenen (ca. 150 bekannte Gene) steuert er die meisten seiner zellulären Funktionen. Obwohl p53 für seine transkriptionelle Aktivität Zn^{2+} benötigt, besitzt seine DNA-bindende Domäne keine Ähnlichkeit zu einem bekannten DNA-bindenden Motiv wie z.B. dem Zink-Finger (Arrowsmith und Morin, 1996).

Bei humanen Tumoren ist die Inaktivierung von p53 durch Punktmutationen am weitesten verbreitet (Hollstein *et al.*, 1991). Die sogenannten ‚hot spots‘ befinden sich in den konservierten Bereichen der DNA-bindenden Domänen (siehe Abbildung 1). Kristallstrukturanalysen der tetrameren Struktur des p53-DNA-Komplexes (Cho *et al.*, 1994; Jeffrey *et al.*, 1995) zeigen, dass diese p53 Missense-Mutationen Aminosäuren betreffen, die direkt mit der DNA wechselwirken oder die die tertiäre Struktur im DNA-bindenden Bereich stark beeinflussen (Bargonetti *et al.*, 1991; Vogelstein und Kinzler, 1992). p53 bindet spezifisch an eine Konsensussequenz, die aus 2 Kopien eines palindromischen 10 bp langen Motivs PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy besteht (Funk *et al.*, 1992; El-Deiry *et al.*, 1992). Zahlreiche Gene, die eine solche Bindestelle für p53 aufweisen, sind bereits identifiziert und besitzen eine biologisch relevante Funktion. Dazu gehören Gene wie p21 (El-Deiry *et al.*, 1993), *mdm2* (Wu *et al.*, 1993), GADD45 (Kastan *et al.*, 1992), Cyclin G (Okamoto und Beach, 1995) und 14-3-3 σ (Hermeking *et al.*, 1997), um nur einige zu nennen. Der molekulare Mechanismus der p53-vermittelten Repression ist weit weniger verstanden als die Aktivierung von Genen, wobei dadurch nicht weniger bedeutende zelluläre Proteine geregelt werden (z.B. c-fos, β -Actin, c-jun [Ginsberg *et al.*, 1991], c-myc [Ragimov *et al.*, 1993] oder das ‚Multidrug resistance gene‘ MDR1 [Chin *et al.*, 1992]). Die DNA-Bindungsaktivität kann durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen durch Casein-Kinase II (Hupp *et al.*, 1993) oder CBP/p300-vermittelte Acetylierungen (Gu *et al.*, 1997) im C-terminalen Bereich verstärkt werden. Gleiches bewirkt die Bindung von HMG-1 (Jayaraman *et al.*, 1998) oder die Deletion der letzten 30 Aminosäuren im C-Terminus (Hupp *et al.*, 1992).

1.1.2. Regulation von p53

Unter normalen Bedingungen ist p53 in der Zelle aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit (5-30 min) nur latent vorhanden (Reich und Levine, 1984). Für den schnellen Umsatz von p53 ist das Ubiquitin-Proteasom-System verantwortlich (siehe Abschnitt 1.3.1.). Verschiedene Umstände können jedoch schnell zu einer Aktivierung von p53 führen. Auslöser einer p53-Akkumulation sind direkte Schädigungen der DNA (Kasten *et al.*, 1991; Maltzman *et al.*, 1984; Huang *et al.*, 1996) oder Schädigungen von Komponenten, die für die Kontrolle und Verteilung des zellulären genetischen Materials notwendig sind. Dazu gehören beispielsweise der mitotische Spindelapparat (Cross *et al.*, 1995), die Ribonukleotid-Depletion (Linke *et al.*, 1996), der Hitzeschock (Ohnishi *et al.*, 1996), Hypoxie (Graeber *et al.*, 1996) oder NO-Exposition (Forrester *et al.*, 1996). Außerdem wird p53 durch verschiedene Onkogene wie Myc, Ras und E1A (Hermeking und Eick, 1994; Serrano *et al.*, 1997; Stanchina *et al.*, 1998) aktiviert. Wie unter 1.1.2.2. beschrieben, wird die Akkumulation von p53 nach Stress weitgehend durch posttranslationale Modifikationen am p53-Protein vermittelt, was eine schnelle Akkumulation und Aktivierung von p53 nach Stress erlaubt. Durch die Beeinflussung der p53-Lokalisation in der Zelle kann die Aktivität des Tumorsuppressors gesteuert werden. p53 befindet sich in latenter Form oft im Cytoplasma, zumindest zu bestimmten Zeiten des Zellzyklus (Shaulsky *et al.*, 1990), wobei Stress zur nukleären Akkumulation von p53 führt und es seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausübt. Es gibt Hinweise darauf, dass p53 im Kern zurückgehalten wird und folglich nicht mehr durch das cytoplasmatisch lokalisierte Ubiquitin-Proteasom-System degradiert werden kann, was letztlich zur Akkumulation führt (Tao und Levine, 1999; Zhang und Xiong, 2001).

1.1.2.1. p53 wird über einen negativen Rückkopplungsmechanismus durch Mdm2 reguliert

Im Zentrum der p53-Regulation steht die Interaktion mit dem Onkoprotein Mdm2, das oft auch als ‚Master Regulator of p53‘ bezeichnet wird. Mdm2 bindet p53 im N-terminalen Bereich (Aminosäuren 15-22, siehe Abbildung 1) direkt in der Transaktivierungs-Domäne (Momand *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1996; Haupt *et al.*, 1996). Die Bindung von Mdm2 an p53 kann die transkriptionelle Aktivität durch Störung der Wechselwirkung von p53 mit seinen transkriptionellen Aktivatoren wie z.B. CBP/p300 beeinflussen und direkt die

transkriptionelle Aktivität von p53 hemmen (Oliner *et al.*, 1993; Wadgaonkar und Collins, 1999; Thut *et al.* 1997).

Einerseits führt p53 durch transkriptionelle Aktivierung des *mdm2*-Gens zur Akkumulation von Mdm2 (Barak *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1993), andererseits ist Mdm2 an der Degradation von p53 beteiligt. Mdm2 ist die E3-Ligase von p53 und führt in dieser Eigenschaft zum Abbau von p53 durch das Ubiquitin-Proteasom-System (Kubbutat *et al.*, 1997; Haupt *et al.*, 1997; siehe 1.3.1.). Das Onkoprotein Mdm2 und das Tumorsuppressorprotein p53 bilden somit einen negativen Rückkopplungsmechanismus. Mdm2 ist eine E3-Ligase aus der Gruppe der RING-Finger-Proteine, d.h. zur Übertragung von Ubiquitinresten auf p53 ist eine konservierte Region (RING-Finger) notwendig, die im aktiven Zentrum Cystein- und Histidin-Reste besitzt und ein Zn^{2+} komplexiert (Fang *et al.*, 2000). Außerdem ist Mdm2 in der Lage, sich selbst zu ubiquitinieren. Mutationen in der RING-Finger Domäne von Mdm2 verhindern die Ubiquitinierung von p53 und Mdm2 und führen zur Stabilisierung beider Proteine. In einigen Tumorarten liegt Mdm2 in erhöhten Mengen vor (z.B. durch Genduplikation), was die Akkumulation von p53 verhindert und somit zur Anhäufung von genetischen Defekten führt. Während p53(-/-)-Mäuse eine normale Embryonalentwicklung zeigen und lediglich nach der Geburt zu einer vermehrten Tumorbildung neigen, führt die Deletion von beiden *mdm2*-Allelen schon im frühen Embryonalstadium durch Apoptose zum Tod (Donehower *et al.*, 1992; de Rozières *et al.*, 2000). Bei gleichzeitiger Deletion von p53 sind die Mäuse wieder lebensfähig, sind aber auch sehr anfällig gegenüber Tumorentstehung (Montes de Oca Luna *et al.*, 1995).

Ein drittes Protein, das an der Mdm2-abhängigen Regulation von p53 beteiligt ist, ist das Tumorsuppressorprotein p14^{ARF} (human, p19^{ARF} murin) (zusammengefasst in Zhang und Xiong, 2001). Die Überexpression von p14^{ARF} führt zur Akkumulation von p53, so dass p14^{ARF} oberhalb von p53 in die Signalkaskade eingestuft wird. p14^{ARF} interagiert direkt mit Mdm2 und hält Mdm2 im Nukleolus zurück, so dass p53 nicht zur Degradation ins Cytoplasma gelangen kann (Tao und Levine, 1999; siehe auch 1.1.2.3.). Eine direkte Wechselwirkung von p14^{ARF} mit p53 konnte in humanen Zellen noch nicht nachgewiesen werden, wobei ein ternärer Komplex der drei Proteine nicht ausgeschlossen wird. Zudem führt die Überexpression von p14^{ARF} zur Erhöhung von p21, welches ein transkriptionelles Zielgen von p53 ist (Stott *et al.*, 1998; Pomerantz *et al.*, 1998). p14^{ARF} scheint also in die Interaktion von p53 mit Mdm2 einzugreifen. Für die Regulation der p53-Mdm2-Wechselwirkung scheinen auch Phosphorylierungen eine Rolle zu spielen. p53 und Mdm2 sind Phosphoproteine, die mehrere mögliche Phosphorylierungsstellen besitzen.

Verschiedene Forschergruppen haben gezeigt, dass DNA-Schädigung zur Phosphorylierung von p53 am N-Terminus führt (Siliciano *et al.*, 1997; Shieh *et al.*, 1997). Durch die Phosphorylierung an Serin 15 kommt es zur verminderten Interaktion von p53 mit Mdm2, was letztlich zur Akkumulation von p53.

1.1.2.2. Posttranslationale Modifikationen

Die häufigsten posttranslationalen Modifikationen von p53 finden sich in den ca. 100 Aminosäuren der N-terminalen und in den ca. 90 Aminosäuren der C-terminalen Domänen. Hierbei lassen sich im N-Terminus massive Phosphorylierungen und im C-Terminus neben Phosphorylierungen auch Acetylierungen, Sumoylierung und Ubiquitinierungen feststellen (siehe Abbildung 1). Posttranslationale Modifikationen haben Einfluss auf die Stabilität, die Lokalisation, die DNA-Bindung und die transkriptionelle Aktivität von p53. Nach Stresseinwirkung auf die Zelle findet man im C-terminalen Bereich von p53 Phosphorylierungen (Meek, 1999), Sumoylierung (Gostissa *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 1999) und Acetylierungen (Gu und Roeder, 1997), die die sequenzspezifische DNA-Bindung und transkriptionelle Aktivität von p53 verstärken. Die Acetylgruppen werden von Histonacetyltransferasen, wie CBP/p300 und PCAF, die p53 im N-terminalen Bereich binden, übertragen (Liu *et al.*, 1999). Wiederum regulieren Phosphorylierungen im N-terminalen Bereich die Bindung der Acetyltransferasen, so dass eine Phosphorylierungs-Acetylierungs-Kaskade die p53-Aktivität verstärkt (Sakaguchi, *et al.*, 1998). SUMO-1 (small ubiquitin-like modifier 1) wird ähnlich wie Ubiquitin übertragen. Hierfür sind das E1 und Ubc9 zuständig (Appella und Anderson, 2001). Im Falle von p53 übt der Sumorest keinen Einfluss auf den Abbau aus, auch wenn der Name SUMO es vermuten lassen würde.

Zahlreiche Kinasen (ATM, ATR, Caseinkinase 1, DNA-abhängige Proteinkinase) werden nach DNA-Schädigung aktiviert und phosphorylieren p53 im N-terminalen Bereich. Serin 15, Serin 20 und Threonin 18 sind hier von besonderem Interesse, da sie sich in oder nahe der Mdm2-Bindungsstelle befinden. Shieh *et al.* (1997) und Unger (1997) berichten, dass die Phosphorylierung von Serin 15 die Mdm2-Bindung vermindert. Glykosylierung von p53 wurde ebenfalls beschrieben und führt zu verstärkter Bindung an die DNA (Shaw *et al.*, 1996).

Eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen ist wohl die Ubiquitinierung, die für den Abbau von p53 unbedingt benötigt wird (siehe auch 1.3.1.). Ubiquitinierungen von

p53 findet man im C-terminalen Bereich an den Lysinresten 370, 372, 373, 381, 382 und 386 (Rodriguez *et al.*, 2000, Nakamura *et al.*, 2000; Gu *et al.*, 2001). Da Ubiquitin durch Mdm2 übertragen wird, hängen auch Phosphorylierung und Ubiquitinierung eng zusammen. Um das Netzwerk der posttranslationalen Modifikationen vollständig zu verstehen, sind sicher noch einige Studien notwendig, die vor allem die bisher gewonnenen *in vitro* Daten *in vivo* bestätigen und Kontroversen erklären können. Möglicherweise differieren die posttranslationalen Modifikation in verschiedenen Zelllinien, was die Aufklärung der Zusammenhänge sichtlich erschweren würde.

1.1.2.3. Regulation der p53-Lokalisation

Die Funktion von p53 hängt von seiner nukleären Lokalisation ab, deshalb sind der nukleäre Im- und Export von p53 strengstens reguliert. Der nukleäre Import von p53 hängt von seiner Interaktion mit dem Mikrotubulinetzwerk und Dynein ab (Giannakakou *et al.*, 2000). p53 wird aktiv in Richtung Kern transportiert und mittels des nukleären Lokalisationssignals (NLS) in den Kern importiert (Liang und Clarke, 1999). Prinzipiell werden einteilige und zweiteilige NLS unterschieden. p53 besitzt zwei einteilige und eine zweiteilige NLS, welche im C-terminalen Bereich lokalisiert sind (siehe Abbildung 1). Wie Abbildung 2 zeigt, führt die Deletion der NLS zum nukleären Ausschluss von p53, wohingegen wt p53 nukleär lokalisiert ist.

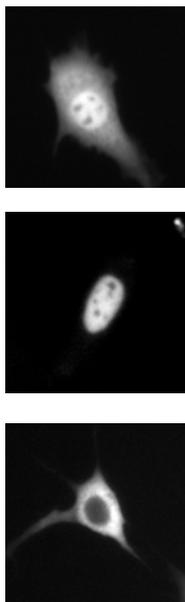


Abbildung 2: Die Deletion der NLS von p53 führt zur cytoplasmatischen Akkumulation von p53 (unteres Bild), wohingegen wt p53 nukleär lokalisiert ist (mittleres Bild). wt und NLS-deletiertes p53 wurden mit dem gelb fluoreszierenden Protein (YFP) markiert und in NIH3T3 transfiziert. Im oberen Bild wurde der YFP-Vektor ohne p53-Insert transfiziert (Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen).

Der Importin α - und β -Komplex bindet an die NLS und vermittelt das Andocken des p53-Importin-Komplexes an den Kernporenkomplex (Görlich und Mattaj, 1996; Weis, 1998). Um zur Degradation wieder ins Cytoplasma gelangen zu können, besitzt p53 neben der NLS auch zwei nukleäre Exportsignale (Stommel *et al.*, 1999; Zhang und Xiong, 2001). Beide sind hoch konservierte leucinreiche NES. Eine davon wurde in der Tetramerisierungs-Domäne identifiziert (AS 339-352), die andere befindet sich im N-terminalen Bereich, der ebenfalls für die Transaktivierung und Mdm2-Bindung wichtig ist (AS 11-27). Der Exportfaktor CRM1/Exportin1/XPO1 bindet an leucinreiche Sequenzen und vermittelt den nukleären Export über den Kernporenkomplex (Fornerod *et al.*, 1997; Stade *et al.*, 1997). Für die Regulation der nukleocytoplasmatischen Translokation wurden verschiedene Modelle entworfen, die die Oligomerisierung, die Phosphorylierungen und die Interaktion mit Mdm2 in Betracht ziehen. Da die C-terminal lokalisierte NES sich in und die NLS nahe der Tetramerisierungsdomäne befindet, ist es möglich, dass der nukleocytoplasmatische Transport von p53 von der Oligomerisierung abhängig ist (Stommel *et al.*, 1999; Liang und Clarke, 2001). Es ist bekannt, dass p53 im N- und C-terminalen Bereich zahlreiche Phosphorylierungsstellen aufweist. Phosphorylierungen und eventuelle Ubiquitinierungen beeinflussen die Oligomerisierung und die Interaktion von Mdm2 mit p53. Phosphorylierung von p53 an Serin 392 verstärkt die Oligomerbildung von p53, wohingegen Phosphorylierung an Serin 315 den Effekt wieder weitgehend aufhebt (Sakaguchi, 1997). Phosphorylierungen, die die direkte Wechselwirkung der Exportfaktoren mit p53 beeinflussen, sind ebenfalls denkbar. Serin 315 ist ein möglicher Angriffspunkt, da dieses direkt in der zweiteiligen NLS liegt, also dem Bereich der für die Bindung des Importkomplexes notwendig ist.

Den Einfluss von Mdm2 auf die p53-Lokalisation zeigen Mdm2-Antisense-Versuche und die Überexpression von p19^{ARF} (Tao und Levine, 1999; siehe auch 1.1.2.1.). Beides führt zur nukleären Lokalisation von p53. Wie, wann und ob Mdm2 für den nukleären Export notwendig ist, wird in zahlreichen Studien kontrovers diskutiert (z.B. Boyed *et al.*, 2000; Geyer *et al.*, 2000; Roth *et al.*, 1998). Stommel *et al.* (1999) und Liang und Clarke (2001) schlagen verschiedene Mechanismen für einen Mdm2-vermittelten Export von p53 vor. Dabei ist zu klären, ob der Exportfaktor CRM1 direkt an p53 bindet oder indirekt über Mdm2 einen ternären Komplex bildet. Auch ist unklar, ob p53 nur als Monomer exportiert werden kann und ob die Mdm2-vermittelte Ubiquitinierung von p53 durch Strukturveränderung die Bindung von CRM1 an p53 erlaubt. Sicher ist, dass die zelluläre Lokalisation von p53 einer genauen Regulation unterliegen muss und somit auch die

transkriptionelle Aktivität von p53 beeinflusst werden kann. Einige Tumore besitzen wt p53; der Funktionsverlust beruht in diesen Fällen auf einer cytoplasmatischen Akkumulation des Tumorsuppressorproteins (Ryan *et al.*, 2001). Dabei ist zu bedenken, dass der nukleäre Im- und Export ein fließendes Gleichgewicht ist und eine Verschiebung des Gleichgewichts leicht zu einer Veränderung der p53-Lokalisation in der Zelle führen kann (z.B. Akakura *et al.*, 2001).

1.2. Der CRM1-vermittelte, nukleäre Export

Die ersten Beobachtungen, die ein ‚Shuttling‘ von Proteinen zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma vermuten ließen, wurden schon in den 50er Jahren von Goldstein gemacht (1958). Es dauerte rund weitere 30 Jahre bis das erste ‚shuttling‘-Protein, Nucleolin, identifiziert wurde (Borer *et al.*, 1989). Ist ein schneller Transport von Proteinen aus oder in den Kern notwendig oder das Protein größer als 40 kDa, so erfolgt der Transport in einem bidirektionellen, energieabhängigen Mechanismus durch den sogenannten Kernporenkomplex (NPC = nuclear pore complex). Die meisten Proteine unter 40 kDa können sich durch Diffusion (durch den Kernporenkomplex) frei zwischen Kern und Cytoplasma bewegen (Nigg, 1997). Der Transport von Proteinen durch den Kernporenkomplex hängt von konservierten Signalsequenzen, spezifischen Rezeptoren und Adaptermolekülen ab, welche die effiziente Translokation durch die Kernmembran bewerkstelligen (zusammengefasst in Nakielny und Dreyfuss, 1999; Görlich und Kutay, 1999; Michael, 2000). Typischerweise besitzen die zu transportierenden Proteine beides, nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS) und nukleäre Exportsequenzen (NES). CRM1 gehört zur RanGTP-bindenden Importin β -Superfamilie und ist der am besten untersuchte Exportfaktor. Er bindet an leucinreiche Sequenzen im zu exportierenden Protein oder in Adaptermolekülen und vermittelt durch die Wechselwirkung mit CAN/Nup214 (Protein des NPC) den Export durch den Kernporenkomplex (Fornerod *et al.*, 1997a). Die kleine GTPase Ran (Ras associated nuclear protein) spielt eine tragende Rolle im Importin β -vermittelten nukleär-cytoplasmatischen Transport von Proteinen und wechselt zwischen einem GDP- und GTP-gebundenen Zustand. Exportrezeptoren der Importin β -Familie binden spezifisch an RanGTP. Ran reguliert zudem die Bindung des Transportrezeptors zum exportierenden Protein. Die Ablösung von RanGTP vom Exportrezeptor führt zum Zerfall des Exportkomplexes aus Exportrezeptor und zu exportierendem Protein. Dagegen

lösen sich importierte Proteine in der Gegenwart von RanGTP von ihrem Importrezeptor ab. Um einen effizienten Transport durch den Kernporenkomplex zu gewährleisten, besteht in der Zelle eine Asymmetrie in der Verteilung von RanGTP und RanGDP zwischen Kern und Cytoplasma (Abbildung 3). Zudem ist das RanGTPase aktivierende Protein (RanGAP) vorwiegend im Cytoplasma und der Guanidin-Nukleotid-Austauschfaktor RCC1 (oder RanGEF) vorwiegend im Nukleus lokalisiert. So bewegt sich Ran immer zwischen dem Kern und dem Cytoplasma hin und her.

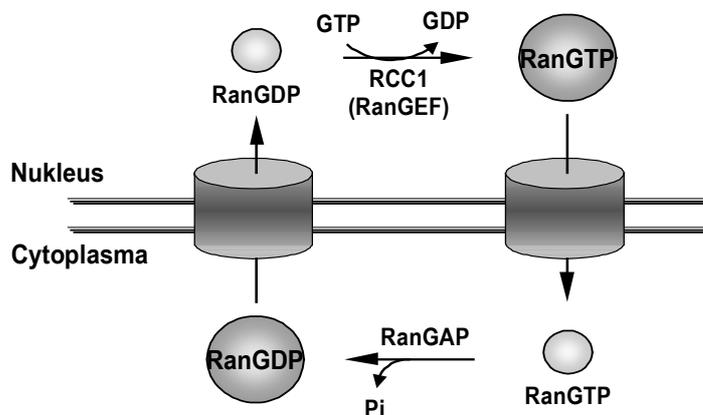


Abbildung 3: Der RanGTPase-Zyklus (nach Macara, 1999). Erklärung siehe Text.

Durch Immunofluoreszenzfärbungen und Western Blot-Analysen kann nur ein momentanes Bild der Verteilung eines Proteins in der Zelle gewonnen werden, d.h. ob es sich zwischen Kern und Cytoplasma bewegt, kann mit diesen Methoden nicht erfasst werden. Es gibt mehrere Möglichkeiten das ‚Shuttling‘ von Proteinen zu untersuchen. Eine häufig verwendete Methode ist der sogenannte Heterokaryon-Assay. Das Prinzip dieses Assays ist es, in Gegenwart von Proteinsynthese-Inhibitoren zu untersuchen, ob ein Protein, das im Zellkern einer Zellspezies vorkommt (Donor-Zelle), in der Lage ist, in den Kern einer anderen Zellspezies, die dieses Protein nicht besitzt (Akzeptorzelle), zu ‚shutteln‘. Hierfür werden verschiedene Zellen co-kultiviert und fusioniert (schematische Darstellung in Abbildung 4). Anschließend wird das zu untersuchende Protein mit spezifischen Antikörpern detektiert. Um die Zellkerne der unterschiedlichen Zellspezies unterscheiden zu können, wird ein zusätzliches Protein detektiert, das nur in einer der beiden Zellspezies vorkommt.

Für Studien des CRM1-vermittelten nukleären Exports bietet sich der spezifische Inhibitor Leptomycin B an. Er bindet kovalent an einen Cysteinrest in der zentralen konservierten Region (CCR) von CRM1 und verhindert die Ausbildung des Exportkomplexes zwischen CRM1, RanGTP und dem zu exportierenden Protein (Kudo *et al.*, 1999).

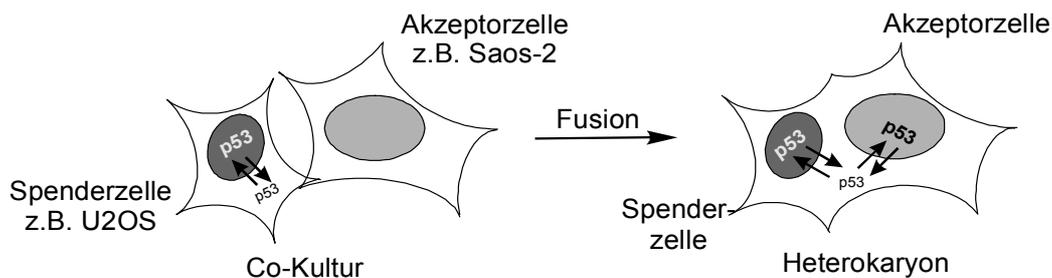


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Heterokaryon-Assays (Erläuterung im Text).

1.3. Die Degradation von p53

Der erste kritische Schritt der p53-vermittelten Apoptose ist die Akkumulation des Proteins. Die meisten Stressoren führen zu einer Verlängerung der Halbwertszeit von p53 durch Hemmung des Abbauweges. Im Falle von p53 ist die Degradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System am besten untersucht. In neuerer Zeit gibt es einige Berichte, die eine Spaltung von p53 durch eine Cysteinprotease beschreiben.

1.3.1. Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Aufbau, Funktion und Regulation des Proteasoms sind sehr komplex und bis jetzt auch nur teilweise verstanden. Hier kann deshalb nur ein grober Überblick gegeben werden. Verschiedene Aspekte des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) werden in den Reviewartikeln von Baumeister (1998), Ciechanower (1998), Hershko und Ciechanover, (1998), Rivett (1998) beschrieben und Glickman und Ciechanower (2001) fassen das bisher Bekannte in einem umfangreichen Artikel zusammen.

Das Konzept des intrazellulären Proteinabbaus wurde durch die Entdeckung des Ubiquitin-Proteasom-Systems völlig revolutioniert. In eukaryotischen Zellen stellt das Proteasom das wichtigste nicht-lysosomale proteolytische System dar. Die Proteolyse von zellulären

Proteinen ist ein sehr komplexer, zeitlich kontrollierter und genau regulierter Prozess, der eine wichtige Rolle in einem breiten Spektrum grundlegender zellulärer Prozesse spielt. Durch die große Anzahl an Substraten, wie Proteine des Metabolismus, der Zelldifferenzierung und Zellzykluskontrolle, Proteine mit Beteiligung an apoptotischen Prozessen, der Stressantwort und der Antigenprozessierung (MHC I-Prozessierung), ist es wenig verwunderlich, dass Störungen des Abbauweges an der Entstehung zahlreicher Erkrankungen beteiligt sind. Dazu gehören beispielsweise Malignität, Cystische Fibrose (Mukoviszidose; Ward *et al.*, 1995), Angelmann-Syndrom (Albrecht *et al.*, 1997), Liddle-Syndrom (Staub *et al.*, 1997), Erkrankungen mit Beteiligung des Immunsystems, neurodegenerative Erkrankungen (Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, amyotropher Lateralsklerose, Creutzfeld-Jakob-Krankheit, Chorea Huntington) oder Muskelatrophie.

Der Abbau von Proteinen durch das UPS erfordert zwei bestimmte, aufeinanderfolgende Schritte: 1. die Markierung des Substrats durch Anhängen von einem oder mehreren Ubiquitinresten (Abbildung 5A) und 2. die Degradation des markierten Proteins durch das 26S-Proteasom unter Freisetzung von wiederverwertbarem Ubiquitin (siehe Abbildung 5 B). Die Konjugation des hoch konservierten, 76 Aminosäuren langen Ubiquitins an das Substrat ist ATP-abhängig und wird in drei Schritten durchgeführt: Im ersten, ATP-verbrauchenden Schritt wird ein Ubiquitinmolekül über seinen C-terminalen Glycinrest auf das sogenannte Ubiquitin-aktivierende Enzym, E1, übertragen. Dabei entsteht eine energiereiche Thioesterbindung zwischen dem Glycinrest und einem Cysteinrest des E1. Das aktivierte Ubiquitin wird in einem zweiten Schritt, unter Generierung einer neuen Thioesterbindung, von E1 auf einen Cysteinrest eines E2-Enzyms übertragen. E2-Enzyme werden auch als ‚ubiquitin-carrier proteins‘ (UBCs) bezeichnet und sind die Ubiquitin-vermittelnden Enzyme zwischen E1 und einem Mitglied der Ubiquitin-Protein-Ligase-Familie, E3. Das zu ubiquitinierende Substrat bindet in der Regel spezifisch an die E3-Ligase, welche in einem dritten Schritt Ubiquitin kovalent auf eine ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes im Substrat überträgt. Der erste Ubiquitinrest kann auch auf die Aminogruppe der N-terminalen Aminosäure des zu degradierenden Proteins übertragen werden (Breitschopf *et al.*, 1998). In weiteren Zyklen werden mehrere Ubiquitinreste auf bestimmte Lysinseitenketten der bereits vorhandenen Ubiquitine übertragen, so dass verzweigte Ketten mit bis zu 10 oder mehr Ubiquitinresten entstehen können (zusammengefasst in Glickman und Ciechanover, 2001). Die meisten Substrate besitzen mehrere Lysinreste, die für eine Ubiquitinierung in Frage kommen, so dass die Mutation eines Lysins in der Regel kompensiert werden kann. p53 beispielsweise, besitzt zwar auf

den C-terminalen Bereich beschränkte ubiquitinierbare Lysinreste (Lys 370, 372, 373, 381, 382 und 386), um aber nicht mehr Mdm2-vermittelt (E3-Ligase) degradiert werden zu können, müssen alle sechs Lysinreste mutiert werden (Rodriguez *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2000; Gu *et al.*, 2001; siehe auch Abbildung 1).

Während es nur ein E1-Enzym gibt, sind in *Saccharomyces cerevisiae* 13 verschiedene E2s und E2-ähnliche Enzyme beschrieben. Die Anzahl in Säugern ist noch um einiges größer. Die E3-Ligasen weisen aufgrund der Vielzahl an Substraten, die spezifisch erkannt und durch das UPS degradiert werden, eine entsprechende Mannigfaltigkeit auf. Die Existenz von 3 verschiedenen Proteinklassen zur Ubiquitinierung von Proteinen ermöglicht eine hohe Spezifität und Selektivität bei der Ubiquitinkonjugation. Koegel und Kollegen (1999) identifizierten ein E4-Protein, das speziell der Elongation der Ubiquitinketten und somit einer besseren Substraterkennung durch das Proteasom dient. Deubiquitinierende Enzyme sorgen für das Recycling von Ubiquitin, indem sie die vom Substrat abgespaltenen Ubiquitinketten in einzelne Ubiquitine spalten. In jüngster Zeit wurden mehrere deubiquitinierende Enzyme gefunden und eine Beteiligung an der Regulation der Substratstabilität scheint wahrscheinlich (z.B. Li *et al.*, 2002).

Die Substraterkennung durch die E3-Ligase erfolgt über verschiedene spezifische Motive, die entweder durch die Primär- oder Sekundär-Struktur oder durch posttranslationale Modifikationen bestimmt werden. Hierzu gehören z.B. die schon relativ gut erforschte ‚N-end rule‘, die sogenannte ‚destructive box‘ in Cyclinen, Phosphorylierungen, Hydroxylierungen, abnormale/mutierte/missgefaltete Proteine, Maskieren/Demaskieren des Degradationssignals durch Oligomerisierung bzw. Proteinumfaltung oder die Vermittlung des Signals durch ein weiteres Protein.

Das 26S-Proteasom ist eine in Eukaryoten hoch konservierte, ca. 2 MDa große multikatalytische Protease, die aus zwei Subkomplexen besteht: dem 20S Kernstück (‚core partikel‘), welches die katalytische Aktivität besitzt und dem 19S-Komplex (‚cap‘), der die regulatorische Untereinheit darstellt. Diese flankieren die beiden Enden der 20S-Untereinheit. Der tonnenförmig zusammengesetzte 20S-Komplex teilt sich in 4 Untereinheiten (zwei α und zwei β), die sich in 4 Ringen aufeinander stapeln (siehe Abbildung 5) und jeweils aus 7 Proteinen bestehen.

