

**Regulation des pro-apoptischen
Proteins GRAMD4 und sein Einfluss
auf den mitochondrialen Apoptose-Signalweg**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Katja John

geboren am 02.06.1978 in Teterow

Februar 2011

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat Brigitte M. Pützer
Vektorologie und Experimentelle Genterapie
Biomedizinisches Forschungszentrum (BMFZ)
Schillingallee 69
D-18057 Rostock
2. Apl. Prof. Dr. Martin Hagemann
Abteilung Pflanzenphysiologie
Universität Rostock
Albert-Einstein-Straße 3
D-18059 Rostock

Datum der Einreichung: 22. Februar 2011

Eröffnung des Promotionsverfahrens: 07. März 2011

Datum der Verteidigung: 16. Mai 2011

Abkürzungsverzeichnis	iii
1. Einleitung	1
1.1. Der programmierte Zelltod	2
1.2. Die Bcl-2-Proteinfamilie	5
1.3. Die E2F-Genfamilie und die E2F1-induzierte Apoptose	7
1.4. Das p53-Familienmitglied p73	10
1.5. Das mitochondriale Protein GRAMD4	12
1.6. Zielstellung	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Materialien	15
2.1.1. Chemikalien, Puffer, Enzyme	15
2.1.2. Kits	15
2.1.3. Plasmide	16
2.1.4. Adenoviren	17
2.1.5. Bakterienstämme	18
2.1.6. Oligonukleotide	18
2.1.7. Antikörper	20
2.1.8. Zelllinien	22
2.1.9. Software	22
2.2. Methoden	23
2.2.1. DNA-Arbeitstechniken	23
2.2.2. RNA-Arbeitstechniken	31
2.2.3. Protein-Arbeitstechniken	32
2.2.4. Zellkulturarbeiten und Transduktion	36
2.2.5. Tierversuche	40
3. Ergebnisse	41
3.1. Aktivierung von GRAMD4 in der E2F1-induzierten Apoptose	41
3.1.1. <i>In silico</i> -Analysen der <i>GRAMD4</i> -Promotorregion	41
3.1.2. <i>GRAMD4</i> ist ein direktes Zielgen von p73	44
3.1.3. Nachweis der Bindung von p73 an den <i>GRAMD4</i> -Promotor mittels Chromatin- Immunpräzipitation (ChIP)	45
3.1.4. Transaktivierung des humanen <i>GRAMD4</i> -Promotors durch p73	50
3.1.5. Detektion der <i>GRAMD4</i> -Expression nach p73-Transduktion	59
3.1.6. Einfluss von endogen-induziertem p73 auf die <i>GRAMD4</i> -Expression	61

3.1.7. GRAMD4 als Bestandteil der p73-induzierten Apoptose	62
3.2. Einfluss von GRAMD4 auf Proteine des mitochondrialen Apoptoseweges	65
3.2.1. Zelluläre Lokalisation von GRAMD4 unter dem Einfluss von p73	65
3.2.2. Einfluss von GRAMD4 auf die Proteinexpression von Bax, Bak und Bcl-2	67
3.2.3. Zelluläre Lokalisation von Bax unter dem Einfluss von GRAMD4	70
3.2.4. Mitochondriales GRAMD4 interagiert mit Bcl-2	71
3.2.5. GRAMD4-induzierte Oligomerisierung von Bax	73
3.2.6. GRAMD4 führt zur Permeabilisierung der mitochondrialen Membran	75
3.2.7. Transkriptionelle Aktivierung von GRAMD4 als Antwort auf Schädigung der DNA und antitumorale Wirksamkeit von GRAMD4 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	77
4. Diskussion	87
4.1. Aktivierung des <i>GRAMD4</i> -Promotors in der E2F1-induzierten Apoptose	88
4.2. Die Rolle des p73-induzierten GRAMD4 in der mitochondrialen Apoptose	90
4.3. Einfluss von GRAMD4 auf die Proteine des mitochondrialen Apoptoseweges	94
5. Zusammenfassung	99
6. Literaturverzeichnis	100
Anhang	113
Danksagung	117
Lebenslauf	118
Publikationen	119
Konferenzbeiträge (Poster/Vorträge)	120
Erklärung der Selbstständigkeit	121

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
AK	Antikörper
AS	Aminosäuren
CCCP	Carbonylcyanide <i>m</i> -chlorophenylhydrazone
cDNA	mRNA komplementärer Strang (= <i>complementary DNA</i>)
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CHX	Cycloheximid
CMV	Cytomegalievirus
Cyt. C	Cytochrom C
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (= <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
<i>et al.</i>	et alii
FACS	Durchflusszytometer (= <i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FCS	fötales Kälberserum (= <i>fetal calf serum</i>)
FL	Full length (<i>GRAMD4</i> -Promotor)
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein (= <i>green fluorescent protein</i>)
h	Stunde
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
kbp	Kilobasenpaare
Luc	Luciferase
MIMP	Permeabilisierung der inneren Mitochondrienmembran (= <i>mitochondrial inner membrane permeabilization</i>)
min	Minute
MOI	Infektionsmultiplizität (= <i>multiplicity of infection</i>)
MOMP	Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (= <i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i>)

mRNA	<i>messenger RNA</i>
OD	Optische Dichte sowie Oligomerisierungsdomäne
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS⁼	<i>phosphate buffered saline</i> ohne Magnesium und Calcium
PCR	Polymerasenkettenreaktion (= <i>polymerase chain reaction</i>)
pH	potentia hydrogenii
RNA	Ribonukleinsäure (= <i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (= <i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR mit reverser Transkription
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
TA	Transaktivierungsdomäne
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tk-faktor	Transkriptionsfaktor
U	Units (Enzymaktivität; 1U = 1 mol x min ⁻¹)
UV	Ultraviolettes Licht
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
WT	Wildtyp
zVAD-fmk	N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone, allgemeiner Caspase-Inhibitor

1. Einleitung

Nach einer statistischen Analyse der Datenbank GLOBOCAN der „International Agency for Research on cancer“ IARC (<http://www-dep.iarc.fr/>) waren im Jahr 2008 weltweit 12,7 Mio. Krebsneuerkrankungen und 7,6 Mio. Todesfälle aufgrund von Krebs zu verzeichnen. Diese Zahlen werden sich voraussichtlich in den nächsten 20 Jahren nahezu verdoppeln. So werden für das Jahr 2030 21,4 Mio. Krebsneuerkrankungen mit einer Sterblichkeitsrate von 13,2 Mio. erwartet. Die dabei am häufigsten auftretenden Neoplasmen sind Lungen-, Brust-, Darm- und Prostatakrebs (<http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900#KEY>).

Für die Behandlung von Krebs stehen eine Vielzahl von Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Dazu gehören die operative Entfernung der Tumore sowie die Chemo- und Strahlentherapie, die allein oder in Kombination zur Anwendung kommen. Kennzeichnend für die Chemotherapie ist der Einsatz von Zytostatika. Diese greifen über intrazelluläre Signalwege direkt in die Zellteilung ein, was zu einer Schädigung schnell wachsender Krebszellen führt. Jedoch ist die Behandlung mit chemotherapeutischen Substanzen mit Nachteilen verbunden. So wirken Zytostatika auch in gesunden Geweben auf Zellen mit hoher Proliferationsaktivität (z. B. Schleimhäute, blutbildendes Knochenmark). Dies führt zu unerwünschten Nebenwirkungen wie Störungen des Blutbildes und des Immunsystems. Des Weiteren kann die Wirksamkeit der Chemotherapeutika durch häufig auftretende Mutationen in den Zelltod-induzierenden Signalwegen von Tumorzellen stark eingeschränkt sein. Dies resultiert in einer erhöhten Resistenz der Tumoren gegenüber den verwendeten Zytostatika, wodurch die wirksame Behandlung von Krebs nicht mehr erzielt werden kann.

Die Schädigung apoptotischer Signalwege, die der Eliminierung entarteter und nichtfunktioneller Zellen dienen, wird oftmals durch Mutationen von Tumorsuppressorproteinen ausgelöst. Als eines der Schlüsselgene gilt hierbei der Tumorsuppressor p53, der nach DNA-Defekten aktiviert wird und zur Apoptoseinduktion führt. In einer Vielzahl von Tumoren liegt p53 jedoch durch Mutationen oder epigenetische Mechanismen modifiziert vor. Dies führt zu einer funktionellen Inaktivierung dieses Proteins (Iwakuma & Lozano, 2007; Joerger & Fersht, 2007; Vousden & Lane, 2007). Aufgrund dessen können Apoptose-induzierende Signalwege über p53 nicht mehr aktiviert werden, wodurch die verwendeten Chemotherapeutika ihre Wirksamkeit in den Tumorzellen verlieren.

Diese Resistenzbildung der Tumore ist ein wesentliches Problem in der Krebstherapie. Um die Ursachen der verminderten bzw. fehlenden Wirksamkeit von Chemotherapeutika zu identifizieren, müssen die Signalwege und deren Schlüsselfaktoren, mittels derer eine kranke oder durch Zytostatika geschädigte Zelle in die Apoptose eintreten kann, untersucht werden. Hierbei steht vor allem die Identifizierung von Genen im Vordergrund, die für die Apoptoseinduktion in Tumorzellen unabhängig von p53-Status relevant sein können. Eine denkbare Rolle zur Entwicklung neuer therapeutischer anti-tumoraler Strategien könnte

hierbei der Transkriptionsfaktor E2F1 und dessen pro-apoptotische Zielgene übernehmen. Im Verlaufe der letzten Jahre konnte eine Vielzahl potenzieller E2F1-Zielgene identifiziert werden, deren Evaluierung zum besseren Verständnis der Apoptose beigetragen hat (Stanelle *et al.*, 2002; Engelmann *et al.*, 2009).

1.1. Der programmierte Zelltod

Der programmierte Zelltod (Apoptose) wurde erst im Jahr 1972 morphologisch beschrieben (Kerr *et al.*, 1972). Apoptose ist ein für die Embryonalentwicklung und Funktionen aller mehrzelligen Organismen essentieller Vorgang, der während des gesamten Lebens im unterschiedlichen Ausmaß stattfindet. In der frühen Ontogenese ist Apoptose an der Ausbildung von Gewebe- und Organstrukturen beteiligt. Später dient sie zum einen der Kontrolle der Zellzahl und damit der Größe von Geweben und zum anderen der Elimination nicht-funktioneller oder entarteter Zellen (Elmore, 2007).

Apoptotische Zellen sind durch zahlreiche charakteristische morphologische Veränderungen gekennzeichnet (Abb. 1). Dazu gehören das Schrumpfen der Zelle und die Kondensation des Kernchromatins und die Degradation von Zellproteinen (Abb. 1 A/B). Des Weiteren kommt es zu Ausweitungen und Knospungen der Zellmembranen („*membrane blebbing*“) sowie zur Ausbildung apoptotischer Körperchen. Diese umschließen Kernfragmente, Organellen und andere zytoplasmatische Bestandteile. Die apoptotischen Körperchen werden anschließend von Makrophagen oder umliegenden Zellen phagozytiert (Kerr *et al.*, 1972; Hacker, 2000). Dadurch werden Schädigungen des umliegenden Gewebes und mögliche Entzündungsreaktionen verhindert (Abb. 1 C/D). Biochemisch geht die klassische Apoptose mit einer Aktivierung bestimmter Proteasen, den Caspasen, und einer Permeabilisierung der mitochondrialen Membran einher.

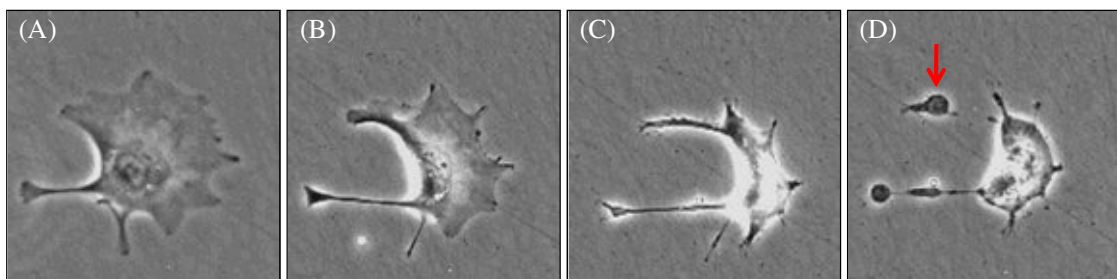


Abb. 1: Morphologie eines apoptotischen Trophoblasten. (A/B) Nach der Spaltung zellulärer Komponenten des Zytoskeletts (z. B. Laminin, Aktin) und der Degradation von nukleären Proteinen (z. B. DNA-Reparatur-Enzyme) durch Caspasen, die in der frühen Phase der Apoptose aktiviert werden, beginnt die Zelle zu schrumpfen. (C/D) Anschließend kommt zum „*membrane blebbing*“, zur Ausbildung apoptotischer Körperchen (roter Pfeil) und zur Phagozytose der apoptotischen Zellen durch Makrophagen (modifiziert nach Phil Dash).

Die Auslösung des programmierten Zelltods erfolgt über eine Vielzahl verschiedener Impulse. Dazu gehören der Entzug von Wachstumsfaktoren, die Aktivierung membranständiger Rezeptoren (CD95-, TNF- und B-Zell-Rezeptor), der Verlust von Zell-Zell-Kontakten, DNA-Schädigungen (UV- und Röntgenstrahlung, Zytostatika) oder Störungen des Zellmetabolismus (Nukleotidsynthese) (Elmore, 2007).

Grundsätzlich kann zwischen der extrinsischen und intrinsischen Initiation des Zelltods unterschieden werden (Cory & Adams, 2002) (Abb. 2).

Der Rezeptor-vermittelte (extrinsische) Apoptoseweg wird durch die Bindung eines Liganden (z. B. FasL/CD95L) an seinen Rezeptor (z. B. FasR/CD95) eingeleitet. Infolgedessen kommt es zur Formierung des DISC-Komplexes (*death-inducing signaling-complex*). In diesem werden die an den Rezeptor gebundenen Adaptermoleküle (z. B. FADD) und Pro-Caspase 8-Zymogene in räumliche Nähe zueinander gebracht. Letztere werden durch autoproteolytische Spaltung aktiviert und können im weiteren Verlauf als Initiator-Caspasen weitere Caspasen initiieren und damit den Zelltod einleiten.