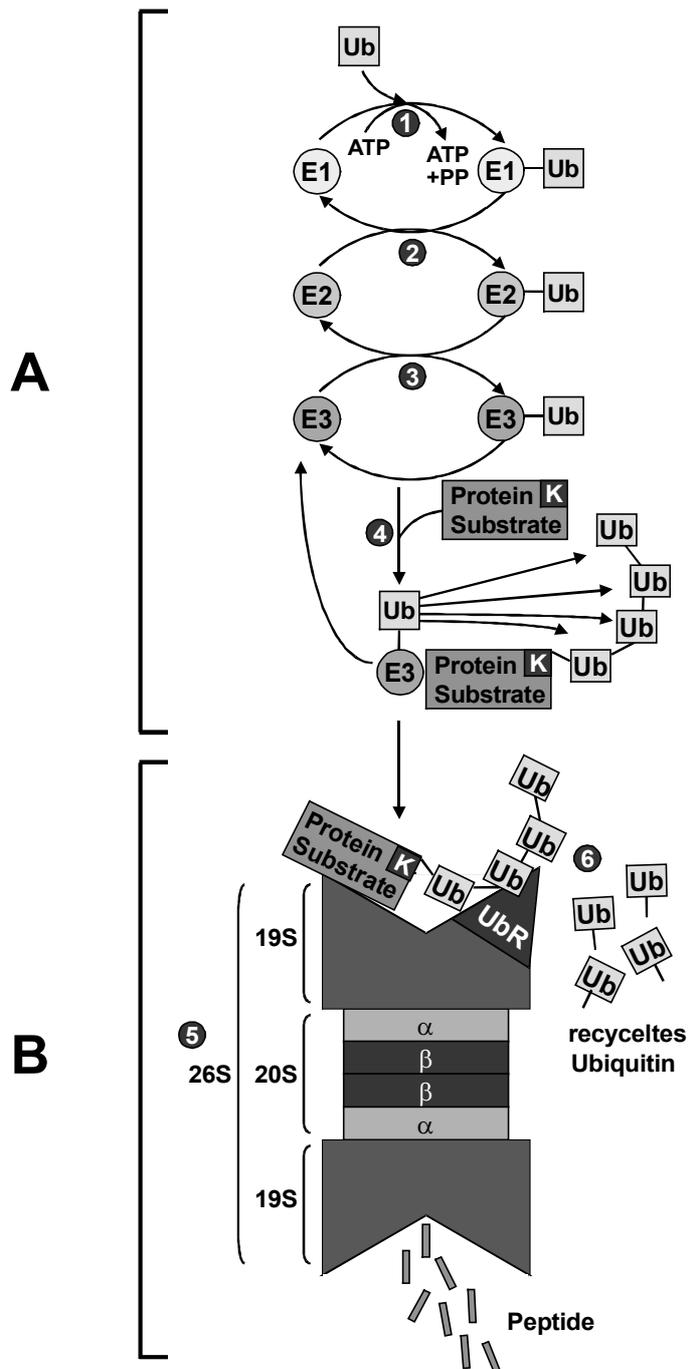


Abbildung 5: Das Ubiquitin-Proteasom-System. (A) Konjugation von Ubiquitin an das zu degradierende Protein. **(B)** Abbau des markierten Proteins durch das 26S-Proteasom. (1) Aktivierung von Ubiquitin durch E1. (2) Transfer des aktivierten Ubiquitins von E1 auf ein Mitglied der E2-Familie. (3) Transfer des aktivierten Ubiquitins von E2 auf eine substratspezifische E3-Ligase. (4) Ausbildung einer mit dem Substrat kovalent verknüpften Polyubiquitin-Seitenkette. (5) Bindung des polyubiquitinierten Substrats an den Ubiquitin-Rezeptor in der 19S-Untereinheit des 26S-Proteasoms und proteolytische Spaltung des Substrats zu kurzen Peptiden durch die 20S-Untereinheit. (6) Recycling von Ubiquitin durch Isopeptidasen. Abbildung nach Ciechanover, 1998

Die drei katalytischen Regionen (trypsin- und chymotrypsin-ähnliche, sowie glutamyl peptidyl-hydrolysierende Proteaseaktivität) befinden sich in den verschiedenen β -Untereinheiten und stellen Threoninproteasen dar. Der 19S-Komplex ist für die energieabhängige Substraterkennung und -entfaltung der ubiquitinierten Proteine zuständig und nimmt damit eine regulatorische Stellung in der Proteasomaktivität ein. Durch das Proteasom werden Proteine in der Regel in 3-23 Aminosäuren lange Peptide gespalten (Kisselev *et al.*, 1998) und vermutlich durch weitere zelluläre Proteasen und Aminopeptidasen rasch in einzelne Aminosäuren gespalten.

Zur Herstellung von Peptiden, die der Antigenpräsentation in MHC Klasse I-Molekülen dienen, ist eine der beiden 19S-Untereinheiten gegen eine 11S-Untereinheit (PA28, PA26) ausgetauscht. Immunoproteasome spalten Peptide vorwiegend hinter hydrophoben Resten, was zur Einbindung in die hydrophobe Tasche der MHC I-Moleküle vorteilhaft ist.

Die proteasomale Proteindegradation stellt einen komplexen Vorgang dar, der in der Regulation der Proteinenlebensdauer von großer Bedeutung ist. Fehler in diesem System sind Ursachen vieler schwerwiegender Erkrankungen; nicht zuletzt ist die Inaktivierung von E1 in Hefe letal (McGarth *et al.*, 1991). Nukleäre sowie cytoplasmatische Proteine, Proteine im Lumen des Endoplasmatischen Reticulums (ER) und membrangebundene Proteine werden durch das UPS reguliert und degradiert. Es ist anzunehmen, dass noch eine weitaus größere Anzahl an Proteinen über das UPS degradiert wird. Davon ausgehend werden sich in Zukunft weitere zur Ubiquitinierung notwendigen E2s und E3s finden.

1.3.2. Calpain, eine p53-spaltende Cysteinprotease

Neben der gut charakterisierten Regulation durch das Onkoprotein Mdm2 (1.1.2.1.) wurde gezeigt, dass p53 *in vitro* auch durch Calpaine proteolytisch gespalten werden kann (Gonen *et al.*, 1997; Pariat *et al.*, 1997; Kubbutat und Vousden, 1999). Calpain (EC 3.4.22.17) ist eine nicht-lysosomale Calcium-aktivierte neutrale Protease, die in nahezu allen Zellen vorkommt. Die zwei bekannten Isoformen, μ - und m -Calpain, unterscheiden sich hauptsächlich in der zu ihrer Aktivierung benötigten Ca^{2+} -Konzentration. Calpaine gehören zur Familie der Cysteinproteasen und bestehen aus einer 80 kDa großen katalytischen Untereinheit und einer kleineren, 30 kDa großen Untereinheit, die in allen Isoformen gleich ist. Beide Untereinheiten sind in der Lage, Ca^{2+} zu binden. Die Aktivität der Protease wird zusätzlich über Autoprotolyse und ein Inhibitorprotein Calpastatin reguliert (Goll *et al.*, 1992). Kommerzielle Inhibitoren wie Calpain-Inhibitor I oder II

hemmen leider auch teilweise das Proteasom, was die Untersuchungen unter Zellkulturbedingungen erschwert. Neuere Ergebnisse zeigen, dass Gas2 *in vivo* mit *m*-Calpain interagiert und dass rekombinantes Gas2 die Calpain-vermittelte Spaltung von p53 hemmt (Benetti *et al.*, 2001). Gas2 ist ein Caspase-3-Substrat, das während des Zellzyklusarrests (G₀) hochreguliert ist (Sgorbissa *et al.*, 1999; Brancolini *et al.*, 1992) und p53-abhängig Apoptose induziert (Benetti *et al.*, 2001).

Die genaue Funktion von Calpainen ist noch unklar. Man nimmt an, dass sie, wie das Proteasom, ein Teil eines proteolytischen Systems mit regulierenden Funktionen sind. Es werden ihnen Einflüsse bei der Plättchenaggregation, der Aktivierung neutrophiler Granulozyten, der neuronalen ‚long-term potentiation‘ (LTP), der Oocytenreifung und der Apoptose zugeschrieben (Squier *et al.*, 1995; Zhu *et al.*, 1995; einen umfassenden Überblick geben Corall und DeMartino, 1999). Neben p53 spalten Calpaine Talin, Filamin, Fodrin, Protein-Kinase C und Transkriptionsfaktoren wie c-Jun und c-Fos (Watt und Molloy, 1993; Hirai *et al.*, 1991).

1.4. Stickstoffmonoxid (NO)

Klein (30 Da), einfach und gasförmig: Stickstoffmonoxid ist ein Radikal mit vielfältigen Wirkungen. Für die Entdeckung der Rolle von „NO als Signalmolekül im Kardiovaskulären System“ wurde Robert Furchgott, Louis Ignarro und Ferid Murad 1998 der Nobelpreis für Medizin verliehen. Zuerst als Produkt von Bakterien entdeckt, konnte es wider erwarten auch als wichtiges Molekül für höhere Organismen identifiziert werden. Inzwischen ist bekannt, dass NO von zahlreichen Zelltypen generiert wird (Brüne *et al.*, 1998). Von Endothelzellen in Gefäßwänden produziert und von Furchgott und Zawadzki 1980 zuerst als ‚endothelial derived relaxing factor‘ (EDRF) bezeichnet, reguliert es den Blutdruck durch seine relaxierende Wirkung auf glatte Muskelzellen. Größere Mengen von NO, wie sie von Makrophagen produziert werden, wirken toxisch gegenüber Mikroorganismen und anderen in den Körper eingedrungenen Parasiten, und spielen somit eine Rolle bei Infektionserkrankungen. Ein Aspekt auf dem Gebiet der NO-Forschung umfasst die Tumorabwehr durch Induktion von Apoptose. Überdies wirkt NO als unspezifischer Neurotransmitter, wobei noch unklar, ist ob NO in der Gedächtnisfunktion eine Rolle spielt. Neben diesen wichtigen physiologischen Funktionen kann NO auch toxisch wirken und ist z.B. Bestandteil von Autoabgasen und Zigarettenrauch. Auch von

endogen produziertem NO ist bekannt, dass es bei chronischen Entzündungen wie Arthritis, Hepatitis, Sepsis, beim hämorrhagischem Schock und einigen Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielt. NO ist also ein Molekül mit vielen bekannten Wirkungen, wobei sicher noch einige interessante Wirkungen auf ihre Entdeckung warten.

1.4.1. Die NO-Biosynthese

Die Familie der sogenannten NO-Synthasen (NOS; Oxidoreduktasen: EC 1.14.13.39) ist für die enzymatische Produktion von NO zuständig. NO wird in stöchiometrischen Mengen durch eine 5-Elektronen-Oxidation unter Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin gebildet (Abbildung 6). An der Reaktion sind außerdem zahlreiche Cofaktoren wie NADPH (Nicotinamidadeninucleotidphosphat), FAD (Flavinadeninucleotid) und FMN (Flavinadeninmononucleotid) sowie BH_4 (Tetrahydrobiopterin), eine Hämgruppe und $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Calcium-Calmodulin) beteiligt. Dabei überträgt NADPH im ersten Teilschritt der Reaktion zwei Elektronen auf L-Arginin und bildet unter Verbrauch eines O_2 das Zwischenprodukt N^G -Hydroxyl-L-Arginin. Im zweiten Teilschritt wird durch NADPH nur noch ein Elektron übertragen und unter Verbrauch eines weiteren O_2 -Moleküls L-Citrullin und NO freigesetzt (Marletta, 1993).

Dieser Mechanismus ähnelt den von P450-Enzymen bekannten Reaktionen. Tatsächlich weisen beide Enzyme eine hohe Homologie im C-terminalen Bereich auf und sind bis jetzt die beiden einzigen Enzyme, welche gleichzeitig eine Bindestelle für FAD und FMN besitzen (Bredt *et al.*, 1991).

Die Familie der NO-Synthasen besteht aus 3 Isoenzymen, die aufgrund ihrer Eigenschaften in 2 Gruppen eingeteilt werden: solche, die konstitutiv exprimiert werden und $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -abhängig arbeiten, oder solche, die Cytokin-induzierbar sind und $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -unabhängig reguliert werden. Zur ersten Gruppe gehören die neuronale NOS (nNOS/NOS I) und die endotheliale NOS (eNOS/NOS III), während die, ursprünglich aus Makrophagen isolierte, induzierbare NOS (iNOS/NOS II) die zweite Gruppe bildet.

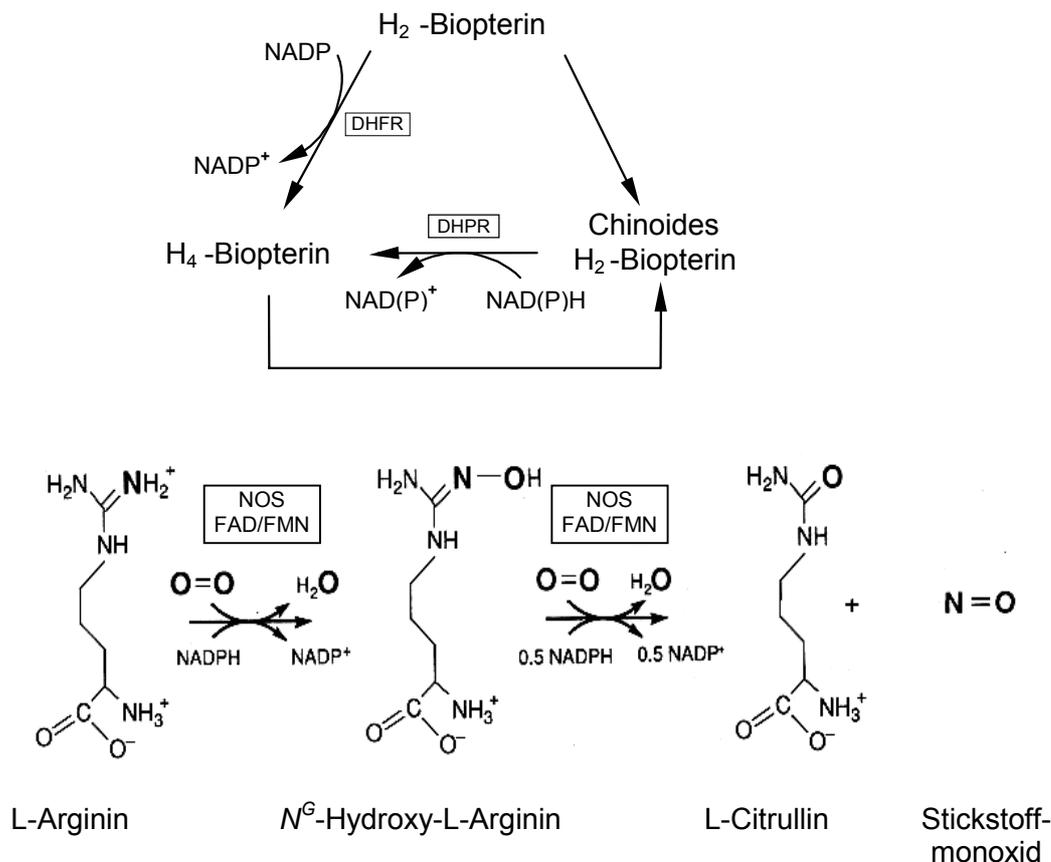


Abbildung 6: NO-Biosynthese. NOS, NO-Synthase; DHFR, Dihydrofolat-Reduktase; DHPR, Dihydropteridin-Reduktase (weitere Erläuterungen siehe Text).

Die **iNOS** (130 kDa) liegt unter nativen Bedingungen cytosolisch in Homodimeren vor und bindet bereits bei sehr niedrigen Ca²⁺-Konzentrationen CaM, weshalb ihre Aktivität nicht von der Ca²⁺-Konzentration abhängt. Eine Aktivitätssteigerung wird bei der iNOS durch transkriptionelle Induktion erreicht (Überblick in MacMicking *et al.*, 1997). Je nach Zelltyp kann die iNOS durch bakterielles LPS (Lipopolysaccharid), Cytokine wie INF- γ , TNF- α , IL-1 β und einige weitere Verbindungen induziert werden. So führt z.B. die Stimulation von murinen Makrophagen mit Lipopolysacchariden und INF- γ zur Induktion der iNOS durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und NF-IL-6 (Lowenstein *et al.*, 1993). Einmal induziert, produziert die iNOS über einen Zeitraum von mehreren Tagen NO in 1000-fach höheren Mengen als ihre konstitutiv exprimierten Isoformen nNOS und eNOS. Die Regulation der Aktivität ist deshalb sehr wichtig und

wird einerseits durch NO selbst gehemmt (negative Rückkopplung) (Griescavage *et al.*, 1993; Assreuy *et al.*, 1993), andererseits führen hohe NO-Konzentrationen sowie einige Cytokine (z.B. IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β) durch Herunterregulierung der iNOS-mRNA zu verminderter iNOS-Expression (Sheffler *et al.*, 1995; Doyle *et al.*, 1994). Immunhistochemische Untersuchungen zeigen, dass die iNOS in verschiedenen Zelltypen wie Makrophagen, Hepatozyten, Kupfferschen Zellen, Endothelzellen, β -Zellen des Pankreas, glatten Muskelzellen, Mesangiumzellen und Astrozyten zu finden ist (Nathan, 1992).

Die **nNOS** wird in neuronalen Zellen des Gehirns und im peripheren Nervensystem (Bredt und Snyder, 1990), sowie in Lungenepithelzellen, Skelettmuskelzellen und der Macula densa der Niere exprimiert. Das 160 kDa große Protein liegt in der nativen Form ebenfalls membranengebunden als Homodimer vor. Die Aktivität wird durch cytosolische Ca^{2+} -Konzentrationen über 100 nM gesteigert und führen zur Bindung von CaM. NO selbst sowie Phosphorylierungen an Serin- und Threoninresten durch Kinasen wie PKA (Brüne und Lapetina, 1991) oder Ca^{2+} /CaM-abhängige Kinase führen zur Hemmung von nNOS (Nakane *et al.*, 1991).

Die **eNOS** kommt nur membrangebunden vor, was wohl der Grund der relativ späten Entdeckung des 135 kDa großen Proteins ist. Aufgrund des Fehlens einer transmembranären Domäne wird angenommen, dass die Membranintegration durch posttranslational angehängtes Myristoyl erfolgt (Busconi und Michel, 1993). Die Membranassoziation so wie die CaM-Bindung sind für die Aktivierung der eNOS notwendig (Sessa *et al.* 1995). Eine Aktivierung der eNOS kann relativ rasch durch verschiedene Aktivatoren, z.B. Calcium-Ionophore, Bradykinin oder Acetylcholin, erfolgen. Es wurde jedoch beobachtet, dass eNOS-mRNA und Proteinlevel nach ‚Shear-Stress‘ oder Hemmung bzw. Herunterregulierung von PKC erhöht sind (Nishida *et al.*, 1992; Ohara *et al.*, 1995).

Zur Hemmung der NOS können auch Arginin-Analoga eingesetzt werden. Die Substitution einer oder beider Aminogruppen in der Guanidinogruppe führt zu einem Substrat, das zwar gebunden werden kann, aber keine Freisetzung von NO ermöglicht (Fukuto und Chaudhuri, 1995; Moncada *et al.*, 1991). Klassische Beispiele von NO-Inhibitoren sind N^{G} -Nitro-L-Arginin (L-NA) und N^{G} -Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME), welche vorwiegend die konstitutiv exprimierten NOS hemmen, sowie N^{G} -Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA), das eine größere Affinität zur iNOS besitzt. Die genannten Inhibitoren binden reversibel an die NOS und können durch Arginin-Überschuss wieder verdrängt werden.

1.4.2. NO-Donoren

Schon mehrere Jahrzehnte vor der Entdeckung der NO-Wirkung wurden NO-Donoren in der Klinik z.B. zur Behandlung von Angina Pectoris, dekompensierter Herzinsuffizienz, pulmonaler Hypertonie, Fibrinolyse und Komplikationen nach Herzkatheterisierung eingesetzt (Abrams, 1987). NO-Donoren sind Verbindungen, die eine natürliche NO-Freisetzung in biologischen Systemen simulieren und dadurch die Untersuchung des NO-Signalwegs ohne Induktion der NOS ermöglichen.

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Struktur (Abbildung 7) lassen sie sich in verschiedene Gruppen einteilen:

1. S-Nitrosothiole: z.B. S-Nitrosoglutathion (GSNO), S-Nitrosocystein
2. Diazeniumdiolate / NONOates: z.B. Spermin-NO (SpNO),
Diethylamin-NO-Komplex (DEA-NO)
3. Sydnonimine: z.B. SIN-1
4. Nitrosoniumsalze: z.B. BF_4NO
5. Metallnitrosyle: z.B. Natriumnitrosylprussiat (SNP)

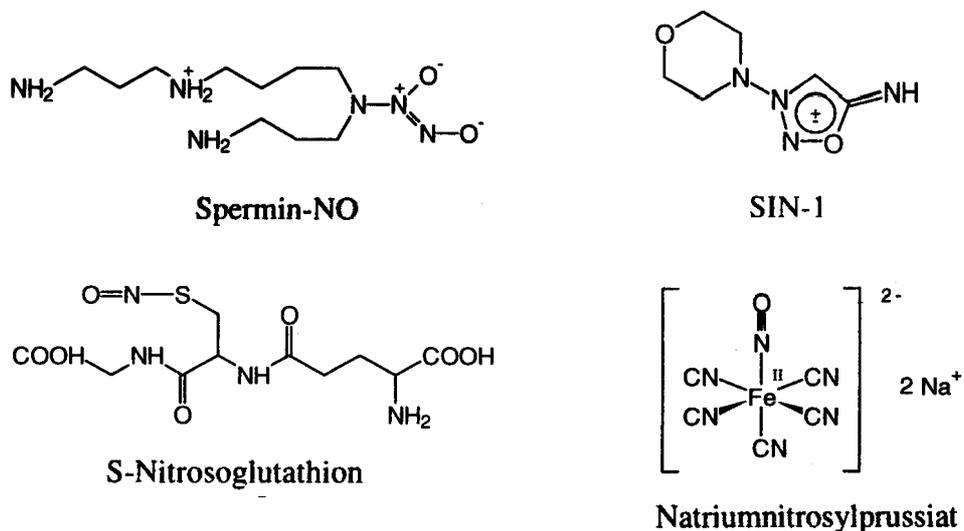


Abbildung 7: Strukturformeln einiger NO-Donoren.

Neben der chemischen Struktur unterscheiden sich die NO-Donoren auch in ihrer Stabilität und ihrer NO-Freisetzungsrates, was ihren Einsatz im Experiment mit beeinflusst. Auch die Entstehung von Nebenprodukten, die je nach NO-Donor unterschiedlich sind, ist ein Kriterium bei der Auswahl der Substanz. So setzt SIN-1 unter Hydrolyse neben NO noch O_2^- frei, wobei die Produkte diffusionskontrolliert zu Peroxynitrit reagieren und damit teilweise andere zelluläre Reaktionen in Gang gesetzt werden als allein durch NO.

1.4.3. NO - Die molekulare Ebene

Die Verbindung eines Stickstoffatoms mit einem Sauerstoffatom ergibt ein Produkt mit einem ungepaarten Elektron, weshalb NO per Definition ein Radikal ist. Seine Halbwertszeit beträgt zwischen 6 und 30 sec. So stellt NO ein Molekül mit additivem sowie reduzierendem und oxidierendem Potential dar, das mit anderen freien Radikalen, Thiolgruppen, Übergangsmetallen und molekularem Sauerstoff (O_2) reagieren kann (zusammengefasst in Butler *et al.*, 1995).

Hierbei zählt die Reaktion mit O_2 vermutlich zu den unwahrscheinlichsten, da zelluläre Bedingungen (niedrige Konzentrationen der Reaktionspartner und wässriges Milieu) die Halbwertszeit auf einige Stunden ansteigen lassen. Das entstehende NO_2 würde dann mit H_2O zu einem Gemisch aus Nitraten (NO_3^-) und Nitriten (NO_2^-) reagieren.

Dagegen stellt die Reaktion von NO mit einem Superoxidanion (O_2^-) die schnellste Reaktion dar. Hierbei entsteht das sehr reaktive Peroxynitrit ($ONOO^-$), welchem kontradiktorische Wirkungen zugeschrieben werden. Einerseits schützt die Reaktion von NO mit O_2^- vor NO- oder O_2 -induzierten Zellschädigungen/Zelltod (Brüne *et al.*, 1997; Troy *et al.*, 1996, Sandau *et al.*, 1997). Andererseits zerfällt Peroxynitrit zu NO_2 und einem Hydroxylradikal (OH^\bullet), welches für seine hohe Reaktivität und biologisch destruktive Wirkung bekannt ist (Beckmann *et al.*, 1990; Moro *et al.*, 1994). So wird Peroxynitrit eine DNA-schädigende Eigenschaft zugeschrieben (Szabo *et al.*, 1996).

Die Reaktion von NO mit prosthetischen Eisen- oder Thiol-Gruppen von Proteinen kann zu deren Aktivierung oder Hemmung führen. Die wohl bekannteste Reaktion ist die Aktivierung der löslichen Guanylat-Zyklase durch Nitrosierung der Häm-Gruppe (Craven und DeRubertis, 1978; Ignarro *et al.*, 1990), welche zur Einteilung von NO-Wirkungen in cGMP-abhängige und -unabhängige Reaktionswege führte. Die Reaktion mit Eisen ist meist reversibel, wohingegen die Reaktion mit Eisen-Schwefel-Clustern, wie sie in

Enzymen des Citratzyklus und der Atmungskette vorkommen, meist irreversibel ist (Butler *et al.*, 1995). Während NO mit Übergangsmetallen direkt reagieren kann, ist für die Reaktion mit Thiol-Gruppen erst eine Ein-Elektronen-Oxidation zu einem Nitrosylkation notwendig. So führt z.B. die Nitrosierung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) zur Hemmung derselben (Dimmler *et al.*, 1992). Jedoch ist die Hemmung der GAPDH in der Glycolyse nicht limitierend. Offensichtlich sind weder eine partielle Hemmung der GAPDH noch eine substantielle Suppression der Aconitase und ähnlicher Fe-S-Cluster für den Zelltod nach NO-Toxifizierung verantwortlich (Meßmer, 1996). NO ist außerdem in der Lage, durch Aufnahme eines Elektrons (Ein-Elektronen-Reduktion) ein Nitroxyl-Anion (NO^-) zu bilden. Nitroxyl-Anionen wie auch Nitrosyl-Kationen können durch Abgabe oder Aufnahme eines Elektrons an einen oder von einem Reaktionspartner ohne direkte Addition an diesen zu seiner Oxidation oder Reduktion führen.

Wie beschrieben, können die Reaktionen von NO sehr vielfältig sein. Durch seinen unpolaren Charakter und seine geringe Größe kann NO die produzierende Zelle leicht verlassen und auch in der Nachbarzelle wirksam sein, wobei die Wirkung wohl regional begrenzt ist. Durch zahlreiche Studien werden immer noch neue Ziele der NO-Wirkung gefunden was zur Klärung der Wirkung beiträgt.

1.4.4. Physiologie und Pathophysiologie von NO

NO reguliert einerseits lebenserhaltende Funktionen, andererseits besitzt es pathophysiologische Eigenschaften im Organismus. Dieser Abschnitt soll einen Einblick in die wichtigsten und am besten untersuchten Funktionen geben.

1.4.4.1. NO und das kardiovaskuläre System

NO ist einer der wichtigsten Blutdruckregulatoren und wird in Endothelzellen, welche die Blutgefäße auskleiden, von der Ca^{2+} /CaM-aktivierbaren eNOS gebildet. Die Ca-Kanäle der Endothelzellen können durch verschiedene Hormone, Bradykinin, Acetylcholin, ADP, ATP oder Histamin geöffnet werden, was zu einem Ca^{2+} -Einstrom führt. In einigen Geweben kann der Ca^{2+} -Influx in Gefäßendothelzellen direkt durch nichtcholinerge/nichtadrenerge Neuronen kontrolliert werden. Gewöhnlich wird der Ca^{2+} -

Influx durch den Blutfluss reguliert, wobei ein erhöhter Druck zu vermehrtem ‚Shear Stress‘ führt und dadurch die Öffnung der Ca^{2+} -Kanäle auslöst. Die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt durch die Aktivierung der eNOS zu vermehrter Bildung von NO, das aus der Zelle in alle Richtungen diffundieren kann. Trifft es auf glatte Gefäßmuskelzellen, so kommt es zur Aktivierung der Guanylat-Zyklase und zum Anstieg von cGMP in den Zellen. Dies führt wiederum zur Aktivierung von cGMP-abhängigen Proteinkinasen, zur Regulation von cGMP-gesteuerten Ionenkanälen oder zur Aktivierung von Phosphodiesterasen, die eine rasche Relaxation der glatten Muskelzellen und damit einen Blutdruckabfall durch Gefäßerweiterung zur Folge haben (Lincoln und Cornwall, 1993; Schmidt und Walter, 1994). Aufgrund der sehr kurzen Halbwertszeit von NO wird ein Blutdruckabfall in anderen Bereichen des Körpers verhindert.

NO diffundiert von seinem Bildungsort auch in das Gefäßlumen und verhindert dort, ebenfalls über einen cGMP-abhängigen Mechanismus, die Aggregation und Adhäsion von Blutplättchen an die Gefäßwand und trägt somit zur Verhinderung von Thrombosen bei (Moncada *et al.*, 1991). Für die Aufrechterhaltung des normalen Blutdrucks scheint eine Gefäßendothelschicht, die konstant NO produziert, notwendig zu sein. Kommt es zu einem Ausfall der NO-Synthese, wie dies z.B. bei Artherosklerose der Fall ist, kann die Gefäßweite und damit der Blutdruck nicht mehr ‚ordnungsgemäß‘ reguliert werden. Die Folge ist Bluthochdruck (Hypertonie). Bei entzündlichen Erkrankungen sowie Sepsis tritt durch die Aktivierung von Makrophagen eine stark erhöhte NO-Produktion auf, was den gegenteiligen Effekt, Hypotonie, zur Folge hat. Verstärkt wird der Effekt durch im Entzündungsprozess gebildete Lipopolysaccharide, die nicht nur in Makrophagen, sondern auch in Gefäßendothelzellen und glatten Muskelzellen die iNOS induzieren können (Schini *et al.*, 1994).

1.4.4.2. NO und das Nervensystem

NO ist wohl der ungewöhnlichste Botenstoff des Nervensystems. Im Gegensatz zu NO sind Neurotransmitter in der Regel stabile Substanzen, die am Nervenende in synaptischen Vesikeln gespeichert werden. Im Nervensystem wird NO vorwiegend durch die nNOS in moderaten Mengen gebildet, wobei keine vesikuläre Lokalisation der nNOS bekannt ist. Die höchste nNOS-Aktivität wurde im Stratum granulosum des Cerebellum und dem Bulbus olfactorius gefunden (Snyder, 1992). Außerdem konnten Berdt *et al.* (1990) zeigen,

dass in bestimmten Neuronen der Retina, des Vorder- und Mittelhirns, sowie im Striatum und im Mittelhirn die nNOS exprimiert wird. Im peripheren Nervensystem wirkt NO in sogenannten nichtadrenergen/nichtcholinergen (NANC) Neuronen als Neurotransmitter und greift somit in die Regulation von Organen ein, die überwiegend glatte Muskelzellen besitzen. NO-produzierende Neuronen des NANC-Typs wurden in verschiedenen peripheren Geweben des kardiovaskulären Systems, des Urogenitaltrakts sowie des Respirations- und Verdauungstrakts gefunden.

Wie im kardiovaskulären System wird im Nervensystem das NO-Signal durch einen cGMP-abhängigen Mechanismus weitergeleitet. Durch Freisetzung von Glutamat an der präsynaptischen Membran werden an der postsynaptischen Membran Ionenkanäle des N-methyl-D-Aspartat (NMDA) Subtyps geöffnet. Dies führt zum Einstrom von Ca^{2+} und somit zur Aktivierung der nNOS durch die Bindung von CaM. Es wird angenommen, dass NO als retrograder Botenstoff agiert, d.h. es diffundiert über den synaptischen Spalt zurück zum präsynaptischen Neuron (i.d.R. Purkinjezellen ohne nNOS) und aktiviert dort die Guanylat-Zyklase (Dawson *et al.*, 1992). Vermehrt gebildetes cGMP führt durch die Aktivierung von Proteinkinasen und die Regulation von Ionenkanälen zur Freisetzung primärer Neurotransmitter und verstärkt oder vermindert damit neuronale Signale. Die retrograde Wirkung von Botenstoffen wird im Zusammenhang mit der ‚long-term potentiation‘ (LTP) und der ‚long-term depression‘ (LTD) diskutiert und könnte somit bei Lernprozessen und der Ausbildung von neuronalen Verbindungen eine Rolle spielen (Schuman und Madison, 1991; Shibuki und Okada, 1991).

NO besitzt neben den regulatorischen Effekten im Nervensystem auch cytotoxische Wirkung, die zur Zerstörung neuronaler Zellen führt. Eine übermäßige NO-Produktion tritt v.a. bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Chorea Huntington oder Morbus Parkinson auf (Nathan, 1992). Nach induzierten Schlaganfällen in Mäusen konnten die Zerstörungen im umliegenden Gewebe durch NOS-Inhibitoren deutlich gesenkt werden (Nowicki *et al.*, 1991).

1.4.4.3. NO und das Immunsystem

NO trägt vorrangig bei der unspezifischen Immunabwehr zur Bekämpfung von Viren, Bakterien, Pilzen, Protozoen, Darmwürmern und Tumorzellen bei (MacMicking *et al.*, 1997; Hibbs *et al.*, 1988). Dabei wird NO hauptsächlich durch die Induktion der iNOS in Makrophagen und neutrophilen Granulozyten produziert. Im Gegensatz zu eNOS und

nNOS werden von der iNOS bis zu 1000-fach höhere Mengen an NO produziert, die letztlich zytotoxisch oder zumindest antiproliferativ auf die pathogenen Keime wirken. Die gleichzeitige Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und NO durch aktivierte Makrophagen und neutrophile Granulozyten führt zur Bildung von Peroxynitrit, welches noch höhere antimikrobielle Eigenschaften besitzt.

Durch die Hemmung der Proliferation und die Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten wirkt NO als Immunregulator (Albina, 1991). NO verhindert nicht nur die Adhäsion von Thrombozyten (siehe 1.4.4.1.), sondern auch von Leukozyten an das Gefäßendothel. Die Folge davon ist eine verminderte Migration der Leukozyten in die extravaskulären Gewebe (Kubes *et al.*, 1991).

Da körpereigene Zellen keinen speziellen Schutz gegen die hohen NO-Konzentrationen besitzen, trägt eine Fehlregulation der iNOS zur Entstehung verschiedener Krankheitsbilder bei. Dabei handelt es sich insbesondere um Autoimmunerkrankungen wie Gelenkrheumatismus, insulinabhängiger Diabetes mellitus Typ I (IDDM) sowie chronische Leber- und Nierenentzündungen (Kolb und Kolb-Bachhofen, 1992; Valduiti, 1995; Corbett und MacDaniel, 1992).

1.4.4.4. NO und Apoptose

Nach Induktion der iNOS oder Stimulation mit NO-Donoren konnten in verschiedenen Zellarten apoptotische Marker nachgewiesen werden (zusammengefasst in Brüne *et al.*, 1998). Unter apoptotischen Markern versteht man morphologische und physiologische Veränderungen der Zelle, wie DNA-Fragmentierung, Chromatinkondensation, Externalisierung von Phosphatidylserin der Zellmembran, Zellschrumpfung, Abschnürung von ‚apoptotic bodies‘, Aktivierung von Caspasen, Akkumulation von p53 und Veränderungen am Mitochondrium, die letztlich zum kontrollierten Zelltod führen (Hale *et al.*, 1996). Ursprünglich wurde die apoptotische Wirkung von NO an peritonealen Makrophagen gezeigt (Albina *et al.*, 1993; Sarih *et al.*, 1993). Die Makrophagenzelllinie RAW 264.7 weist nach Induktion der iNOS oder Stimulation mit NO-Donoren ebenfalls apoptotische Marker auf. Hemmung der iNOS mit NMMA oder Entzug von L-Arginin aus dem Medium verhindern das Auftreten von apoptotischen Markern, was auf einen direkten Zusammenhang der NO-Wirkung mit dem Auftreten von Apoptose hinweist (Meßmer *et al.*, 1995). cGMP-abhängige Mechanismen spielen bei der NO-vermittelten Apoptose eher

eine untergeordnete Rolle. NO führt in RAW-Zellen zum Zellzyklusarrest in G1. Dieser steht im Zusammenhang mit der Expression von p53 und seinem transkriptionellen Zielgen p21 (Meßmer *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2000). Jedoch konnte auch in p53-negativen U937-Makrophagen durch NO Apoptose ausgelöst werden (Brockhaus und Brüne, 1998). Ähnliche Ergebnisse lieferten p53-Antisense-Versuche (Meßmer, 1996). Neben einem p53-abhängigen Signalweg existiert also auch ein p53-unabhängiger Signalweg. Hierbei könnte die Aktivierung von Caspasen und die Induktion des Fas-Systems eine Rolle spielen (Meßmer *et al.*, 1996a; Leist *et al.*, 1997; Stassi *et al.*, 1997). Caspase-Inhibitoren sind in der Lage, die NO-vermittelte Apoptose zu hemmen. Weitere Proteine, die an der NO-induzierten Apoptose beteiligt sind, gehören zur Bcl-2 Familie. So kann die Induktion der Apoptose durch NO mit der Abnahme der Expression des antiapoptotischen Proteins Bax verbunden sein (Händler *et al.*, 1996), während Bcl-2-überexprimierende P815-Tumorzellen oder RAW-Makrophagen gegenüber der NO-vermittelten Apoptose geschützt sind (Meßmer *et al.*, 1996a; Albina *et al.*, 1996). Obwohl Bcl-2 die Aktivierung von Caspasen und die Auslösung der Apoptose in NO-stimulierten Zellen hemmen kann, hat es keinen Einfluss auf die Akkumulation von p53.

Neben seinen proapoptotischen Eigenschaften besitzt NO auch antiapoptotische Qualitäten. Die Vorbehandlung von Zellen mit niedrigen NO-Konzentrationen führt zum Schutz vor sonst toxischen NO-Konzentrationen (Brüne *et al.*, 1996a). Dieser wird vermutlich durch die Cyclooxygenase-2 vermittelt (von Knethen *et al.*, 1997). Zudem konnte gezeigt werden, dass NO zur Induktion des Hitzeschockproteins 70 (HSP70) führt (Kim *et al.*, 1997).

2. Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte der molekulare Mechanismus der NO-vermittelten p53-Akkumulation mit folgenden Schwerpunkten untersucht werden:

- Initial sollte die zeit- und konzentrationsabhängige p53-Akkumulation in NIH3T3-Fibroblasten, RKO- und U2OS-Zellen sowie die Lokalisation von p53 nach NO-Behandlung untersucht werden. Zudem sollte anhand von Luciferasemessungen geklärt werden, ob durch NO-Behandlung akkumuliertes p53 transkriptionell aktiv ist.
- Es sollte durch Northern Blot-Analysen geklärt werden, ob NO einen Einfluss auf die p53-mRNA-Synthese besitzt.
- Nachdem eine Regulation der Stabilität von p53 durch transkriptionelle Mechanismen ausgeschlossen werden konnte, sollte der Abbau von p53 näher untersucht werden. Als Hauptweg des p53-Abbaus gilt das Ubiquitin-Proteasom-System. Im Einzelnen sollte der Einfluss von NO auf die Wechselwirkung von p53 mit der E3-Ligase Mdm2, die Ubiquitinierung sowie die Proteasomaktivität untersucht werden. Hierfür sollte ein Ubiquitinierungsassay etabliert werden.
- Frühere Arbeiten zeigten, dass p53 auch durch eine neutrale Protease, bekannt als Calpain, gespalten werden kann. Die Cysteinprotease stellt ein potentielles Ziel der NO-Wirkung dar. Es sollte *in vitro* untersucht werden, ob NO in der Lage ist, die Spaltung von p53 durch Calpain zu verhindern.
- Posttranslationale Mechanismen spielen in der Regulation von Stabilität, transkriptioneller Aktivität und zellulärer Lokalisation eine bedeutende Rolle. Dabei wird der Phosphorylierung von p53 eine Schlüsselposition zugeschrieben. Es sollte untersucht werden, ob NO zur Phosphorylierung von p53 an Serin 15 führt und der Einfluss der Serin 15-Phosphorylierung auf den nukleären Export von p53 geklärt werden.
- p14^{ARF} beeinflusst die Wechselwirkung von Mdm2 und p53 und ist damit maßgeblich an der Regulation von p53 beteiligt. In einem weiteren Experiment sollte deshalb untersucht werden, ob NO zur Akkumulation von p14^{ARF} führt.

3. Material und Methoden

3.1. Standardpuffer und Lösungen

PBS	140 mM NaCl
	2.7 mM KCl
	8.1 mM Na ₂ HPO ₄
	1.5 mM KH ₂ PO ₄

AM-150-, 300- oder 500-Puffer

20 mM Tris-HCl pH 7.9
5 mM MgCl ₂
0.2 mM EDTA
20% Glycerin
0.5% NP-40
150, 300 oder 500 mM NaCl

TE-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 8.0
	1 mM EDTA

3.2. Stimulanzien

Spermine-NONOate	Calbiochem
MG 132	Sigma
Calpain-Inibitor I	Calbiochem
Calpain-Inibitor II	Calbiochem
Leptomycin B (LMB)	wurde freundlicherweise von Dr. Yoshida Minoru, Tokyo, Japan, zur Verfügung gestellt.

3.2.1. GSNO-Synthese

Zu einer auf 4°C gekühlten Lösung von 0.765 g Glutathion (2.5 mmol) in 0.5 N HCl wurde unter Rühren eine äquimolare Menge Natriumnitrit (0.173 g entspricht 2.5 mmol) gegeben. Die entstandene tief rote Lösung wurde 40 min bei 4°C gerührt. Nach der Zugabe von 10 ml Aceton bildete sich ein rosafarbener Niederschlag, der nach 20 min abgesaugt wurde. Nach mehrmaligem Waschen mit Aceton und Ether wurde der Niederschlag an der Ölpumpe getrocknet.

GSNO kann am besten portioniert bei -20°C gelagert werden.

3.3. Zellkultur eukaryotischer Zelllinien

Zellen wurden kultiviert in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) und 4.5 mg D-Glucose/l, supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum (FCS, hitze-inaktiviert bei 56°C für 30 min, Gibco), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Zum Splitten der Zellen wurde Trypsin-EDTA-Lösung (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.56 mM Na₂HPO₄, 25 mM Tris, 5 mM EDTA, 5 mM Glucose, 0.25% Trypsin) verwendet. RKO- und Sf9-Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgelöst.

Sf9-Zellen wurden in TC-100 Medium (Linaris), supplementiert mit 10% FCS (hitze-inaktiviert bei 56°C für 30 min), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin sowie 5 mM L-Glutamin, gehalten. Die Insektenzellen wurden adhärent bei 27°C kultiviert.

Folgende Zelllinien wurden verwendet:

NIH3T3 – murine Fibroblasten-Zelllinie mit wt p53

U2OS – humane Osteosarkom-Zelllinie mit wt p53

Saos-2 – humane Osteosarkom-Zelllinie defizient in p53

RKO – humane Kolonkarzinom-Zelllinie mit wt p53, Zellen wachsen adhärent, aber werden zum Splitten mit Zellschabern abgelöst

NHF6 – normale humane Fibroblasten, exprimieren „normal reguliertes“ p14^{ARF}

Sf9 – Insektenzelllinie, *Spodoptera frugipeda*, zur Expression von Histidin-markiertem p53

3.4. Kultivieren von Insektenzellen

3.4.1. Virusamplifikation (Baculoviren) und Produktion von rekombinantem His-p53 in Sf9-Zellen

Sf9-Zellen (2×10^7) wurden in eine 15 cm-Schale ausgesät. Am folgenden Tag wurde das Medium entfernt und die Zellen mit ca. 5 ml Baculoviruslösung in TC-100 mit einem MOI (multiplicity of infection) von 0.1 zur Virusamplifikation infiziert. Nach 1-stündiger Inkubation auf einem Plattenschüttler wurde frisches Zellkulturmedium zugegeben und das Medium nach 5 Tagen bei 27°C abgenommen und bei 4°C gelagert. Zur Herstellung von rekombinantem His-p53 wurden die Insektenzellen mit den amplifizierten Baculoviren mit einem MOI zwischen 5 und 10 infiziert und nach 48-stündiger Expression geerntet.

3.4.2. Aufreinigung von His-p53 aus Sf9-Zellen

Rekombinantes humanes Histidin-markiertes wt p53 wurde in baculoviral infizierten Sf9-Zellen exprimiert. Die Insektenzellen wurden nach 48-stündiger Expression geerntet und in 50 mM HEPES [pH 8.0], 130 mM KCl, 1% NP-40 und 1x Proteaseinhibitor-Mix (ohne EDTA, Boehringer) durch Sonifizieren lysiert, das Extrakt zentrifugiert ($100\,000 \times g$, 1 h, 4°C) und der Überstand bei 4°C über Nacht an Ni^{2+} -NTA-Agarose gebunden. Die Beads wurden 3x mit Puffer (50 mM HEPES [pH 8.0], 300 mM KCl, 10% Glycerin) gewaschen. Zur Kontrolle der Expression und Reinigung wurde ein Aliquot der Agarose-Beads in 2x SDS-Gel-Probenpuffer (125 mM Tris-HCl [pH 6.9], 2% SDS, 10% Glycerin, 200 mM DTT, 0.02% Bromphenolblau) gekocht, auf einem 7.5%igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Das gereinigte gebundene His-p53 wurde direkt im ‚Pull-down‘-Assay (siehe 3.8.1.) eingesetzt oder bei 4°C gelagert.

3.5. Bakterien-Zellkultur

E. coli-Zellen wurden nach Standardprotokoll, wie in Sambrook *et al.* (1998) beschrieben, kultiviert. Plasmid-DNA wurde im *E. coli*-Stamm XL-1 Blue amplifiziert.

3.5.1. Transformation und Kultivierung von *E. coli*

Die transformationskompetenten *E. coli* wurden mit 100-500 ng rekombinanter Plasmid-DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 90 sec bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen und danach sofort für 2 min auf Eis abgekühlt. Den Transformationsansätzen wurde 1 ml LB-Medium (Sigma) hinzugefügt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden anschließend auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikazusatz (100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin) ausgestrichen und dann bei 37°C über Nacht inkubiert. 3 ml LB-Medium (mit Antibiotikum) wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und vorkultiviert. Mit 1 ml der Vorkultur wurde am Abend auf 400 ml expandiert und über Nacht bei 37°C, 200 rpm, für die anschließende Plasmidisolierung angezogen.

3.5.2. Plasmidisolierung

Alle verwendeten Plasmide wurden mit Hilfe des Quiagen Maxi Kits (Quiagen) nach vorgegebenem Protokoll isoliert. Die DNA-Konzentration wurde bei OD₂₈₀ fotometrisch bestimmt und in der Regel auf 1 µg/µl eingestellt. Die isolierten Plasmide wurden durch Restriktionsverdau überprüft.

3.6. RNA-Analyse

3.6.1. Präparation von gesamter zellulärer RNA

Für die gesamte RNA-Isolierung wurde mit ‚RNase-freien‘ Plastikmaterialien und DEPC-behandeltem Wasser gearbeitet.

Nach der Stimulation wurde das Medium so gut wie möglich aus der Gewebekulturschale entfernt. Die Monolayer-Zellen wurden direkt in der Gewebekulturschale mit 1 ml peqGold RNAPure™ (peQLab) pro 10 cm-Schale lysiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden 0.2 ml Chloroform zugegeben und die Proben 15 sec kräftig geschüttelt, dann 10 min bei RT stehen gelassen. Eine anschließende Zentrifugation für 5 min bei 12 000 x g führte zur Trennung der Probe in 3 Phasen, wobei sich die RNA in der oberen, farblosen wässrigen Phase anreicherte. Diese Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Präzipitation der RNA durch Zugabe von 0.5 ml Isopropanol erreicht (15 min, RT). Die präzipitierte RNA wurde

abzentrifugiert (12 000 x g, 10 min, 4°C), der Isopropanolüberstand vorsichtig entfernt und das Pellet 2x mit 1 ml 75%igem Ethanol durch Vortexen und anschließende Zentrifugation (12 000 x g, 10 min, 4°C) gewaschen. Das RNA-Pellet wurde kurz an der Luft getrocknet und in H₂O gelöst. Das Erhitzen der RNA-Lösung auf 55°C verbesserte die Lösbarkeit. Abschließend erfolgte eine fotometrische Konzentrationsbestimmung bei OD_{260 nm}. Der Quotient aus OD_{260 nm}/OD_{280 nm} wurde zur Bestimmung der Reinheit herangezogen. Er sollte größer als 1.8 sein. Die RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

3.6.2. Northern Blot-Analyse und Präparation einer Sonde

Für Northern Blot-Analysen wurden 20 µg der gesamten RNA mit 0.1 Volumen denaturierendem Puffer (100 µl Formamid, 40 µl Formaldehyd, 20 µl 10x MOPS, 10 µl Ethidiumbromid [1 mg/ml]) gemischt, für 15 min auf 65°C erhitzt und danach auf Eis abgekühlt. Die RNA wurde durch Elektrophorese in einem 1.3%igen Agarose-MOPS (1x)-Gel (10x MOPS: 200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA) aufgetrennt und mit 20x SSC (3 M NaCl, 0.3 M Natriumcitrat [pH 7.0]) im Kapillarblottverfahren auf eine Nylonmembran (Amersham, Hybond N) über Nacht geblottet. Die Membran wurde gewaschen, getrocknet und das ‚cross-linking‘ durch 30-minütige UV-Bestrahlung unter der Sterilbank durchgeführt. Mit Rapid-Hyb Buffer (Amersham) wurde die Membran 15 min bei 65°C prä-hybridisiert, der Hybridisierungspuffer verworfen und 15 ml frischer Hybridisierungspuffer mit spezifischer ³²P-dCTP markierter DNA-Sonde (ca. 3 x 10⁸ cpm) zugegeben. Hybridisiert wurde bei 65°C für 135 min. Anschließend wurde die Membran 1x mit 2x SSC/0.1% SDS (15 min) und 1x mit 0.2x SSC/0.1% SDS (10 min) jeweils bei 65°C gewaschen und über Autoradiografie analysiert.

3.6.3. Herstellung einer ³²P-dCTP markierten DNA-Sonde

Zur Herstellung der p53-DNA-Sonde wurde das Plasmid pSG5-p53 (murine cDNA) mit BamHI verdaut, die Restriktionsfragmente über ein 0.8%iges Agarosegel aufgetrennt und das p53-cDNA-Stück mit Hilfe des QIAEX II Agarosegel Extraktionskits (Quiagen) nach Anleitung isoliert. 1.5 µl des Isolationsproduktes wurden in 45 µl sterilem TE-Puffer verdünnt und zur Denaturierung der DNA für 5 min auf 95°C erhitzt. Die denaturierte DNA wurde anschließend zu einem Ansatz ‚labelling mix‘ (Amersham, Rediprime DNA labelling system) pipettiert und durch Anschnippen gut gemischt. Durch Zugabe von 5 µl

^{32}P -dCTP und Mischen wurde die Reaktion gestartet und nach 10 min bei 37°C durch Zugabe von $5\ \mu\text{l}$ $0.2\ \text{M}$ EDTA wieder gestoppt. Um die freie Radioaktivität, d.h. ungebundenes ^{32}P -dCTP aus dem Reaktionsansatz zu entfernen, wurde die Probe über eine Chroma Spin-Column (Clontech) aufgereinigt. $1\ \mu\text{l}$ des gereinigten Reaktionsansatzes wurde im Szintillationszähler vermessen und etwa 2×10^7 cpm/ml zur Hybridisierung nach dem Denaturieren (95°C , 5 min) eingesetzt.

3.7. Proteinanalyse

3.7.1. Herstellung von Zelllysaten zur Proteinanalyse

Die gewünschten Zellen wurden in 10 cm-Schalen ausgesät, bei einer Konfluenz von ca. 80% stimuliert und anschließend in PBS abgeschabt und abzentrifugiert (1 000 rpm, 5 min, RT). Das Zellpellet wurde in $200\ \mu\text{l}$ Lysepuffer ($50\ \text{mM}$ Tris-HCl [pH 8.0], $5\ \text{mM}$ EDTA, $150\ \text{mM}$ NaCl, 0.5% NP-40, $1\ \text{mM}$ PMSF) resuspendiert und 30 min auf Eis lysiert. Nach einer Ultraschallbehandlung (Bandelin Sonifier, 10 sec, 80% output) wurden anschließend die verbliebenen Zelltrümmer abzentrifugiert ($18\ 000 \times g$, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Lagerung wurden die Lysate in flüssigem Stickstoff schnell eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.7.2. Bestimmung der Proteinkonzentration und SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinkonzentrationen der zu untersuchenden Zelllysate wurden mittels Bradford Assay (Biorad) bestimmt. Gleiche Proteinmengen wurden mit $2\times$ SDS-Gel-Probenpuffer ($125\ \text{mM}$ Tris-HCl [pH 6.9], 2% SDS, 10% Glycerin, $200\ \text{mM}$ DTT, 0.02% Bromphenolblau) gemischt und 10 min bei 95°C gekocht. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im SDS-Polyacrylamidgel nach Laemmli (Laemmli, 1970) bei $70\ \text{V}$, wobei sich der Polyacrylamidanteil des Gels nach dem Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins richtete. Zur Referenz wurden vorgefärbte Proteinmarker (RPN 800 oder 765, Amersham) mit aufgetrennt. Der Elektrophorese-Puffer war wie folgt zusammengesetzt: $25\ \text{mM}$ Tris, $192\ \text{mM}$ Glycin, 0.1% SDS. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine mit Coomassie Brilliant Blue G250 gefärbt oder auf Nitrozellulose geblottet. Zur Coomassiefärbung wurde das Gel für 30 min mit Färbelösung (50% Methanol, 10%

Essigsäure, 2% w/v Coomassie Brilliant Blue G250) langsam geschüttelt. Anschließend wurde das Gel mit Entfärberlösung (5% Methanol, 3% Essigsäure, 92% H₂O) so lange entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Vor dem Trocknen (Geltrockner, 2 h, 65°C) wurde das Gel in ddH₂O mit 20% Glycerin inkubiert.

3.7.3. Western Blot-Analyse

Durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden im Semi-Dry-Blotverfahren (Trans-Blot SD von Biorad) auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham, Hybond C extra) geblottet (1.3 mA/cm², 90 min). Die Blotapparatur wurde für den Proteintransfer wie folgt zusammengebaut:

- 3 Blatt Whatmann-Papier
- Nitrozellulosemembran
- SDS-Polyacrylamidgel
- 2 Blatt Whatmann-Papier

Whatmann-Papier und Nitrozellulosemembran wurden zuvor mit Blotpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol) getränkt. Die gleichmäßige Beladung und das Blotten des Gels wurde durch Ponceau S-Färbung überprüft (0.1% Ponceau S in 5% Essigsäure). Die Ponceau-Färbung wurde mit TTBS (140 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 7.2], 0.1% Tween-20) entfernt und der Blot mit 5% Milchpulver in TTBS bei RT mindestens 40 min blockiert. Der Blot wurde über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (entsprechend verdünnt in 0.5% Milchpulver in TTBS) inkubiert. Die Membran wurde am nächsten Tag 3x 15 min mit TTBS gewaschen, bevor die Inkubation mit dem entsprechenden HRP(horseradish peroxidase)-gekoppelten Sekundärantikörper (verdünnt in 0.5% Milchpulver in TTBS) für 1 h bei RT vorgenommen wurde. Der Blot wurde weitere 5x für 10 min mit TTBS gewaschen, bevor durch ‚Enhanced Chemi-Luminescence‘ (ECL, Amersham) das gesuchte Protein detektiert wurde.

Folgende Antikörper wurden benutzt:

Primäre Antikörper:

Verdünnung:

anti-p53 Maus monoklonale Antikörper:	
PAb 122 (Epitop: Aminosäuren 369-379; Hybridoma-Überstand, Protein A gereinigt; die Hybridoma-Zelllinie wurde von Prof. Stahl, Homburg/Saar, zur Verfügung gestellt)	1 : 800
PAb 1801 (Epitop: Aminosäuren 46-55, Oncogene)	1 : 1 000
PAb DO-1 (Epitop: Aminosäuren 21-25, Oncogene)	1 : 1 000
anti-phospho-p53 (Serin 15, New England Biolabs)	1 : 1 500
anti-Mdm2 (SMP14; Santa Cruz)	1 : 1 000
anti-humanes CRM1 (wurde von Prof. Grosveld zur Verfügung gestellt)	1 : 300
anti-HA (HA.11, BAbCO)	1 : 1 500
anti-Ubiquitin (Dako)	1 : 2 000
anti-DNA-Topoisomerase IIα, β (StressGene)	1 : 1 500
anti-β-Tubulin (Boehringer, Mannheim)	1 : 1 500
anti-GAPDH (eigene Herstellung, Prof. Brüne)	1 : 800

Sekundäre Antikörper:

Verdünnung:

anti-Kaninchen IgG , HRP-konjugiert (Promega)	1 : 10 000
anti-Maus IgG , HRP-konjugiert (Promega)	1 : 10 000
anti-Maus IgG , HRP-konjugiert (Amersham)	1 : 3 000
anti-Maus IgG2b , human adsorbiert, HRP-konjugiert (Southern Biotechnology)	1 : 4 000

3.7.4. ‚Stripping‘ von Western Blots

Sollen verschiedene Proteine auf einer Nitrozellulosemembran untersucht werden, kann der Blot bei ausreichendem Größenunterschied der Proteine zerteilt oder Antikörper, welche aus unterschiedlichen Spezies gewonnen wurden, verwendet werden. Ist der Größenunterschied zu gering oder sind keine entsprechenden Antikörper verfügbar, so ist es möglich, nach der ersten Färbung die Antikörper von der Membran mittels pH-Verschiebung herunterzuwaschen. Dazu lässt man den Blot mit ‚Stripping Buffer‘ (0.2 M

Glycin, 0.5 M NaCl, mit Essigsäure auf pH 2.8 eingestellt) schütteln (ca. 2 min bei RT) und titriert dann mit 5 N NaOH bis zu einem pH von etwa 8. Man lässt die Membran noch weitere

2-3 min schütteln, bevor sie mit TTBS gewaschen wird. Jetzt kann eine neue Detektion mit einem anderen Antikörper vorgenommen werden. Es ist ratsam, den Blot zuerst mit dem weniger sensitiven Antikörper zu entwickeln. Voraussetzung ist außerdem, dass die Membran nach der ersten Entwicklung feucht gehalten wird.

3.8. Techniken zum Studium von Protein-Protein-Wechselwirkung

3.8.1. ‚Pull-down‘-Assay

Fünf 15 cm-Schalen (je 1.5×10^6 Zellen) NIH3T3-Fibroblasten wurden mit je 10 μg Mdm2-Plasmid (pCHDM1A) transfiziert (Transfektion siehe unter 3.9.), die Zellen nach 24-stündiger Expression in AM-300/1x Protease-Inhibitor-Mix (Roche) 30 min auf Eis lysiert und Zelltrümmer abzentrifugiert ($100\,000 \times g$, 45 min, 4°C). Nach Bedarf wurde das Zelllysate mit GSNO für 30 min bei 37°C vorbehandelt und anschließend mit immobilisiertem His-p53 (an 15 μl der Ni-NTA-Agarose, hergestellt wie unter 3.4.2. beschrieben) gemischt und 1 h bei RT zur Ausbildung der Wechselwirkung auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurden die Agarose-Beads abzentrifugiert ($100 \times g$), der Überstand verworfen und die Beads jeweils 1x mit AM-300 (10 min, RT) und AM-500 (10 min, RT) gewaschen. Die Beads wurden in 2x SDS-Gel-Probenpuffer 10 min gekocht und durch eine 7.5%ige SDS-PAGE getrennt. Nach dem Blotten wurde Mdm2 (SMP14) detektiert.

3.8.2. Co-Immunopräzipitation von p53 oder/und CRM1 mit immobilisiertem anti-Mdm2-Antikörper

2×10^6 NIH3T3-Zellen wurden in 15 cm-Schalen ausgesät, am folgenden Tag mit 8.5 μg pCHDM1A-Plasmid (Mdm2), transfiziert (siehe 3.9.) und nach weiteren 20-24 h Inkubation stimuliert. Die Zellen wurden in PBS abgeschabt, abzentrifugiert (1 000 rpm, 5 min, RT) und in AM-150-Puffer/1 mM PMSF/1 mM NaF/1 mM ortho-Vanadat/1x Protease-Inhibitor-Mix (Roche) lysiert. Nach 30-45 min auf Eis wurden die Proben bei

100 000 xg, 4°C, für 45 min zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt.

Am Vorabend der Immunopräzipitation (IP) wurden pro IP-Probe 2.5 µg Mdm2-Antikörper (SMP14) an 20 µl (,settled volume‘) Protein G-Plus Agarose (Oncogene) bei 4°C gebunden. Die Beads wurden exzessiv mit AM-150-Puffer gewaschen und gleichmäßig in 1.5 ml-Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel verteilt. 1.8 mg Protein/Probe wurden in die IP eingesetzt und über Nacht bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Nach dem Binden wurden die Beads abzentrifugiert (100 xg, 1 min, 4°C), der Überstand verworfen und die Protein G-Beads 3x mit 500 µl AM-150-Puffer/1 mM PMSF/1 mM NaF/1 mM ortho-Vanadat/1x Protease-Inhibitoren gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Puffer möglichst vollständig entfernt und die Beads nach Zugabe von 50 µl 2x SDS-Gel-Probenpuffer 10 min bei 95°C gekocht. Die Beads wurden abzentrifugiert, der Überstand mittels 7.5%iger SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Der Western Blot wurde bei etwa 60 kDa auseinander geschnitten, das obere Teil mit anti-Mdm2 Antikörper (SMP14) und das untere Stück mit anti-p53 Antikörper (PAb 122) inkubiert. Als Sekundäntikörper wurde für den p53-Blot ein HRP-konjugierter anti-Maus IgG2b Antikörper, 1 : 4000 verdünnt, eingesetzt. Zur Input-Kontrolle wurden Western Blots gegen p53 (PAb 122) und Mdm2 (SMP14) direkt aus dem Zellysate hergestellt.

Um p53 und CRM1 mit endogenem Mdm2 zu präzipitieren, wurden RKO-Zellen stimuliert und ansonsten wie bei den NIH3T3-Fibroblasten verfahren. Um copräzipitiertes CRM1 (Größe ca. 110 kDa) zu untersuchen, wurde der Western Blot mit den IP-Proben erst mit Maus anti-Mdm2 Antikörper (SMP14) entwickelt, danach mit TTBS gewaschen, erneut mit 5% Milchpulver in TTBS blockiert und mit Kaninchen anti-hCRM1 Antikörper entwickelt.

3.9. Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

Für den Luciferase-Assay, den Ubiquitinierungsassay und die Co-Immunopräzipitation mussten NIH3T3-Fibroblasten transient transfiziert werden. Dies wurde mit Hilfe von Superfect (Quiagen) durchgeführt. NIH3T3-Zellen ließen sich in den Passagen 16-42 gut transfizieren, wenn man ein Verhältnis von Plasmid-DNA zu Superfect von 1 µg : 8 µl einsetzte. 20-24 h nach der Transfektion erfolgte die Stimulation und Weiterverarbeitung der Zellen wie in den entsprechenden Abschnitten beschrieben.

3.10. Luciferase-Assay

2×10^5 NIH3T3-Zellen wurden am Vortag der Transfektion in 6 cm-Schalen ausgesät. Die Zellen wurden mit 0.3 μg p53-induzierbaren Luciferase-Reporter-Konstrukten PG13-Luc (enthält 13 wt p53-Bindestellen, die ‚upstream‘ eines Polyoma-Virus-early-Promotors liegen, welchem das Luciferasegen nachgeschaltet ist) oder MG15-Luc (enthält 15 mutierte Bindestellen und dient als Negativkontrolle) unter Zuhilfenahme von Superfect transient transfiziert. Die Plasmide wurden freundlicherweise von Prof. B. Vogelstein zur Verfügung gestellt. Die 8-stündige Stimulation der Zellen erfolgte 20-25 h nach der Transfektion. Anschließend wurden die Zellen in PBS abgeschabt, abzentrifugiert und ein weiteres Mal mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Die Zelllyse erfolgte 10 min auf Eis mit 450 μl 1x Lysepuffer für Luciferase-Assay (Promega). Das Lysat wurde 2 min bei 4°C mit 18 000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. 5 μl des Überstandes wurden mit 100 μl Luciferase-Substrat (Promega) vermischt und sofort für 20 sec im Luminometer vermessen.

3.11. Heterokaryon-Assay

Diese Versuche wurden im Labor von Dr. Yanping Zhang (M.D. Anderson, Houston, TX) nach einem modifizierten Protokoll von Roth *et al.*, 1998, durchgeführt. Die benutzten Adenoviren wurden dort zur Verfügung gestellt.

3.11.1. Virale Infektion von eukaryotischen Zellen

Es wurden Adenoviren zur Expression von wt p53, humanem ARF (p14) und E2F1 in adhären Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden am Vortag der Infektion ausgesät. Zur Infektion wurde das Medium abgenommen und durch 2 ml frisches DMEM/ 0.2% FCS/ Penicillin (100 U/ml)/ Streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ersetzt. Aus der Virusstocklösung wurde eine Vorverdünnung in FCS-reduziertem Medium hergestellt und zu den Zellen gegeben. Um eine gute, gleichmäßige Infektion zu gewährleisten, wurde die Schale alle 15 min geschwenkt. Nach 2-stündiger Inkubation wurde die Infektionslösung abgesaugt, die Zellen 1x mit PBS und 2x mit voll supplementiertem DMEM gewaschen und mit frischem, vollständig supplementiertem DMEM zur Proteinexpression 16-20 h inkubiert. Sollten die

infizierten Zellen später für Heterokaryon-Analysen verwendet werden, wurden sie nach etwa 1 h abtrypsiniert, mit den zu verschmelzenden Zellen gemischt und in 6-Well-Platten ausgesät.