Im Mittelpunkt des intrinsischen Apoptoseweges befinden sich die Mitochondrien. Diese gelten als zentrale Verknüpfungsstelle für zahlreiche Zelltodsignale und enthalten in ihrem Intermembranraum zahlreiche pro-apoptotische Faktoren. Dazu gehören z. B. das Cytochrom C, Smac (*Second Mitochondria-derived Activator of Caspases*), HtrA2/Omi (*HtrA serine peptidase 2*), AIF (*Apoptosis-Inducing-Factor*) und die Endonuclease G (*EndoG*). Bei der Initiation des Signalweges durch Hitzeschock, Bestrahlung, Zytostatika, ER- und proteasomalen Stress oder den Entzug von Wachstumsfaktoren kommt es zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und damit zur Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytosol (Reed, 1998; Susin *et al.*, 1999). Die Proteine Cytochrom C, Smac und HtrA2/Omi aktivieren den Caspase-abhängigen Signalweg, während AIF und EndoG im intrinsischen Apoptoseweg unabhängig von Caspasen fungieren. Cytochrom C, ein peripheres Protein der inneren Mitochondrienmembran, übernimmt im Intermembranraum der Organelle lebenswichtige Funktionen beim Elektronentransport der Atmungskette und der Vermeidung von oxidativem Stress. In das Zytosol freigesetztes Cytochrom C ist jedoch für die Aktivierung der Pro-Caspase-9 notwendig und assoziiert in Gegenwart von (d)ATP mit Apaf-1 (*Apoptosis Protease Activating Factor-1*) (Liu *et al.*, 1996; Perkins *et al.*, 2009). Dies führt zur Bindung der Pro-Caspase 9 um das Apoptosom zu formen (Acehan *et al.*, 2002; Hill *et al.*, 2003). In diesen Multiproteinkomplex wird die Pro-Caspase 9 prozessiert um anschließend die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 zu aktivieren (Green & Reed, 1998; Reed, 1998). Die pro-apoptotischen Faktoren Smac und HtrA2/Omi inhibieren die anti-apoptotisch wirksamen IAPs (*Inhibitor of apoptosis proteins*), die die Aktivität der Caspasen direkt inhibieren können (Verhagen *et al.*, 2000; Schimmer, 2004). Die Proteine AIF und EndoG translozieren im Verlauf des programmierten Zelltods in den Nukleus und führen dort zu DNA-

Fragmentierung und Kondensation des nukleären Chromatins (Joza *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001).

Eine Verbindung zwischen dem intrinsischen und extrinsischen Signalweg wird durch das pro-apoptotische Protein Bid (*BH3-interacting domain death agonist*), einem Mitglied der Bcl-2-Familie, vermittelt. Bid kann durch die Initiator-Caspase 8, aber auch durch die Caspasen 3 und 6 zu seiner trunktierten Form tBid prozessiert werden. Die Bindung von tBid an die Bcl-2-Familienmitglieder Bax (*Bcl-2-associated X protein*) oder Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*) führt zu deren Insertion in die äußere Mitochondrienmembran, zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (*mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP), infolgedessen zur Ausschüttung von Cytochrom C und Initiation der Caspase-Kaskade (Eskes *et al.*, 2000; Hengartner, 2000).

Die Kontrolle und Regulation des mitochondrialen Apoptoseweges unterliegen den Proteinen der Bcl-2-Familie (Cory & Adams, 2002).

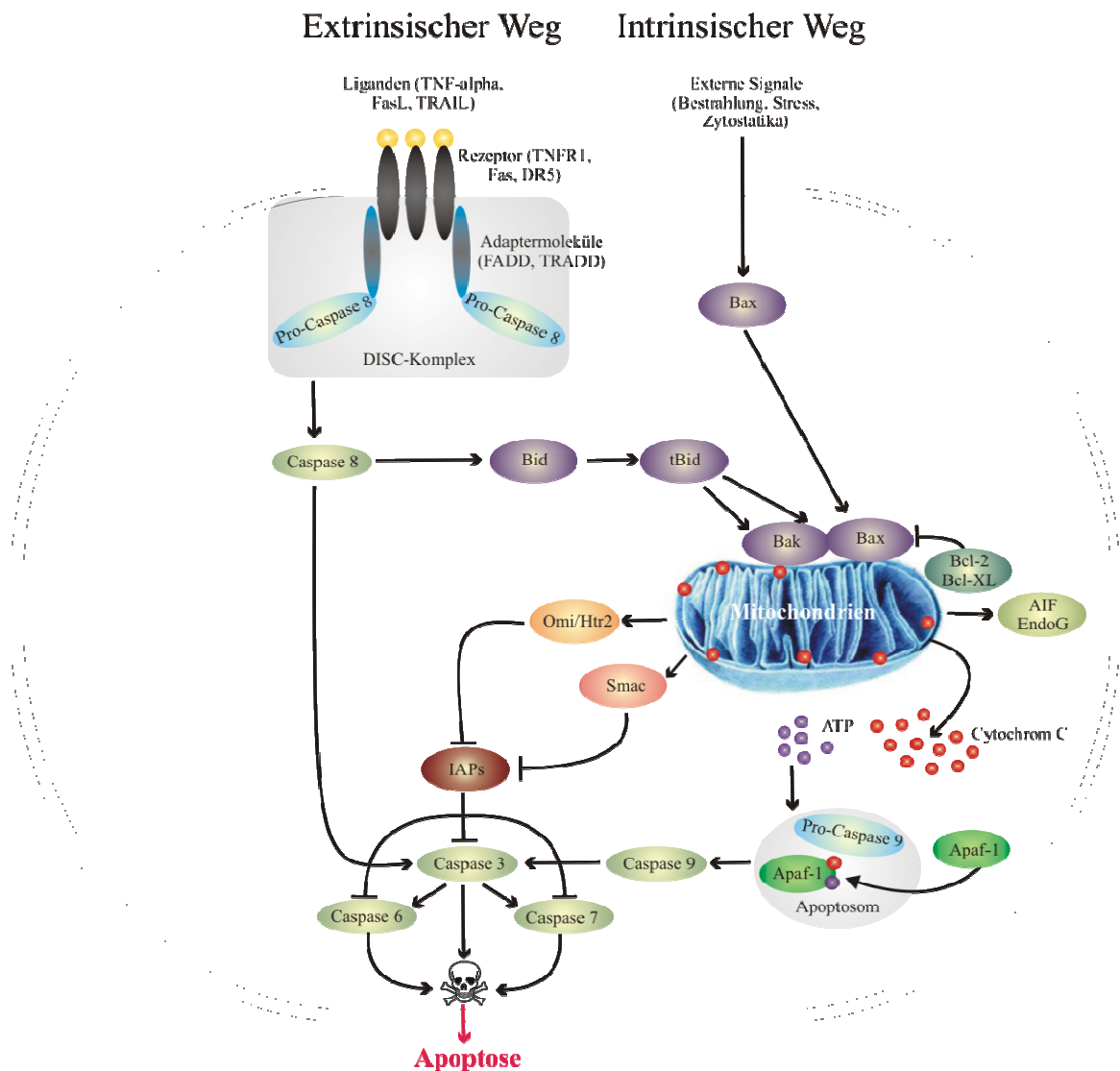


Abb. 2: Darstellung der beiden Haupttodessignalwege in Säugetierzellen. Der programmierte Zelltod kann in Säugetierzellen sowohl über den extrinsischen (Rezeptor-vermittelten) als auch den intrinsischen (mitochondrialen) Signalweg eingeleitet werden. Der extrinsische Apoptoseweg wird über Todesrezeptoren aktiviert. Hierbei interagieren die Liganden mit membranständigen Rezeptoren, induzieren die Rezeptortrimerisierung, die Anlagerung der Adaptermoleküle und die Rekrutierung der Pro-Caspase-8. In diesem DISC-Komplex (*death-inducing signaling-complex*) erfolgt die Aktivierung der Pro-Caspase-8. Intrinsische Apoptosesignale induzieren die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (*mitochondrial outer membrane permeabilisation*, MOMP). Das freigesetzte Cytochrom C bindet im Zytosol an Apaf-1 und initiiert die Bildung des Apoptosoms, das als Aktivierungskomplex für Pro-Caspase-9 dient. Die Pro-Caspase-9 wird prozessiert um anschließend die Effektor-Caspasen-3, -6 und -7 zu aktivieren. Die freigesetzten Proteine Smac und Omi/HtrA2 heben die Hemmung der Caspasen-3,-7 und -9 durch die zelleigenen Caspaseinhibitoren der IAP-Familie auf. AIF und EndoG translozieren in den Nukleus. Dort lösen sie durch Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung einen Caspase-unabhängigen Zelltod aus. Eine Verbindung beider Signalwege wird durch tBid vermittelt.

1.2. Die Bcl-2-Proteinfamilie

Die Mitglieder der Bcl-2-Proteinfamilie sind eine evolutionär hochkonservierte Gruppe von Proteinen, die als wichtige Regulatoren des programmierten Zelltods fungieren. Die Familie umfasst sowohl anti-apoptotische Mitglieder wie Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) und Bcl-X_L (*B-cell lymphoma-X large*), als auch pro-apoptotische Proteine, wie Bax, Bak und die „BH3-only“-Proteine (Antonsson, 2001). Sie besitzen mindestens eine von vier Bcl-2-Homologie-Domänen (BH1, BH2, BH3, BH4) (Adams & Cory, 1998). Eine Übersicht über die Einteilung der humanen Bcl-2-Familienmitglieder bezüglich ihrer Struktur und ihrer Funktion in vier verschiedene Subfamilien ist in Abb. 3 dargestellt.

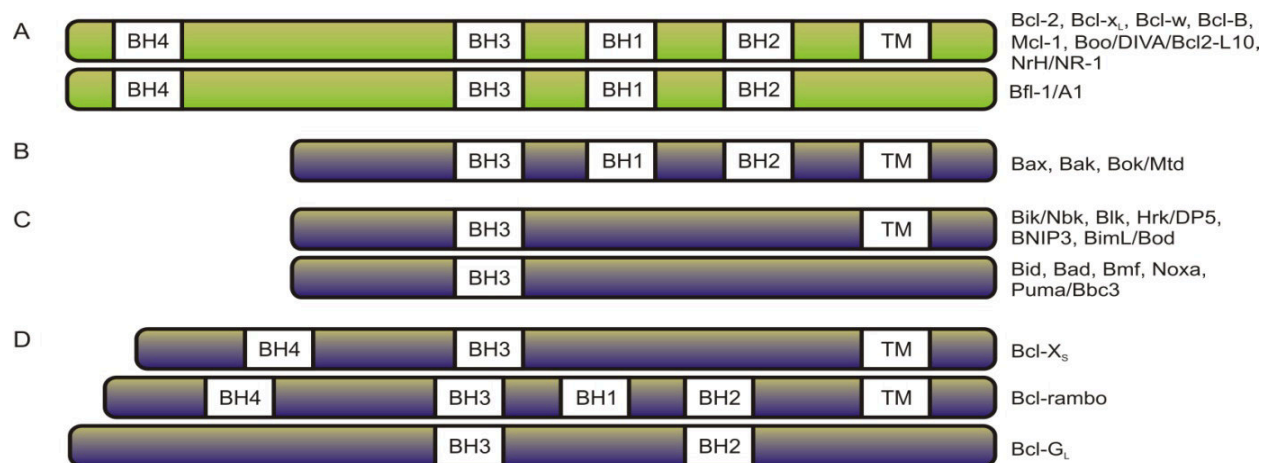


Abb. 3: Schematische Übersicht über die strukturelle und funktionelle Klassifizierung der humanen Bcl-2-Familienmitglieder. (A) Bcl-2-Subfamilie, (B) Bax-Subfamilie, (C) „BH3-only“-Subfamilie, (D) Multidomänenproteine; BH-Domänen: Bcl-2-Homologie-Domänen; TM: Transmembrandomänen; Grün: anti-apoptotische Proteine, Blau: pro-apoptotische Proteine

Die vier BH- (*Bcl-2 homology*-) Domänen in der Bcl-2-Subfamilie sind für deren anti-apoptotische Funktion unentbehrlich (Yin *et al.*, 1994). Diese Domänen besitzen keine

enzymatische Aktivität, vermitteln aber die Interaktionen zwischen den Mitgliedern der Bcl-2-Subfamilie mit anderen BH3-enhaltenen pro-apoptotischen Vertretern der Bax- bzw. „BH3-only“-Subfamilie. Diese Vermittlung erfolgt über die Ausbildung einer von den BH-Domänen 1-3 gebildeten hydrophoben Tasche, die durch die N-terminale BH4-Domäne stabilisiert wird (Yin *et al.*, 1994; Borner, 2003).

Proteine der Bax-Subfamilie haben die Domänen BH1-BH3, besitzen aber keine BH4-Domäne (Adams & Cory, 2001; Antonsson, 2001). Als wichtigster Vertreter dieser Gruppe ist das pro-apoptotische Bax-Protein zu nennen, welches inaktiv als zytosolisches Monomer (Antonsson *et al.*, 2001) oder in Komplexen mit den anti-apoptotischen Proteinen Bcl-2 bzw. Bcl-X_L vorliegt. Aufgrund apoptotischer Signale inseriert Bax nach einer Konformationsänderung in die äußere Mitochondrienmembran und führt dort zur Bildung von Poren. Durch diese können die im Intermembranraum enthaltenen Proteine wie z. B. Cytochrom C in das Zytosol entlassen werden (Eskes *et al.*, 2000).

Die zu diesem Zeitpunkt bekannten zehn Mitglieder der „BH3-only“-Subfamilie besitzen nur die BH3-Domäne. Sie agieren als Sensoren und Mediatoren der Apoptose (Huang & Strasser, 2000; Lutz, 2000; Puthalakath & Strasser, 2002). In gesunden Zellen liegen die Mitglieder dieser Gruppe durch transkriptionelle und translationelle Mechanismen inaktiv vor und können so die Zelle vor dem Zelltod bewahren (Borner, 2003). Nach ihrer Aktivierung kommt es zu Interaktion der „BH3-only“-Proteine mit den Proteinen der Bcl-2-Subfamilie (Abb. 4).

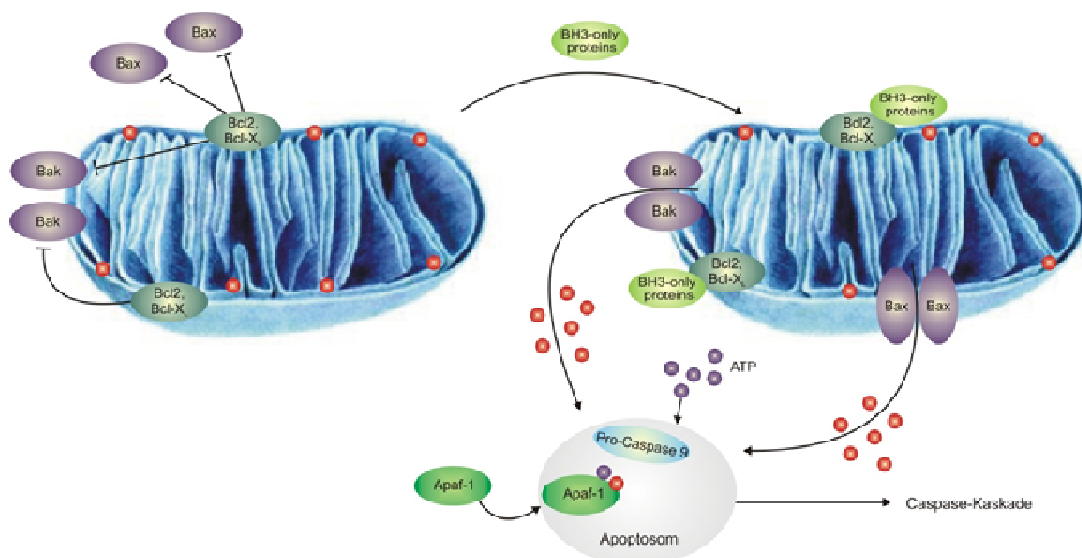


Abb. 4: Regulation der Apoptose durch Mitglieder der Bcl-2-Familie. In gesunden Zellen liegen die pro-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie, Bax und Bak, in Komplexen mit den anti-apoptotischen Proteinen Bcl-2 oder Bcl-X_L vor. Apoptotische Signale führen zur Aktivierung von „BH3-only“-Proteinen, die an der äußeren Mitochondrienmembran mit den Proteinen der Bcl-2-Subfamilie interagieren und infolgedessen die Proteine der Bax-Subfamilie freigesetzt werden. Diese unterliegen einer Konformationsänderung, inserieren in die äußere Mitochondrienmembran und führen dort durch die Bildung von Poren zur Freisetzung von Cytochrom C, zur Ausbildung des Apoptosoms und darauf folgend zur Initiation der Caspase-Kaskade.

1.3. Die E2F-Genfamilie und die E2F1-induzierte Apoptose

Der zelluläre Transkriptionsfaktor E2F1 ist neben seiner Funktion als Zellzyklusregulator in der Lage Apoptose zu induzieren (Nahle *et al.*, 2002).

Das E2F1-Protein wird neben acht weiteren Mitgliedern (E2F2-E2F8) der E2F-Transkriptionsfaktorfamilie zugeordnet (Stanelle & Pützer, 2006). Diese regulieren die Expression von Genen, die für die DNA-Synthese und die Zellzykluskontrolle am Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus benötigt werden (Harbour & Dean, 2000).

In Abhängigkeit von ihrer Struktur (Abb. 5), Funktion und Assoziation mit den „pocket“-Proteinen pRB („*Retinoblastoma Protein*“), p107 und p130 werden die E2F-Familienmitglieder in verschiedene Untergruppen eingeordnet (Ginsberg, 2002). E2F1, E2F2 und E2F3 fungieren in Assoziation mit pRB als transkriptionelle Aktivatoren, während E2F4, assoziiert mit pRB, p107 und p130 und E2F5 assoziiert mit p130, Repressorfunktionen aufweisen. E2F6 kann mit keinem der „pocket“-Proteine eine Verbindung eingehen und agiert ebenfalls als negativer Regulator der E2F-abhängigen Transkription. Diese Repressorfunktion beruht auf der Komplexbildung mit Proteinen (z. B. „*polycomb*“-Proteine, Histon-Methyltransferasen), die für die Umordnung des Chromatins im Zellkern verantwortlich sind (Trimarchi *et al.*, 2001). E2F7 und E2F8 sind ebenfalls Repressoren, die keine Verbindung mit den „pocket“-Proteinen eingehen (de Bruin *et al.*, 2003; Maiti *et al.*, 2005).

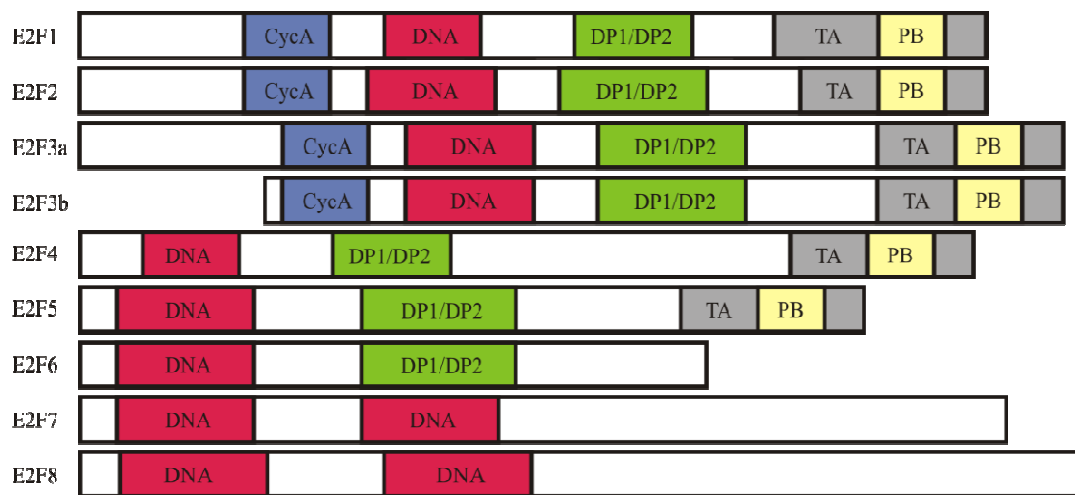


Abb. 5: Schematische Übersicht der E2F-Familienmitglieder. In Abhängigkeit von ihrer strukturellen Beschaffenheit können die 9 bekannten Mitglieder der E2F-Familie in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Gruppe 1 beinhaltet die Mitglieder E2F1-E2F3. Diese besitzen sowohl eine DNA-, eine TA-, eine „pocket“-Protein-, eine CycA-Bindedomäne als auch eine Domäne, die für die Dimerisierung mit DP1/2 benötigt wird. Die Mitglieder der Gruppe 2 (E2F4, E2F5) haben im Vergleich zu Gruppe 1 keine CycA-Bindedomäne. E2F6 ist carboxyterminal um die TA- und die „pocket“-Protein-Bindedomäne trunziert. E2F7 und E2F8 besitzen zwei DNA-Bindedomänen. CycA, CyclinA-Bindedomäne; DNA, DNA-Bindedomänen; DP1/DP2, DRFT1-Polypeptid-1/2; TA, Transaktivierungsdomäne; PB, „pocket“-Protein-Bindedomäne.

Die transkriptionelle Aktivität der E2F-Familienmitglieder wird durch die „pocket“- Proteine pRB, p107 und p130 gesteuert. Vor allem das RB-Tumorsuppressorprotein (pRB) besitzt eine Schlüsselfunktion beim Übergang von der G1- zur S-Phase des Zellzyklus und ist somit entscheidend an der Aktivitätskontrolle der E2F's beteiligt. In der frühen G1-Phase werden die E2F's nur in sehr geringem Maße exprimiert. Dabei wird die E2F-abhängige Transaktivierung von Zielgenen durch Interaktion mit hypophosphoryliertem pRb inhibiert (Hollingsworth *et al.*, 1993). Im Verlauf der G1-Phase kommt es zur Induktion der E2F-Transkription und gleichzeitig zur Akkumulation des E2F-Genproduktes (Moberg *et al.*, 1996). Die damit einhergehende Phosphorylierung von pRB, die durch mitogene Impulse über Cyclin-abhängige Kinasen (CDK4, CDK6) initiiert wird, führt zur Dissoziation des inhibierenden E2F/pRB-Komplexes und zur Freisetzung und Aktivierung der E2F's. Dies hat den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus zur Folge (Phillips & Vousden, 2001).

E2F1 nimmt in der E2F-Transkriptionsfamilie eine besondere Stellung ein. Neben seiner Funktion als Zellzyklusregulator, konnte anhand zahlreicher Studien gezeigt werden, dass E2F1 als einziger Faktor innerhalb dieser Familie Tumorsuppressorfunktion besitzt. So führte die E2F1-Überexpression sowohl *in vitro* (Qin *et al.*, 1994; Wu & Levine, 1994) als auch *in vivo* (Guy *et al.*, 1996; Pierce *et al.*, 1998) zur Einleitung der Apoptose. Bei E2F1^{-/-}-Mäusen resultiert die Deletion des E2F1-Gens in einer verminderten Apoptosefunktion bei deutlich erhöhter Tumorzinzidenz. Dies ist ein Hinweis für die entscheidende Rolle von E2F1 bei der Hemmung des Zellwachstums (Yamasaki *et al.*, 1996). Bisher konnten eine Vielzahl unterschiedlicher E2F1-induzierter Signalwege identifiziert werden, die Apoptose auslösen.

Einer der Mechanismen der E2F1-induzierten Apoptose ist die Stabilisierung des Tumorsuppressorgens p53 und damit dessen Aktivierung (Kowalik *et al.*, 1995). Hierbei aktiviert E2F1 als Antwort auf ein Stresssignal die Transkription des Tumorsuppressorproteins p14ARF (Bates *et al.*, 1998). Die direkte Bindung von p14ARF an den p53-Inhibitor Mdm2 (*murine double minute 2*) verhindert den Abbau des p53-Proteins und führt damit zu dessen Akkumulierung (Pomerantz *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998). Das heißt, E2F1 vermittelt auf indirektem Weg die Akkumulation von p53, wodurch es zum Anstieg der Expression von p53-Zielgenen und in Folge zur Apoptose kommt (Abb. 6). Des Weiteren sind Transaktivierungs-defiziente Mutanten befähigt Apoptose zu induzieren. Dies weist darauf hin, dass die E2F1-induzierte Apoptose auch unabhängig von der transkriptionellen Aktivierung von Zielgenen ist (Hsieh *et al.*, 1997).

Weiterhin kann E2F1 den Zelltod induzieren, indem es anti-apoptotische Signalwege hemmt (Phillips *et al.*, 1999). So kann E2F1 durch die Herunterregulation des TRAF2 (*TNF receptor-associated factor 2*) -Proteins den anti-apoptotischen NF-κB (*necrosis factor κB*)-Signalweg inhibieren (Phillips *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 2002). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Überexpression von E2F1 zur Repression der Apoptoseantagonisten Bcl-2 und Mcl-1 (*myeloid cell leukemia sequence-1*) führt (Eischen *et al.*, 2001; Croxton *et al.*, 2002). Die

transkriptionelle Inhibierung erfolgt durch die direkte Bindung von E2F1 an die Promotoren und ist abhängig von seiner DNA-Bindungsdomäne (Hsieh *et al.*, 1997).

E2F1 kann ebenfalls in stressinduzierte Apoptosewege des Endoplasmatischen Retikulums (ER), das für die Synthese, Faltung und den Export von sekretorischen Proteinen verantwortlich ist, eingreifen (Park *et al.*, 2006). So wurde vor Kurzem in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen, dass E2F1 in der Lage ist, den zentralen Regulator GRP78/Bip auf transkriptioneller Ebene zu reprimieren (Racek *et al.*, 2008). Das Chaperon verhindert die Aktivierung der Pro-Caspasen-7 und -12, inhibiert die pro-apoptotischen Proteine Bik und Bax und hemmt somit die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien (Fu *et al.*, 2007). Neben der Überexpression führt auch die Aktivierung von endogenem E2F1 zu einer signifikanten Abnahme von GRP78/Bip auf mRNA- und Proteinebene, wodurch die anti-apoptotische Funktion von GRP78/Bip aufgehoben wird (Racek *et al.*, 2008).

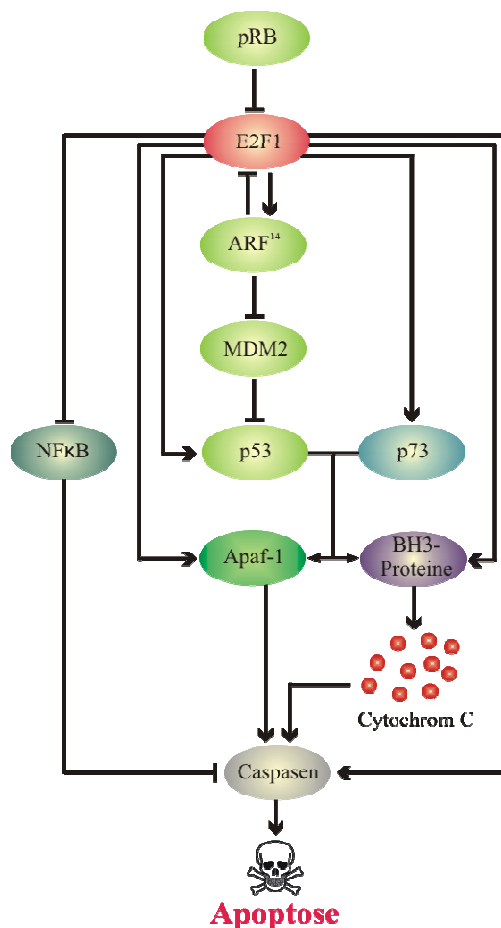


Abb. 6: Darstellung möglicher E2F1-Apoptosewege. E2F1 kann den Tumorsuppressor p53 abhängig und unabhängig vom Protein p14ARF induzieren. Des Weiteren wird Apoptose p53-unabhängig durch Faktoren wie p73 und Apaf-1 ausgelöst (Ginsberg, 2002).

Neben der Hemmung anti-apoptotischer Proteine ist E2F1 in der Lage, die Expression der pro-apoptotischen „BH3-only“-Proteine PUMA (*Bcl-2 binding component 3*), NOXA (*NADPH oxidase activator*), BIM (*BCL2-like 11*) und HRK (*hara-kiri*) durch die direkte

Bindung an deren Promotoren zu induzieren (Hershko & Ginsberg, 2004). „BH3-only“-Proteine, die neben den pro-apoptischen Proteinen Bax und Bak sowie den anti-apoptischen Proteinen Bcl-2 und Bcl-X_L zur evolutionär hochkonservierten Bcl-2-Proteinfamilie gehören, fungieren wie oben beschrieben als wichtige Regulatoren des programmierten Zelltods.

Der p53-homologe Transkriptionsfaktor p73 ist an der Induktion der E2F1-vermittelten Apoptose, die unabhängig vom p53-Status erfolgt, beteiligt. E2F1 aktiviert die Transkription von *TP73* durch die direkte Bindung an dessen Promoter (Irwin *et al.*, 2000; Stiewe & Pützer, 2000; Seelan *et al.*, 2002). Die nachfolgende Expression von p73 führt durch die Stimulation von p53-Zielgenen zum Zellzyklusarrest und letztendlich zur Apoptose. Der E2F1-induzierte Zelltod konnte durch die Verwendung von p73-antisense-RNA und dominant-negativen p73-Mutanten, die keine Transaktivierungsdomäne besitzen (Δ TA-p73), inhibiert werden (Stiewe & Pützer, 2000). p73 nimmt somit eine entscheidende Rolle in der p53-unabhängigen E2F1-vermittelten Apoptose ein.