3.11.2. Verschmelzen der Zellen und Immunfluoreszenzfärbung

Die Heterokaryon-Analysen wurden in 6-Well-Platten durchgeführt. Um eine gute Verschmelzung der Zellen, d.h. Heterokaryen zu erzielen, ist es wichtig, dass die Zellen am Tag des Versuchs nahezu konfluent sind. Um eine Protein-Neusynthese zu verhindern, wurde nach der gewünschten Stimulation das Medium abgesaugt und durch Cycloheximid-haltiges Medium ersetzt. Nach 20 min wurden die Zellen 1x mit 37°C warmem PBS gewaschen und anschließend mit PBS/50% (w/v) Polyethylenglycol (PEG) 8000 überschichtet und 3 min bei 37°C inkubiert. Dabei soll die 6-Well-Platte gut geschwenkt werden, um sicherzustellen, dass alle Zellen bedeckt sind und außerdem die Verschmelzung der Zellmembranen wesentlich verbessert wird. Danach wurde die PEG-Lösung bestmöglich entfernt und die Zellen je 2x mit PBS und voll supplementiertem DMEM gewaschen. Die verschmolzenen Zellen wurden für weitere 50-60 min mit Cycloheximid-haltigem, voll supplementiertem DMEM inkubiert, um das ‚Protein-Shuttling‘ zu ermöglichen. Danach wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen, mit 3% Paraformaldehyd in PBS für 10 min bei RT fixiert und anschließend mit 0.2% Triton X-100 in PBS für 5 min bei 4°C permeabilisiert. Unspezifische Bindungen wurden mit 0.5% BSA in PBS geblockt (30 min bei RT). Für die Blockierung und die weiteren Färbeschritte wurde die 6-Well-Platte auf einen Kippschüttler gestellt. Die primären Antikörper wurden in 400 µl 0.5% BSA in PBS pro Well wie folgt verdünnt und für mindestens 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert:

anti-p53 (FL-393, Santa Cruz)	0.1 µg/Well
anti-Phospho-p53 (serine 15, New England Biolabs)	0.15 µl/Well
anti-p14ARF (Klon 14P02, Neomarkers)	0.4 µg/Well

Überschüssiger Primärantikörper wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen anschließend mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern inkubiert. Diese

wurden ebenfalls in 400 μ l PBS/0.5% BSA pro Well verdünnt und für 1 h bei RT und lichtgeschützt inkubiert:

Affe anti-Kaninchen IgG, FITC-konjugiert	8 μ l/Well
Affe anti-Ziege IgG, Rhodamine Red TM -X-konjugiert	8 μ l/Well
Affe anti-Maus IgG, AMCA-konjugiert	8 μ l/Well

(Alle fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper wurden von Jackson Research bezogen.)

Überschüssiger Sekundärantikörper wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt und die Zellen mit Mounting solution (DAKO) und einem Deckgläschen eingedeckt. Die digitalen Aufnahmen wurden an einem Invert-Fluoreszenzmikroskop der Firma Olympus gemacht.

3.12. Immunfluoreszenzfärbung

Die Zellen wurden auf beschichteten Objektträgern mit Aussparungen ausgesät und stimuliert. Vor dem Fixieren wurden die Objektträger vorsichtig mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte durch 10-minütige Inkubation mit 3% Paraformaldehyd in PBS auf Eis. Überschüssiges Paraformaldehyd wurde mit PBS abgewaschen und die Zellen in 0.2% Triton X-100 in PBS auf Eis für 10 min permeabilisiert. Vor dem Blockieren mit FCS (20 min, RT) wurde das Triton X-100 durch sorgfältiges Waschen mit PBS (3x 10 min bei RT) entfernt. Der 1. Antikörper (PAb 122) wurde in PBS/0.5% BSA 1:20 verdünnt und die Zellen damit über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Überschüssiger 1. Antikörper wurde durch exzessives Waschen mit PBS bei RT entfernt und danach der 2. Antikörper (Rabbit anti-Maus IgM, CyTM3-konjugiert / Jackson Immuno Research; Verdünnung 1:600) für 2 h bei 37°C inkubiert. Durch 3x Waschen mit PBS wurde überschüssiger 2. Antikörper entfernt und anschließend die DNA mit 4', 6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, 1 μ g/ml in PBS) gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden mit Mowiol (Calbiochem-Novabiochem) eingedeckt und mit einem Fluoreszenzmikroskop (Leica) digitale Aufnahmen erzeugt.

3.13. Darstellung von ubiquitiniertem p53

3.13.1. Ubiquitinierung von transient exprimiertem HA-p53

denaturierender Lyse-Puffer:

6 M Guanidinium-HCl
0.1 M Natrium-Phosphat-Puffer [pH 8.0]
10 mM Imidazol

Protein-Puffer:

50 mM Natrium-Phosphat-Puffer [pH 8.0]
100 mM NaCl
10 mM Imidazol
20% Glycerin
0,2% NP-40

Waschpuffer:

- A: 6 M Guanidinium-HCl
0.1 M Natrium-Phosphat-Puffer [pH 5.8]
B: denaturierender Lysepuffer : Protein-Puffer / 1 : 1
C: denaturierender Lysepuffer : Protein-Puffer / 1 : 3

NIH3T3-Zellen wurden, wie unter 3.9. beschrieben, mit Superfect transfiziert. Pro Probe wurde eine 15 cm-Schale mit 0.6 µg HA-p53-Plasmid, 4.5 µg His-Ubiquitin-Plasmid und, je nach Versuchsansatz, unterschiedliche Mengen pCHDM1A-Plasmid (Mdm2) transfiziert.

20-24 h nach der Transfektion wurden die Zellen stimuliert und anschließend in PBS abgeschabt. Für die Analyse der Protein-Level (Input) von endogenem p53, exogenem HA-p53 und Mdm2 wurde 1/8 der Zellen mit Lysepuffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 1 mM PMSF) für 30 min auf Eis inkubiert und 10 sec sonifiziert. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (18 000 x g, 10 min, 4°C) und das Extrakt einer Western Blot-Analyse, wie unter 3.7.3. beschrieben, unterzogen.

7/8 der Zellen wurden in 2 ml denaturierendem Lysepuffer lysiert und für 20 sec einer Ultraschallbehandlung (Bandelin Sonifier, 80% output) unterzogen. 30 µl/Probe („settled volume“) Ni²⁺-NTA-Agarose-Beads wurden mit denaturierendem Lysepuffer äquilibriert und zu den Proben pipettiert. Die Bindung von His-Ubiquitin erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Überkopfschüttler.

Am nächsten Morgen wurden die Agarose-Beads abzentrifugiert und mit je 0.7 ml wie folgt gewaschen:

- denaturierender Lysepuffer [pH 8.0]
- Puffer A
- denaturierender Lysepuffer [pH 8.0]
- Puffer B
- Puffer C
- Protein-Puffer

Zwischen den einzelnen Waschsritten wurden die Beads mit 100 x g (1 min) abzentrifugiert und der Waschpuffer verworfen.

Nach dem letzten Waschsritt wurde der Puffer möglichst vollständig entfernt und die Ni²⁺-NTA-Agarose mit 50 µl 2x SDS-Gel-Probenpuffer/20 % β-Mercaptoethanol (an stelle von DTT) für 10 min bei 95°C gekocht. Die Proben wurden durch eine 7.5%ige SDS-PAGE aufgetrennt und der Western Blot mit anti-HA Antikörper entwickelt.

Die Plasmide wurden freundlicherweise von Christine Jost (HA-p53), Dirk Bohmann (His-Ubiquitin) und Arnie Levine (pCHDM1A) zur Verfügung gestellt.

HA-p53	Marin <i>et al.</i> , 1998	HA-markiertes p53 (Ratten cDNA)
His-Ubiquitin	Treier <i>et al.</i> , 1994	His ₆ -markiertes Ubiquitin (human)
pCHDM1A	Chen <i>et al.</i> , 1995	Mdm2 (humane cDNA)

3.13.2. Ubiquitinierung von endogenem p53

RKO-Zellen wurden stimuliert, in PBS abgeschabt, abzentrifugiert (1 000 rpm, 5 min, RT) und die Zellen in AM-150-Puffer/1 mM PMSF/1 mM NaF/1 mM ortho-Vanadat/1x Protease-Inhibitoren lysiert. Nach 30-45 min auf Eis wurden die Proben bei 100 000 x g (4°C) für 45 min zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration nach Bradford (Biorad) bestimmt. 80 µg Protein wurden mit 2x SDS-Gel-Probenpuffer gemischt und 10 min gekocht. Die Proben wurden durch eine 7.5%ige SDS-PAGE aufgetrennt und der Western Blot mit DO-1 Antikörper entwickelt. Um die Ubiquitinierung detektieren zu können, musste der Film meist länger als 5 min aufgelegt werden. Durch extrem kurze Expositionen konnten die p53-Level der unterschiedlichen Proben gezeigt werden.

3.14. Zellfraktionierung

Hypotonischer Puffer:

10 mM Hepes [pH 7.9]
10 mM KCl
0.1 mM EDTA
1.5 mM MgCl₂
0.5 mM PMSF
1 mM NaF
1 mM ortho-Vanadat
1x Protease-Inhibitor-Mix (Roche)

Kernlysepuffer:

10 mM Hepes [pH 7.9]
350 mM KCl
0.1 mM EDTA
1.5 mM MgCl₂
0.5 mM PMSF
1 mM NaF
1 mM ortho-Vanadat
1x Protease-Inhibitor-Mix (Roche)

Glycerol Storage Buffer:

50 mM Tris-HCl [pH 8.3]
5 mM MgCl₂
0.1 mM EDTA
40% Glycerin

Pro Probe wurden etwa 1.5 bis 2×10^7 RKO-Zellen eingesetzt. Nach der Stimulation wurden die Zellen in PBS abgeschabt, gezählt und abzentrifugiert. $\frac{7}{8}$ der Zellen wurden in hypotonischem Puffer resuspendiert ($100 \mu\text{l}$ pro 1×10^6 Zellen) und zum Anschwellen für 3 min auf Eis inkubiert. Zur Lyse wurde unter Vortexen NP-40 bis zu einer Endkonzentration von 0.05% zugegeben (Stock-Lösung: 10% NP-40) und die Zelllyse mikroskopisch mit Trypanblau kontrolliert. Es ist eine 100%ige Zelllyse erforderlich, da das Kernlysat ansonsten mit cytoplasmatischen Proteinen verunreinigt ist, was zur Verfälschung der Ergebnisse führt. Nach abgeschlossener Zelllyse mussten die noch intakten Kerne sofort bei $400 \times g$ (4 min, 4°C) abzentrifugiert und der Überstand, der die cytosolische Fraktion darstellt, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt werden. Die cytosolische Fraktion wurde sofort einer weiteren Zentrifugation (10 min, $18\,000 \times g$, 4°C) unterzogen und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. In der Zwischenzeit wurden die Kerne in $350 \mu\text{l}$ Glycerol Storage Buffer resuspendiert und wieder abzentrifugiert ($400 \times g$, 4 min, 4°C). Dieser Schritt wurde noch 2x wiederholt, um die cytoplasmatische Matrix möglichst gut zu entfernen. Zur Kernlyse wurde das Kernpellet in Kernlysepuffer aufgenommen und 30 min auf Eis, unter gelegentlichem Vortexen,

inkubiert. Anschließend wurde die Kernsuspension für 15 sec einer Ultraschallbehandlung (Bandelin Sonifier, 80% output) unterzogen und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Das Kernlysate wurde durch Zentrifugation bei 18 000 x g (10 min bei 4°C) von unlysierten Kernen und Membrantrümmern befreit. Der Überstand stellt die nukleäre Fraktion dar.

Als Referenz (komplettes Zelllysate) wurde immer $\frac{1}{8}$ der stimulierten Zellen nach dem Abschaben gesondert in Kernlysepuffer lysiert, 30 min auf Eis inkubiert, 15 sec einer Ultraschallbehandlung (Bandelin Sonifier, 80% output) unterzogen und weitere 15 min auf Eis inkubiert. Um unlösliche Zelltrümmer zu entfernen, wurde zentrifugiert (18 000 x g, 10 min, 4°C) und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Es erfolgte eine Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Biorad) und gleiche Proteinmengen wurden mit 2x SDS-Gel-Probenpuffer gemischt, gekocht und einer Western Blot-Analyse unterzogen.

3.15. Proteasomaktivitätsmessung

Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-Aminomethylcumarin (s-LLVY-AMC) ist ein vom Proteasom als Substrat bevorzugtes Fluoropeptid (Grune et al., 1996). Durch die proteolytische Aktivität des Proteasoms wird aus dem Fluoropeptid AMC freigesetzt, welches fluorimetrisch bei 365 nm Excission und 460 nm Emission gemessen werden kann.

Die Zellen wurden nach der Stimulation in PBS abgeschabt, abzentrifugiert und 1x mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 200 µl HEPES-Puffer (100 mM HEPES [pH 7.9], 10% Succrose, 0.1% Chaps) pro 10 cm Schale aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Lyseansatz für 10 sec einer Ultraschallbehandlung (Bandelin Sonifier, 60% output) unterzogen und weitere 10 min auf Eis lysiert. Um Membrantrümmer und andere Zellreste zu entfernen, wurde für 15 min (5 000 x g bei 4°C) zentrifugiert, der erhaltene Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration nach Bradford (Biorad) bestimmt.

100 µg des so gewonnenen Zellextrakts wurden in einem Gesamtvolumen von 200 µl mit 50 µM s-LLVY-AMC, 5 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 50 mM Tris-HCl [pH 7.8], 20 mM KCl und 5 mM Magnesiumacetat gemischt und 1 h bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl 0.1 M Natriumborat in Ethanol/H₂O (9:1, [pH 9.0]) wurde der proteolytische Abbau gestoppt und das freigesetzte AMC im Fluorimeter (Tecan) bestimmt.

3.16. Gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation

Die *in vitro* Synthese von p53 wurde mit dem TNT[®] Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega) durchgeführt. Zu 40 µl Master-Mix wurde 1 µg pSG5-p53-Plasmid und 50 µCi ³⁵S-Methionin (1 000 Ci/mmol) gegeben und der Gesamtansatz auf 50 µl aufgefüllt. Der *in vitro* Translations-Ansatz wurde 90 min bei 30°C inkubiert und entweder direkt in den unter 3.17. beschriebenen Assay eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff schnell eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

3.17. Assay zur Spaltung von p53 durch Calpain

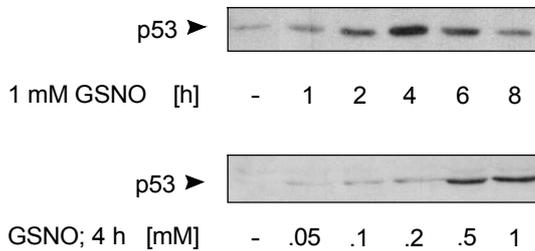
5 µl *in vitro* translatiertes ³⁵S-markiertes wt p53 wurden mit PBS/1 mM CaCl₂/1 mM MgCl₂ gemischt. 0.2 U Calpain und, je nach Ansatz noch 1 mM GSNO, wurde dazu pipettiert. Die Reaktionsansätze wurden 3 h bei RT inkubiert und anschließend mit 2x SDS-Gel-Probenpuffer für 5 min gekocht. Die Proteine wurden durch eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel getrocknet. ³⁵S-p53 und seine Spaltprodukte wurden autoradiografisch detektiert.

4. Ergebnisse

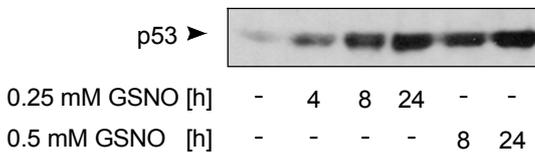
4.1. Die Stickstoffmonoxid-vermittelte Akkumulation von p53 ist zelllinienspezifisch sowie zeit- und konzentrationsabhängig

Die Akkumulation von p53 nach exogen applizierten NO-Donoren wie S-Nitrosoglutathion (GSNO) oder SperminNONOate (SpNO) verhält sich zelllinienspezifisch. Um die optimalen Inkubationszeiten und Arbeitskonzentrationen für die Stimulation mit GSNO festzustellen, wurden Zeit- und Konzentrationskinetiken mit den Zelllinien durchgeführt, die in den weiteren Versuchen eingesetzt werden sollten (murine NIH3T3-Fibroblasten, humane RKO und U2OS). Nach der Stimulation der verschiedenen Zelllinien mit unterschiedlichen GSNO-Konzentrationen (0.1-1 mM) und unterschiedlich langen Stimulationszeiten (1-24 h) wurde die Expression von p53 im Western Blot analysiert (Abbildung 8).

NIH 3T3



RKO



U2OS

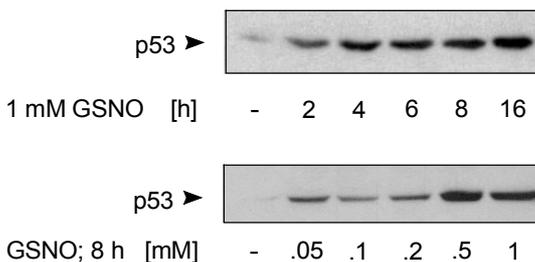


Abbildung 8: Konzentrations- und Zeitkinetiken der GSNO-vermittelten p53-Akkumulation.

NIH3T3-Fibroblasten, U2OS- und RKO-Zellen wurden mit den angegebenen Zeiten und GSNO-Konzentrationen inkubiert. Die relative Bestimmung der p53-Expression erfolgte durch Western Blot-Analyse mit folgenden Primärantikörpern: NIH3T3 – PAb122; RKO – DO-1; U2OS – PAb 1801.

Während in NIH3T3-Fibroblasten nach 4 h mit 1 mM GSNO ein Maximum im p53-Level erreicht war und bei längeren Stimulationszeiten (6-16 h) die p53-Menge wieder abnahm, konnte in RKO- und U2OS-Zellen auch bei den längsten untersuchten Zeiten noch eine Zunahme des p53-Levels festgestellt werden. In RKO-Zellen genügte eine GSNO-Konzentration von 0.5 mM um eine maximale Akkumulation von p53 zu erreichen. Höhere GSNO-Konzentrationen führten zum Ablösen der Zellen von der Gewebekulturschale, was auf toxische Effekte von NO zurückzuführen ist. NIH3T3-Fibroblasten und U2OS-Zellen zeigten bei 1 mM GSNO eine normale Anhaftung und die höchsten p53-Proteinlevel. Deshalb wurde in weiteren Versuchen mit RKO-Zellen maximal 0.5 mM GSNO und in solchen mit NIH3T3- bzw. U2OS-Zellen 1 mM GSNO eingesetzt.

4.2. Durch NO induziertes p53 ist nukleär lokalisiert und transkriptionell aktiv

Manche Stressoren bewirken zwar eine Akkumulation von p53, führen aber nicht zwangsläufig zur Lokalisation des Proteins im Kern, wie es bei einem aktiven Transkriptionsfaktor zu erwarten wäre (Davis *et al.*, 2000). Um zu klären, ob durch NO induziertes p53 nukleär lokalisiert ist, wurden Zellfraktionierungen von RKO-Zellen (Abbildung 9) sowie Immunfluoreszenzfärbungen an NIH3T3-Zellen (Abbildung 10) durchgeführt. Als Positivkontrolle für nukleär lokalisiertes p53 wurde Leptomycin B (LMB, 5 ng/ml) in den Zellfraktionierungsversuchen eingesetzt. LMB ist ein Inhibitor des CRM1-vermittelten nukleären Exports, welchem p53 folgt. Eine Hemmung des nukleären Exports führt in diesem Fall zur Akkumulation von p53, da angenommen wird, dass die proteasomale Degradation von p53 im Cytoplasma stattfindet. RKO-Zellen wurden mit GSNO und LMB stimuliert und die Zellen entweder komplett lysiert (Abbildung 9, Spuren 1-4) oder in cytoplasmatische (Spuren 5-8) und nukleäre Fraktionen (Spuren 9-12) getrennt. Um die Reinheit der Fraktionen zu kontrollieren, wurden die Leitproteine DNA-Topoisomerase II und β -Tubulin zusätzlich im Western Blot analysiert. Die Zellfraktionierung zeigte, dass nach GSNO-Behandlung akkumuliertes p53 vorwiegend nukleär lokalisiert ist. Nach Hemmung des nukleären Exports mit LMB zeigte sich eine ähnliche Verteilung des dadurch akkumulierten p53.

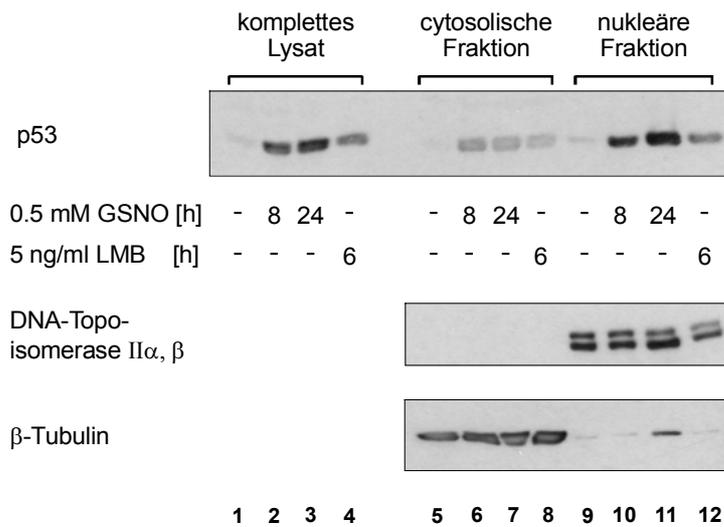


Abbildung 9: GSNO führt zu nukleär lokalisiertem p53. RKO-Zellen wurden für 8 und 24 h mit 0.5 mM GSNO oder für 6 h mit 5 ng/ml LMB inkubiert und anschließend entweder komplett lysiert (Spuren 1-4) oder in cytoplasmatische (Spuren 5-8) und nukleäre (Spuren 9-12) Fraktionen getrennt. Die Kontrolle (Spuren 1, 5 und 9) wurde nicht behandelt. Western Blot-Analysen von p53 (DO-1), DNA-Topoisomerase II α , β und β -Tubulin wurden durchgeführt.

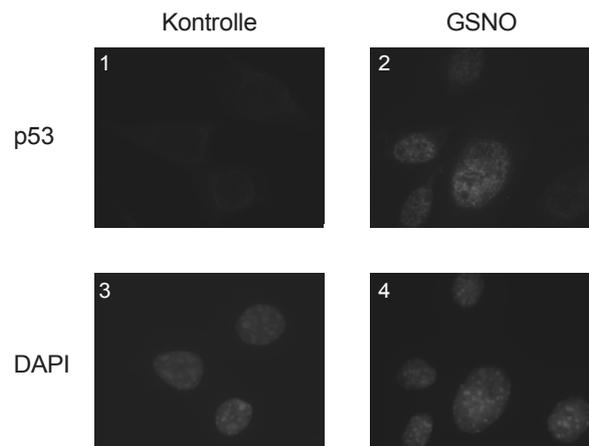


Abbildung 10: Durch GSNO-Behandlung akkumuliertes p53 ist nukleär lokalisiert – Immunfluoreszenzfärbung. NIH3T3 wurden mit 1 mM GSNO für 4 h inkubiert und gegen p53 (Pab122) gefärbt (Bild 2). Die DNA wurde mit DAPI gefärbt (Bilder 3 und 4).

Immunfluoreszenzfärbungen von GSNO-stimulierten NIH3T3-Zellen gegen p53 (Pab122) bestätigten die Ergebnisse der Zellfraktionierung und zeigten nukleäre Färbung (Abbildung 10, Bild 2). Die nukleäre Lokalisation des p53-Proteins wurde durch Gegenfärbung der DNA mit DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindol) verifiziert (Abbildung 10, Bilder 3 und 4).

Wie gezeigt, akkumuliert der Transkriptionsfaktor p53 nach NO-Stimulation nukleär. In früheren Untersuchungen zeigte sich auch, dass Gene wie *Mdm2*, *bax* oder *p21^{WAF1/CIP1}*, die in der p53-Signalkaskade stromabwärts liegen, nach NO-Exposition transkriptionell aktiviert werden (z.B. Nakaya *et al.*, 2000). Am Beispiel von *Mdm2* konnte in RKO-Zellen gezeigt werden, dass schon eine 4-stündige NO-Behandlung zu signifikant höheren *Mdm2*-Konzentrationen führte (Abbildung 11, Spuren 2), die nach 8 h ein Maximum erreichten (Abbildung 11, Spuren 3 und 5). Die Stimulation mit Proteasom-Inhibitor MG 132 diente als Positivkontrolle. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass p53 transkriptionell aktiv ist und p53-abhängige Gene aktiviert.

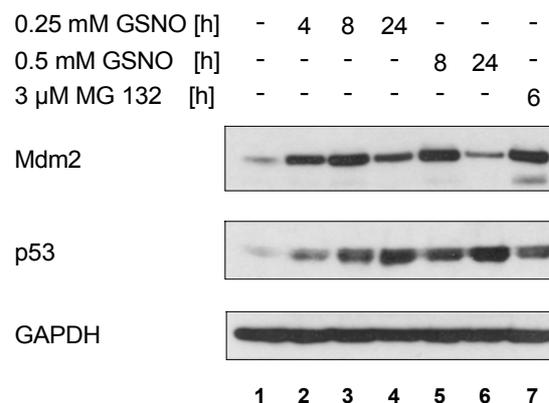


Abbildung 11: Die *Mdm2*-Konzentration wird durch GSNO-Stimulation in RKO-Zellen erhöht. RKO-Zellen wurden mit 3 μ M MG 132 (6 h) oder 0.25 mM bzw. 0.5 mM GSNO (4, 8 oder 24 h) inkubiert und die Zelllysate im Western Blot auf *Mdm2* (SMP14) und p53 (DO-1) untersucht. Als Ladekontrolle wurde der Blot mit anti-GAPDH Antikörpern gegengefärbt.

Jedoch lassen die Ergebnisse dieser Western Blot-Analysen nicht zwangsläufig auf eine direkte transkriptionelle Aktivierung von *mdm2* durch p53 schließen. Durch Untersuchungen mit dem Luciferase-Assay lassen sich in diesem Fall genauere Aussagen

treffen. Hierfür wurde in NIH3T3-Zellen ein p53-induzierbares Luciferase-Reporter-Konstrukt (PG13-Luc) transient transfiziert. Das Reporter-Konstrukt besitzt 13 Bindestellen für p53, die ‚upstream‘ des ‚Polyoma-Virus early Promotors‘ liegen, welchem das Luciferasegen nachgeschaltet ist. Als Negativkontrolle diente ein Konstrukt mit 15 mutierten Bindestellen (MG15-Luc). Nach 20- bis 25-stündiger Expression wurden die Zellen für 8 h mit GSNO, SpNO oder MG 132 inkubiert und die Luciferaseaktivität bestimmt (Abbildung 12).

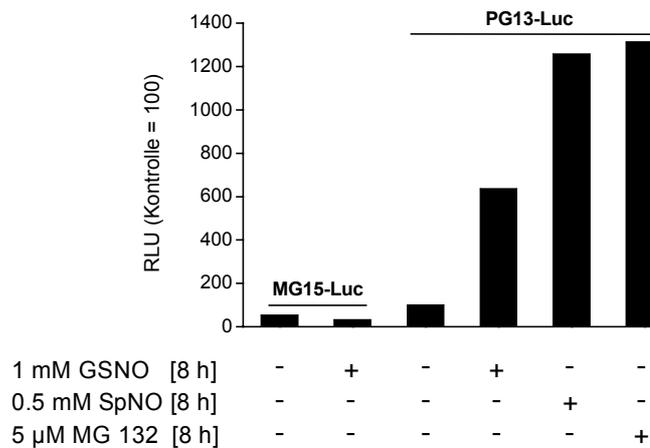


Abbildung 12: Akkumuliertes p53 ist transkriptionell aktiv – Luciferase-Assay.

NIH3T3 wurden mit dem Luciferase-Reporter-Konstrukt PG13-Luc oder als Negativkontrolle mit MG15-Luc transfiziert und nach 20- bis 25-stündiger Expression für 8 h mit 1 mM GSNO, 0.5 mM SpNO oder 5 μM MG 132 stimuliert. Im Diagramm sind die Mittelwerte der RLU (‚relative light units‘) aus 3 unabhängigen Versuchen aufgetragen.

Nach Stimulation mit GSNO konnte durchschnittlich eine 6-fach und nach SpNO- und MG 132-Stimulation eine 12-fach höhere Luciferaseaktivität als in der unbehandelten Kontrolle gemessen werden. Die mit MG15-Luc transfizierten Negativkontrollen (unbehandelt oder mit GSNO inkubiert) blieben mit der Luciferaseaktivität in beiden Fällen unter der PG13-Luc transfizierten/unbehandelten Kontrolle. Diese Ergebnisse zeigen deutlich die transkriptionelle Aktivität von p53 nach NO-Behandlung.

Es konnte also durch Zellfraktionierungen, Immunfluoreszenzfärbungen und Luciferasemessungen gezeigt werden, dass p53 nach NO-Behandlung in NIH3T3- und RKO-Zellen nukleär lokalisiert und transkriptionell aktiv ist.

4.3. p53-mRNA bleibt nach NO-Stimulation unverändert

p53 wird unter Stress in der Regel über eine Verlängerung der Halbwertszeit akkumuliert. Um auszuschließen, dass nach NO-Stimulation eine erhöhte p53-mRNA-Bildung zu einem erhöhten p53-Proteinspiegel führt, wurden NIH3T3-Fibroblasten mit SpNO (0.5 mM) für 1, 2 und 4 h stimuliert und die Gesamt-RNA isoliert. Northern Blot-Analysen zeigten, dass die p53-mRNA nach SpNO-Behandlung in NIH3T3-Fibroblasten nicht erhöht ist (Abbildung 13).

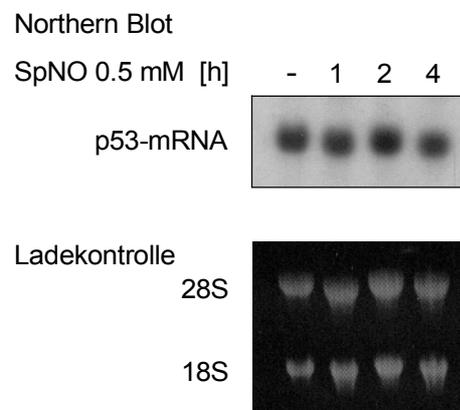


Abbildung 13: p53-mRNA bleibt nach SpNO-Behandlung konstant. NIH3T3 wurden mit 0.5 mM SpNO für 1, 2 und 4 h inkubiert und die isolierte Gesamt-RNA im Northern Blot (oberes Bild) analysiert. Zum Hybridisieren wurde ³²P-dCTP markierte p53-cDNA murinen Ursprungs eingesetzt. Im unteren Bild ist als Ladekontrolle die mit Ethidiumbromid gefärbte RNA nach der Auftrennung im 1.3%igen Agarosegel gezeigt.

Halbwertszeitbestimmungen von p53-Protein, die in der Arbeitsgruppe an RAW-Makrophagen durchgeführt wurden, zeigten, dass diese erhöht ist (Meßmer, 1996). Es kann also davon ausgegangen werden, dass auch in anderen Zellsystemen, d.h. in NIH3T3-Fibroblasten, RKO- und U2OS-Zellen, eher eine verminderte Degradation als eine Neusynthese für die Akkumulation von p53 verantwortlich ist.

4.4. Einfluss von NO auf den Abbau von p53

Da die NO-vermittelte Akkumulation von p53 nicht auf eine gesteigerte Neusynthese zurückzuführen ist, wurde im Folgenden der Einfluss von NO auf die Abbaumechanismen untersucht. p53 wird über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) degradiert, d.h. um vom 26S-Proteasom als Substrat erkannt zu werden, bedarf es einer vorherigen kovalenten Verknüpfung von p53 mit Ubiquitin. Mdm2 dient im Falle von p53 als sogenannte E3-Ligase und vermittelt enzymatisch die Verbindung von p53 mit Ubiquitin. Jeder der einzelnen Schritte stellt ein potenzielles Angriffsziel für NO dar.

4.4.1. NO hemmt die 20S-proteasomale Aktivität nicht

Der proteolytische Verdau eines Proteins, welches durch das UPS degradiert wird, wird von der 20S-Untereinheit des Proteasoms durchgeführt. Die enzymatisch aktiven Zentren des 20S-Proteasoms stellen ein potentiell Ziel für NO dar, da z.B. durch oxidative Prozesse an Aminosäureresten, wie Cysteinseitengruppen, die Proteaseaktivität gehemmt werden könnte.

Die proteolytische Aktivität des 20S-Proteasoms lässt sich fluorimetrisch bestimmen. Dazu wurden RKO-Zellen und NIH3T3-Fibroblasten mit GSNO, SpNO und Proteasom-Inhibitor MG 132 inkubiert und lysiert. Zu den Lysaten wurde das Proteasomsubstrat Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-Aminomethylcumarin (s-LLVY-AMC) zugegeben und der durch das 20S-Proteasom freigesetzte, fluoreszierende AMC-Rest bestimmt (Abbildung 14). s-LLVY-AMC ist ein bevorzugtes Substrat des 20S-Proteasoms (Grune *et al.*, 1996), und eine vorangehende Ubiquitinierung ist für die proteolytische Spaltung nicht notwendig. MG 132 führte zu einer deutlichen Hemmung der 20S-proteasomalen Aktivität in beiden Zelllinien. Mit NO-Donoren inkubierte Zellen zeigten hingegen keine signifikante Erniedrigung der Proteasomaktivität. Lediglich in RKO-Zellen war nach 24-stündiger Inkubation mit GSNO die mittlere Aktivität um ca. 10% gesenkt. Die Akkumulation von p53 ist jedoch bereits nach 4 und 8 h (siehe Abbildung 8) eindeutig nachweisbar, wobei keine Hemmung der Proteasomaktivität zu verzeichnen ist.