Ein weiteres direktes transkriptionelles Zielgen von E2F1 ist Apaf-1. Dies kann unabhängig von p53 reguliert werden. (Moroni *et al.*, 2001). Apaf-1 bildet zusammen mit Pro-Caspase-9, (d)ATP und dem aus den Mitochondrien freigesetzten Cytochrom C das Apoptosom. Hierdurch kommt es zur Initiation der Caspase-Kaskade und Zelltod (Furukawa *et al.*, 2002). Die Aktivierung von Apaf-1 ist jedoch auch durch p53 möglich (Abb. 6). Diese Tatsache zeigt, dass eine Vernetzung der Signalwege besteht. Somit können im Falle des Verlustes einer Komponente andere Faktoren (z. B. E2F1) die Funktionen zumindest teilweise übernehmen.

In von unserer Arbeitsgruppe veröffentlichten Studien wurden mittels DNA-Microarray-Analysen weitere pro-apoptische E2F1-regulierte Gene identifiziert (Stanelle *et al.*, 2002; Engelmann *et al.*, 2009). Hierzu gehört das mitochondriale Protein KIAA0767 (GRAMD4). Dessen Expression löst ebenfalls unabhängig von p53 Apoptose in der Zelle aus. Dagegen führt die Repression von GRAMD4 zur Abnahme der E2F1-induzierten Apoptose (Stanelle *et al.*, 2005).

1.4. Das p53-Familienmitglied p73

p73 gehört neben p53 und p63 zu einer Gruppe nukleärer Transkriptionsfaktoren deren Mitglieder hohe Sequenzhomologie auf genomischer und Protein-Ebene aufweisen. Alle Proteine dieser Familie besitzen eine aminoterminal Transaktivierungs (TA)-, eine zentrale DNA-Bindungs- (DB-) und eine carboxyterminale Oligomerisierungs-Domäne (Levrero *et al.*, 2000). Vor allem die zentrale DB-Domäne ist innerhalb der Proteinfamilie stark konserviert (63 % Sequenzhomologie zwischen p53 und p73). Aufgrund der strukturellen Gemeinsamkeiten besitzen die Proteine dieser Familie auch funktionelle Ähnlichkeiten. So wurde in zahlreichen Studien nachgewiesen, dass p73 an p53-Zielgene bindet, sie

transkriptionell aktiviert und Zellzyklusarrest sowie Apoptose induziert (Jost *et al.*, 1997; Kaghad *et al.*, 1997; Ishida *et al.*, 2000; Irwin & Kaelin, 2001; Melino *et al.*, 2003; Moll & Slade, 2004; Tuve *et al.*, 2006). Der Tumorsuppressor p73 kann damit die Expression von Zellzyklus- (z. B. GADD45, 14-3-3 σ , p21^{Cip1/Waf1}) und Apoptose-relevanten Genen (z. B. Bax, PUMA) regulieren (Melino *et al.*, 2004). In Übereinstimmung damit kann dagegen der Verlust der transkriptionellen Aktivität von p73 die Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose inhibieren (Jost *et al.*, 1997; Kaghad *et al.*, 1997). Allerdings existieren auch funktionelle Unterschiede zwischen p53, p63 und p73. Verschiedene Studien an „knockout“-Mäusen zeigen deutlich, dass die Expression von p63 und p73 für das Wachstum und die Entwicklung bedeutender ist als die Expression von p53. Des Weiteren führt der Verlust von p73 nicht zur Entstehung von Tumoren. (Yang *et al.*, 2000; 2002).

Das humane *TP73*-Gen kodiert für eine Reihe verschiedener Protein-Isoformen, die durch differentielles mRNA-Spleißen (Pozniak *et al.*, 2000) und Nutzung eines alternativen Promotors (Kaghad *et al.*, 1997) entstehen können. Neben den C-terminalen Isoformen (p73 α - η 1), die durch alternatives Spleißen der Exone 10-14 gebildet werden, entstehen N-terminale p73-Isoformen, denen die Transaktivierungsdomäne fehlt. Sowohl das Volllängenprotein als auch die N-terminal trunkierten Spleißvarianten (Δ TAp73) werden über den ersten Promotor (P1) stromaufwärts von Exon 1 erzeugt, während der alternative Promotor im Intron 3 die Synthese der aminoterminal trunkierten Isoformen Δ Np73 kontrolliert. Während das Volllängenprotein als Transkriptionsfaktor fungiert, haben die als DNp73 zusammengefassten N-terminal trunkierten Isoformen keine Zellzyklusarrest- oder Apoptose-induzierenden Funktionen und wirken als dominant-negative Inhibitoren (Ishimoto *et al.*, 2002; Zaika *et al.*, 2002). Dies geschieht durch direkte Konkurrenz der DNA-Bindung bzw. durch Bildung von Heteroduplex-Strukturen mit p73, p63 sowie p53 (Nakagawa *et al.*, 2002; Moll & Slade, 2004). Da nur p73-Homotetramere transkriptionell aktiv sind, führt die Komplexbildung zu inaktiven Heterotetrameren.

Wie p53 kann auch p73 nach Schädigung der DNA durch chemotherapeutische Stimuli (z. B. Cisplatin, Etoposid, Gemcitabin) und Bestrahlung aktiviert werden (Agami *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2004; Thottassery *et al.*, 2006). Des Weiteren wird die Sensitivität von Tumorzellen für klinisch verwendete Chemotherapeutika nach ektopter p73-Expression gesteigert (Tuve *et al.*, 2006).

Aufgrund seiner Bedeutung für den Zellzyklusarrest und für die p53-unabhängige Apoptose stellt der E2F1-induzierte Tumorsuppressor p73 einen wertvollen Kandidaten in der Krebstherapie dar. Durch die Evaluierung von Genen, die durch p73 positiv reguliert werden, kann ein weiterer Einblick in die molekularen Mechanismen der p73-induzierten Apoptose gewonnen werden. Hier ist das eingangs erwähnte mitochondriale Protein GRAMD4 von besonderem Interesse.

1.5. Das mitochondriale Protein GRAMD4

Das Protein GRAMD4 (alias KIAA0767, DIP-(D)eath-(I)nducing-(P)rotein) wurde im Rahmen von DNA-Microarray-Analysen in p53-negativen Osteosarcomzellen (Saos-2) als ein weiterer E2F1-regulierter Faktor mit pro-apoptotischer Funktion identifiziert (Stanelle *et al.*, 2002).

Das humane *GRAMD4*-Gen (GenBank Accession Number NM_015124) ist auf dem Chromosom 22 (q-Arm) an Position 13.31 lokalisiert. Es besteht aus 17 Exons, die eine 1737 bp lange mRNA bilden. Das daraus resultierende Protein hat eine Länge von 578 Aminosäuren (AS). Am N-Terminus des Proteins befinden sich neben einer nukleären Lokalisationsdomäne (AS 110-121) mindestens zwei Transmembrandomänen (AS 246-268 bzw. 345-367). Am C-Terminus von GRAMD4 wurde eine GRAM-Domäne identifiziert (AS 445-523), die sich unter anderem in membranassoziierten Proteinen wie Glykosyltransferasen und Myotubuli befindet. Des Weiteren wurden mittels Datenbankanalysen zahlreiche putative Phosphorylierungs- und Glykosylierungspositionen innerhalb des Proteins vorhergesagt (Stanelle *et al.*, 2005) (Abb. 7).

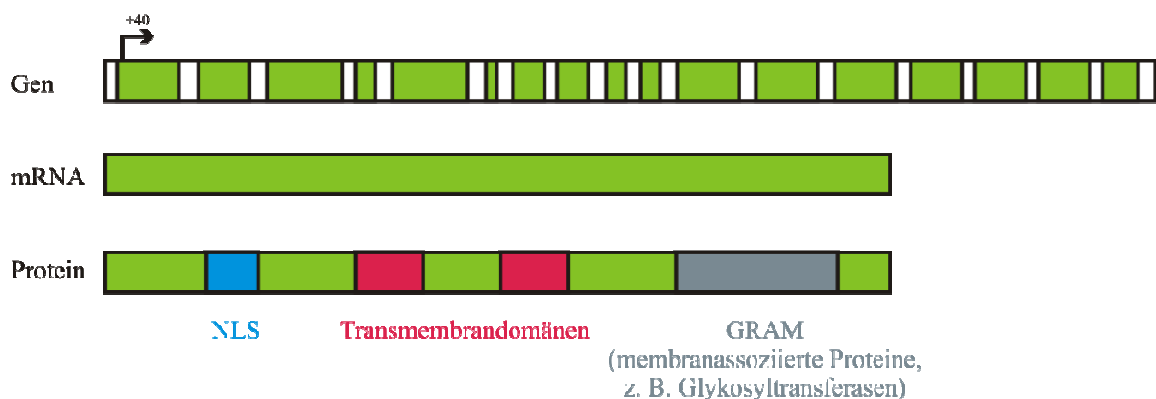


Abb. 7: Strukturelle Übersicht von GRAMD4. Das *GRAMD4*-Gen besitzt 17 Exone und kodiert für eine mRNA von 1737 bp. Das kodierte GRAMD4-Protein hat eine Länge von 578 AS und ein Molekulargewicht von ca. 66 kDa. Das Protein beinhaltet eine nukleäre Lokalisations- (NLS-), eine GRAM-Domäne sowie zwei Transmembrandomänen.

Das durch den Tumorsuppressor E2F1 sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene regulierte GRAMD4 beeinflusst die Zellvitalität, indem es effizient Apoptose induziert (Stanelle *et al.*, 2005). So führt die ektope Expression von GRAMD4 mittels adenoviralem Vektor in verschiedenen Tumorzelllinien (Saos-2, H1299, *p53*^{-/-} und *p53*^{+/+} HCT116) und in karyotypischen normalen Fibroblasten zu einem signifikanten Verlust der Zellvitalität. Der zytotoxische Effekt von GRAMD4 ist hierbei unabhängig vom p53-Status.

Die GRAMD4-induzierte Apoptose ist durch typische morphologische Veränderungen gekennzeichnet. Die Zellen zeigen das charakteristische „*membrane blebbing*“, den nukleären Kollaps sowie die Ausbildung apoptotischer Körperchen. Des Weiteren kommt es im Verlauf

des GRAMD4-induzierten Zelltods zur Aktivierung der Caspase-3. Dessen Aktivität kann durch Verwendung des Caspase-Inhibitors zVAD-fmk (N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone) blockiert werden (Stanelle *et al.*, 2005). Durch die Einleitung der Caspase-Todessignalkaskade werden Substrate wie die Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) durch Spaltung deaktiviert, was anschließend zur Degradation chromosomaler DNA in nukleosomale Einheiten („DNA-ladder“) führt. Die Detektion dieser Fragmente ist der klassische Nachweis apoptotischer Zellen. Diese durch überexprimiertes GRAMD4-induzierte PARP-Spaltung wurde bereits in den p53-negativen Zelllinien Saos-2 und H1299 nachgewiesen. *In silico*-Analysen in Bezug auf die Lokalisation von GRAMD4 ergaben, dass das Protein mit einer Wahrscheinlichkeit von 76 % in der mitochondrialen Membran lokalisiert vorliegt. Diese Daten wurden durch Verwendung von Immunfluoreszenz und *Western Blot*-Analysen nochmals verifiziert (Stanelle *et al.*, 2005). Alle bisherigen Ergebnisse sprechen dafür, dass GRAMD4 ein potenter Mediator der E2F1-induzierten Apoptose ist, der unabhängig von p53 den Zelltod auslöst. Jedoch gab es bisher bezüglich seiner Regulation und seiner genauen Rolle innerhalb des programmierten Zelltods keine gesicherten Informationen.

1.6. Zielstellung

Eines der hervorstechendsten Merkmale von malignen Tumoren ist die Apoptoseresistenz. Diese trägt erheblich zur neoplastischen Proliferation sowie Resistenz gegenüber Chemotherapie bei. Ein Regulator ist hierbei der Tumorsuppressor p53. Jedoch liegt p53 in mehr als 50 % aller Malignome durch Mutationen oder epigenetische Mechanismen inaktiviert vor. Die Apoptoseresistenz neoplastischer Zellen fördert das Überleben und die Metastasierung von Tumorzellen nach Chemotherapie und Bestrahlung. Für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze wird daher ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen der Apoptoseinduktion benötigt. Hierbei ist die Identifikation von Proteinen und deren Funktionen in pro-apoptotischen Signalwegen, die unabhängig von p53 agieren, von besonderem Interesse. Bei der Entwicklung neuer therapeutischer anti-tumoraler Strategien spielt der nukleäre Transkriptionsfaktor E2F1 eine entscheidende Rolle. Als ein neues E2F1-Zielgen mit pro-apoptotischer Funktion konnten wir GRAMD4 (alias KIAA0767, DIP-(D)eath-(I)nducing-(P)rotein) identifizieren (Stanelle *et al.*, 2002; 2005). Jedoch war bis dato nicht bekannt, über welche Mechanismen GRAMD4 reguliert wird und seine Tumorsuppressorfunktion vermittelt.

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, GRAMD4 in den molekularen Kontext der p53-unabhängigen pro-apoptotischen Signalwege einzuordnen. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt daher zum einen in der Aufklärung der E2F1-induzierten *GRAMD4*-Aktivierung. Dabei sollen direkte Mediatoren identifiziert und die Transaktivierung von *GRAMD4* durch diese untersucht werden. Zum anderen soll die Rolle von GRAMD4 in der mitochondrialen Apoptose genauer analysiert werden. Hierbei ist vor allem der Einfluss auf pro- und anti-apoptotische Proteine von besonderem Interesse. Ziel der Arbeit ist die Aufklärung der molekularen Mechanismen der GRAMD4-vermittelten Apoptose um damit möglicherweise einen weiteren Ansatz zur effizienten Tumorthherapie auf gentherapeutischer Basis unabhängig von p53 zu schaffen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien, Puffer, Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham Biosciences (Freiburg), AppliChem (Darmstadt), Bio-Rad (München), Becton Dickinson Bioscience (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Fermentas (St. Leon-Rot), Gibco (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), PAA (Pasching), PEQLAB (Erlangen), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg) und Sigma (München). Die Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders beschrieben, nach Standardprotokollen hergestellt (Sambrook *et al.*, 1989). Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (Frankfurt) erworben.

2.1.2. Kits

Zur Herstellung, Aufreinigung und Modifikation von Nukleinsäuren, Proteinen und Adenoviren fanden folgende Kits Verwendung:

Name	Hersteller
ApoAlert[®] Cell Fractionation Kit	Clontech, Mountain View, CA, USA
ECL Plus Western Blotting Detection System	Amersham Biosciences, Freiburg
Effectene Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
Elongase[®] Enzyme Mix	Invitrogen, Karlsruhe
HotMaster Mix 2.5x	5 Prime, Hamburg
iQ[™] SYBR[®] Green Supermix	Bio-Rad, München
Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
Nuclear Extract kit	Active Motif, Rixensart, Belgien
NucleoSpin[®] RNAII	Macherey-Nagel, Düren
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden
pcDNA3.1/V5-His[®] TOPO TA Expression Kit	Invitrogen, Karlsruhe
PerfectPrep[®] Gel Cleanup	Eppendorf, Hamburg
pGEM[®]-T Vector Systems	Promega, Mannheim
Plasmid DNA Purification Kit (Nucleobond)	Macherey-Nagel, Düren

2.1.3. Plasmide

Alle hier beschriebenen Vektoren wurden, wenn nicht anders angegeben, im Rahmen dieser Arbeit generiert.

Expressionsvektor	Quelle
pcDNA3.1	Klonierungsvektor mit CMV-Promotor zur Herstellung von Expressionsvektoren (Invitrogen)
pCMV-E2F1	E2F1-Expressionsvektor unter Kontrolle des CMV-Promotors (Stiewe und Pützer, 2000)
pcDNA3.1-p53	p53WT-Expressionsvektor unter Kontrolle des CMV-Promotors
pcDNA3.1-p73α	Expressionsvektor der C-terminalen Isoform p73 α unter Kontrolle des CMV-Promotors (Stiewe <i>et al.</i> , 2002)
pcDNA3.1-p73β	Expressionsvektor der C-terminalen Isoform p73 β unter Kontrolle des CMV-Promotors (Stiewe <i>et al.</i> , 2002)
pcDNA3.1-p73ΔEx2/3α	Expressionsvektor der N-terminalen Isoform Δ Ex2/3p73 α unter Kontrolle des CMV-Promotors (Stiewe <i>et al.</i> , 2002)
pcDNA3.1-p73ΔEx2/3β	Expressionsvektor der N-terminalen Isoform Δ Ex2/3p73 β unter Kontrolle des CMV-Promotors (Stiewe <i>et al.</i> , 2002)
pcDNA3.1-GRAMD4/V5/His	Expressionsvektor nach Einführung der kompletten <i>GRAMD4</i> kodierenden Gensequenz mit His-Tag unter Kontrolle des CMV-Promotors
pcDNA3.1-GRAMD4ΔBH/V5/His	Expressionsvektor nach Deletion einer GRAMD4-Aminosäuresequenz (AS 92-176) mit His-Tag unter Kontrolle des CMV-Promotors
pGL3 basic	Luciferase-Basisvektor ohne Promotor und Enhancer Sequenzen (Promega, Mannheim)
pGL3_<i>GRAMD4</i> -2064/+8	Luciferase-Expressionsvektor nach Einführung eines 2072 bp großen <i>GRAMD4</i> -Promotorfragmentes
pGL3_<i>GRAMD4</i> -1361/+8	Luciferase-Expressionsvektor nach Einführung eines 1369 bp großen <i>GRAMD4</i> -Promotorfragmentes

pGL3_GRAMD4 -1295/+8	Luciferase-Expressionsvektor nach Einführung eines 1303 bp großen <i>GRAMD4</i> -Promotorfragmentes
pGL3_GRAMD4 -601/+8	Luciferase-Expressionsvektor nach Einführung eines 609 bp großen <i>GRAMD4</i> -Promotorfragmentes
pGL3_GRAMD4 -430/+8	Luciferase-Expressionsvektor nach Einführung eines 438 bp großen <i>GRAMD4</i> -Promotorfragmentes
pGL3_GRAMD4 -77/+8	Luciferase-Expressionsvektor nach Einführung eines 85 bp großen <i>GRAMD4</i> -Promotorfragmentes
pGL3_Bax	Luciferase-Expressionsvektor nach Einführung des <i>Bax</i> -Promotors

2.1.4. Adenoviren

Virusvektor	Quelle
Ad.GFP	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) unter Kontrolle des CMV-Promotors (Pützer <i>et al.</i> , 2000)
Ad.GRAMD4	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert das humane GRAMD4-Protein unter Kontrolle des CMV-Promotors (Stanelle <i>et al.</i> , 2005)
Ad.p53	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert das humane p53 Wildtyp-Protein unter Kontrolle des CMV-Promotors (Pützer <i>et al.</i> , 2000)
Ad.p73α	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert das humane p73 α -Protein unter Kontrolle des CMV-Promotors (Stiewe <i>et al.</i> , 2002)
Ad.p73β	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert das humane p73 β -Protein unter Kontrolle des CMV-Promotors (Stiewe <i>et al.</i> , 2002)
Ad.shGFP	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert eine Kontroll-shRNA, die gegen kein humanes Zielgen gerichtet ist
Ad.shGRAMD4	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert shRNA zur Hemmung der GRAMD4-Expression (RNAi), (Stanelle <i>et al.</i> , 2005)

Ad.shp73 Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert shRNA zur Hemmung der p73-Expression (RNAi), (Buhlmann *et al.*, 2008)

2.1.5. Bakterienstämme

Bezeichnung	Genotyp
One shot[®] TOP10 <i>E.coli</i> (chemisch kompetent)	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>)Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 <i>DlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>
<i>E.coli</i> JM109 (chemisch kompetent)	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk-, mk+), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, laqIqZΔM15]</i>

2.1.6. Oligonukleotide

2.1.6.1. Oligonukleotide für die Vollängenamplifikation von *GRAMD4*

Primer		Sequenz
<i>GRAMD4_V5/His</i>	sense	5'-GTCATGCTAAGGAGGTTGGA-3'
	antisense	5'-GCTGTCCCCGCCAGACG-3' (ohne Stopcodon)

2.1.6.2. Oligonukleotide für die Herstellung von *GRAMD4*ΔBH

Primer		Sequenz
<i>GRAMD4_V5/His</i>	sense	5'-GTCATGCTAAGGAGGTTGGA-3'
	antisense	5'-GCTGTCCCCGCCAGACG-3' (ohne Stopcodon)
<i>GRAMD4</i>ΔBH <i>P3_V5/His</i>	sense	5'-GCCTTATTGGAAAAATACGTGGAGGACTTC-3'
	antisense	5'-GAAGTCCTCCACGTATTTTCCAATAAGGC-3'

2.1.6.3. Oligonukleotide für die RT-PCR

Primer		Sequenz
<i>GAPDH</i>	sense	5'-CACAGTCCATGCCATCAC-3'
	antisense	5'-CACCACCCTGTTGCTGTA-3'

<i>rS9</i>	sense	5'-GATGAGAAGGACCCACGGCGT-3'
	antisense	5'-GAGACAATCCAGCAGCCCAGG-3'
<i>p73</i>	sense	5'-GACGGAATTCACCACCATCCT-3'
	antisense	5'-CCAGGCTCTCTTTCAGCTTCA-3'
<i>p53</i>	sense	5'-CTCAGACTGACATTCTCCAC-3'
	antisense	5'-ACTCTGTGAGGTAGGTGCAA-3'
<i>E2F1</i>	sense	5'-GGTGAGGTCCCCAAAGTCAC-3'
	antisense	5'-GCCACCATAGTGTCACCACC-3'
<i>p21</i>	sense	5'-TTCTTATGCCAGAGGCTGG-3'
	antisense	5'-TGTGGACCTGTCACTGTCTTG-3'
<i>GRAMD4</i>	sense	5'-TCTTACAGGAGGAGCTCCGGA-3'
	antisense	5'-TTAGTGACCGGCTTGGCA-3'
<i>S100A2</i>	sense	5'-ATGTGCAGTTCTCTGGAG-3'
	antisense	5'-TCAGGGTCGGTCTGGGCA-3'

2.1.6.4. Oligonukleotide zur Untersuchung der *GRAMD4*-Promotorregion (ChIP-Analyse)

Primer		Sequenz
<i>GRAMD4_P_fragA</i>	sense	5'-TGAGAACCCTGGCTTCCTTCT-3'
	antisense	5'-AACATGACGCTCGGGTTCCT-3'
<i>GRAMD4_P_fragB</i>	sense	5'-AGAATCAACCGAGGCATCCCTA-3'
	antisense	5'-AGAAGGAAGCCAGGGTTCTCA-3'
<i>GRAMD4_P_fragC</i>	sense	5'-GTGTGACCAGGTTTCTGTGTTGA-3'
	antisense	5'-TAGGGATGCCTCGGTTGATTCT-3'
<i>GRAMD4_P_fragD</i>	sense	5'-TCCTGTGGGCCACTGATCCT-3'
	antisense	5'-TCAACACAGAAACCTGGTCACAC-3'
<i>GRAMD4_P_fragE</i>	sense	5'-CTGACCTTGCTCTCAGTGCT-3'
	antisense	5'-AGGATCAGTGGCCCACAGGA-3'
<i>GRAMD4_P_fragF</i>	sense	5'-GCCTCCCAAAGTGCTGGAATTA-3'
	antisense	5'-AGCACTGAGAGCAAGGTCAG-3'
<i>GRAMD4_P_fragG</i>	sense	5'-CCTGTGTCCTGTGGGATTTT-3'
	antisense	5'-TAATTCCAGCACTTTGGGAGGC-3'

2.1.6.5. Oligonukleotide für die Klonierung des *GRAMD4*-Promotors

Primer		Sequenz
-2064 <i>KpnI</i>	sense	5'-AGCCGGG <u>GTACCC</u> CTATATGGGAAGCTTTTCC-3'
-2064 <i>BglII</i>	antisense	5'-GTCTGGA <u>AGATCT</u> ACATGACGCTCGGGTTCC-3'
-1361 <i>KpnI</i>	sense	5'-GCCGGG <u>GTACCC</u> GCTCTCAGTGCTTCCTTG-3'
-1295 <i>KpnI</i>	sense	5'-GCCGGG <u>GTACCC</u> GATCACTCCCCGCCCCAT-3'
-601 <i>KpnI</i>	sense	5'-GCCGGG <u>GTACCC</u> GGGACACAAGGCCAGGTCC-3'
-430 <i>KpnI</i>	sense	5'-GCCGGG <u>GTACCC</u> TTCCCAATGCCAGAGCAGC-3'
-77 <i>KpnI</i>	sense	5'-GCCGGG <u>GTACCC</u> GTGTGGGAGCTGGCTCGT-3'

GGTACC, Schnittstelle für *KpnI*; AGATCT, Schnittstelle für *BglII*

2.1.7. Antikörper

2.1.7.1. Primärantikörper

Name	Bezeichnung	Herkunft
β-Aktin (Klon AC-15)	monoklonaler Antikörper (Maus); reagiert mit dem N-Terminus von β-Aktin	Sigma, München
p73 (ER-15)	monoklonaler Antikörper (Maus); reagiert mit AS 367-380 humaner p73α/β-Isoformen	BD Bioscience, Heidelberg
p53 (DO-1)	monoklonaler Antikörper (Maus); reagiert mit AS 1-45 von humanem Wildtyp und mutierten p53	BD Bioscience, Heidelberg
E2F1	monoklonaler Antikörper (Maus); reagiert mit AS 342-386 von humanem E2F1	BD Bioscience, Heidelberg
p53 (FL393)	polyklonaler Antikörper (Kaninchen); reagiert mit p53 humanen Ursprungs	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Bax (Klon 6A7)	monoklonaler Antikörper (Maus); reagiert mit AS 12-24 von humanem Bax	Sigma, München

Bax (N-20)	polyklonaler Antikörper (Kaninchen), reagiert mit dem N-Terminus von humanem Bax	Santa Cruz Biotechno- logy, Heidelberg
Bak (N-20)	polyklonaler Antikörper (Ziege), reagiert mit dem N-Terminus von humanem Bak	Santa Cruz Biotechno- logy, Heidelberg
Bcl-2 (N-19)	polyklonaler Antikörper (Kaninchen), reagiert mit dem N-Terminus von humanem Bcl-2	Santa Cruz Biotechno- logy, Heidelberg
CoxIV	polyklonaler Antikörper (Kaninchen), reagiert mit CoxIV humanen Ursprungs	Cell Signaling Techno- logy, Danvers, USA
Cytochrome C	polyklonaler Antikörper (Kaninchen), reagiert mit Cyt. C humanen Ursprungs	Clontech Laboratories, Inc./ Takara Bio Company, Mountain View, USA
GRAMD4	polyklonaler Antikörper (Kaninchen)	Eurogentec, Seraing, Belgien
Smac	monoklonaler Antikörper (Maus), reagiert mit Smac humanen Ursprungs	Cell Signaling Techno- logy, Danvers, USA
TBP (TATA-binding protein)	monoklonaler Antikörper (Maus), reagiert mit AS 1-20 von humanem TBP	Abcam, Cambridge, UK

2.1.7.2. Sekundärantikörper

Name	Bezeichnung	Herkunft
<i>bovine anti-goat</i>	HRP-konjugiert	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
<i>sheep anti-mouse</i>	HRP-konjugiert	Amersham Biosciences, Freiburg
<i>donkey anti-rabbit</i>	HRP-konjugiert	Amersham Biosciences, Freiburg
<i>goat anti-rabbit</i>	Alexa Fluor [®] 633-konjugiert	Invitrogen, Karlsruhe
<i>goat anti-mouse</i>	Alexa Fluor [®] 488-konjugiert	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.8. Zelllinien

Alle hier beschriebenen Zelllinien waren bereits, wenn nicht anders angegeben, in der Arbeitsgruppe etabliert. Die verwendeten Zelllinien wurden in DMEM-Medium kultiviert, das neben 10 % hitzeinaktivierten fötalen Kälberserum (FKS), 2 mM L-Glutamin, 1x MEM non-essential amino acids (PAA, Pasching, Österreich), 100 µg/mL Penicillin, 100 U/mL Streptomycin und 1,25 µg/mL Amphotericin B enthielt. Das DMEM-Medium der stabilen Zelllinien H1299.ERE2F1 und Saos-2.ERE2F1 wurde des Weiteren mit 1 µg/ml Puromycin ergänzt.