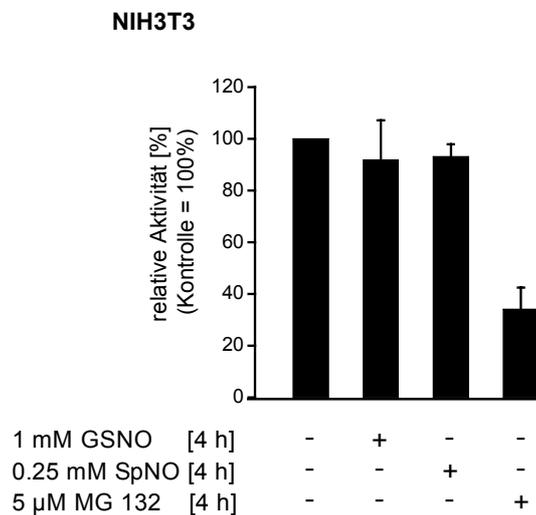
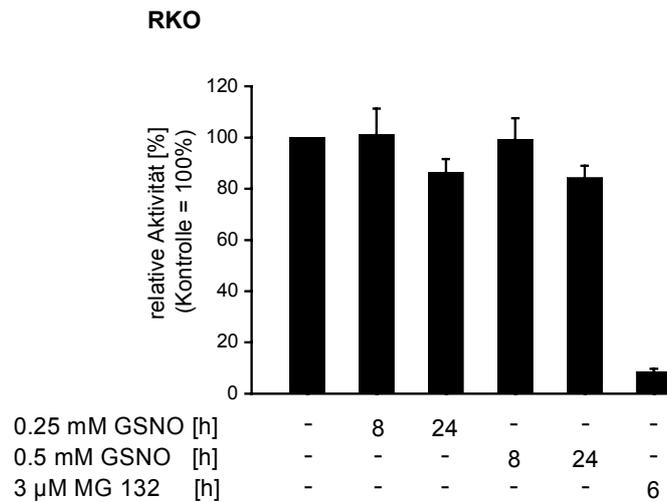


Abbildung 14: 20S-Proteasomaktivität wurde durch NO nicht gehemmt. RKO-Zellen wurden mit 0.25 mM und 0.5 mM GSNO für je 8 und 24 h und mit 3 μM MG 132 (6 h) inkubiert (oberes Diagramm); NIH3T3-Fibroblasten mit 1 mM GSNO und 0.25 mM SpNO sowie 5 μM MG 132 für jeweils 4 h (unteres Diagramm). Die Freisetzung von AMC aus dem Proteasomsubstrat s-LLVY-AMC wurde fluorimetrisch bestimmt. Unbehandelte Kontrollen = 100% relative Fluoreszenz.

Für die fluorimetrische Bestimmung der Proteasomaktivität mussten die Zellen lysiert werden, wobei durch die Aufarbeitung die Proteasome weitgehend in ihre 19S- und 20S-Untereinheiten zerfallen. Um zu untersuchen, ob NO einen generellen Effekt auf die

Erkennung ubiquitiniertes Proteine durch die 19S-Untereinheit und somit deren Degradation hat, wurden NIH3T3-Fibroblasten (nicht gezeigt) und U2OS-Zellen (Abbildung 15) mit NO-Donoren oder MG 132 inkubiert und das Zelllysate im Western Blot auf Ubiquitin untersucht. Im Western Blot wurden alle ubiquitinierten Proteine detektiert, wobei durch die unterschiedlichen Molekulargewichte nur ein ‚Schmier‘ zu sehen ist, der sich nach Hemmung des Proteasoms, wie erwartet, verstärkte. Nach NO-Behandlung konnte jedoch keine Veränderung in der Menge der ubiquitinierten Proteine festgestellt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wird ausgeschlossen, dass NO zu einer allgemeinen Hemmung des proteasomalen Abbaus von ubiquitinierten Proteinen führt.

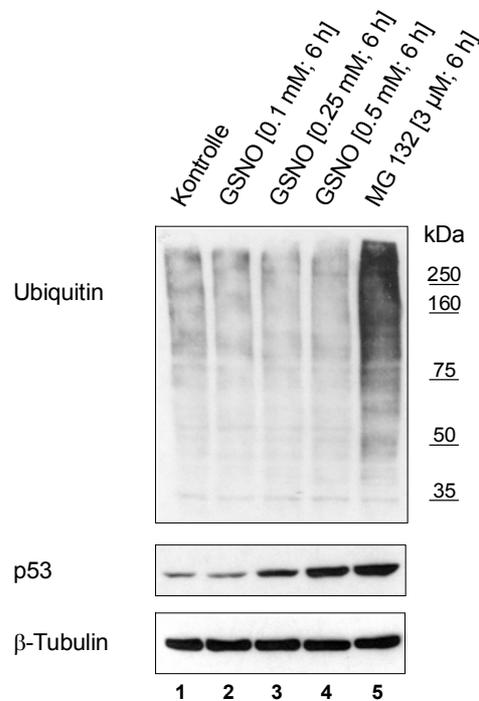


Abbildung 15: Western Blot-Analyse ubiquitiniertes Proteine. U2OS-Zellen wurden mit 0.1 mM, 0.25 mM, 0.5 mM GSNO oder 3 μ M MG 132 für 6 h inkubiert. Die Kontrolle blieb unbehandelt. 20 μ g eines 18 000 \times g-Überstandes wurden in einer 7.5%igen SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und Ubiquitin detektiert (oberer Blot). Zur Ladekontrolle wurde Tubulin detektiert.

4.4.2. NO hat keinen Einfluss auf die p53-Mdm2-Interaktion

Wie bereits unter 4.4. erwähnt, fügt Mdm2 Ubiquitinreste kovalent an p53. Dazu ist die direkte Wechselwirkung von Mdm2 mit p53 im N-terminalen Bereich notwendig. Es wird angenommen, dass durch Stress-vermittelte posttranslationale Modifikationen in diesem Bereich zum Abbruch der Interaktion beider Proteine führen können. Aber auch Modifikationen am Mdm2 sind denkbar. Deshalb sollte die Wechselwirkung von Mdm2 mit p53 unter dem Einfluss von NO untersucht werden.

4.4.2.1. ‚Pull-down‘ Assay von Mdm2 an immobilisiertem His-p53

Zuerst wurde die Wechselwirkung von baculoviral-exprimiertem, gereinigtem His-p53 mit Mdm2 *in vitro* getestet (Abbildung 16). Dazu wurde in Sf9-Zellen His-p53 exprimiert und über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. In NIH3T3-Fibroblasten wurde Mdm2 überexprimiert und das gewonnene Lysat mit dem immobilisierten His-p53 inkubiert. Um den Einfluss von NO auf die Ausbildung der Wechselwirkung zu untersuchen, wurde das Fibroblastenlysat mit unterschiedlichen GSNO-Konzentrationen vorinkubiert. Hierbei stand die direkte Nitrosierung von Mdm2 oder p53 im Vordergrund. Durch die Modifikation von Mdm2 oder/und p53 wird dann die Ausbildung einer Wechselwirkung der beiden Proteine verhindert. In Spur 1 (Abbildung 16) sind 10% des NIH3T3-Fibroblastenlysats, aufgetragen und Spur 2 zeigt ein Aliquot des immobilisierten His-p53. Eine klare Co-Präzipitation von Mdm2 mit His-p53 ist in der unbehandelten Kontrolle (Spur 3) sowie nach GSNO-Behandlung (Spuren 4-6) zu finden. Nach Behandlung mit 1 mM GSNO nimmt die Menge an co-präzipitiertem Mdm2 etwas ab, was aber *in vivo* sicherlich unbedeutend ist, da NO-Konzentrationen von 1 mM nicht auf Proteine in der Zelle einwirken, selbst wenn mit 1 mM NO stimuliert wird. Höhere NO-Konzentrationen als 1 mM wurden für *in vivo* Versuche nicht eingesetzt und werden nach der Induktion der iNOS auch nicht gebildet werden. Ein Einfluss einer direkten Nitrosierung von Mdm2 oder/und p53 auf deren Interaktion kann also *in vitro* ausgeschlossen werden.

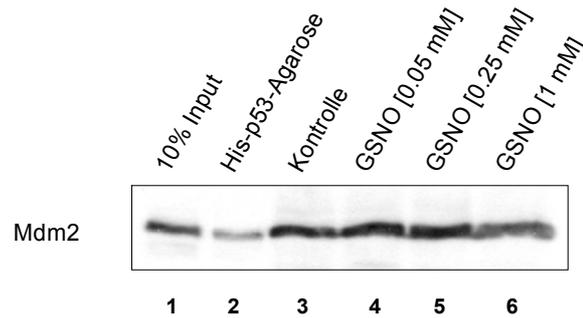


Abbildung 16: NO übt keinen Einfluss auf die Interaktion von Mdm2 mit p53 *in vitro* aus – ‚Pull down‘ Assay. Histidin-markiertes p53 wurde in Insektenzellen (Sf9) exprimiert, an Ni-NTA-Agarose gebunden und aufgereinigt. NIH3T3-Zellen wurden parallel dazu mit Mdm2 exprimierendem Plasmid (pCHDM1A) transfiziert und lysiert. Das Lysat wurde sowohl ohne als auch mit GSNO (0.05 mM, 0.25 mM oder 1 mM, Spur 4-6) für 30 min bei 37°C behandelt, bevor es mit immobilisiertem His-p53 inkubiert wurde. Gebundenes Mdm2 wurde im Western Blot analysiert. In Spur 1 sind 10% des NIH3T3-Lysats aufgetragen und Spur 2 zeigt Ni-NTA-Agarose mit gebundenem His-p53.

4.4.2.2. Wechselwirkung von p53 mit exogenem Mdm2

Die Wechselwirkung von Mdm2 mit p53 wurde mittels Co-Immunopräzipitationen untersucht. Um vergleichbare und größere Mengen Mdm2 für die Immunopräzipitationen zu erhalten, wurden NIH3T3-Fibroblasten mit Mdm2-exprimierendem Plasmid transient transfiziert und anschließend mit GSNO inkubiert. Zur Kontrolle wurde mit Proteasom-Inhibitor (MG 132) inkubiert oder die Zellen mit UV-Licht bestrahlt. Während durch MG 132 (Positivkontrolle) akkumuliertes p53 mit Mdm2 co-präzipitieren sollte, wurde nach UV-Bestrahlung (Negativkontrolle) der Abbruch der p53-Mdm2-Wechselwirkung erwartet (Fuchs *et al.*, 1998; Maki, 1999). Mit immobilisiertem Mdm2-Antikörper (SMP14 an Protein G-Plus Agarose) wurde Mdm2 präzipitiert und durch Western Blot-Analyse das Co-Präzipitat auf p53 untersucht (Abbildung 17).

In der unstimulierten Kontrolle wurde wenig p53 co-präzipitiert (IP, Spur 1), da hier ohnehin wenig bzw. nicht detektierbare Mengen an p53-Protein vorlagen (Input, Spur 1).

Nach MG 132-Behandlung akkumulierte p53 (Input, Spur 3) und konnte auch im Co-Präzipitat (IP, Spur 3) detektiert werden. Dagegen zerstörte UV-Bestrahlung, wie erwartet, die Interaktion von p53 mit Mdm2 (IP, Spur 4), was zur Akkumulation von p53 führte (Input, Spur 4). Unter NO-Einwirkung akkumulierte p53 (Input, Spur 2), wie erwartet, jedoch blieb die Wechselwirkung von exogenem Mdm2 mit p53 intakt (IP, Spur 4).

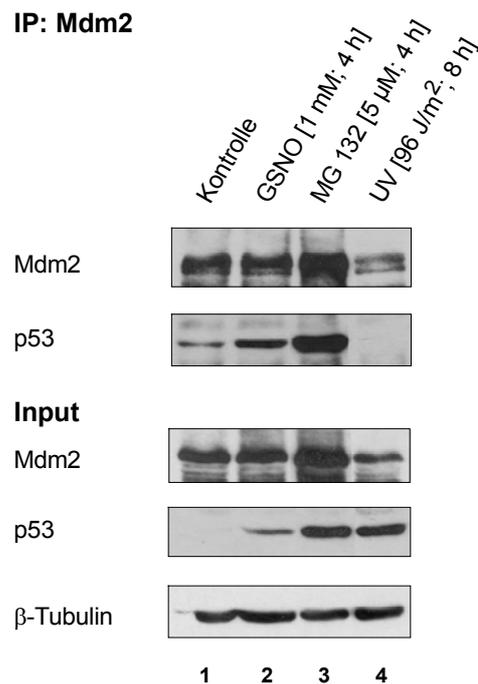


Abbildung 17: Die Wechselwirkung von exogenem Mdm2 mit p53 wird durch NO nicht beeinflusst – Co-Immunopräzipitation. NIH3T3-Fibroblasten wurden transient mit dem Mdm2-Expressionsplasmid pCHDM1A transfiziert und blieben entweder unbehandelt (Spur 1) oder wurden mit 1 mM GSNO (4 h, Spur 2) bzw. 5 μ M MG 132 (4 h, Spur 3) inkubiert. Die UV-Bestrahlung erfolgte mit einer Dosis von 96 J/m² und einer anschließenden Inkubationszeit von 8 h. Mit Protein G-gebundenem SMP14-Antikörper wurde Mdm2 präzipitiert und präzipitiertes Mdm2 (SMP14) sowie co-präzipitiertes p53 (PAb122) anschließend im Western Blot analysiert (IP). Etwa 3% des Zelllysats wurden zur Kontrolle direkt im Western Blot auf Mdm2 und p53 untersucht (Input) und als Ladekontrolle mit β -Tubulin-Antikörper gegengefärbt.

4.4.2.3. Serin 15-phosphoryliertes p53 co-präzipitiert mit endogenem Mdm2

Es ist bekannt, dass posttranslationale Modifikationen im NH₂-Terminus von p53 die Wechselwirkung von Mdm2 mit p53 beeinflussen können. Die Phosphorylierung von p53 am Serin 15, wie sie z.B. nach UV-Bestrahlung auftritt, wurde als Ursache für den Verlust der Wechselwirkung zwischen Mdm2 und p53 diskutiert (siehe Einleitung). Theoretisch könnte auch nur ein Teil des akkumulierten p53 phosphoryliert und der nicht phosphorylierte Anteil weiterhin zur Interaktion mit Mdm2 befähigt sein.

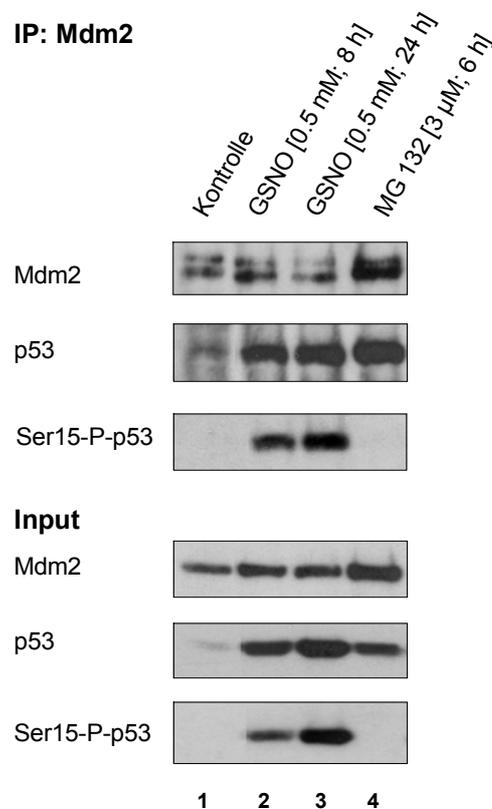


Abbildung 18: Serin 15-phosphoryliertes p53 co-präzipitiert mit Mdm2. RKO-Zellen wurden mit 0.5 mM GSNO (8 und 24 h, Spuren 2 und 3) sowie mit 3 µM MG 132 (6 h, Spur 4) stimuliert. Die Kontrolle wurde nicht behandelt (Spur 1). Endogenes Mdm2 (SMP14) wurde präzipitiert und anschließend Mdm2 und p53 (PAb122) detektiert. Der p53-Blot wurde danach mit anti-phospho-p53 (Serin 15) entwickelt. Für die Input-Kontrollen wurden die Zelllysate im Western Blot direkt auf Mdm2 (SMP14), p53 (DO-1) und Serin 15-phosphoryliertes p53 untersucht.

Außerdem könnte die Überexpression von Mdm2 durch unnatürlich hohe Mdm2-Mengen per se das Ergebnis der Co-Immunopräzipitation beeinflussen und zu einem anderen Ergebnis als die Co-Immunopräzipitation von endogenem Mdm2 mit p53 führen. Um dies zu untersuchen, wurden RKO-Zellen mit GSNO und MG 132 behandelt und eine Co-Immunopräzipitation gegen Mdm2 durchgeführt. Das Co-Präzipitat sowie die Zelllysate wurden im Western Blot auf Mdm2, p53 und Serin 15-phosphoryliertes p53 untersucht (Abbildung 18).

Die Ergebnisse waren annähernd die gleichen wie die in NIH3T3-Fibroblasten erzielten, obwohl endogenes Mdm2 präzipitiert wurde. Nach 8 und 24 h GSNO-Behandlung akkumulierte p53 und co-präzipitierte mit Mdm2 (Spur 2 und 3). Außerdem konnte gezeigt werden, dass NO zur Phosphorylierung von p53 an Serin 15 führt, was jedoch nicht, wie in der Literatur diskutiert, zum Abbruch der Wechselwirkung zwischen p53 und Mdm2 führte. Es konnte Serin 15-phosphoryliertes p53 im Co-Präzipitat von Mdm2 detektiert werden. Kreuzreaktionen des anti-Phospho-p53 (Serin 15) Antikörpers sind ausgeschlossen, da p53 nach MG 132-vermittelter Hemmung des Proteasoms akkumulierte und auch mit Mdm2 co-präzipitierte, jedoch nicht an Serin 15 phosphoryliert war (Spur 4, IP- und Input-Blot anti-Ser15-P-p53).

4.4.3. Die Ubiquitinierung von p53 unter dem Einfluss von NO

Ubiquitinreste werden kovalent über Isopeptidbindungen an ϵ -NH₂-Gruppen von Lysinseitenketten im C-terminalen Bereich von p53 gebunden. Wie gezeigt wurde, hat NO zwar keinen Einfluss auf die Wechselwirkung von p53 mit Mdm2, womit die zum Abbau notwendige Ubiquitinierung von p53 jedoch noch nicht gesichert ist. Eine konservierte Region im Mdm2, die sogenannte ‚RING-finger domain‘, bildet das aktive Zentrum und enthält Cysteinreste, die ein Zn²⁺ komplexieren und somit ein potentielles Angriffsziel für NO darstellen.

4.4.3.1. NO hat keinen Einfluss auf den Ubiquitinierungsstatus von exogenem HA-p53

Um den Ubiquitinierungsstatus von p53 zu untersuchen, wurde ein Ubiquitinierungs-Assay etabliert, welcher in Abbildung 19 schematisch dargestellt ist.

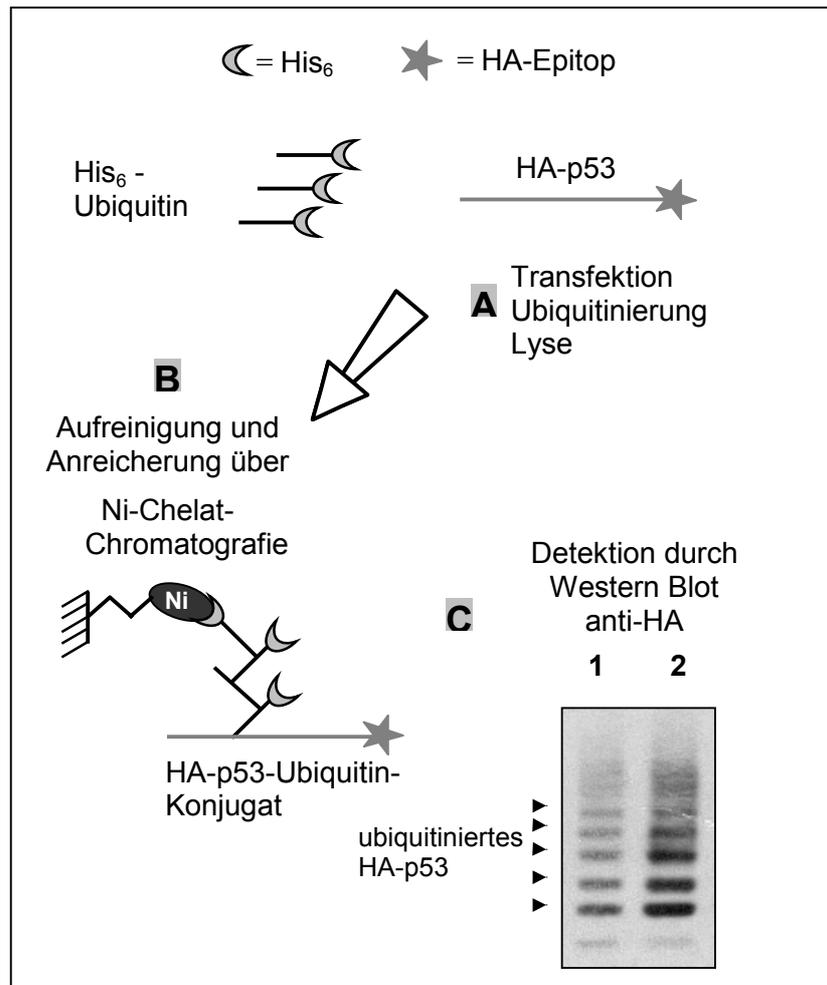


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Ubiquitinierungsassays. Zellen werden transient mit His-Ubiquitin und HA-p53-exprimierenden Plasmiden co-transfiziert. In den Zellen wird HA-p53 mit His-Ubiquitin markiert (A). Anhand der Histidinmarkierung kann His-Ubiquitin-markiertes HA-p53 über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt und angereichert werden (B). Nach der Auftrennung durch SDS-PAGE wird HA-p53 mit unterschiedlich starker Ubiquitinierung mit anti-HA Antikörper detektiert (C). Spur 1 im Western Blot-Beispiel zeigt eine unbehandelte Kontrolle und Spur 2 zeigt akkumuliertes ubiquitiniertes HA-p53 nach Hemmung des Proteasoms.

Hierzu wurden NIH3T3-Zellen transient mit His-Ubiquitin und HA-p53 sowie mit Mdm2-exprimierenden Plasmiden co-transfiziert und anschließend stimuliert. Anhand der Histidinmarkierung des Ubiquitins konnten über Ni-NTA-Agarose mit Ubiquitin markierte Proteine aufgereinigt und angereichert werden. Ubiquitiniertes exogenes p53 wurde dann über seine HA-Markierung im Western Blot nachgewiesen.

Im Versuch wurden konstante Mengen His-Ubiquitin- und HA-p53-Plasmid mit steigenden Mengen Mdm2-Plasmid co-transfiziert und die Wirkung von SpNO auf den Ubiquitinierungsstatus von HA-p53 untersucht (Abbildung 20). Zur Kontrolle wurde mit Proteasom-Inhibitor MG 132 (Spur 13) inkubiert oder mit UV-Licht bestrahlt (96 J/m^2 mit anschließender Inkubation für 8 h, Spur 14). Wie erwartet, zeigte die Probe nach MG 132-Behandlung, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine Anhäufung von ubiquitiniertem HA-p53 (durch Hemmung des Abbaus) und nach UV-Bestrahlung vermindert ubiquitiniertes HA-p53 (durch Störung der Interaktion und verringerte Proteinnengen von Mdm2). Durch diese Kontrollen wurde gezeigt, dass der Assay per se funktionierte. Wurde kein Mdm2 mit HA-p53 co-exprimiert, so konnte leicht ubiquitiniertes HA-p53 detektiert werden (Spur 1). Schon nach Co-Transfektion von gleichen Mengen Mdm2- und HA-p53-exprimierendem Plasmid fand verstärkte Ubiquitinierung statt; vor allem stieg auch die Anzahl an Ubiquitinresten pro HA-p53-Molekül (Spur 3 und 5). Ab dem 10-fachen Überschuss an Mdm2-exprimierendem Plasmid konnte, aufgrund des verstärkten Abbaus, nur noch ein vermindertes Signal von ubiquitiniertem HA-p53 detektiert werden (Spur 7 und 9). Bei längerer Exposition des Films wurde auch dort noch ein ausreichendes Signal erhalten. Der verstärkte Abbau von HA-p53 wurde auch im Input deutlich, wo bei steigenden Mengen Mdm2 die Menge an HA-p53 kontinuierlich abnahm.

Nach Stimulation mit 0.5 mM SpNO konnte jedoch bei keinem Verhältnis von co-exprimiertem HA-p53 zu Mdm2 eine Veränderung gegenüber der unstimulierten Kontrolle festgestellt werden (vergleiche Spur 1 mit 2, 3 mit 4, 5 mit 6, 7 mit 8 oder 9 mit 10). Um die Stimulation zu kontrollieren, wurde die Akkumulation von endogenem p53 mit PAb122 Antikörper immer parallel untersucht (Input, p53 endo). Die Dauer der NO-Behandlung (4 h) wurde bei diesem Versuch entsprechend dem Maximum der p53-Akkumulation gewählt (siehe Abbildung 8, NIH3T3).

Als Nächstes wurde die Ubiquitinierung von HA-p53 in Abhängigkeit von der Stimulationsdauer untersucht (Abbildung 21), um eine Veränderung v.a. bei kürzeren

Stimulationszeiten auszuschließen. Dazu wurden NIH3T3-Fibroblasten wie im vorangegangenen Versuch mit His-Ubiquitin-, HA-p53- und Mdm2-exprimierendem Plasmid transient co-transfiziert und aufgearbeitet.

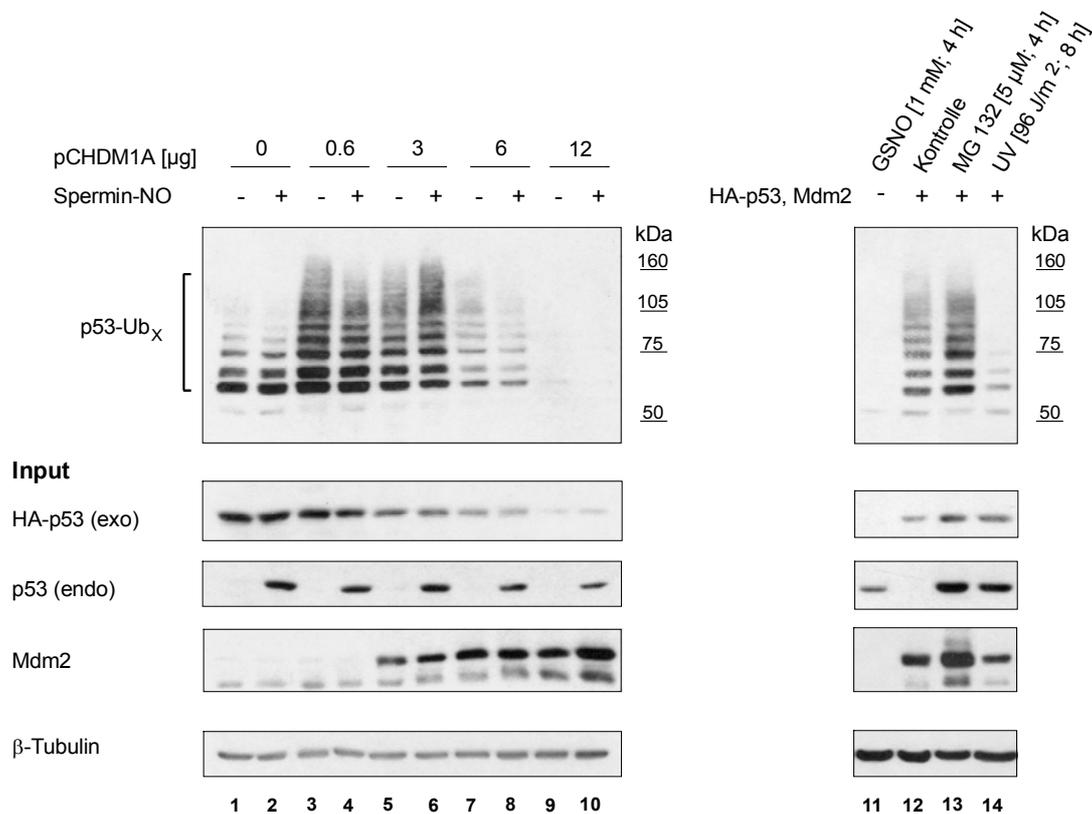


Abbildung 20: Die Ubiquitinierung von HA-p53 ist Mdm2-, jedoch nicht NO-abhängig.

NIH3T3-Zellen wurden mit 4.5 µg His-Ubiquitin-, 0.6 µg HA-p53- und steigenden Mengen Mdm2-exprimierendem Plasmid (0 bis 12 µg) co-transfiziert. 24-28 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 0.5 mM SpNO (4 h, Spuren 2, 4, 6, 8 und 10) bzw. 5 µM MG 132 (4 h, Spur 13) inkubiert oder mit UV-Licht bestrahlt (96 J/m² mit anschließender Inkubation für 8 h, Spur 14). Die Kontrollen in den Spuren 1, 3, 5, 7, 9 und 12 blieben unbehandelt. Extrakte aus Zellen, nur mit His-Ubiquitin-exprimierendem Plasmid transfiziert und mit 1 mM GSNO behandelt, sind in Spur 11 gezeigt. Mit His-Ubiquitin-markierte Proteine wurden über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt und HA-p53 mit anti-HA Antikörper im Western Blot detektiert. Nicht aufgereinigte Zellextrakte wurden als Input-Kontrollen im Western Blot auf exogenes (exo) HA-p53 (anti-HA.11 Antikörper), endogenes (endo) p53 (PAb 122 Antikörper) oder Mdm2 (SMP14 Antikörper) untersucht. Als Ladekontrolle wurde gegen β-Tubulin gefärbt.

Im Ubiquitinierungsmuster zeigte sich auch bei kürzeren (1.5 h) und längeren Inkubationszeiten (7.5 h) mit 0.5 mM SpNO keine Änderung in der Ubiquitinierung von HA-p53, verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Im Western Blot anti-HA der Ni-NTA-aufgereinigten Proben sieht man zwar eine leichte Verstärkung von ubiquitiniertem HA-p53 nach 3.5 und 7.5 h SpNO-Behandlung, dies ist aber auf eine erhöhte Menge an HA-p53 (siehe Input, Western Blot anti-HA) zurückzuführen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass NO keinen Einfluss auf die Ubiquitinierung von exogenem p53, d.h. HA-p53, hat.

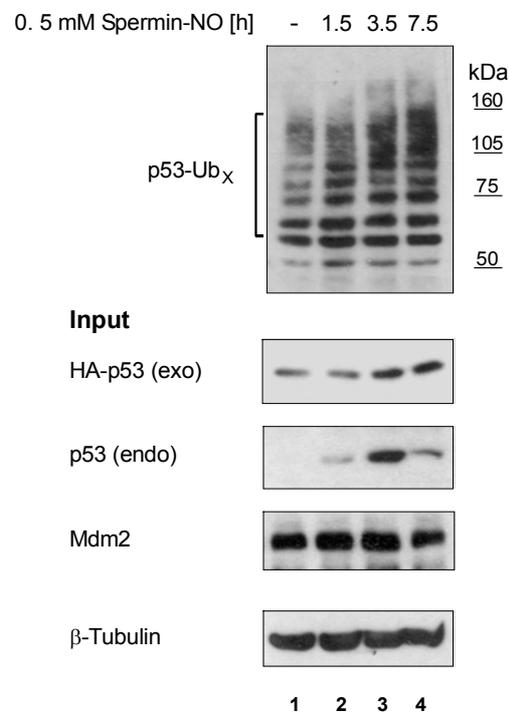


Abbildung 21: Die Ubiquitinierung von HA-p53 ist von der Stimulationszeit unabhängig. NIH3T3-Fibroblasten wurden mit His-Ubiquitin-, HA-p53- und Mdm2-exprimierendem Plasmid transfiziert und 20-24 h danach mit 0.5 mM SpNO für 1.5, 3.5 oder 7.5 h inkubiert (Spuren 2 bis 4). Die Kontrolle (Spur 1) wurde nicht behandelt. Über Ni-NTA-Agarose aufgereinigte Zellysate wurden im Western Blot mit anti-HA Antikörper untersucht. Die Input-Kontrollen wurden, wie in Abbildung 13 beschrieben, im Western Blot analysiert.

4.4.3.2. Ubiquitinierung von endogenem p53

Wie in den beiden vorangegangenen Versuchen gezeigt und aus der Literatur bekannt (z.B. Wang *et al.*, 2002), ist es problematisch, die Überexpression von p53 zu kontrollieren. In dem folgenden Experiment sollte geprüft werden, ob sich die Ubiquitinierung von endogenem p53 nach NO-Behandlung anders verhält als die von exogenem, überexprimiertem HA-p53. Hierfür wurden humane RKO-Zellen verwendet, da diese p53 nach GSNO-Behandlung sehr gut akkumulierten und es außerdem möglich war, p53 und seine ubiquitinierten Formen mit dem sensitiven DO-1 Antikörper (erkennt nur humanes p53) zu detektieren (Abbildung 22). Die Zellen wurden mit 0.5 mM GSNO (8 und 24 h) oder 3 μ M MG 132 (6 h) inkubiert bzw. mit UV-Licht bestrahlt (96 J/m² mit anschließender Inkubation für 8 h) und anschließend in AM-150-Puffer lysiert. p53 wurde im Western Blot mit DO-1 Antikörper detektiert.

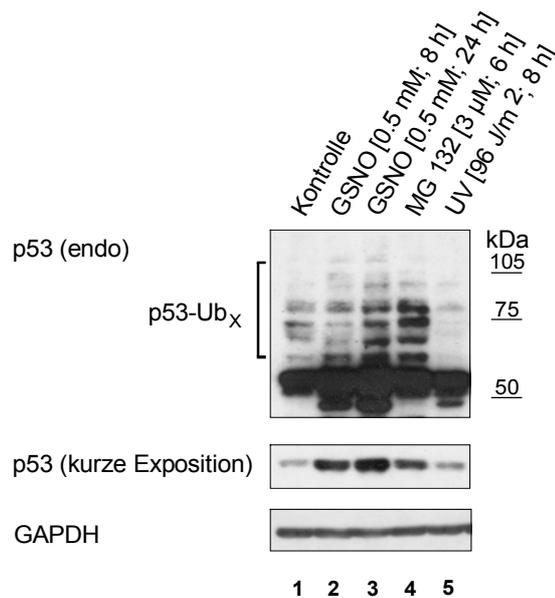


Abbildung 22: Ubiquitinierung von endogenem p53 unter dem Einfluss von NO. RKO-Zellen wurden mit 0.5 mM GSNO (8 oder 24 h, Spuren 2 und 3) oder 3 μ M MG 132 (6 h, Spur 4) behandelt oder mit UV-Licht bestrahlt (96 J/m² mit anschließender Inkubation für 8 h, Spur 5). In Spur 1 ist die unbehandelte Kontrolle dargestellt. Die Proteine wurden mit einem 7.5%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, p53 und seine ubiquitinierten Formen dann im Western Blot mit DO-1 Antikörper detektiert. Die mittlere Abbildung zeigt eine kürzere Exposition der oberen Abbildung. Als Ladekontrolle wurde GAPDH detektiert.

In Analogie zu HA-p53 konnte nach Behandlung mit MG 132 verstärkte und nach UV-Bestrahlung verminderte Ubiquitinierung von endogenem p53 beobachtet werden. In der unstimulierten Kontrolle konnten geringe Mengen ubiquitiniertes p53 detektiert werden, die nach NO-Behandlung anstiegen. Dabei ist jedoch zu beachten, dass nach der Stimulation mit GSNO per se mehr p53 in den Zellen vorhanden war und die Zunahme an ubiquitiniertem p53 durch die Zunahme an p53 nach NO-Behandlung zu begründen ist. Diese Daten, wie auch die mit überexprimiertem HA-p53 gewonnenen, zeigen, dass NO die Ubiquitinierung von p53 nicht beeinflusste, d.h. weder verminderte noch verstärkte. Dies korreliert zudem mit den Daten aus der Proteasomaktivitätsmessung, da eine Hemmung des Proteasoms zur Akkumulation von ubiquitiniertem p53 führen würde.

4.4.3.3. Ubiquitiniertes p53 befindet sich nach NO-Stimulation vorwiegend im Zellkern

Durch Immunfluoreszenzfärbungen und Zellfraktionierungen (Abbildungen 9 und 10) wurde bereits gezeigt, dass p53 nach NO-Behandlung überwiegend im Zellkern akkumuliert. Die Degradation findet jedoch im Cytoplasma statt. Es interessierte nun wie die Verteilung von ubiquitiniertem p53 in der Zelle aussieht. Dazu wurden RKO-Zellen mit 0.5 mM GSNO (24 h) oder 5 ng/ml LMB (12 h) inkubiert oder blieben als Kontrolle unbehandelt. Ein Aliquot der Zellen wurde komplett lysiert und das andere in eine cytoplasmatische und eine nukleäre Fraktion getrennt. Die erhaltenen Lysate wurden im Western Blot mit DO-1 Antikörper auf p53 und seine ubiquitinierten Formen untersucht (Abbildung 23). GSNO und LMB führten zu vorwiegend nukleär lokalisiertem („kürzere Exposition“), ubiquitiniertem p53 (oberes Bild). Geringere Mengen an niedrig ubiquitiniertem p53 wurden auch im Cytoplasma detektiert. Jedoch konnte stärker ubiquitiniertes p53 nur nukleär gefunden werden. Western Blots gegen DNA-Topoisomerase II α , β und β -Tubulin zeigten eine saubere Trennung der Fraktionen.

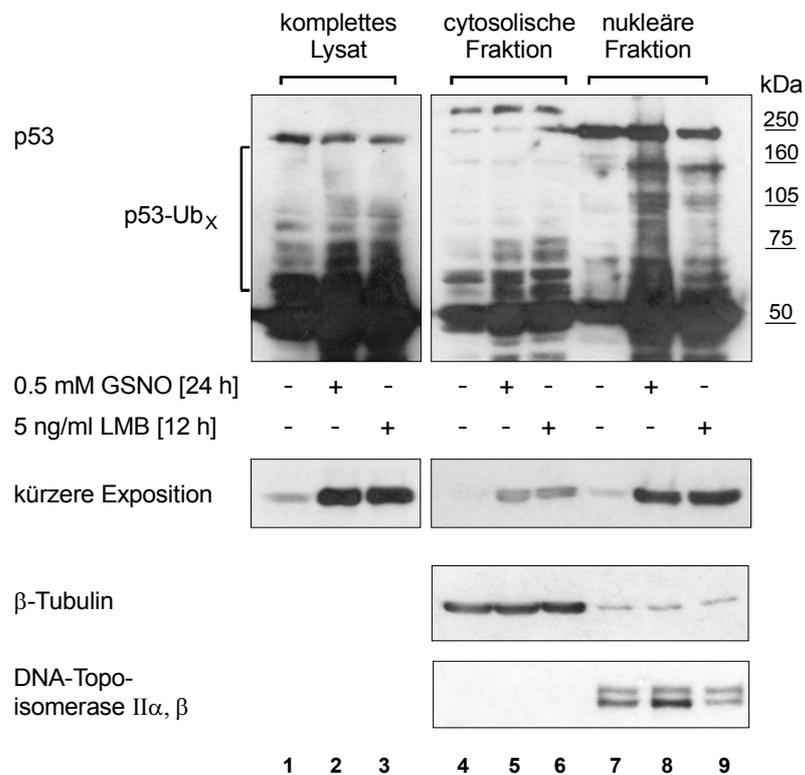


Abbildung 23: Ubiquitiniertes p53 ist vorwiegend nukleär lokalisiert. RKO-Zellen blieben als Kontrolle unbehandelt, wurden mit 0.5 mM GSNO (24 h) oder mit 5 ng/ml LMB (12 h) inkubiert. Die Zellen wurden entweder komplett lysiert (komplettes Lysat, Spuren 1-3), in cytosolische (Spuren 4-6) oder nukleäre Fraktionen (Spuren 7-9) getrennt. Ubiquitiniertes p53 wurde im Western Blot mit DO-1 Antikörper detektiert. Eine kürzere Exposition lässt die vorwiegend nukleäre Lokalisation von p53 erkennen. Zur Reinheitskontrolle der Fraktionen wurden die Markerproteine DNA-Topoisomerase II α , β und β -Tubulin untersucht.

4.5. Einfluss von NO auf den nukleären Export von p53

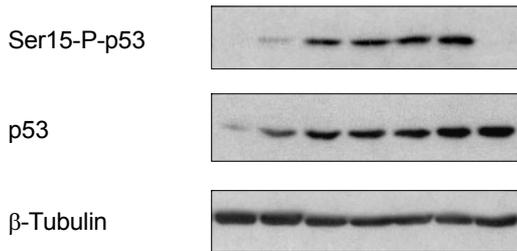
Vorangegangene Untersuchungen mit NO als Stimulanz zeigten, dass akkumuliertes p53 sich ähnlich wie p53 nach LMB-Behandlung verhielt. Außerdem ließ die Kombination der Ergebnisse aus der Co-Immunopräzipitation und den Untersuchungen zur Ubiquitinierung sowie zur Proteasomaktivität als möglichen Wirkmechanismus von NO einen Einfluss auf den nukleären Export von p53 vermuten. Da der Abbau von p53 im Cytoplasma stattfindet, p53 seine Aufgabe als Transkriptionsfaktor aber im Zellkern ausübt, ist der nukleäre Export auf dem Weg zum Abbau ein wichtiger Schritt.

4.5.1. NO induziert die Phosphorylierung von p53 am Serin 15

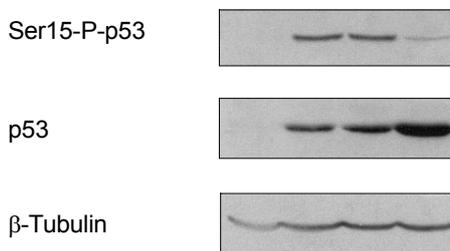
Posttranslationale Modifikationen, vor allem Phosphorylierungen im N-terminalen Bereich, scheinen für die Regulation der Stabilität von p53 von Interesse zu sein. Wie bereits bei den Ergebnissen der Co-Immunopräzipitation angesprochen, führt NO zur Phosphorylierung von p53 an Serin 15. Dass dies kein Zelllinien-spezifischer Effekt ist, zeigt Abbildung 24. NIH3T3-Fibroblasten, U2OS-Zellen und RKO-Zellen wurden mit GSNO oder SpNO behandelt und die Zelllysate auf Serin 15-phosphoryliertes p53 sowie Gesamt-p53 untersucht. Schon nach kurzen Zeiten konnte die Phosphorylierung von Serin 15 festgestellt werden, wohingegen nach Inkubation mit MG 132 p53 nicht oder nur sehr schwach phosphoryliert wurde. In RKO-Zellen führte auch die LMB-Behandlung (12 h) zur Serin 15-Phosphorylierung von p53.

U2OS

1 mM GSNO [h]	-	2	4	6	8	16	-
5 μ M MG 132 [h]	-	-	-	-	-	-	4

**NIH3T3**

1 mM GSNO [h]	-	4	-	-
0.5 mM SpNO [h]	-	-	4	-
5 μ M MG 132 [h]	-	-	-	4

**RKO**

0.5 mM GSNO [h]	-	8	24	-	-
5 ng/ml LMB [h]	-	-	-	12	-
3 μ M MG 132 [h]	-	-	-	-	8

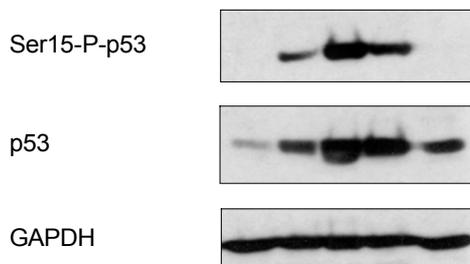


Abbildung 24: NO-Behandlung führt zur Phosphorylierung von p53 an Serin 15. U2OS-Zellen wurden mit 1 mM GSNO (2, 4, 6 oder 8 h) oder 5 μ M MG 132 (4 h) inkubiert. NIH3T3-Fibroblasten wurden für 4 h mit 1 mM GSNO, 0.5 mM SpNO oder 5 μ M MG 132 inkubiert. RKO-Zellen wurden mit 0.5 mM GSNO (8 und 24 h), 5 ng/ml LMB (12 h) oder 3 μ M MG 132 (8 h) inkubiert. Die Kontrolle blieb jeweils ohne Behandlung. Die anschließend gewonnenen Zelllysate wurden im Western Blot auf ihren Gehalt an Serin 15-phosphoryliertem p53 untersucht. Zum Vergleich wurde auch immer gesamtes p53 untersucht; folgende Antikörper wurden dafür verwendet: NIH3T3 – PAb122, U2OS – PAb 1801, RKO – DO-1.

4.5.2. Serin 15-phosphoryliertes p53 kann nicht mehr aus dem Zellkern exportiert werden

Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass eine Phosphorylierung von p53 an Serin 15 den nukleären Export beeinflusst (Zhang und Xiong, 2001). Eine Blockade des nukleären Exports würde im Fall von p53 zur Akkumulation führen. Außerdem scheint der Anteil an Serin 15 phosphoryliertem p53 im Vergleich zu Gesamt-p53 nach NO-Behandlung relativ groß zu sein. Untersuchungen zum sog. ‚Shuttling‘ von Proteinen wurden mit dem Heterokaryon-Assay durchgeführt (Abbildung 25). Durch adenovirale Transfektion wurde in Saos-2-Zellen (p53^{-/-}) p14^{ARF} und in U2OS-Zellen humanes wt p53 überexprimiert. Die co-kultivierten Zellen blieben entweder unbehandelt (Kontrolle) oder wurden mit 1 mM GSNO bzw. 10 ng/ml LMB behandelt. Nach 6-stündiger Inkubation wurden die Zellen fusioniert. Um eine Verfälschung des Ergebnisses durch Proteinneusynthese zu verhindern, wurde vor und nach der Zellfusion das Medium mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid supplementiert. 1 h nach der Fusion wurden die Zellen fixiert und indirekt mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Die U2OS/Saos-2-Heterokaryen wurden mikroskopisch im Phasen-Kontrast identifiziert und durch die Färbung von p14^{ARF} eine Unterscheidung von Saos-2 (p14^{ARF} positiv) und U2OS-Zellen (p14^{ARF} negativ) fluoreszenzmikroskopisch ermöglicht. Dabei ist zu beachten, dass das in den Saos-2 überexprimierte p14^{ARF} keinen Einfluss auf das ‚Shuttling‘ von p53 aus den U2OS-Nuklei in die Saos-2-Nuklei hat. Es kann sogar zu einem besseren Ergebnis führen, da es einmal im Saos-2-Nuklei befindliches p53, durch Hemmung dessen nukleären Exports, vor dem Abbau schützt. Das ‚Shuttling‘ von p53 zwischen U2OS- und Saos-2-Zellkernen wurde mittels Färbung von Gesamt-p53 (FL-393) oder Phospho-p53 (Serin 15) verfolgt. Unter Kontrollbedingungen konnte ein Teil des in U2OS-Zellen überexprimierten p53 in den ansonsten p53 negativen Saos-2-Nuklei gefunden werden und zeigte somit, dass der Versuch an sich funktionierte. Wie die Western Blot-Ergebnisse in Abbildung 17 erwarten ließen, war unter Kontrollbedingung keine Serin 15-Phosphorylierung von p53 zu detektieren. Nach GSNO-Behandlung wird p53 an Serin 15 phosphoryliert und phosphoryliertes p53 kann auch nur in U2OS-Zellkernen detektiert werden. Interessanterweise ‚shuttelt‘ ein Teil des nicht an Serin 15 phosphorylierten p53 in Saos-2-Nuklei. Wie erwartet, konnte nach LMB-Behandlung weder an Serin 15 phosphoryliertes noch unphosphoryliertes p53 die U2OS-Nuklei verlassen, da die Ausbildung des nukleären Export-Komplexes durch LMB gestört wurde.

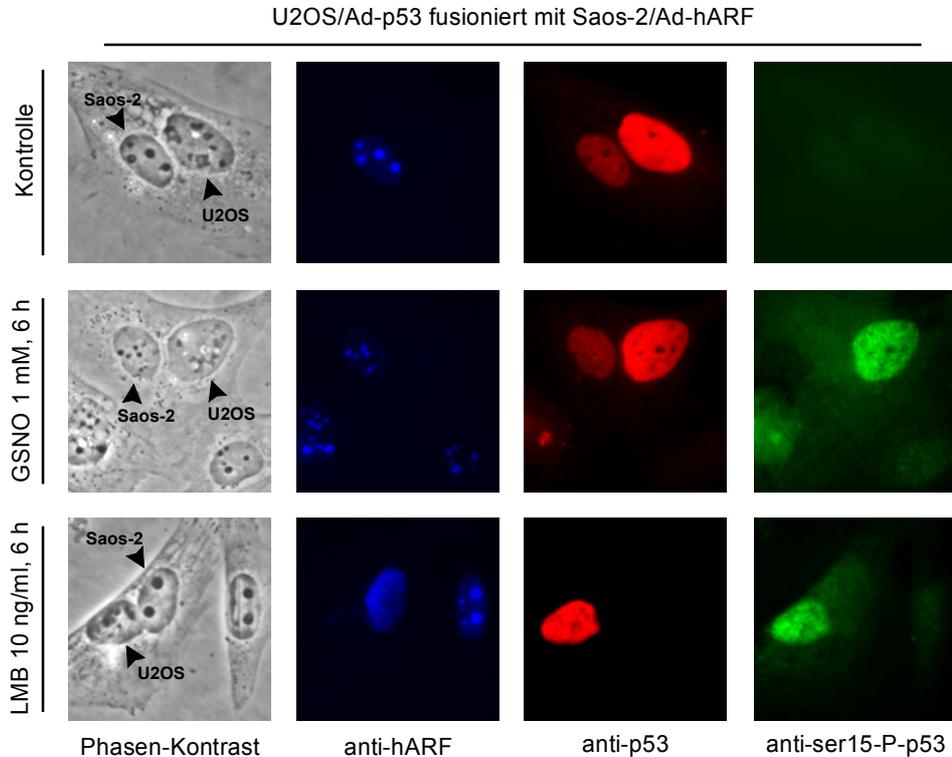


Abbildung 25: Serin 15-phosphoryliertes p53 kann nicht mehr aus dem Zellkern exportiert werden – Heterokaryon-Assay. Adenoviral wurde humanes p53 in U2OS-Zellen und p14^{ARF} in Saos-2-Zellen überexprimiert. Die co-kultivierten Zellen wurden jeweils für 6 h mit 1 mM GSNO (mittlere Bildreihe) oder 10 ng/ml LMB (untere Bildreihe) inkubiert; die Kontrolle (obere Bildreihe) wurde nicht behandelt. 1 h nach der Fusion wurden die Zellen fixiert und die Verteilung von Gesamt-p53 (rot, FL-393 Antikörper) oder Serin 15-phosphoryliertem p53 (grün, anti-Ser15-P-p53) fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Saos-2-Nuklei wurden von U2OS-Nuklei durch die Färbung von p14^{ARF} (blau, OP02) in den Heterokaryen (Phasen-Kontrastaufnahmen) unterschieden.

4.5.3. Mdm2 und CRM1 interagieren

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, gibt es für den nukleären Export von p53 verschiedene Modelle. p53 wird CRM1-abhängig exportiert, was bereits durch die LMB-sensitive Akkumulation von p53 gezeigt wurde (Abbildung 24 RKO; Roth *et al.*, 1998). Es stellt sich nun die Frage, ob p53 direkt oder über ein drittes Protein mit dem Exportfaktor CRM1 wechselwirkt. Mdm2 könnte ein solches Protein sein, da es ebenfalls eine nukleäre Exportsequenz besitzt und mit p53 interagieren kann. Um zu untersuchen, ob CRM1 mit Mdm2 interagiert wurden RKO-Zellen lysiert und Mdm2 (SMP14) präzipitiert. Das Co-Präzipitat wurde im Western Blot auf CRM1 untersucht und präzipitiertes Mdm2 zur Kontrolle nachgewiesen (Abbildung 26, Spur 2). Zur Kontrolle von unspezifischen Bindungen an Protein G-Plus Agarose wurde diese mit Lysat (ohne Antikörper) inkubiert. *In vitro* translatiertes HA-CRM1 ist in Spur 3 gezeigt. Dieses Ergebnis zeigt, dass CRM1 mit Mdm2 direkt oder indirekt interagiert. In Abschnitt 4.4.2. wurde gezeigt, dass Mdm2 auch mit p53 wechselwirkt, so dass CRM1 über einen ternären Komplex Mdm2-p53-CRM1 präzipitiert wurde.

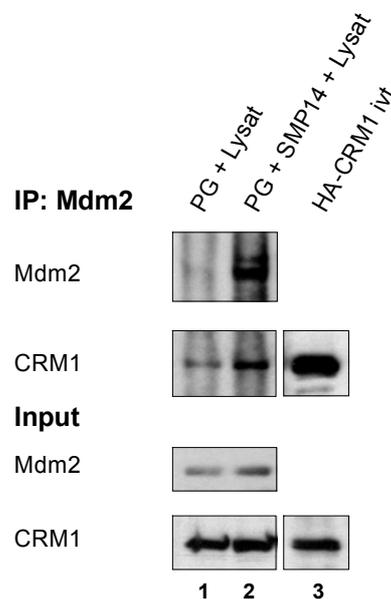


Abbildung 26: CRM1 interagiert mit Mdm2. RKO-Zellen wurden lysiert und Mdm2 mit SMP14-Antikörper präzipitiert. Das Co-Präzipitat wurde im Western Blot auf CRM1 untersucht und Mdm2 zur Kontrolle detektiert. Zur Kontrolle unspezifischer Bindungen wurde Protein G-Plus Agarose (PG) mit Zelllysat inkubiert (Spur 1). *In vitro* translatiertes HA-CRM1 wurde im Western Blot mit aufgetrennt (Spur 3). Input-Kontrollen sind in den beiden unteren Blots dargestellt.

4.6. Weitere Untersuchungen zur p53-Akkumulation nach NO-Behandlung

4.6.1. Hemmung cytosolischer Cystein-Proteasen

Ein wenig untersuchter Abbauweg von p53 ist die proteolytische Spaltung durch Calpain im Cytoplasma. Calpain ist eine Ca^{2+} -abhängige Cystein-Protease, d.h. sie besitzt im aktiven Zentrum ein Cystein und somit einen gegenüber NO sensitiven Angriffspunkt. Inkubierte man RKO-Zellen und NIH3T3-Fibroblasten mit Calpain-Inhibitoren, so kam es zur Akkumulation von p53 (Abbildung 27). Beide Zelllinien reagierten sensitiver auf Calpain-Inhibitor I, der schon bei Konzentrationen weit unter 100 μM zu einer starken Akkumulation von p53 führte. Bei der Behandlung mit Calpain-Inhibitor II mussten Konzentrationen um 100 μM eingesetzt werden, um eine Akkumulation von p53 zu erreichen. Zu beachten ist jedoch, dass Calpain-Inhibitor II spezifischer die proteolytische Aktivität von Calpain hemmt als Calpain-Inhibitor I. Letzterer hemmt auch schon bei niedrigeren Konzentrationen teilweise die Proteasomaktivität ($K_i = 6 \mu\text{M}$). Die Menge an akkumuliertem p53 in NIH3T3 war nach GSNO-Behandlung mit der nach Calpain-Inhibitor II-Behandlung vergleichbar, was auf einen ähnlichen Mechanismus hindeutete.

Um die Spaltung von p53 durch Calpain und den Einfluss von NO auf Calpain direkter zu untersuchen, wurde durch *in vitro* Translation generiertes, ^{35}S -markiertes p53 mit gereinigtem Calpain inkubiert (Abbildung 28, Spur 2). Durch Zugabe von 1 mM GSNO konnte die Spaltung von p53 durch Calpain teilweise verhindert werden (Spur 3). Spur 1 zeigt ^{35}S -p53 ohne Calpain-Inkubation.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass NO die Spaltung von p53 durch Calpain zumindest teilweise verhindern konnte. Die Beurteilung der Ergebnisse mit Calpain-Inhibitoren ist etwas problematisch, da es keine sehr spezifischen Inhibitoren für dieses Enzym gibt und v.a. Calpain-Inhibitor I auch die proteasomale Aktivität teilweise hemmt.

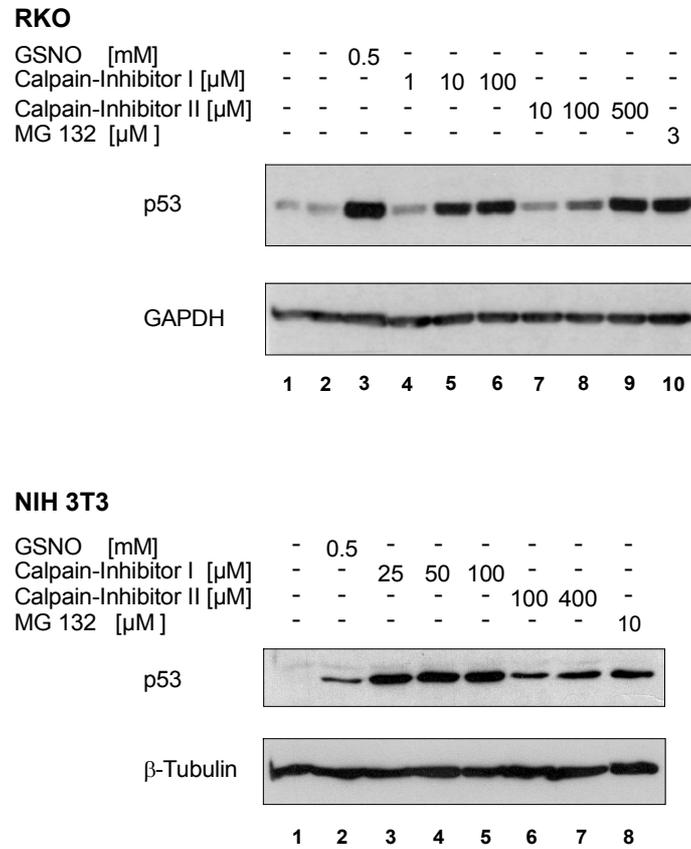


Abbildung 27: Calpain-Inhibitoren führen zur Akkumulation von p53. RKO-Zellen wurden für 8 h und NIH3T3-Fibroblasten für 4 h mit unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Abbildung) Calpain-Inhibitor I oder Calpain-Inhibitor II sowie mit GSNO oder MG 132 inkubiert. Die unbehandelten Kontrollen sind jeweils in Spur 1 gezeigt. RKO-Zellen wurden außerdem mit 5 μ l DMSO inkubiert (RKO, Spur 2). p53 wurde in RKO-Extrakten im Western Blot mit DO-1 Antikörper und in NIH3T3-Extrakten mit PAb122 nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde entweder GAPDH oder β -Tubulin detektiert.

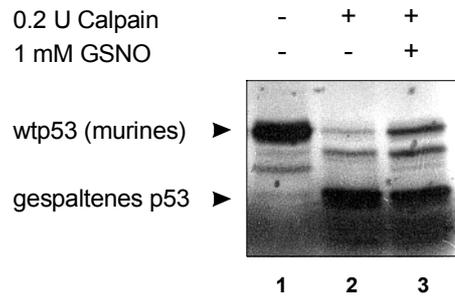


Abbildung 28: NO hemmt calpain-vermittelte p53-Spaltung *in vitro*. *In vitro* translatiertes, ^{35}S -markiertes p53 wurde für 3 h entweder ohne (Spur 1) oder mit 0.2 U Calpain inkubiert (Spuren 2 und 3). Durch Zugabe von 1 mM GSNO wurde die Spaltung von p53 durch Calpain gehemmt (Spur 3). Die Proben wurden durch eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiografie von ^{35}S -p53 detektiert.

4.6.2. NO induziert die Akkumulation von hARF (p14) in Nukleoli

Eine Möglichkeit, die Mdm2-vermittelte Degradation von p53 zu regulieren, ohne die Mdm2-p53-Interaktion zu stören, besteht in der Wechselwirkung mit dem Tumorsuppressorprotein p14^{ARF}. Die Expression von p14^{ARF} führt in wt p53-exprimierenden Zellen durch die Stabilisierung und Aktivierung von p53 zum Zellzyklusarrest. p14^{ARF} wechselwirkt mit Mdm2 und verhindert, ohne die Interaktion zwischen Mdm2 und p53 zu stören, die Degradation von p53. Onkogene, wie E1A oder Myc, führen zur Stabilisierung von p14^{ARF}; DNA-Schädigung führt jedoch nicht zur Akkumulation des INK4a-Genprodukts p14^{ARF}. Ein dimerer Komplex von p14^{ARF} und Mdm2 (also ohne p53) kann in manchen Zellen mit Nukleoli assoziiert gefunden werden. Um zu untersuchen, ob NO-Stimulation zur Akkumulation von p14^{ARF} führt, wurden NHF6 mit NO stimuliert, blieben unbehandelt oder wurden zur Induktion von p14^{ARF} E2F1 adenoviral überexprimiert (Abbildung 29). Anschließend wurden die Zellen gegen p14^{ARF} und p53 gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Phasenkontrastaufnahmen zeigen deutlich den Zellkern mit seinen Nukleoli (durch schwarze Pfeile markiert). Während in der unstimulierten Kontrolle kaum und relativ diffus verteiltes p14^{ARF} zu

detektieren war, konnte nach NO-Stimulation ein deutlicher Anstieg von p14^{ARF} in der Zelle verzeichnet werden, das zudem teilweise mit Nukleoli assoziiert war (weiße Pfeile). E2F1-Überexpression führte ausschließlich zu Nukleoli-assoziiertem p14^{ARF}. p53 akkumulierte nach NO-Stimulation und E2F1-Überexpression.

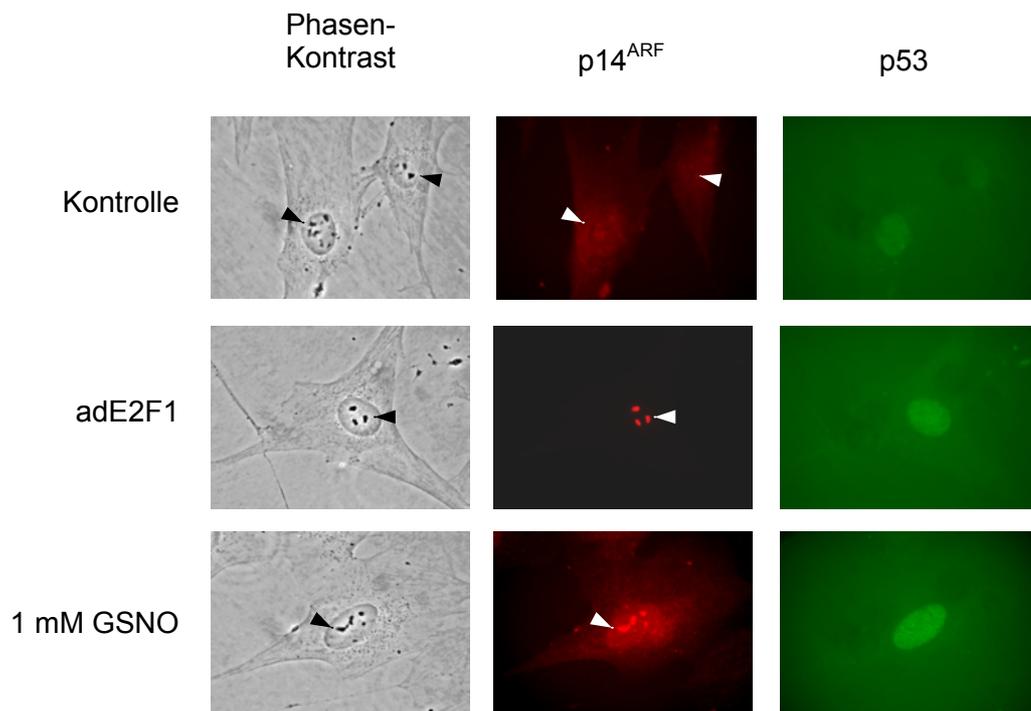


Abbildung 29: NO führt zur Akkumulation von p14^{ARF} in Nukleoli - Immunfluoreszenzfärbung. NHF6-Zellen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit 1 mM GSNO für 20 h inkubiert. Als Positivkontrolle dienten Zellen mit adenoviral überexprimiertem E2F1. Die Zellen wurden fixiert und eine Fluoreszenzfärbung gegen p14^{ARF} (OP02, rot) und p53 (FL-393, grün) durchgeführt. Durch Pfeile markiert sind die Nukleoli, die in Phasen-Kontrastaufnahmen dargestellt werden konnten.

NO führt demnach zur Induktion der p14^{ARF}-Expression oder zumindest zur Translokation von bereits vorhandenem Protein in den Zellkern und die Nukleoli. p14^{ARF} ist jedoch nicht notwendig für die NO-vermittelte Akkumulation von p53, da es auch in Zellen, die kein p14^{ARF} exprimieren, wie z.B. RKO-Zellen (Daten nicht gezeigt), zur p53-Akkumulation nach NO-Behandlung kommt.