Zelllinie	Beschreibung
H1299	humane Lungenkarzinom-Zelllinie, ATCC-Nr. CRL5803™
H1299.ERE2F1	humane Lungenkarzinom-Zelllinie, stabil transfiziert mit pBABEHA-ERE2F1, exprimiert das Fusionprotein HA-ERE2F1
HCT116 (p53WT)	humane Kolonadenokarzinom-Zelllinie, zu Verfügung gestellt von Dr. Michael Linnebacher (Molekulare Onkologie und Immuntherapie, Universität Rostock), ATCC-Nr. CCL-247™
HCT116 (p53 -/-, Bax +/-)	humane Kolonkarzinom-Zelllinie, zu Verfügung gestellt von Bert Vogelstein (John Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA)
HCT116 (p53 +/+, Bax +/-)	humane Kolonkarzinom-Zelllinie, zu Verfügung gestellt von Bert Vogelstein (John Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA)
HEK 293	humane embryonale Nierenzellen mit Ad5-E1A stabil transformiert (Graham <i>et al.</i> , 1977)
Saos-2	humane Osteosarkoma-Zelllinie, p53 negativ, ATCC-Nr. HTB-85™
Saos-2.ERE2F1	humane Osteosarkoma-Zelllinie, stabil transfiziert mit pBABEHA-ERE2F1, exprimiert das Fusionprotein HA-ERE2F1, (Stiewe & Pützer, 2000)

2.1.9. Software

Software	Herkunft
CellQuest®	Becton Dickinson Bioscience, Heidelberg
Vektor NTI 6	InforMax Inc.
CLONE Mgr Suite 7	Scientific & Educational Software, Cary, USA

2.2. Methoden

2.2.1. DNA-Arbeitstechniken

2.2.1.1. DNA-Restriktion

Zur Restriktion der Plasmid-DNA wurden 0,1 bis 3 µg DNA mit 5-10 Enzymeinheiten der entsprechenden Restriktionsenzyme im geeigneten Reaktionspuffer bei 37 °C inkubiert. Die Inkubationsdauer (1-3 h) richtete sich nach den Angaben der Hersteller. Die Verifizierung der DNA-Restriktion erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

2.2.1.2. DNA-Dephosphorylierung

Zur Unterdrückung der Religation von linearisierten Plasmiden wurden die 5'-Phosphatgruppen durch eine Phosphatasereaktion abgetrennt. Hierfür wurde die linearisierte und aufgereinigte Plasmid-DNA mit vier Einheiten alkalischer Phosphatase (Fermentas) im entsprechenden Puffer in einem Gesamtvolumen von 30 µl 1,5 h bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.3. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach Restriktion und PCR fand in horizontalen Elektrophoresekammern mit 1 x TAE als Laufpuffer und bei einer Spannung von 90-125 V für 15-60 min statt. Der Agarosegehalt der Gele betrug, in Abhängigkeit von der Fragmentgröße, 0,8-2 % (w/v). Die anschließende Detektion der aufgetrennten DNA erfolgte unter Verwendung von Ethidiumbromid (0,2 µg/ml) mithilfe einer UV-Dokumentationsanlage.

50x TAE-Puffer	Tris/Acetat	2	M
	EDTA pH 8,0	150	mM

2.2.1.4. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das zu eluierende DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel (0,8-2 %, w/v) ausgeschnitten und anschließend unter Verwendung des PerfectPrep[®]Gel Cleanup Kits nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die eluierte DNA konnte nun direkt für Ligationen eingesetzt werden.

2.2.1.5. Ligationen

Ligation in pGEM[®]-T

Für die Klonierung der *GRAMD4*-Promotorkonstrukte wurde das pGEM[®]-T-Vektor System verwendet (Abb. 8). In den bereits durch *EcoRV* linearisiert vorliegenden pGEM[®]-T Vektor mit 3'-dT-Überhängen wurden die mit dem Elongase[®] Enzyme amplifizierte *GRAMD4*-Promotorfragmente mit künstlich eingefügten Restriktionschnittstellen *KpnI* und *BglIII* nach Protokoll ligiert und anschließend in chemisch kompetente *E.coli* JM109 transformiert.

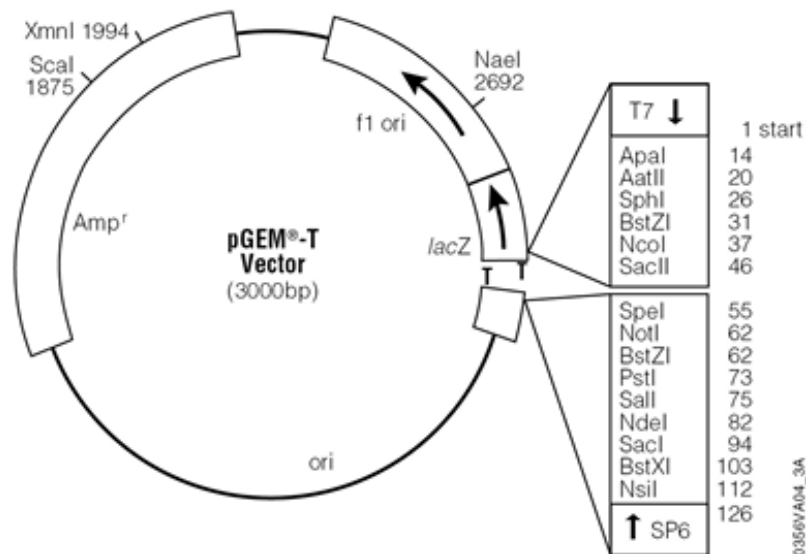


Abb. 8: Schematische Darstellung des pGEM[®]-T-Vektorsystems. Amp^r: Ampicillin-Resistenzgen; ori: Replikationsursprung; *lacZ*: kodiert für das α -Peptid des Enzyms β -Galactosidase; f1 ori: Replikationsursprung des Bakteriophagen f1; T7, SP6: Promotor für T7- und SP6-abhängige Bakteriophagen-RNA Polymerase.

Ein typischer Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

2x Rapid Ligation Buffer	5	μ l
pGEM [®] -T Vektor	0,5	μ l
PCR-Produkt	1,5	μ l
T ₄ -DNA Ligase (3 Weiss units/ μ l)	1	μ l
ddH ₂ O	2	μ l

Ligation in pGL3

Für die Klonierung der *GRAMD4*-Promotorkonstrukte in den pGL3-Basisvektor (Abb. 9) wurden die *GRAMD4*-Promotorfragmente unter Verwendung der Restriktionsenzyme *KpnI* und *BglIII* aus dem pGEM[®]-T-Vektor (Klonierungszwischenschritt) geschnitten und in den mit *KpnI/BglIII*-linearisierten (2.2.1.1) und mit alkalischer Phosphatase (2.2.1.2) behandelten

pGL3-Vektor ligiert. Die Ligation erfolgte üN bei 4°C mit der T₄-DNA Ligase (Fermentas, St.Leon Roth). Die anschließende Transformation fand in *E.coli* JM109 statt.

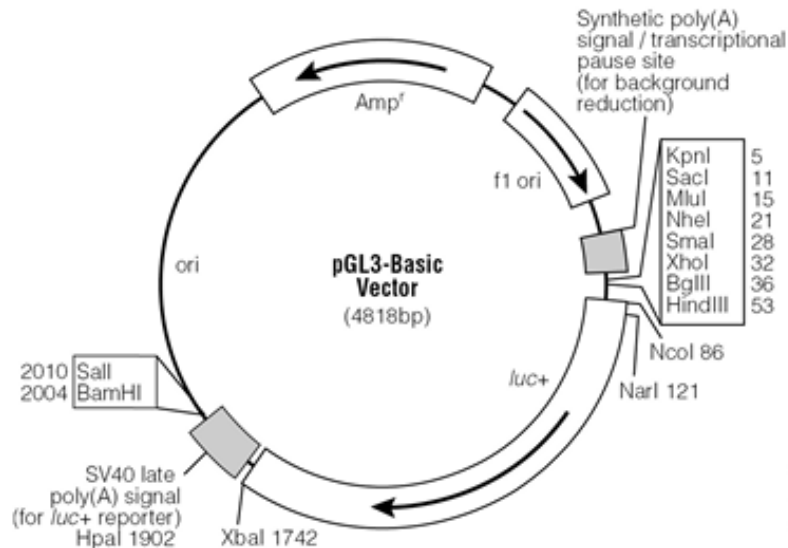


Abb. 9: Schematische Darstellung des pGL3-basic Vektors. Luc: cDNA codierend für Firefly-Luciferase, Amp^r: Ampicillin-Resistenzgen, f1 ori: Origin/filamentous phage abstammend, ori: Origin der Plasmidreplikation in *E.coli*, SV40: DNA-Bereich vom Simianvirus 40 stammend, poly A signal: mRNA Polyadenylationssignal

Ein typischer Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

10x T ₄ -DNA Ligase Reaction Buffer	1	μl
T ₄ -DNA Ligase	1	μl
pGL3-Vektor <i>KpnI/BglII</i>	3	μl
<i>GRAMD4</i> -Promotorfragmente <i>KpnI/BglII</i>	1	μl
ddH ₂ O	4	μl

Ligation in pcDNA3.1

Für die Klonierung der *GRAMD4*-Gensequenz und der *GRAMD4*ΔBH-Deletionsmutante fand das pcDNA3.1/V5/His[®]TOPO[®]TA Expression Kit Anwendung. Die Ligation von Vektor und DNA-Fragmenten und die darauf folgende Transformation in chemisch kompetente One Shot[®] TOP10 *E.coli* Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers.

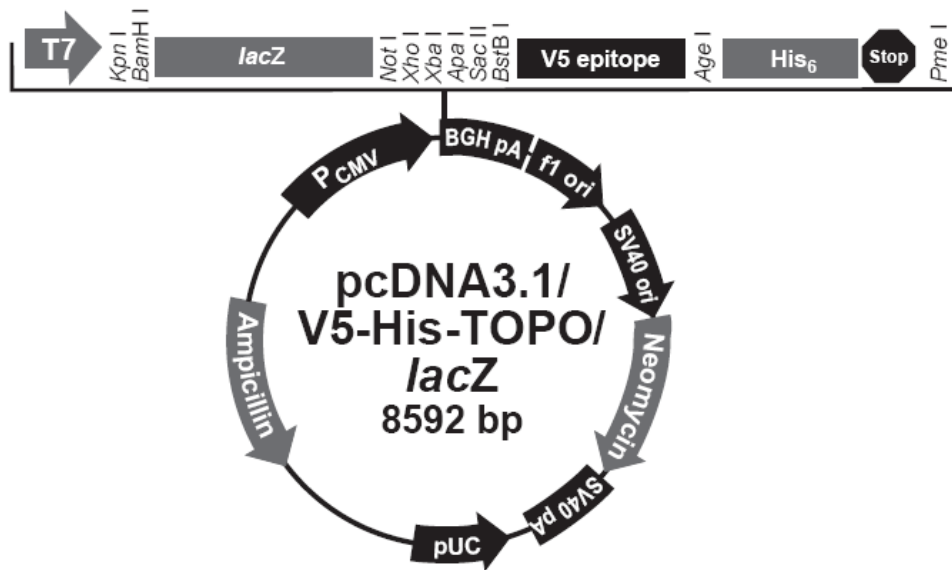


Abb. 10: Schematische Darstellung des pcDNA3.1/V5/His[®]TOPO[®]TA-Vektors. Der Vektor enthält *enhancer*- und Promotorsequenzen des humanen Cytomegalievirus (CMV) zur *high level*-Transkription, ein Poly-A-Signal und den SV40 *origin* zur episomalen Replikation in Zelllinien.

Ein typischer Ligationsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

pcDNA3.1 Vektor	1	μl
PCR-Produkt	2	μl
Salzlösung	1	μl
ddH ₂ O	2	μl

2.2.1.6. Transformation von *E.coli* durch Hitzeschock

Den chemisch-kompetenten *E. coli*-Bakterien wurden 2-5 μl des Ligationsansatzes bzw. der Plasmid-DNA zugesetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit auf Eis folgte der Hitzeschock für 50 s bei 42 °C. Anschließend wurden die Ansätze 5 min auf Eis abgekühlt, in 500 μl SOC-Medium suspendiert und 60 min bei 37 °C im Thermoschüttler bei 250 rpm inkubiert. Die Ansätze wurden auf LB-Agarplatten mit 50 μg/ml Ampicillin (pcDNA3.1, pGL3) bzw. Ampicillin-X-Gal-IPTG-(AXI-) Platten (pGEM[®]T) ausgebracht und bei 37°C üN bebrütet. Die AXI-Platten ermöglichen eine rasche Identifizierung von rekombinanten Klonen über das Blau-Weiß-Screening. Rekombinante Klone erscheinen als weiße Kolonien, während Klone, bei denen die Transformation nicht erfolgreich gewesen ist, eine charakteristische Blaufärbung der Kolonien aufweisen.

LB-Agar	LB-Medium	1	l
	Agar	15	g

AXI-Platten	LB-Medium	1	l
	Agar	15	g
	Ampicillin	100	µg/ml
	IPTG	0,5	mM
	X-Gal	80	µg/ml
SOC-Medium	Trypton	2	% (w/v)
	Hefeextrakt	0,5	% (w/v)
	NaCl	10	mM
	KCl	2,5	mM
	MgCl ₂	10	mM
	MgSO ₄	10	mM
	Glukose	20	mM

2.2.1.7. Mini-Plasmidpräparation

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde der jeweilige *E. coli*-Stamm in 3 ml LB-Medium unter entsprechenden Selektionsbedingungen (50 µg/ml Ampicillin) bei 37 °C und 225 rpm über Nacht angezogen. 2 ml dieser Bakterienkultur wurden durch Zentrifugation (12000 x g, 3 min, 4 °C) sedimentiert und das Bakteriensediment in 300 µl S1-Puffer suspendiert. Die alkalische Lyse der Bakterienzellen erfolgte durch Zugabe von 300 µl S2-Puffer bei einer Inkubation für 5 min bei RT. Nach Zusatz von 300 µl gekühltem S3-Puffer und Durchmischung wurde der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde danach 15 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 630 µl Isopropanol präzipitiert und sedimentiert. Das erhaltene DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen (10 min, 12000 x g, 4 °C) und getrocknet. Zum Schluss wurde die DNA in 30 µl ddH₂O suspendiert und durch Restriktionsanalysen überprüft.