5. Diskussion

Durch Zellfraktionierungen und Immunfluoreszenzfärbungen wurde gezeigt, dass p53 nach NO-Behandlung nukleär lokalisiert ist. Western Blot-Analysen zeigten die transkriptionelle Aktivierung des Zielgens *mdm2* durch NO-induziertes p53 in RKO-Zellen (Abbildung 11) und bestätigten vorangegangene Studien (Nakaya *et al.*, 2000). Eindeutiger lässt sich eine direkte transkriptionelle Aktivität von p53 nach NO-Behandlung durch Luciferasemessungen zeigen. Der Luciferase-Assay wurde in NIH3T3-Fibroblasten durchgeführt und die Ergebnisse bestätigten die transkriptionelle Aktivität von NO-induziertem p53 (Abbildung 12). Ebenfalls zu transkriptionell aktivem p53 führte die Stimulation mit MG 132, einer Substanz, die die proteolytische Aktivität des Proteasoms hemmt und dadurch die Degradation von p53 verhindert. Im Zusammenhang mit der transkriptionellen Aktivität wird der Einfluss posttranslationaler Modifikationen, v.a. im N-terminalen Bereich, diskutiert. Im Vordergrund einiger Studien stehen Phosphorylierungen von Serinresten, wie Serin 15, 20, 33 oder/und 37 (Unger *et al.*, 1999; Shieh *et al.*, 1999; Turenne *et al.*, 2001; Ashcroft *et al.*, 1999). In NIH3T3-Fibroblasten, RKO- sowie U2OS-Zellen führte die Stimulation mit NO-Donoren zur Phosphorylierung von p53 an Serin 15 (Abbildung 24). Außerdem konnten Nakaya und Kollegen (2000) nach Stimulation mit dem NO-Donor SNAP die Phosphorylierung von Serin 392 feststellen, welche die tetramere und somit potentiell transkriptionell aktive Form von p53 begünstigt (Nakaya *et al.*, 2000; Sakaguchi *et al.*, 1997). Die Stimulation mit MG 132 führte zu einem transkriptionell aktiven p53 ohne Serin 15-Phosphorylierung. Dies lässt sich durch eine basale transkriptionelle Aktivität von p53 im nicht Serin 15-phosphorylierten Zustand begründen (Dumaz und Meek, 1999), sowie durch eine wesentlich stärkere Akkumulation von p53 in NIH3T3-Fibroblasten nach Inkubation mit MG 132 als mit den NO-Donoren GSNO und SpNO (Abbildung 10 Input oder Abbildung 17, NIH3T3), was zwangsläufig eine höhere Luciferaseaktivität nach sich zieht.

Eine Modulation der Affinität von p53 zu seinen transkriptionellen Co-Aktivatoren, wie z.B. CBP/p300, ist ein möglicher Mechanismus zur Regulierung der transkriptionellen Aktivität von p53. Die Phosphorylierung von p53 an Serin 15 führt zu einer verstärkten Bindung der Co-Aktivatoren CBP/p300 *in vitro* (Lambert *et al.*, 1998; Dumaz und Meek, 1999) und erhöht die transkriptionelle Aktivität von p53 (Avantaggiati *et al.*, 1997; Scolnick *et al.*, 1997).

Die Stabilisierung von p53 wird, nach heutigen Erkenntnissen, weitgehend durch posttranslationale Modifikationen reguliert. Deshalb findet die transkriptionelle Regulation des *p53*-Gens nur wenig Beachtung. In der Regel kann man nach Stress-Einwirkung keine Veränderung der p53-mRNA-Levels feststellen. Das bedeutet jedoch nicht, dass die Regulation der *p53*-Genexpression gänzlich irrelevant ist. Tatsächlich konnte vor einigen Jahren gezeigt werden, dass die p53-mRNA nach Serum-Stimulation ansteigt (Ginsberg *et al.*, 1990), was vermutlich auf das Vorhandensein von Bindestellen für Serum-induzierte Faktoren im p53-Promotor zurückzuführen ist (Reisman *et al.*, 1993). Northern Blot-Analysen zeigten, wie erwartet, dass nach NO-Behandlung keine Regulation der p53-mRNA stattfindet (Abbildung 13). Die Regulation von p53 über die Translation wurde bisher nur in einem autoregulatorischen ‚feedback‘-Mechanismus beschrieben, führt also eher zu verminderten p53-Level (Kubbutat und Vousden, 1998). Da nach NO-Stimulation keine Regulation der p53-mRNA gefunden wurde, aufgrund der Literatur translationelle Effekte auszuschließen sind und eine Verlängerung der Proteinhalfwertszeit von p53 bereits an RAW-Makrophagen in der Arbeitsgruppe gezeigt wurde (Meßmer, 1996), wurden in dieser Arbeit hauptsächlich die Einzelschritte des Abbaus von p53 durch das Ubiquitin-Proteasom-System untersucht.

Das Proteasom stellt die proteolytisch degradierende Instanz dar, die mittels ihrer 19S-Untereinheit ubiquitinierte Proteine erkennt und diese durch die 20S-Untereinheit proteolytisch spaltet. Die fluorimetrische Bestimmung der 20S-Proteasomaktivität zeigte in RKO-Zellen lediglich nach 24-stündiger NO-Behandlung eine Reduktion um etwa 10%, die in NIH3T3-Zellen nicht zu beobachten war (Abbildung 14). Eine Akkumulation von p53 konnte aber schon nach wesentlich kürzeren Stimulationszeiten festgestellt werden. Die starke Hemmung der AMC-Freisetzung, also verminderte 20S-Proteasomaktivität nach Inkubation von NIH3T3-Fibroblasten und RKO-Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG 132, zeigte, dass der Assay an sich funktionierte. Das fluorogene Proteasomsubstrat, s-LLVY-AMC, wird ohne vorherige Ubiquitinierung durch die proteolytische Aktivität des 20S-Proteasoms gespalten. Es ist also keine Erkennung durch die 19S-Untereinheit erforderlich. Sollte NO Einfluss auf die Substraterkennung, d.h. die Erkennung von ubiquitiniertem p53 haben, könnte das durch diesen Assay nicht erfasst werden. Im Western Blot lassen sich mit anti-Ubiquitin-Antikörper sämtliche ubiquitinierten Proteine detektieren, die sich auf Grund ihrer unterschiedlichen Molekulargewichte nur als ‚Schmier‘ darstellen (Abbildung 15). Auch hier zeigt sich nach Inhibition des Proteasoms

eine Verstärkung des Signals im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Dagegen kann nach NO-Stimulation keine Veränderung festgestellt werden. Ein genereller Einfluss von NO auf die Erkennung ubiquitinerter Proteine durch das 19S-Proteasom ist demnach auszuschließen. Ob die Erkennung mancher Proteine durch NO verhindert wird, ist im Einzelfall zu prüfen.

Ein wesentlicher Schritt in der Degradation von p53 ist seine Ubiquitinierung durch Mdm2 (Fuchs *et al.*, 1998; Fang *et al.*, 2000,). Die Wechselwirkung von Mdm2 und p53 scheint durch Phosphorylierung am N-Terminus, v.a. an Serin 15, reguliert zu werden. Hierbei führt die Phosphorylierung zum Abbruch der Interaktion beider Proteine und dadurch zur Stabilisierung von p53 (Shieh *et al.*, 1997). Außerdem wird angenommen, dass die Bindung von p53 an Mdm2 zur transkriptionellen Inaktivierung von p53 führt (Oliner *et al.*, 1993; Wadgaonkar und Collins, 1999; Thut *et al.*, 1997). Die Ergebnisse der Co-Immunopräzipitation zeigten deutlich die Wechselwirkung von p53 mit Mdm2 auch nach NO-Stimulation (Abbildung 17). Wie durch Luciferasemessungen gezeigt wurde, ist p53 nach NO-Stimulation aber auch transkriptionell aktiv, was scheinbar im Widerspruch zu den vorherigen Untersuchungen steht. Zudem konnte im Co-Präzipitat von Mdm2 auch an Serin 15 phosphoryliertes p53 gefunden werden, was in dieser Weise bisher für kein anderes Stimulans gezeigt werden konnte (Abbildung 18). Dies stützt kontroverse Ergebnisse aus früheren Untersuchungen von Dumaz und Meek (1999), die zeigen, dass die transkriptionelle Aktivität der p53-Mutante S15D in Abhängigkeit von steigenden Mengen coexprimiertem Mdm2 gesenkt, d.h. Mdm2-vermittelt degradiert werden kann. Hierbei täuscht die Asparaginsäure ein phosphoryliertes Serin 15 vor. Ersetzt man Serin durch Alanin (Synonym für die unphosphorylierte Form), so ist die transkriptionelle Aktivität der S15A-Mutante auch in Mdm2-negativen Zellen niedriger als die des wt p53. Diese Ergebnisse lassen auf eine Mdm2-unabhängige Regulation der transkriptionellen Aktivität von p53 schließen. Der allgemein akzeptierte Mechanismus, wie er z.B. für UV induziertes, Serin 15-phosphoryliertes p53 proklamiert wird, führt durch die Phosphorylierung zum Abbruch der Interaktion von p53 und Mdm2 (Maki, 1999; Fuchs *et al.*, 1998). Außerdem wird die *Mdm2*-Expression vermindert, was zusätzlich zur verminderten Ubiquitinierung und somit zur Stabilisierung von p53 beiträgt. Die NO-induzierte Akkumulation von p53 basiert also auf einem Mechanismus, der sich von der UV-induzierten p53-Akkumulation in diesen Aspekten deutlich unterscheidet und auf eine Regulation der transkriptionellen Aktivität - unabhängig von Mdm2 - schließen lässt.

Wang *et al.* (2002) berichteten kürzlich über einen transienten Abfall der Mdm2-Konzentration kurz nach der Stimulation mit GSNO, wie er auch nach UV-Bestrahlung zu beobachten ist, und erklärten damit den frühen Anstieg von p53 nach NO-Stimulation. Die p53-Stabilisierung in einer zweiten, späteren Phase, in welcher die Mdm2-Konzentration durch Transaktivierung über Kontrolllevel ansteigt, konnten sie jedoch nicht erklären.

Der Einfluss direkter Nitrosierungen auf die p53-Mdm2-Wechselwirkung konnte durch *in vitro* Co-Immunopräzipitationen ausgeschlossen werden (Abbildung 16).

Die Wechselwirkung zwischen p53 und Mdm2 ist nach NO-Behandlung noch intakt. Damit ist aber noch nicht garantiert, dass eine effiziente Ubiquitinierung von p53 stattfindet. Das aktive Zentrum der E3-Ligasefunktion von Mdm2 besteht aus insgesamt 8 Cystein- und Histidinresten, die zwei ineinander greifende Zn^{2+} -Koordinationsstellen bilden, die sogenannte RING-Finger Domäne (Lai *et al.*, 1998; Boddy *et al.*, 1994; Fang *et al.*, 2000). NO ist in der Lage, die intrazelluläre Konzentration an freiem Zn^{2+} zu erhöhen (Berendij *et al.*, 1994) und führt *in vitro* zur Freisetzung von komplexgebundenem Zn^{2+} aus Metallothionein (Kröncke *et al.*, 1994). Im Fall von Mdm2 würde ein Herauslösen des komplexierten Zn^{2+} zur Zerstörung der E3-Ligase-Funktion und somit zu vermindert ubiquitiniertem p53 führen (Fang *et al.*, 2000). Außerdem scheint eine funktionsfähige RING-Finger Domäne für den nukleären Export von p53 nötig zu sein, wobei ein Exportmechanismus zugrundegelegt wird, bei welchem Mdm2 eine direkte Bindung mit p53 vor oder sogar während des nukleären Exports eingeht (Tao und Levine, 1999; Geyer *et al.*, 2000; Boyd *et al.*, 2000). Obwohl Mdm2 eine nukleäre Exportsequenz (NES) besitzt, ist nur die im p53 vorhandene für den Export notwendig. Neueste Studien lassen den Schluss zu, dass eine Ubiquitinierung von p53 die NES für die Bindung des Exportkomplexes zugänglich macht (Liang und Clarke, 2001).

Für den Einfluss von NO auf die RING-Finger Domäne gibt es jedoch keinen Anhaltspunkt. Untersuchungen mit dem Ubiquitinierungsassay zeigten, dass das Ausmaß der Ubiquitinierung von HA-p53 stark von der Menge an co-exprimiertem Mdm2 abhängig ist (Abbildung 20). Die Stimulation mit NO hatte keinen Einfluss auf die Ubiquitinierung von HA-p53 nach der Co-Expression mit verschiedenen Mengen Mdm2. Auch nach verschiedenen Stimulationszeiten mit SpNO konnte keine Veränderung festgestellt werden (Abbildung 21). Scheinbar nimmt in diesem Versuch die Ubiquitinierung bei längeren Stimulationszeiten zu, was sich aber durch die Zunahme an HA-p53 wieder relativiert, so dass letztlich keine Veränderung festzustellen war. Wie

erwartet, nahm die Ubiquitinierung nach UV-Behandlung ab, was durch die Herunterregulierung von Mdm2 und den Abbruch der p53-Mdm2-Interaktion zu erklären ist. Eine deutliche Zunahme an ubiquitiniertem HA-p53 konnte durch eine Hemmung des Proteasoms mit MG 132 erzwungen werden. Die Kontrollen beweisen die Funktionalität des Testsystems. Die Überexpression von HA-markiertem p53 bietet zwei Vorteile: Erstens ist eine Detektion geringer Mengen HA-p53 durch den sehr sensitiven HA-Antikörper möglich. Zweitens findet man überexprimiertes HA-p53 in Kontrolle und NO-stimulierter Probe in ähnlichen Mengen (siehe auch Wang *et al.*, 2002), so dass die beiden Proben im Western Blot relativ einfach verglichen werden können.

Um einen unerwünschten Effekt durch Überexpression oder HA-Markierung auszuschließen, wurde die Ubiquitinierung von endogenem p53 untersucht. Der Einsatz von RKO-Zellen ließ die Verwendung eines sensitiven p53-Antikörpers, der ausschließlich humanes p53 erkennt, zu und ermöglichte damit die direkte Detektion von ubiquitiniertem endogenem p53 (Abbildung 22). Die Auswertung der Ergebnisse ist durch die unterschiedliche p53-Expression in der unbehandelten Kontrolle und den stimulierten Proben aber problematisch. Nach NO-Stimulation konnte zwar eine verstärkte Ubiquitinierung von p53 im Western Blot detektiert werden, diese ist aber lediglich auf die NO-vermittelte Induktion, also eine erhöhte Menge an p53 in den einzelnen Proben bzw. Spuren im Western Blot, zurückzuführen. UV-Bestrahlung und Hemmung des Proteasoms mit MG 132 führten zu den bereits für HA-p53 beobachteten Ergebnissen. Dies bedeutet, dass nach NO-Behandlung weder exogenes noch endogenes p53 in seinem Ubiquitinierungsstatus verändert ist.

Die Ubiquitinierung von p53 kann sowohl im Cytoplasma als auch im Kern stattfinden (Yu *et al.*, 2000), wobei der proteasomale Abbau im Cytoplasma durchgeführt wird. Nach NO-Behandlung akkumuliert p53 aber nukleär. Eine Betrachtung der Verteilung von ubiquitiniertem p53 ist daher von Interesse. Zu diesem Zweck wurden RKO-Zellen mit GSNO stimuliert und in eine nukleäre sowie cytoplasmatische Fraktion zerlegt (Abbildung 23). Western Blot-Analysen zeigten, dass nach NO-Stimulation ubiquitiniertes p53 überwiegend im Zellkern lokalisiert ist. Zudem handelt es sich um höher ubiquitinierte Formen, d.h. um p53, das mit mehr Ubiquitinresten versehen ist als cytoplasmatisches p53. Das im Cytoplasma detektierte p53 war weniger stark ubiquitiniert. Diese Ergebnisse korrelieren mit den Literaturdaten, die die Möglichkeit einer Mdm2-abhängigen Ubiquitinierung von p53 in Cytoplasma und Nukleus postulieren (Yu *et al.*, 2000).

Für den nukleären Export von p53 werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Dabei könnte, wie schon angesprochen, die Ubiquitinierung von p53 zur Demaskierung der NES von p53 führen (Liang und Clarke, 2001; Lohrum *et al.*, 2001), so dass einem Export von p53 nichts mehr im Weg stünde und eine gleichmässige Verteilung von ubiquitiniertem p53 in Cytoplasma und Nukleus zu erwarten wäre. Unklar ist auch, ob während des nukleären Exports Mdm2 an p53 gebunden ist oder vor dem Passieren des Kernporenkomplexes abdissoziieren muss. p53 ist nicht unbedingt auf die NES von Mdm2 angewiesen (Boyed *et al.*, 2001). Da es eigene NES besitzt, ist es durchaus möglich, dass p53 ohne Mdm2-Bindung den Kern verlassen kann. Vielleicht hindert gerade die Mdm2-Bindung p53 an seinem nukleären Export. Da p53 nach NO-Stimulation transkriptionell aktiv ist, kann davon ausgegangen werden, dass zumindest ein Teil in der tetrameren Form vorliegt. Zudem wechselwirkt es mit Mdm2. Dies könnten Gründe für eine Hemmung des nukleären Exports von p53 nach NO-Stimulation sein, was schließlich zur Akkumulation von p53 führen würde. p53 ist zwar ubiquitiniert, aber NO-Behandlung führt auch zur Phosphorylierung von p53 an Serin 392, was wiederum zur Stabilisierung der tetrameren Form beiträgt (Sakaguchi *et al.*, 1997). Zellfraktionierungen und Immunfluoreszenzfärbungen lassen nur Rückschlüsse auf eine momentane Verteilung von p53 zu. Um herauszufinden, ob NO einen Einfluss auf das nukleocytoplasmatische ‚shuttling‘ von p53 hat, wurden Heterokaryon-Analysen durchgeführt. Mit dem Heterokaryon-Assay (Abbildung 4) kann geklärt werden, ob p53 nach NO-Behandlung in der Lage ist den Zellkern zu verlassen, um im Cytoplasma degradiert werden zu können. Zhang und Xiong (2001) konnten zeigen, dass p53 neben der C-terminalen NES eine zweite im N-terminalen Bereich besitzt. Diese ist nicht so stark in ihrer Wirkung wie die C-terminale NES, genügt aber, um eine Akkumulation von p53 auszulösen (Zhang, persönliche Mitteilung). Die N-terminale NES umspannt die Aminosäurereste 11-27 (Zhang und Xiong, 2001). In ihr befinden sich also auch die beiden kritischen Serinreste 15 und 20, die nach Stress oft phosphoryliert sind. Die Heterokaryon-Analysen (Abbildung 25) zeigten, dass Serin 15-phosphoryliertes p53 nicht mehr in der Lage ist, den Kern zu verlassen. Eine spontane Dephosphorylierung von Serin 15-phosphoryliertem p53 in Saos-2-Nuklei wird ausgeschlossen, da die Zellen durch Paraformaldehyd sehr schnell und effizient fixiert werden, so dass zumindest ein Teil gefärbt werden müsste. Ob weitere Aminosäurereste der NES oder benachbarter Regionen in den Export involviert sind, bleibt zu klären. Leptomycin B (LMB)-Stimulation führte ebenfalls zur Akkumulation von p53, was auf

einen CRM1-vermittelten nukleären Export von p53 schließen lässt (Abbildung 18; Roth *et al.*, 1998). CRM1 bindet normalerweise an Leucin-reiche NES. p53 und Mdm2 besitzen solche Exportsequenzen (Fornerod *et al.*, 1997). Durch Co-Immunopräzipitationen konnte erstmals gezeigt werden, dass CRM1 direkt oder zumindest indirekt mit Mdm2 wechselwirkt (Abbildung 26). Dazu wurde Mdm2 aus RKO-Zelllysats präzipitiert und CRM1 im Co-Präzipitat detektiert. Da RKO-Zellen p53 exprimieren und auch die Wechselwirkung von Mdm2 mit p53 gezeigt werden konnte, bleibt offen, ob CRM1 direkt oder indirekt über p53 mit Mdm2 interagiert. Ein Einfluss von NO auf die Wechselwirkung von CRM1 mit Mdm2 bzw. p53 konnte jedoch nicht gezeigt werden. Weitere Studien mit p53-negativen und Mdm2-positiven Saos-2-Zellen sollten über diesen Sachverhalt Aufschluss geben.

Ein anderer Ansatz zur Erklärung einer p53-Akkumulation nach NO-Behandlung, wäre die Induktion des humanen Tumorsuppressors p14^{ARF} (p19^{ARF} ist das murine Äquivalent). p14^{ARF} ist neben p53 das am häufigsten mutierte Gen in Tumoren (Zhang und Xiong, 2001). Es wird in der Regel von Onkoproteinen wie E1A oder Myc induziert. DNA-Schädigungen führen nicht zu einer Akkumulation von p14^{ARF} (Kubbutat und Vousden, 1998). Umso interessanter ist das Ergebnis, dass NO das Potenzial besitzt, p14^{ARF} in NHF6 zu induzieren (Abbildung 22), und sich somit in einem weiteren Punkt von DNA-schädigenden Substanzen in der Vermittlung der p53-Akkumulation unterscheidet. NO-Stimulation führte zur Akkumulation und Rekrutierung von p14^{ARF} im Zellkern, wobei ein Teil mit Nukleoli co-lokalisierte. Die adenovirale Überexpression von E2F1 führte ausschließlich zu p14^{ARF}, das mit Nukleoli co-lokalisierte. Dies könnte aber auch durch die nur schwer kontrollierbare Überexpression von E2F1 zustande kommen. In den momentan existierenden Modellen einer p14^{ARF}-vermittelten Stabilisierung von p53 scheint es jedoch keine Rolle zu spielen, ob p14^{ARF} mit den Nukleoli im Zellkern sublokalisiert ist; wichtig ist die nukleäre Lokalisation (Zhang und Xiong, 2001). Untersuchungen mit endogenem p14^{ARF} sind insofern problematisch, als Zelllinien mit zunehmender Passagenzahl zu Mutationen von p14^{ARF} neigen. In vielen Zelllinien, wie z.B. in RKO-Zellen (Daten nicht gezeigt), wird p14^{ARF}, auch nach Überexpression von E2F1, nicht mehr exprimiert. Deshalb können die Daten aus den Experimenten mit NIH3T3-Fibroblasten, RKO- oder U2OS-Zellen nicht ohne weiteres auf NHF6 übertragen werden. Dies zeigt aber zudem, dass p14^{ARF} zur NO-vermittelten Akkumulation nicht unbedingt notwendig ist (siehe auch Wang *et al.*, 2002).

Verschiedene Mechanismen der NO-vermittelten p53-Akkumulation können also aufgrund der in dieser Arbeit gewonnen und bereits bekannten Daten entworfen werden:

1. NO führt zur nukleären Akkumulation von p14^{ARF}, welches teilweise sogar mit Nukleoli assoziiert vorliegt. p14^{ARF} verhindert durch seine Wechselwirkung mit Mdm2 den Mdm2-abhängigen nukleären Export von p53. Dies kann auf zwei Arten geschehen: Einerseits, indem p14^{ARF} die Interaktion von Mdm2 und p53 stört und Mdm2 mit den Nukleoli assoziiert (im Schema rechts). Andererseits führt die Stimulation mit NO nicht zur vollständigen Lokalisation von p14^{ARF} mit den Nukleoli, sondern ist auch ‚frei‘ im Nukleoplasma zu finden. Zudem ist Mdm2 in der Lage, p14^{ARF} aus den Nukleoli zu rekrutieren (Zhang und Xiong, 1999). Dabei könnte es mit Mdm2 und p53 einen ternären Komplex eingehen, der ebenfalls nicht exportiert werden kann (im Schema links).

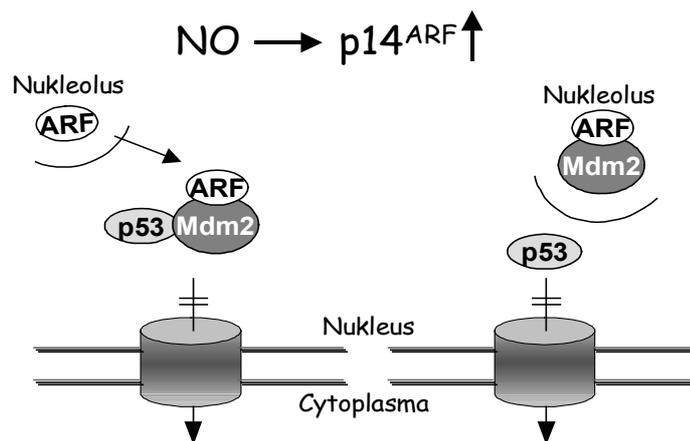


Abbildung 30: NO verhindert den nukleären Export von p53 durch Induktion von p14^{ARF}. Schematische Darstellung.

2. Nach NO-Stimulation akkumuliert p53 auch in Zellen, die kein p14^{ARF} mehr exprimieren.
 - A. NO-Behandlung führt zur Phosphorylierung von p53 an Serin 15 und Serin 392. Möglicherweise verhindert die Serin 15-Phosphorylierung die Bindung des Exportrezeptors CRM1 in der N-terminalen NES. Die Phosphorylierung an Serin 392 stabilisiert zudem die tetramere Form, die zur Maskierung der C-terminalen NES von p53 führt.

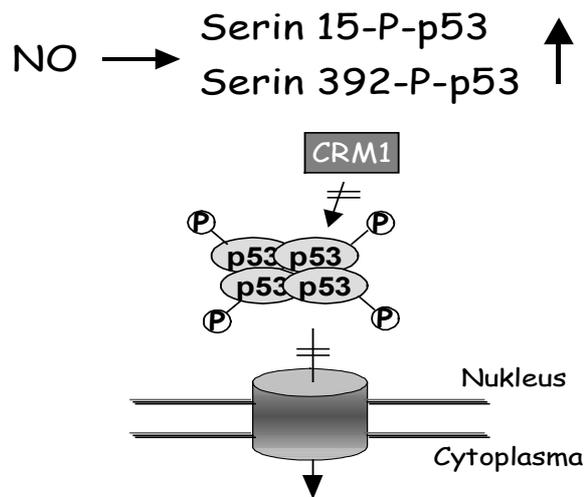


Abbildung 30A: Schematische Darstellung Nr. 1 eines postulierten Mechanismus der NO-vermittelten Akkumulation von p53 (in Zellen ohne p14^{ARF}-Expression).

B. Damit p53 aus dem Kern exportiert werden kann, muss es ubiquitiniert werden. Vor dem Export muss Mdm2 abdissoziieren, damit CRM1 an p53 binden kann. Nach NO-Behandlung ist die Ubiquitinierung zwar vorhanden, Mdm2 löst sich aber nicht von p53, womit der Export verhindert werden könnte.

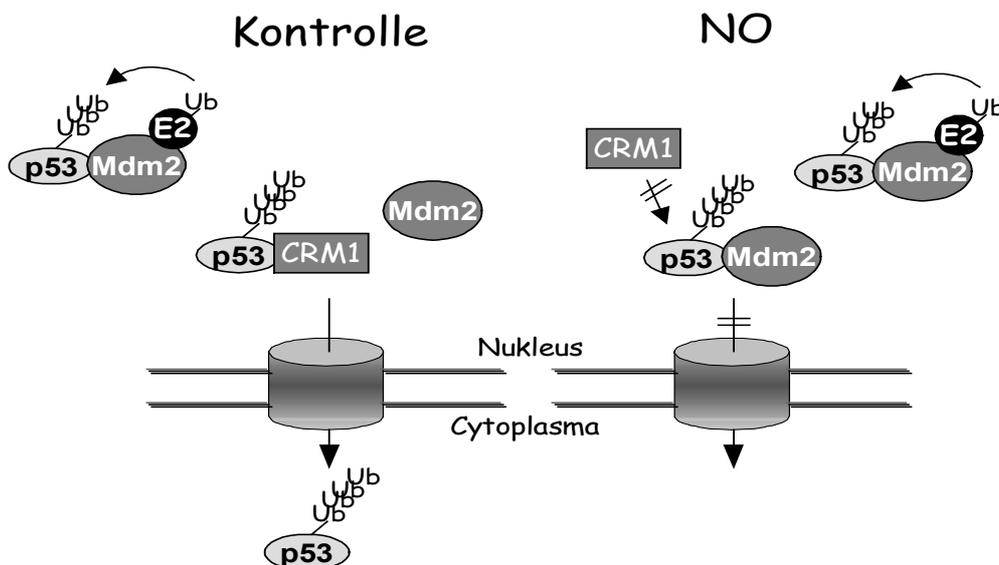


Abbildung 30B: Schematische Darstellung Nr. 2 eines postulierten Mechanismus der NO-vermittelten Akkumulation von p53 (in Zellen ohne p14^{ARF}-Expression).

Neben der Degradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System kann p53 auch durch die cytosolische Cysteinprotease Calpain gespalten werden. Die Hemmung von Calpain durch Calpain-Inhibitoren führte zur Stabilisierung von p53 (Abbildung 27; Gonen *et al.*, 1997; Kubbutat und Vousden, 1997). Zu bedenken ist jedoch, dass die exogen zugeführten Calpain-Inhibitoren I und II auch teilweise das Proteasom hemmen. *In vitro* translatiertes ³⁵S-markiertes p53 konnte durch Calpain gespalten werden (Abbildung 28). Die Zugabe von NO verhinderte die Calpain-vermittelte Spaltung von p53, so dass ein hemmender Effekt von NO auf die Cystein-Protease angenommen werden kann. Die eindeutigsten Ergebnisse liefert die Überexpression von Calpastatin, dem zelleigenen Inhibitor von Calpain. Die Überexpression von Calpastatin führt zur Akkumulation von p53 (Pariat *et al.*, 1997). Calpainaktivität ist im Nukleus vor der DNA-Synthese zu finden. Die Hemmung von Calpain führt zur Akkumulation von p53 sowie p21 und hemmt die DNA-Synthese (Zhang *et al.*, 1997). Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Spaltung von p53 durch Calpain während der G1-Phase es der Zelle erlaubt in die S-Phase überzutreten. Die Hemmung von Calpain besitzt also einen weitreichenden Einfluss auf den Zellzyklus besitzt. Es ist dennoch fraglich, ob die Akkumulation von p53 in dieser Situation ein direkter oder eher ein indirekter Effekt ist. Geht man von einer Calpainaktivität aus, die vorwiegend cytoplasmatisch ist, so ist die hemmende Wirkung von NO als redundant einzuschätzen, da die hemmende Wirkung von NO auf den nukleären Export zuerst zum Tragen käme.

Diese Studie zeigt, dass die Akkumulation von p53 nach NO-Behandlung auf der Hemmung des nukleären Exports von Serin 15-phosphoryliertem p53 beruht. Die durch NO hervorgerufene Serin 15-Phosphorylierung von p53 führt nicht zum Abbruch der Wechselwirkung zwischen p53 und seiner E3-Ligase, Mdm2. Die zum Abbau von p53 notwendige Ubiquitinierung wird nicht durch NO beeinflusst. Zudem konnte gezeigt werden, dass NO in NHF6 p14^{ARF} induziert, welches durch Hemmung des nukleären Exports ebenfalls eine Akkumulation von p53 verursacht. Da p53 auch in p14^{ARF}-negativen Zellen nach NO-Behandlung akkumuliert, müssen zwei prinzipiell unterschiedliche Mechanismen existieren, die in p14^{ARF}-positiven Zellen auch gleichzeitig zum Tragen kommen können.

Da in der Literatur kontroverse Ergebnisse zur Regulation und zum Mechanismus des nukleären Exports von p53 zu finden sind, ist es sicherlich notwendig, in diesem Bereich

noch tiefgründiger zu forschen. Die Klärung des nukleären Exportmechanismus von p53 ist von großer Bedeutung, da man sich erhofft über, ihn mögliche Therapieansätze zur Tumorbekämpfung zu erschließen. Da NO ein ubiquitärer Stoff im Körper ist und auch in Therapien bereits Verwendung findet, ist gerade der NO-vermittelte Mechanismus der p53-Akkumulation von großem Interesse.

6. Zusammenfassung

p53 und NO sind zwei Moleküle mit großer Bedeutung für den menschlichen Organismus. Beide beeinflussen den Zellzyklus und sind entweder Auslöser (NO) oder Vermittler der Apoptose, d.h. NO induziert eine Signalkaskade die, teilweise p53-abhängig, zur Apoptose führt. Seit Beginn der 90er Jahre ist bekannt, dass p53 unter Einfluss von NO akkumuliert. Dieses Erkenntnis ist inzwischen für mehrere Zellsysteme etabliert. Dabei spielt es keine Rolle, ob NO über NO-Donoren oder durch Stimulation endogener NO-Synthasen zugeführt wird. In der Regel wird p53 nach NO-Einwirkung über eine Verlängerung seiner Halbwertszeit reguliert. Northern Blot-Analysen schlossen eine p53-mRNA-Erhöhung nach Stimulation mit NO aus. Es wird deshalb ein hemmender Einfluss von NO auf die p53-Degradation vermutet. Der molekulare Mechanismus der p53-Akkumulation nach NO-Einwirkung wurde in der vorliegenden Arbeit näher untersucht:

- Die Stimulation mit dem NO-Donor GSNO führte in NIH3T3-Fibroblasten, RKO-Zellen und U2OS-Zellen zur Akkumulation von p53. Dabei konnten unterschiedliche Zeit- und Konzentrationsabhängigkeiten der verschiedenen Zelllinien beobachtet werden. Das akkumulierte p53 ist vorwiegend nukleär lokalisiert und transkriptionell aktiv.
- Eine Regulation der p53-Stabilität durch transkriptionelle Induktion des *p53*-Gens konnte durch Northern Blot-Analysen ausgeschlossen werden.
- p53 wird hauptsächlich über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut. Die Interaktion von p53 mit seiner E3-Ligase Mdm2 ist für die Ubiquitinierung von p53 notwendig. Durch Co-Immunoprecipitationsversuche konnte gezeigt werden, dass p53 auch nach NO-Stimulation noch mit Mdm2 wechselwirkt. Dies ist interessanterweise trotz Serin 15-Phosphorylierung der Fall. Ein Einfluss auf die Ubiquitinierung von exogenem HA-p53 und endogenem p53, wie er durch UV-Bestrahlung oder Hemmung des Proteasoms zu verzeichnen war, konnte nach NO-Stimulation nicht festgestellt werden. Durch Messungen der Proteasomaktivität und Analyse ubiquitiniertes Proteine im Zelllysat ließ sich ein direkter Effekt von NO auf die proteolytische Aktivität des Proteasoms ausschließen.

- Die Cysteinprotease Calpain kann p53 im N-terminalen Bereich proteolytisch spalten. Eine Hemmung dieser Protease mit Calpain-Inhibitor I und II führte zur Akkumulation von p53. Beide Stoffe hemmen aber ab bestimmten Konzentrationen auch die proteolytische Aktivität des Proteasoms. ^{35}S -markiertes p53 konnte *in vitro* durch gereinigtes Calpain gespalten werden. Eine gleichzeitige Inkubation mit GSNO verhinderte teilweise die Spaltung des ^{35}S -markierten p53.
- Es konnte gezeigt werden, dass p53 durch NO an Serin 15 phosphoryliert wird. Da weder die Bindung an Mdm2 noch die Ubiquitinierung von p53 nach NO-Stimulation beeinträchtigt war, wird ein Einfluss der Serin 15-Phosphorylierung von p53 auf den nukleären Export vermutet. Zudem konnte gezeigt werden, dass höher ubiquitiniertes p53 nach NO-Behandlung vorwiegend nukleär zu finden ist. Heterokaryon-Analysen bestätigten die Annahme, dass Serin 15-phosphoryliertes p53 nicht mehr in der Lage ist, den Kern zu verlassen. Aufgrund des gehemmten nukleären Exports kann Serin 15-phosphoryliertes p53 nicht mehr ins Cytoplasma gelangen, um dort vom Proteasom degradiert zu werden, was letztlich zur Akkumulation von p53 führt.
- NHF6 exprimieren wt p14^{ARF}, ein Tumorsuppressorprotein, das über die Wechselwirkung mit Mdm2 in die Regulation der p53-Stabilität eingreifen kann. Durch NO-Behandlung kam es zur Akkumulation von p14^{ARF} im Nukleus, das teilweise mit Nukleoli assoziierte. Die Akkumulation von p14^{ARF} stellt einen weiteren möglichen Mechanismus zur p53-Akkumulation dar. Da es jedoch in Zellen, die kein p14^{ARF} exprimieren, nach NO-Behandlung ebenso zur Akkumulation von p53 kommt, bleibt offen, welchen Stellenwert der Mechanismus einer p14^{ARF}-vermittelten Akkumulation neben der Blockade des nukleären Exports durch Serin 15-Phosphorylierung einnimmt.

7. Literaturverzeichnis

- Abrams, J. (1987). A symposium: nitroglycerin therapy - contemporary perspective. *Am. J. Cardiol* **60**: 1H-48H
- Akakura, S., Yoshida, M., Yoneda, Y., Horinouchi, S. (2001). A role for Hsc70 in regulating nucleocytoplasmic transport of a temperature-sensitive p53 (p53Val-135). *J. Biol. Chem.* **276**:14649-14657.
- Albina, J. E., Cui, S., Mateo, R. B., Reichner, J. S. (1993). Nitric oxide-mediated apoptosis in peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **147**:347-350.
- Appella, E., Anderson, C. W. (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur. J. Biochem.* **268**:2764-2772.
- Arrowsmith, C. H., Morin, P. (1996). New insights into p53 function from structural studies. *Oncogene* **12**:1379-1385.
- Aschcroft, M., Kubbutaat, M. H. G., Vousden, K. H. (1999). Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **19**:1751-1758.
- Assreuy, J. Cunha, F. Q., Liew, F. Y., Moncada, S. (1993) Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* **108**:833-837.
- Avantaggiati, M. L., Ogryzko, V., Gardner, K., Giordano, A., Levine, A. S., Kelly, K. (1997). Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* **89**:1175-1184.
- Barak, Y., Juven, T., Haffner, T., Oren, M. (1993). mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* **12**:461-468.
- Bargonetti, J. P., Friedman, N., Kern, S. E., Vogelstein B, Prives C. (1991). Wild-type but not mutant p53 immunopurified proteins bind to sequences adjacent to the SV40 origin of replication. *Cell* **65**:1083-1091.
- Baumeister, W., Walz, J., Zühl, F., Seemüller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**:367-380.
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., Freeman, B. A. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:1620-1624.

- Benetti, R., Del Sal, G., Monte, M., Paroni, G., Brancolini, C., Schneider, C. (2001). The death substrate Gas2 binds m-calpain and increases susceptibility to p53-dependent apoptosis. *EMBO J.* **20**:2720-2714.
- Berendji, D., Kolb-Bachofen, V., Meyer, K.L., Grapenthin, O., Weber, H., Wahn, V., Kroncke, K.D. (1997) Nitric oxide mediates intracytoplasmic and intranuclear zinc release. *FEBS Lett.* **405**(1):37-41.
- Boddy, M. N., Freemont, P. S., Borden, K. L. (1994). The p53-associated protein MDM2 contains a newly characterized zinc-binding domain called the RING finger. *Trends Biochem Sci.* **19**:198-199.
- Borer, R. A., Lehner, C. F., Eppenberger, H. M., Nigg, E. A. (1989). Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* **56**:379-390.
- Boyd, S.D., Tsai, K.Y., Jacks, T. (2000). An intact HDM2 RING-finger domain is required for nuclear exclusion of p53. *Nat Cell Biol.* **2**:563-568
- Brancolini, C., Bottega, S., Schneider, C. (1992). Gas2, a growth arrest-specific protein, is a component of the microfilament network system. *J. Cell Biol.* **117**:1251-1261.
- Bredt, D. S., Hwang, P. M., Glatt, C. E., Lowenstein, C., Reed, R. R., Snyder, S. H. (1991). Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* **351**:714-718
- Breitschopf, K., Bengal, E., Ziv, T., Admon, A., Ciechanover, A. (1998). A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *EMBO J.* **17**:5964-
- Brockhaus, F., Brüne, B. (1998). U937 apoptotic cell death by nitric oxide: Bcl-2 downregulation and caspase activation. *Exp. Ell. Res.* **238**:33-41.
- Brüne, B., Golkel, C., von Knethen, A. (1996a). Cytokine and low-level nitric oxide prestimulation block p53 accumulation and apoptosis of RAW 264.7 macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**:396-401.
- Brüne, B., Gotz, C., Messmer, U. K., Sandau, K., Hirvonen, M. R., Lapetina, E. G. (1997). Superoxide formation and macrophage resistance to nitric oxide-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **272**:7253-7258.

- Brüne, B., Lapetina, E. G. (1991). Phosphorylation of nitric oxide synthase by protein kinase A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**:921-926.
- Brüne, B., von Knethen, A., Sandau, K. (1998). Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur. J. Pharmacol.* **351**:261-271.
- Busconi, L., Michel, T. (1995): Endothelial nitric oxide synthase: N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J. Biol. Chem.* **270**:995-998.
- Butler, A. R., Flintney, F. W., Williams, D. L. H. (1995) NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends Pharmacol. Sci.* **16**:18-22
- Chen, J. D., Wu, X. W., Lin, J. Y., Levine, A. J. (1996). Mdm2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor suppressor protein. *Mol. Cell. Biol.* **16**:2445-2452.
- Chen, J., Lin, J., Levine, A.J. (1995). Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the mdm-2 oncogene. *Mol. Med.* **1**, 142-152
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D., Pavletich, N. P. (1994). Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* **265**:346-355
- Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* **17**(24):7151-7160.
- Davis, D.W., Weidner, D.A., Holian, A., McConkey, D.J. (2000). Nitric oxide-dependent activation of p53 suppresses bleomycin-induced apoptosis in the lung. *J. Exp. Med.* **192**, 857-869
- Dawson, T. M., Dawson, V. L., Snyder, S. H. (1992). A novel neuronal messenger in the brain: the free radical, nitric oxide. *Ann. Neurol.* **32**:297-311.
- de Rozières, S., Maya, R., Oren, M., Lozano, G. (2000). The loss of mdm2 induces p53 mediated apoptosis. *Oncogene* **19**:1691-1697.
- de Stanchina, E., McCurrach, M. E., Zindy, F., Shieh, S. Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A. V., Prives, C., Roussel, M. F., Sherr, C. J., Lowe, S. W. (1998). E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev.* **12**:2434-2442.

- Dimmeler, S., Lottspeich, F., Brüne, B. (1992). Nitric oxide causes ADP-ribosylation and inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **267**:16771-16774.
- Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A. Jr, Butel, J. S., Bradley, A. (1992). Mice deficient in for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**:215-221.
- Doyle, A. G., herbein, g., montaner, L. J., Nity, A.J. Caput, D., Ferrara, P., Gordon, S. (1994) Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages *in vitro*: comparison with interleukin-4 and interferon- γ . *Eur. J. Immunol.* **24**: 1441-1445.
- Dumaz, N., Meek, D.W. (1999). Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *EMBO J.* **18**, 7002-7010
- El-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat. Genet.* **1**:45-51.
- El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**:817-825.
- Fang, S., Jensen, J. P., Ludwig, R. L., Vousden, K. H., Weissman, A. M. (2000). Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J. Biol. Chem.* **275**:8945-8951
- Fehsel, K., Kroncke, K. D., Meyer, K. L., Huber, H., Wahn, V., Kolb-Bachofen, V. (1995). Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *J. Immunol.* **155**:2858-2865
- Fields, S., Jang, S. K. (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science* **249**:1046-1049.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., Mattaj, I. W. (1997). CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**:1051-1061.

- Fornerod, M., Van Deursen, J., Van Baal, S., Reynolds, A., Davis, D., Murti, K. G., Fransen, J., Grosveld, G. (1997a). The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88. *EMBO J.* **16**:807-816.
- Friedman, P. N., Chen, X., Bargonetti, J., Prives, C. (1993). The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:3319-3323.
- Fuchs, S.Y., Adler, V., Buschmann, T., Wu, X., Ronai, Z. (1998). Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene*. **17**(19):2543-2547.
- Fukuto, J. M., Chaudhuri, G. (1995). Inhibition of constitutive and inducible nitric oxide synthase. Potential selective inhibition. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**:165-194.
- Funk, W. D., Pak, D. T., Karas, R. H., Wright, W. E., Shay, J. W. (1992). A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Mol. Cell. Biol.* **12**:2866-2871.
- Geyer, R.K., Yu, Z.K., Maki, C.G. (2000). The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export. *Nat Cell Biol.* **2**:569-573.
- Giannakakou, P., Sackett, D. L., Ward, Y., Webster, K. R., Blagosklonny, M. V. Fojo, T. (2000). p53 is associated with cellular microtubules and uses dynein-dependent transport for nuclear accumulation. *Nat. Cell. Biol.* **2**:709-717.
- Ginsberg, D., Oren, M., Yaniv, M., Piette, J. (1990). Protein-binding elements in the promoter region of the mouse p53 gene. *Oncogene* **5**:1285-1290.
- Glickman, M. H., Ciechanover, A. (2001). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* **82**:373-428
- Goldstein, L. (1958). *Exp. Cell Res.* **15**:635-637.
- Goll, D. E., Thompson, V. F., Taylor, R. G., Zalewska, T. (1992). Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? *Bioessays* **14**:549-556.

- Gonen, H., Shkedy, D., Barnoy, S., Kosower, N. S., Ciechanover, A. (1997). On the involvement of calpains in the degradation of the tumor suppressor protein p53. *FEBS Lett.* **406**:17-22.
- Görlich, D., Mattaj, I. W. (1996). Nucleocytoplasmic transport. *Science* **271**:1513-1518.
- Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S. E., Scheffner, M., Del Sal G. (1999). Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *EMBO J.* **18**:6462-6471.
- Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M., Harris, C. C. (1994): Mutations in p53 tumor suppressor gene: clues to cancer ethiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* **54**:4855-4878
- Griescavage, J. M., Rogers, N. E., Sherman, M.P., Ignarro, L. J. (1993) Inducible Nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide. *J. Immunol.* **151**:6329-6337.
- Grune, T., Reinheckel, T., Davies, K. J. (1996). Degradation of oxidized proteins in K562 human hematopoietic cells by proteasome. *J. Biol. Chem.* **271**, 15504-15509
- Gu, J., Linghu, N., Wiederschain, D., Youan, Z. (2001). Identification of p53 sequence elements that are required for Mdm2-mediated nuclear export. *Mol. Cell. Biol.* **21**:8533-8546.
- Gu, W., Roeder, R. G. (1997) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* **90**:595-606.
- Gu, W., Shi, X. L., Roeder, R. G. (1997). Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* **387**:819-823.
- Hale, A. J., Smith, C. A., Sutherland, L. C., Stoneman, V. E., Longthorne, V. L., Culhane, A. C., Williams, G. T. (1996). Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur. J. Biochem.* **236**:1-26.
- Hart, T.W. (1985). Some observations concerning the S-nitroso and S-phenylsulphonyl derivatives of L-cysteine and glutathione. *Tetrahedron Lett.* **26**:2013-2016
- Haupt, Y., Barak, Y., Oren, M. (1996). Cell type-specific inhibition of p53-mediated apoptosis by mdm2. *EMBO J.* **15**:1596-1606.

- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**:296-299.
- Hermeking, H., Eick, D. (1994). Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science* **265**:2091-2093
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 σ is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Molecular Cell* **1**:3-11.
- Hershko, A., Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:425-479.
- Hirai, S., Kawasaki, H., Yaniv, M., Suzuki, K. (1991). Degradation of transcription factors, c-Jun and c-Fos, by calpain. *FEBS Lett.* **287**:57-61.
- Huang, L. C., Clarkin, K. C., Wahl, G. M. (1996). Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1 arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:4827-4832.
- Hupp, T. R., Meek, D. W., Midgley, C. A., Lane, D. P. (1992). Regulation of the specific DNA-binding function of p53. *Cell* **71**:875-886.
- Ignarro, J. J. (1990). Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**:535-560.
- Jeffrey, P. D., gorina, S., (1995). Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science* **267**:1498-1502.
- Kastan, M. B., Zhan, Q., el-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B., Fornace, A. J. Jr. (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* **71**:587-597.
- Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., Craig, R. W. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res.* **51**:6304-6311.
- Kern, S. E., Kinzler, K. W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C., Vogelstein, B. (1991). Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* **256**:827-830.

- Kisselev, A. F., Akopian, T. N., Woo, K. M., Goldberg, A. L. (1999). The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem.* **274**:3363-3371.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H. D., Mayer, T. U., Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**:635-644.
- Kröncke, K.D., Fehsel, K., Schmidt, T., Zenke, F.T., Dasting, I., Wesener, J.R., Bettermann, H., Breunig, K.D., Kolb-Bachofen, V. (1994) Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9. *Biochem Biophys Res Commun.* **200**(2):1105-10.
- Kubbutat, M. H. G., Vousden, K. H. (1997). Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potent regulator of protein stability. *Mol. Cell. Biol.* **17**:460-468.
- Kubbutat, M. H. G., Vousden, K. H. (1998). Keeping an old friend under control: regulation of p53 stability. *Mol. Med. Today* **4**(6):250-256.
- Kubbutat, M. H., Jones, S. N., Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**:299-303.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lai, Z., Freedman, D. A., Levine, A. J., McLendon, G. L. (1998) Metal and RNA binding properties of the hdm2 RING finger domain. *Biochemistry* **37**:7005-7015.
- Lambert, P. F., Kashanchi, F., Radonovich, M. F., Shiekhattar, R., Brady, J. N. (1998). Phosphorylation of p53 Serine 15 Increases Interaction with CBP. *J. Biol. Chem.* **273**, 33048-33053.
- Lane, D. P. (1992). p53, guardian of the genome. *Nature* **358**:15-16.
- Leist, M., Volbracht, C., Kühnle, S., Fava, E., Ferrnado-May, E., Nicotera, P. (1997). Caspase mediated apoptosis in neuronal excitotoxicity triggered by nitric oxide. *Mol. Med.* **3**:750-764.

- Li, M., Chen, D., Shiloh, A., Luo, J., Nikolaev, A. Y., Qin, J., Gu, W. (2002). Deubiquitination of p53 by HAUSUP is an important pathway for p53 stabilization. *Nature* **416**:648-652
- Liang, S.-H., Clarke, M. F. (1999). A bipartite nuclear localization signal is required for p53 nuclear import regulated by a carboxyl-terminal domain. *J. Biol. Chem.* **274**:32699-32703.
- Liang, S.-H., Clarke, M. F. (2001). Regulation of p53 localization. *Eur J Biochem.* **268**:2779-2783.
- Lincoln, T. M. and Cornwall T. L. (1993). Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J.* **7**:328-338.
- Liu, L., Scolnick, D. M., Trievel, R. C., Zhang, H. B., Marmorstein, R., Halazonetis, T. D., Berger, S. L. (1999). p53 sites acetylated *in vitro* by PCAF and p300 are acetylated *in vivo* in response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.* **19**:1202-1209.
- Lohrum, M. A. E., Woods, D. B., Ludwig, R. L., Balint, E., Vousden, K. H. (2001). C-terminal Ubiquitination of p53 contributes to nuclear export. *Mol. Cell. Biol.* **21**:8521-8532.
- Lowenstein, C. J., Alley, E. W., Raval, P., Snowman, A. M., Snyder, S.H., Russel, S W., Murphy, W. J. (1993). Macrophage nitric oxide synthase gene: Two upstream regions mediate induction by interferon- γ and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**:9730-9734.
- Macara, I. G. (1999). Nuclear transport: randy couples. *Curr. Biol.* **9**:R436-439
- MacMicking, J., Xie, Q., Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**:323-350
- Maki, C.G. (1999) Oligomerization is required for p53 to be efficiently ubiquitinated by MDM2. *J. Biol. Chem.* **274**:16531-16535
- Maltzman, W., Czyzyk, L. (1984). UV-irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* **4**:1689-1694.

- Marin, M.C., Jost, C.A., Irwin, M.S., DeCaprio, J.A., Caput, D., Kaelin, W.G. Jr. (1998). Viral oncoproteins discriminate between p53 and the p53 homolog p73. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6316-6324
- Marletta, M. A. (1993). Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* **268**:12231-12234
- McGrath, J. P., Jentsch, S., Varshavsky, A. (1991). UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *EMBO J.* **10**:227-236
- Meßmer, U. (1996) Nitric Oxide-Induced Apoptosis: Signaling Pathways in RAW264.7 Macrophages. Ph.D. Thesis, University of Konstanz.
- Meßmer, U. K., Reimer, D. M., Reed, J. C. Brüne, B. (1996a). Nitric oxide induced poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in RAW 264.7 macrophage apoptosis is blocked by Bcl-2. *FEBS Lett.* **384**:162-166.
- Meßmer, U., Lapetina, E G., Brüne, B. (1995). Nitric oxide induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is antagonized by protein kinase C and protein kinase A activating compounds. *Mol. Pharmacol.* **47**:757-765.
- Momand, J., Zambetti, G. P., George, D., L., Levine, A. J. (1992). The mdm2-oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* **69**:1237-1245.
- Moncada, S., Palmer, R. M. J., Higgs, E. A. (1991). Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**:109-142.
- Montes de Oca Luna, R., Wagner, D. S., Lozano, G. (1995). Rescue of early embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53. *Nature* **378**:203-206.
- Moro, M. A., Darley-USmar, V. M., Goodwin, D. A., Read, N. G., Zamora-Pino, R., Feelisch, M., Radomski, M. W., Moncada, S. (1994). Paradoxical fate and biological action of peroxynitrite on human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:6702-6706.
- Nakamura, S., Roth, J., Mukhopadhyay. (2000). Multiple lysine mutations in the c-terminal domain of p53 interfere with Mdm2-dependent protein degradation und ubiquitinierung. *Mol. Cell. Biol.* **20**:9391-9398.

- Nakane, M., Mitchell, J., Förstermann, U., Murad, F. (1991). Phosphorylation by calcium calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**:1396-1402.
- Nakaya, N., Lowe, S.W., Taya, Y., Chenchik, A., Enikolopov, G. (2000). Specific pattern of p53 phosphorylation during nitric oxide-induced cell cycle arrest. *Oncogene* **19**, 6369-6375
- Nathan, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**:3051-3064.
- Nigg, E. A. (1997). Nucleocytoplasmic transport: Signals, mechanisms and regulation. *Nature* **386**:779-789.
- Nishida, K., Harrison, D. G., Navas, J. P., Fischer, A. A., Dockery, S. P., Uematsu, M., Nerem, R. M., Alexander, R. W., Murphy, T. J. (1992). molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial nitric oxide synthase *J. Clin. Invest.* **90**:2092-2096.
- Nowicki, J. P., Duval, D., Poignet, H., Scatton, B. (1991). Nitric oxide mediates neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse. *Eur J Pharmacol.* **204**(3):339-40
- Ohara, Y., Sayegh, H. S., Yamin, J. J., Harrison, D. G. (1995). Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase by protein kinase C. *Hypertension* **25**:415-420.
- Okamoto, K., Beach, D. (1994). Cyclin G is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor protein. *EMBO J.* **13**:4816-4822.
- Oliner, J. D., Pietenpol, J. A., Thiagaligam, S., Gyuris, J., Kinzler, K., W., Vogelstein, B. (1993). Oncoprotein Mdm2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature* **362**:857-860.
- Pariat, M., Carillo, S., Molinari, M., Salvat, C., Debussche, L., Bracco, L., Milner, J., Piechaczyk, M. (1997). Proteolysis by calpains: a possible contribution to degradation of p53. *Mol. Cell. Biol.* **17**:2806-2815.
- Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature* **389**:300-305.

- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liegeois, N. J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H. W., Cordon-Cardo, C., DePinho, R. A. (1998). The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*. **92**:713-727.
- Reisman, D., Elkind, N. B., Roy, B., Beamon, J., Rotter, V. (1993). c-Myc trans-activates the p53 promoter through a required downstream CACGTG motif. *Cell Growth Differ*. **4**:57-65.
- Rivett, J. (1998). Intracellular distribution of proteasomes. *Curr. Opin. Immunol*. **10**:110-114.
- Rodriguez, M. S., Desterro, J. M. Lain, S., Laine, D. P., Hay, R. T. (2000). Multiple C-terminal lysine-residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol. Cell. Biol*. **20**:8458-8467.
- Rodriguez, M. S., Desterro, J. M. Lain, S., Midgley, C. A., Lane, D. P., Hay, R. T. (1999). SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *EMBO J*. **18**:6455-6461.
- Roth, J., Dobbelstein, M., Freedman, D. A., Shenk, T., Levine, A. J. (1998). Nucleocytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *EMBO J*. **17**, 554-564
- Ryan, K. M., Philipps, A. C., Vousden, K. H. (2001). Regulation and function of the p53 tumor suppressor protein. *Curr. Opin. Cell Biol*. **13**:332-337.
- Sakaguchi, K., Herrera, j. E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C. W., Appella, E. (1998). DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev*. **12**:2831-2841.
- Sakaguchi, K., Sakamoto, H., Lewis, M. S., Anderson, C. W., Erickson, J. W., Appella, E., Xie, D. (1997). Phosphorylation of serine 392 stabilizes the tetramer formation of tumor suppressor protein p53. *Biochemistry* **36**:10117-10124
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1998). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour. New York

- Sandau, K., Pfeilschifter, J., Brüne, B. (1997). The balance between nitric oxide and superoxide determines apoptotic and necrotic death of rat mesangial cells. *J. Immunol.* **158**:4938-4946.
- Sarih, M., Souvannavong, V., Adam, A. (1993). Nitric oxide induces macrophage death by apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **191**:503-508.
- Schmidt, H. H. H. W. and Walter, U. (1994) NO at work. *Cell* **78**:919-925
- Schuman, E. M., Madison, D. V. (1991). A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science* **254**:1503-1506
- Scolnick, D. M., Chehab, N. H., Stavridi, E. S., Lien, M. C., Caruso, L., Moran, E., Berger, S. L., Halazonetis, T. D. (1997). CREB-binding protein and p300/CBP-associated factor are transcriptional coactivators of the p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res.* **57**:3693-3696
- Serrano, M., Lin, A., McCurrach, M. E., Beach, D., Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**:593-602.
- Sessa, W. C., García-Cardena, G., Liu, J., Keh, A., Pollock, J. S., Bradley, J., Thiru, S., Braverman, I. M., Desai, K. M. (1995). The golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for efficient synthesis of nitric oxide. *J Biol. Chem.* **270**:1764-17644.
- Sgorbissa, A., Benetti, R., Marzinotto, S., Schneider, C., Brancolini, C. (1999). Caspase-3 and caspase-7, but not caspase-6 cleave Gas2 *in vitro*: implications for microfilament reorganization during apoptosis. *J. Cell Sci.* **112**:4475-4482.
- Shaulsky, G., Ben-Zeev, A., Rotter, V. (1990). Subcellular distribution of the p53 protein during the cell cycle of Balb/c 3T3 cells. *Oncogene* **5**:1707-1711.
- Shaw, P., Freeman, J., Bovey, R., Iggo, R. (1996). Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene* **12**:921-930.
- Sheffler, L. A., Wink, D. A., Mellilo, G., Cox, G. W. (1995). Exogenous nitric oxide regulates IFN- γ plus lipopolysaccharide-induced nitric oxide synthase expression in mouse macrophages. *J. Immunol.* **155**:886-894.

- Shibuki, K., Okada, D. (1991). Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature* **349**:326-328
- Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y., Prives, C. (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by Mdm2. *Cell* **91**:325-334.
- Shieh, S. Y., Taya, Y., Prives, C. (1999). DNA damage-inducible phosphorylation of p53 at N-terminal sites including a novel site, Ser20, requires tetramerization. *EMBO J.* **18**:1815-1823.
- Siliciano, J. D., Canman, C. E., Taya, Y., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M. B. (1997). DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes Dev.* **11**:3471-3481.
- Soussi, T., Caron de Fromentel, C., May, P. (1990). Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. *Oncogene* **5**:945-952
- Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C., Weis, K. (1997). Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* **90**:1041-1050.
- Stassi, G., de Maria, R., Trucco, G., Rundert, W., Testi, R., Galluzo, A., Gordano, C., Trucco, M. (1997). Nitric oxide primes pancreatic β -cells for Fas-mediated destruction in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Exp. Med.* **8**:1193-1200.
- Stenger, J. E., Mayr, G. A., Mann, K., Tegtmeier, P. (1992). Formation of stable p53 homotetramers and multiples of tetramers. *Mol. Carcinog.* **5**:102-106.
- Stommel, J. M., Marchenko, N. D., Jimenez, G. S., Moll, U. M., Hope, T. J., Wahl, G. M. (1999). A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J.* **18**:1660-72.
- Stott, F. J., Bates, S., James, M. C., McConnell, B. B., Starborg, M., Brookes, S., Palmero, I., Ryan, K., Hara, E., Vousden, K. H., Peters, G. (1998). The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J.* **17**:5001-5014.

- Szabo, C., Zingarelli, B., O'Connor, M., Salzman, A. L. (1996). DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 1753-1758.
- Tao, W., Levine, A.J. (1999). Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci* **96**:3077-3080.
- Tao, W., Levine, A.J. (1999). p19^{ARF} stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci* **96**:6937-6941.
- Thut, C. J., Goodrich, J. A., Tjian, R. (1997) Repression of p53-mediated transcription by MDM2: a dual mechanism. *Genes Dev.* **11**:1974-1986.
- Treier, M., Staszewski, L.M., Bohmann, D. (1994). Ubiquitin-dependent c-Jun degradation in vivo is mediated by the delta domain. *Cell* **78**, 787-798.
- Troy, C. M., Derossi, D., Prochiantz, A., Greene, L. A., Shelanski, M. L. (1996). Downregulation of Cu/Zn superoxide dismutase leads to cell death via the nitric oxide-peroxynitrite pathway. *J. of Neurosci.* **16**:253-261
- Turenne, G. A., Paul, P., Laflair, L., Price, B. D. (2001). Activation of p53 transcriptional activity requires ATM's kinase domain and multiple N-terminal serine residues of p53. *Oncogene* **20**:5100-5110.
- Unger, T., Juven-Gershon, T., Moallem, E. Berger, M., Vogt Sionov, R., Lozano, G., Oren, M., Haupt, Y. (1999). Critical role for Ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by Mdm2. *EMBO J.* **18**:1805-1814.
- Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1992). p53 function and dysfunction. *Cell* **70**:523-526.
- Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* **408**:307-310.
- von Knethen, A., Brüne, B. (1997). Cyclooxygenase-2: an essential regulator of NO-mediated apoptosis. *FASEB J.* **11**:887-895.
- Wadgaonkar, R., Collins, T. (1999). Murine double minute (Mdm2) blocks p53-coactivator interaction, a new mechanism for inhibition of p53-dependent gene expression. *J. Biol. Chem.* **274**:13760-13767.

- Wang, X., Michael, D., de Murcia, G., Oren, M. (2002). p53 Activation by nitric oxide involves down-regulation of Mdm2. *J. Biol. Chem.* **277**:15697-702.
- Ward, C. L., Omura, S., Kopito, R. R. (1995). Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell* **83**:121-127
- Watt, F., Molloy, P. L. (1993). Specific cleavage of transcription factors by the thiol protease, m-calpain. *Nucleic Acids Res.* **21**:5092-5100.
- Weis, K. (1998). Imortins and exportins: how to get in and out of the nucleus *Trends Biochem. Sci.* **23**:185-189.
- Wu, X. W., Bayle, J. H., Olson, D., Levine, A. J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.* **7**:1126-1132.
- Yu, Z. K., Geyer, R. K., Maki, C. G. (2000). Mdm2-dependent ubiquitination of nuclear and cytoplasmic p53. *Oncogene* **19**:5892-5897.
- Zhang, W., Lu, Q., Xie, Z. J., Mellgren, R. L. (1997). Inhibition of the growth of WI-38 fibroblasts by bezyloxycarbonyl-Leu-Ley-Tyr diazomethyl ketone: evidence that cleavage of p53 by calpain-like protease is necessary for G1 to S-phase transition. *Oncogene* **14**:255-263.
- Zhang, Y., Xiong, Y. (2001). A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* **292**:1910-1915.
- Zhang, Y., Xiong, Y. (2001). Control of p53 ubiquitination and nuclear export by Mdm2 and ARF. *Cell Growth Diff.* **12**:175-186.

Veröffentlichungen

Brüne, B., Schneiderhan, N. Nitric oxide-evoked p53 accumulation and apoptosis. Toxicology Letters. In press.

Schneiderhan N., Budde A., Zhang Y., Brüne B. Nitric oxide induces phosphorylation of p53 on serine 15: impairment of nuclear export. Submitted.

Poster

N. Schneiderhan, A. Budde, and B. Brüne. Nitric oxide-evoked accumulation of the tumor suppressor p53: mechanism of NO-action.

42. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Mainz, 2001.

Stipendium

Reisestipendium des Boeringer Ingelheim Fonds, 2001.

Meine akademischen Lehrer waren:

Physiologische Chemie	H. Bisswanger, P. Bohley, K. Eisele, K.-U. Fröhlich, R. Gebhardt, B. Hamprecht, D. Mecke, H. Probst, U. Weber, U. Weser
Organische Chemie	E. Bayer, G. Häfelinger, H. Hagenmaier, M. Hanack, G. Jung, H. Stegmann
Anorganische Chemie	E. Lindner, J. Strähle
Physikalische Chemie	G. Gauglitz, W. Göpel, V. Hoffmann, D. Oelkrug
Theoretische Chemie	F. F. Seelig
Physikalische Biochemie	W. Voelter
Physik	W. Nakel, G. Staudt
Mathematik	H. Pommer
Botanik	H. Metzner, W.-E. Mayer
Zoologie	H. Günzel, W. Pfeiffer
Humanphysiologie	E. Betz
Mikrobiologie	R. Haas, W. Wohlleben
Cytologie	W. Büsen, C. Pelling
Anatomie, Histologie	K. Reutter
Pharmakologie und Toxikologie	K. W. Bock, Breyer, U. Breyer-Pfaff, M. Schwarz, J. Werringloer
Strahlenschutz	U. Feine, E. Kallee, H.-J. Reinecke