LB-Medium	Pepton	10	g
	Hefeextrakt	5	g
	NaCl	170	mM
	ad ddH ₂ O	1	l
	pH 7,5		
S1-Puffer	Tris/HCl pH 8,0	50	mM
	EDTA	10	mM
	RNase A	100	µg/ml
S2-Puffer	NaOH	200	mM
	SDS	1	% (w/v)
S3-Puffer	Kaliumacetat pH 7,2	2,6	M

2.2.1.8. Maxi-Plasmidpräparation

Die Extraktion von Plasmid-DNA im großen Maßstab erfolgte mittels Plasmid-DNA Purification Kit (Macherey-Nagel). Dazu wurden Bakterienkulturen in 100 ml LB-Medium üN bei 37 °C und 225 rpm unter den entsprechenden Selektionsbedingungen angezogen. Zur Sedimentation der Bakterien wurden die Ansätze für 15 min bei 6000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml S1-Puffer suspendiert, nach Zugabe von 10 ml S2-Puffer sorgfältig durchmischt und anschließend für 3 min bei RT inkubiert. Danach wurden 10 ml S3-Puffer zu der Suspension gegeben, erneut gemischt und für 3 min auf Eis gelagert. In der Zwischenzeit wurde die Nucleo-Bond AX500 (Maxi) Säule mit 6 ml N2-Puffer äquilibriert. Das Lysat wurde danach über einen Papierfilter auf die Säule gegeben, um gebildete Präzipitate zu entfernen. Anschließend wurde die Säule zweimal mit 15 ml N3-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA mit 10 ml N5-Puffer eluiert. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde mit 7 ml Isopropanol präzipitiert und für 30 min bei 6000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das gewonnene DNA-Pellet wurde mit 5 ml 70 % Ethanol für 10 min bei 6000 x g und 4 °C gewaschen, getrocknet und abschließend in 100 µl ddH₂O suspendiert. Im Anschluss erfolgten Kontroll-Restriktionsanalysen.

2.2.1.9. Herstellung von Glycerinkulturen

Für die dauerhafte Lagerung von Bakterienstämmen und Transformanten wurden Glycerinkulturen angefertigt. Von den üN in LB-Medium unter entsprechenden Selektionsbedingungen gewachsenen Bakterienkulturen wurden jeweils 500 µl mit 500 µl einer sterilen 50%-igen Glycerinlösung versetzt und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.10. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration an Nukleinsäure wurde durch spektrophotometrische Messung der UV-Strahlung, die durch die Basen absorbiert wird, bestimmt. Die optische Dichte wurde in einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und mit der von Wasser als Referenz abgeglichen. Eine optische Dichte von 1 bei 260 nm entspricht annähernd einem DNA-Gehalt (doppelsträngig) von 50 µg/ml. Da Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm haben, bestimmt das Verhältnis der Absorption von A₂₆₀/A₂₈₀ die Reinheit der Nukleinsäuren. So können DNA-Präparationen mit einem A₂₆₀/A₂₈₀-Wert von 1,6-2,0 als rein betrachtet werden.

2.2.1.11. Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation sequenzspezifischer Bereiche von Nukleinsäuren wurde mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt (Mullis *et al.*, 1992). Dafür wurde der

HotMasterMix der Firma 5' Prime (Hamburg) verwendet, der, mit Ausnahme der Primer und der DNA, alle die für die PCR notwendigen Reagenzien enthält. Ein typischer Ansatz, wie er zur Amplifizierung von revers transkribierter cDNA (2.2.2.3) verwendet wurde, setzte sich wie folgt zusammen:

2,5x HotMasterMix	8	µl
Primer sense (10 µM)	0,8	µl
Primer antisense (10 µM)	0,8	µl
cDNA	1	µl
ddH ₂ O	9,4	µl

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten größer als 1 kbp wurde der Elongase[®]Enzyme Mix verwendet, der zum einem die *Taq*-Polymerase ohne proofreading Aktivität und zum anderen eine thermostabile DNA-Polymerase enthält. Ein typischer Ansatz, wie er zur Amplifizierung verwendet wurde, setzte sich wie folgt zusammen:

Puffer A	5	µl
Puffer B	5	µl
10 mM dNTPs	1	µl
Elongase	0,5	µl
Primer sense (10 µM)	0,8	µl
Primer antisense (10 µM)	0,8	µl
Plasmid-DNA	0,5	µl
ddH ₂ O	36,4	µl

Für eine *touchdown*-PCR wurden folgende Reaktionsbedingungen verwendet:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	94°C	5 min	
2	94°C	20 s	10 Zyklen
3	T _m Primer +2°C (-0.5°C/Zyklus)	30 s	
4	72°C (<i>Taq</i> -Polymerase) bzw. 68°C (Elongase [®] Enzyme Mix)	1-3 min (abhängig von der Fragmentlänge, 1kbp/min)	
5	94°C	20 s	
6	T _m Primer -3°C	30 s	15-20 Zyklen
7	72°C (<i>Taq</i> -Polymerase) bzw. 68°C (Elongase [®] Enzyme Mix)	1-3 min (abhängig von der Fragmentlänge, 1kbp/min)	
8	72°C	7 min	
9	4°C	∞	

Die bei jeder PCR mitgeführte Kontrollreaktion bestand aus allen den oben beschriebenen Zusätzen mit Ausnahme von cDNA. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese visualisiert.

2.2.1.12. Quantitative *real-time* PCR (qPCR)

Die quantitative *real-time* PCR wurde mit dem DNA Engine OPTICON[®]2 Thermozykler (MJ Research Inc., USA) durchgeführt, wobei die Quantifizierung der Produkte mithilfe des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green erfolgte. Durch Bindung des Farbstoffs an die DNA nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, wodurch eine Quantifizierung möglich wird. Für die *real-time* PCR wurde das QuantiTect[®] SYBR Green PCR Kit der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Von jeder Probe wurde dabei ein Duplikat erstellt, wobei ein typischer Ansatz sich wie folgt zusammensetzte:

2x SYBR Green MasterMix	10	µl
Primer sense (10 µM)	0,6	µl
Primer antisense (10 µM)	0,6	µl
Template	5	µl
ddH ₂ O	3,6	µl

Zur Durchführung einer quantitativen *real-time* PCR wurden folgende Reaktionsbedingungen verwendet:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	94°C	15 min	
2	94°C	1 min	45 Zyklen
3	T _m Primer	1 min	
4	72°C	1 min	
5	72°C	10 min	
6	4°C	∞	

2.2.1.13. Herstellung der *GRAMD4*ΔBH/V5/His-Deletionsmutante

Eine Methode zur Herstellung von DNA-Deletionsmutanten ist die PCR (2.2.1.11). Mithilfe einer *Two-Step*-PCR (Abb. 11) konnte die *GRAMD4*ΔBH/V5/His-Deletionsmutante generiert werden. In dieser *Two-Step*-PCR führen 2 hintereinander geschaltete PCR-Schritte zur Verknüpfung zweier DNA-Sequenzen, die zuvor mit unterschiedlichen Primerpaaren 1 + 2 bzw. 3 + 4 (2.1.6.2) im ersten PCR-Schritt aus dem pcDNA3.1-*GRAMD4*/V5/His-Vektor (2.1.3) amplifiziert wurden. In einem zweiten Schritt wird mit den Primern 1 + 4 ein PCR-Produkt erzeugt, das aus den beiden Einzelsequenzen zusammengesetzt ist. Dieses Produkt

wurde anschließend über TOPO-TA-cloning in den pcDNA3.1-Vektor kloniert (2.2.1.5) und mittels DNA-Sequenzierung (*seqlab*) bestätigt. Während der *GRAMD4/V5/His*-Vektor die komplette *GRAMD4*-Gensequenz beinhaltet und ein Protein von ca. 66 kDa exprimiert, enthält das pcDNA3.1-*GRAMD4ΔBH/V5/His*-Plasmid eine um 255 bp deletierte *GRAMD4*-Sequenz und exprimiert ein ca. 56 kDa-großes Protein.

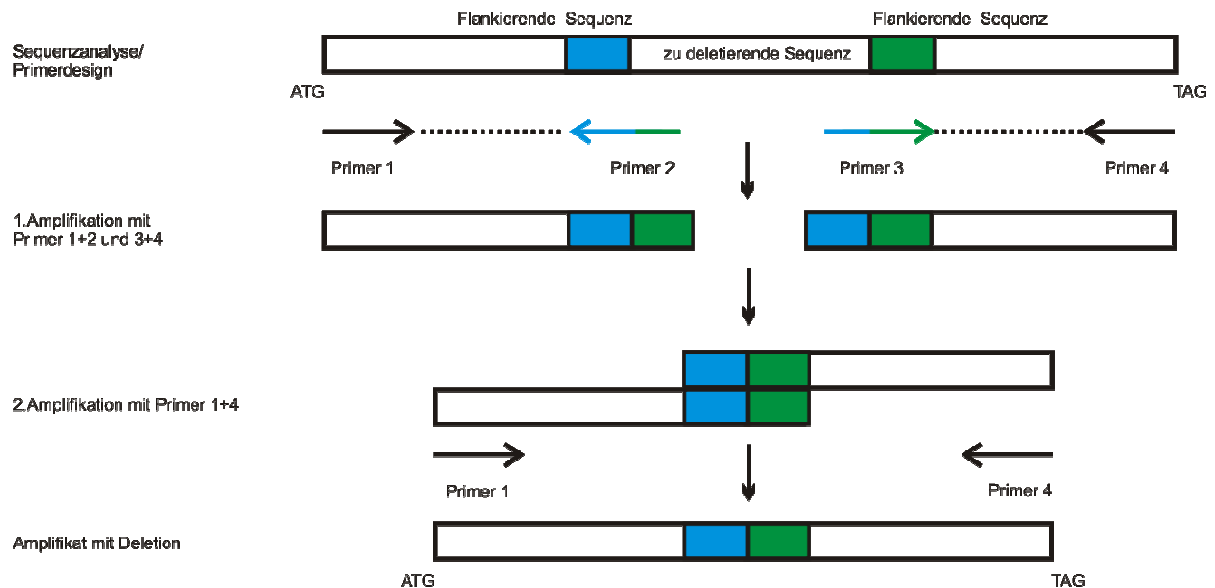


Abb. 11: Schematische Darstellung der *Two-Step-PCR* zur Generierung der *GRAMD4ΔBH*-Deletionsmutante. Erklärung siehe 2.2.1.13

2.2.2. RNA-Arbeitstechniken

2.2.2.1. RNA-Isolierung

Die Präparation von Gesamt-RNA erfolgte mit dem NucleoSpin[®] RNAII Kit von Macherey-Nagel nach den Angaben des Herstellers. Genomische DNA-Kontaminationen wurden mit der im Kit enthaltenen RNase-freien DNaseI unterbunden. Die aufgereinigte RNA wurde in 30 μ l RNase-freiem Wasser eluiert und nach Konzentrationsbestimmung und Überprüfung der Qualität mittels Agarosegelelektrophorese bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2. RNA-Konzentrationsbestimmung

Die optische Dichte wurde in einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und mit der von Wasser als Referenz abgeglichen. Eine optische Dichte von 1 bei 260 nm entspricht annähernd einem RNA-Gehalt von 40 μ g/ml. Da Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm haben, bestimmt das Verhältnis der Absorption von A260/A280 die Reinheit der Nukleinsäuren. So können RNA-Präparationen mit einem A260/A280-Wert von 1,7-2,0 als rein betrachtet werden.

2.2.2.3. Reverse Transkription

Im Anschluss an die RNA-Präparation folgte die reverse Transkription, bei der 1 µg der Gesamt-RNA zur *semiquantitativen* bzw. quantitativen (*qPCR*) Genexpressionsanalyse (2.2.1.11, 2.2.1.12) in cDNA transkribiert wurde. Dafür wurde das Omniscript RT Kit sowie Oligo(dT)₁₈ Primer (Fermentas, Deutschland) verwendet. Ein Reaktionsansatz wurde wie folgt angesetzt:

10x RT-Puffer	2	µl
dNTP mix (5 mM pro dNTP)	2	µl
Oligo(dT) ₁₈ Primer (2,5 µM)	2	µl
RNase-Inhibitor (40 U)	0,25	µl
Omniscript reverse Transkriptase (RT)	0,5	µl
RNA	1,0	µg
ad. RNase freies H ₂ O	20	µl

Der Ansatz wurde für 60 min bei 37 °C in einem Thermozykler inkubiert. Nach einem Inaktivierungsschritt (5 min, 95 °C) konnte die cDNA zur Amplifizierung sequenzspezifischer Bereiche in der PCR (2.2.1.11, 2.2.1.12) eingesetzt werden.

2.2.3. Protein-Arbeitstechniken

2.2.3.1. Proteinextraktion

Extraktion aus Gesamtzelllysaten

Adhärent wachsende Zellen wurden mittels Zellschaber von der Zellkulturplatte abgelöst und anschließend für 5 min bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert. In Abhängigkeit von der Zellzahl wurde das Zellpellet dann in 50-200 µl kaltem RIPA-Puffer mit 1x Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, Mannheim) suspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde (15 min, 14.000 rpm, 4 °C) der die Proteine enthaltende Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

RIPA-Puffer	Tris/HCl pH 7,2	50	mM
	NaCl	150	mM
	SDS	0,1	% (w/v)
	Na-Desoxycholat	1	% (w/v)
	Triton X-100	1	% (v/v)

Extraktion der mitochondrialen und zytoplasmatischen Proteine

Für die Extraktion der mitochondrialen und zytoplasmatischen Proteine fand das ApoAlert® Cell Fractionation Kit von Clontech Verwendung. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Extraktion der nukleären und zytoplasmatischen Proteine

Proteine aus dem Zellkern und dem Zytoplasma wurden mit dem Nuclear Extract Kit (Active Motif) laut Herstellerangaben extrahiert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.2.3.2. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der aus den Zellysaten gewonnenen Proteine wurde mithilfe des Bradford-Assays (Bio-Rad, München) bestimmt. Hierzu wurde 1 µl Proteinextrakt in 700 µl ddH₂O, 99 µl PBS und 200 µl Bradford-Reagenz verdünnt. Nach 10-minütiger Inkubation erfolgte die Messung der Extinktion bei 595 nm im Eppendorf BioPhotometer. Durch die Verwendung einer BSA-Eichkurve konnte die Proteinkonzentration ermittelt werden.

2.2.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinlysate wurden über SDS-Polyacrylamidgele unter reduzierenden Bedingungen im diskontinuierlichen System elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteinproben (20-100 µg) wurden mit 1x Lane Marker Non-Reducing Sample Buffer (Pierce, Bonn) sowie 1x DTT gemischt, für 10 min bei 95 °C denaturiert und auf ein Zweiphasen-SDS-Polyacrylamidgel geladen. Die Proteine wurden in der ersten Phase (Sammelgel) aufkonzentriert, um anschließend in der zweiten Phase (Trenngel) nach dem Molekulargewicht aufgetrennt zu werden. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels betrug je nach Proteingröße zwischen 10 % und 14 %. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im Mini-Protean 3-System (Bio-Rad, München) in 1x SDS-Laufpuffer bei 75-100 V für 2-3 h.

5x SDS-Laufpuffer	Tris/HCl pH 8,3	125	mM
	Glycin	1	M
	SDS	17	mM
Sammelgel	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	2,5	ml
	10 % SDS	100	µl
	Acrylamid (40 %)	1,0	ml
	TEMED	11	µl
	30 % Ammoniumpersulfat	17	µl
	H ₂ O	6,4	ml

Trenngel	10 %	12 %	14 %	
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5	2,5	2,5	ml
10 % SDS	100	100	100	µl
Acrylamid (40 %)	2,5	3,0	3,5	ml
TEMED	6	6	6	µl
30 % Ammoniumpersulfat	17	17	17	µl
H ₂ O	4,9	4,4	3,9	ml

2.2.3.4. *Western Blot* und Immundetektion

Um elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond ECL, Amersham, Freiburg) zu transferieren, wurde das semi-dry Blotting-Verfahren mit Hilfe der Trans Blot SD-Zelle (Bio-Rad, München) angewendet. Nachdem die Membran, das Gel und das „Whatman-Papier“ im Transferpuffer äquilibriert wurden, erfolgte der Transfer der Proteine je nach Größe für 90-120 min bei 70 mA. Anschließend wurde die Membran zur Visualisierung und Fixierung der geblotteten Proteine für 3 min in Ponceau-S-Lösung überführt. Nach einem Waschvorgang in *A. dest* wurde die Membran in 5%-iger Blockierlösung (5 % (w/v) Milchpulver gelöst in 0,1 % TBST) 20 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert um unspezifische Antikörperbindungen zu reduzieren. Dann erfolgte die Inkubation der Membran mit dem 1:500-1:1000 verdünnten Primärantikörper μ N bei 4 °C. Nach 3x Waschen mit 0,1 % TBST für je 5 min erfolgte die Inkubation mit dem in 5%-iger Blockierlösung verdünnten, HRP-konjugierten Sekundärantikörper nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die Membran in 0,1 %-igen TBST (2x) und in TBS-Puffer (1x) zu je 5 min gewaschen. Die Detektion spezifisch markierter Proteine erfolgte mithilfe der Chemilumineszenzreaktion des Sekundärantikörpers, die mit dem ECL-Plus Western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences, Freiburg) entsprechend den Angaben des Herstellers ausgeführt wurde. Die Chemilumineszenz wurde mit einem Chemilumineszenzfilm (Amersham Biosciences) detektiert und im Curix 60 (AGFA Health Care, Deutschland) entwickelt.

1x „Ultimate Power“- Transferpuffer	Tris	40	mM
	Natriumacetat	20	mM
	EDTA	2	mM
	SDS	0,05	%
	Methanol	20	%
1x SDS-Transferpuffer	Tris	48	mM
	Glycin	39	mM
	Methanol	20	%

Ponceau-S-Lösung	Ponceau-S	1	g
	Essigsäure	50	ml
	ad. A. dest	1	l
10x TBS-Puffer	Tris	200	mM
	NaCl	1,35	M
	pH 7,6		
1x TBS-Puffer	10x TBS-Puffer	100	ml
	H ₂ O	900	ml
0,1 % TBST-Puffer	1x TBS-Puffer	1	l
	Tween-20	1	ml

2.2.3.5. Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation wurde zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vitro* genutzt. Dazu wurden die vermeintlichen Interaktionspartner transient überexprimiert und nach 48 h die Proteine aus den Zellen extrahiert (2.2.3.1). Nach Konzentrationsbestimmung wurden 400 µg Protein je Ansatz auf 250 µl Volumen mit RIPA-Puffer aufgefüllt und durch Zugabe von 20 µl Protein A/G-Plus Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) für 1 h bei konstanter Rotation (25 rpm, 4 °C) gereinigt. Nach 30 s Zentrifugation bei 1500 x g wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt und 500 µl RIPA-Puffer dazu pipettiert. Nach Zugabe von 4 µg Antikörper erfolgte üN bei konstanter Rotation (25 rpm, 4 °C) die Bindung des Antikörpers an das Zielprotein, das am nächsten Tag durch 20 µl Protein A/G-Plus Agarose präzipitiert wurde (1 h, 25 rpm, 4 °C). Bei einer möglichen Interaktion kann somit der an das Zielprotein gebundene Bindungspartner kopräzipitiert werden. Die Agaroseteilchen wurden für 30 s bei 1500 x g pelletiert und 4x mit 500 µl RIPA-Puffer gewaschen, um unspezifische Proteine zu entfernen. Danach wurde das Agarose-Pellet in 40 µl Laemmli-Puffer suspendiert und die Proteine durch Denaturierung (3 min, 95°C) von den Agaroseteilchen gelöst. Nach kurzer Sedimentierung der Agarose wurde der Überstand auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen und durch *Western Blot* der kopräzipitierte Interaktionspartner des Zielproteins mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen.

2.2.3.6. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Um spezifisch Protein-DNA-Interaktionen *in vivo* zu untersuchen, wurden Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) nach dem Protokoll von Nelson durchgeführt (Nelson *et al.*, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die mögliche Bindung des Transkriptionsfaktors p73 an den humanen *GRAMD4*-Promotor genauer untersucht werden. Hierfür wurden zum einen Saos-2 und H1299-Zellen mit Ad.p73β transduziert, als auch H1299-Zellen mit Cisplatin

(cDDP) behandelt, um die Expression des endogenen p73 zu steigern und dessen Bindung an den *GRAMD4*-Promoter unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Nach 24 h wurden die Protein-DNA-Komplexe durch *cross-linking* mit Formaldehyd (Endkonzentration 1,42 %) fixiert und das Chromatin durch Ultraschall (Sonifizierung, 4x 15 s Impulse, Amplitude 50 %) in DNA-Fragmente mit einer Größe von 200-1000 bp zerschnitten. Anschließend erfolgte die Messung der Proteinkonzentration (2.2.3.2) und die Einstellung der Proben auf gleiche Proteinmengen. Die Protein-DNA-Komplexe, die den zu untersuchenden Transkriptionsfaktor enthielten, wurden mithilfe eines spezifischen Antikörpers (anti-p73) gegen dieses Protein präzipitiert. Als Kontrollen wurden ein unspezifischer anti-IgG-Antikörper sowie eine Probe ohne Antikörper mitgeführt. Vom isolierten Chromatin wurde die DNA aufgereinigt und durch PCR (2.2.1.11, 2.2.1.12) mittels spezifischer Primer die genomischen Promotorsequenzen detektiert.

2.2.4. Zellkulturarbeiten und Transduktion

2.2.4.1. Allgemeine Zellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden nach Lagerung im Flüssigstickstoff bei 37 °C aufgetaut, in 10 ml Medium (2.1.8) suspendiert und in Zellkulturschalen überführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C in 5%-iger CO₂-Atmosphäre. Zum Passagieren wurden die Zellen nach Aspiration des Mediums mit PBS gewaschen, mit einer Trypsin/EDTA-Lösung für 5-10 min bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert und von der Zellkulturschale gelöst. Die gelösten Zellen wurden in neues Medium aufgenommen, bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert und anschließend in Anhängigkeit von der Zelllinie 1:5-1:10 auf neue Zellkulturplatten mit frischem Medium gesplittet. Zur Lagerung in Flüssigstickstoff wurden die Zellen mit PBS gewaschen, durch Trypsin/EDTA gelöst und in dem, für jede Zelllinie geeigneten eiskalten Medium ergänzt mit 10 % DMSO, suspendiert.

2.2.4.2. Transiente Transfektion von Zellen

24 h vor der transienten Transfektion wurden 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen auf Zellkulturplatten ausgebracht und üN inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen unter Verwendung des Effectene Transfection Reagent Kits nach Angaben des Herstellers mit 1,5 bis 2 µg DNA transfiziert und in Abhängigkeit vom Experiment weitere 24 bis 48 h kultiviert.

2.2.4.3. Immunfluoreszenz

Die Zellen wurden zunächst in einer 6-well-Zellkulturplatte auf Deckgläsern kultiviert und entsprechend dem Experiment behandelt. Nach Entfernung des Mediums und mehrmaligen Waschen in 1xPBS erfolgte die Fixierung der Zellen in 3,7 % Paraformaldehyd für 15 min.

Anschließend wurde das Paraformaldehyd abgenommen und die Zellen 10 min mit 1xPBS gewaschen. Anschließend erfolgte der Permeabilisierung der Zellen für 10 min mit 1x PBS/ 0,2 % Triton-X. Nach einem Waschschrift in 1xPBS folgte die 20-minütige Inkubation der Zellen in Blocking Puffer und anschließend die 1h-Inkubation mit dem in 1xPBS/3 % BSA/0,02 % Triton-X verdünnten Primärantikörper (anti-GRAMD4, anti-Bax, 1:50). Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen zunächst 3x mit PBS gewaschen, bevor sie für 1 h mit dem Sekundärantikörper im Dunkeln inkubiert wurden. Auch dieser Antikörper wurde zuvor in 1xPBS/3 %BSA/0,02 % Tween 20 verdünnt (anti-rabbit-Alexa 488 bzw. 633, anti-mouse 633, 1:300). Nach der Inkubation schlossen sich erneut Waschschriffe mit PBS (1x 10 min, 1x 5 min) an, bevor die Zellkerne 5 min mit 5 µg/ml DAPI gefärbt wurden. Nach einem letzten Waschschrift (5 min) wurden die Deckgläser mit der Zellunterseite in 20 µl Einbettmittel (Oncogene Research Products, Großbritannien) auf Objektträgern fixiert. Zur Visualisierung der Mitochondrien wurden die Zellen vor dem Fixierungsschrift für 30 min mit 200 nM MitoTracker[®]Orange CMTMRos nach Angaben des Herstellers (Molecular Probes, Eugene, USA) inkubiert und anschließend das Immunfluoreszenz-Protokoll wie beschrieben durchgeführt. Die Fluoreszenzaufnahmen der Proben wurden mit einem Konfokal-Laser-Rastermikroskop TCS SP2 AOBS (Leica, Deutschland) angefertigt.

Fixierungspuffer	PBS	1	x
	Formalin	3,7	% (v/v)
Permeabilisierungspuffer	PBS	1	x
	Triton-X	0,2	% (v/v)
Blockierungspuffer	PBS	1	x
	BSA	1	% (w/v)
	Tween-20	0,1	% (v/v)
Antikörperverdünnungslösung	PBS	1	x
	BSA	3	% (w/v)
	Tween-20	0,02	% (v/v)

2.2.4.4. Reportergenanalysen

Zur Analyse des *GRAMD4*-Promotors und dessen Aktivierung durch Transkriptionsfaktoren wie E2F1, p53 und p73 wurden Reportergenanalysen durchgeführt. Zur Amplifikation des *GRAMD4*-Promotors wurde der Bac Klon # RPCI-3-439F8 von BACPAC Resources, Oakland, CA, USA verwendet. Mithilfe des Elongase[®]Enzyme Mix wurde mit den sequenzspezifischen Primern -2064 *KpnI* sense und +8 *BglIII* antisense (2.1.6.5) ein 2072 bp großes Promotorfragment amplifiziert, in den pGEM[®]-T-Vektor zwischenkloniert und anschließend in den mit *KpnI/BglIII* geschnittenen pGL3-Vektor eingebracht (2.2.1.5). Ausgehend von diesem Konstrukt wurden fünf weitere Promotorkonstrukte mit den

Primern -1361 *KpnI* sense/+8 *BglIII* antisense, -1295 *KpnI* sense/+8 *BglIII* antisense, -601 *KpnI* sense/+8 *BglIII* antisense, -430 *KpnI* sense/+8 *BglIII* antisense und -77 *KpnI* sense/+8 *BglIII* antisense (2.1.6.5) amplifiziert und ebenfalls über pGEM[®]-T in pGL3-basic kloniert. Nach Sequenzierung der Promotorkonstrukte standen diese für die Luciferase-Assays zur Verfügung.

2.2.4.5. Luciferase-Assay

Zur Quantifizierung der Promotoraktivität wurde die Aktivität der *Firefly*-Luciferase bestimmt. Dazu wurden 5×10^5 Zellen (H1299, Saos-2, *p53*^{-/-} HCT116) auf 6-cm Zellkulturplatten ausgebracht und mit einem Luciferase-Reporterplasmid sowie entsprechenden Expressionsplasmiden (2.1.3) unter Verwendung des Effectene Transfection Reagent Kit (Qiagen) transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit je 0,5 µg pGL3-Promotorkonstrukt bzw. pGL3-basic als Negativkontrolle und in Abhängigkeit vom Experiment mit unterschiedlichen Konzentrationen an Expressionsplasmiden. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen von der Zellkulturplatte gelöst, die Zellsuspension in 15 ml Falcons überführt und 10 min bei 300 x g und 4 °C sedimentiert. Das Zellpellet wurde dann in 150 µl 1x Cell Culture Lysis Reagent (Promega) suspendiert und für 30 min auf Eis lysiert. Nach 15 min Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C wurden je Ansatz 3x 25 µl des Überstandes in Messröhrchen überführt (Triplikat) und im Luminometer Lumat LB9507 (Berthold Technologies) auf die Luciferaseaktivität analysiert. Der Messwert wurde in RLU (Relative Luciferase Unit) angegeben und gegen die Proteinkonzentration der Lysate normalisiert.

2.2.4.6. Detektion von Apoptose mittels Hoechst 33342-Färbung

Der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 (H342) kann, ähnlich wie DAPI, spezifisch den Zellkern bzw. die dort befindliche DNA anfärben, wobei eine erhöhte Interkalationseffizienz durch kondensierte DNA erzielt wird. Die Folge ist eine stärkere Anfärbung von mitotischen und insbesondere von apoptotischen Zellen, die nach H342-Färbung unter dem Mikroskop deutlich an der diffusen, blau-weißlichen Fluoreszenz (Emmissionsmaximum 461 nm) zu erkennen sind. Es wurden 1×10^5 Zellen in einer 6-well-Platte ausgesät und am folgenden Tag je nach Experiment transduziert. Für die Detektion apoptotischer Zellen, wurde 1 µg/ml H324 in das Zellkulturmedium gegeben und für 15 min bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Daraufhin wurde die Fluoreszenz der Zellen direkt in der Zellkulturschale mit dem Mikroskop detektiert. Die Anregungswellenlänge von H342 liegt im UV-Bereich bei etwa 350 nm.

2.2.4.7. FACS (*fluorescence activated cell sorting*)-Analyse zur Quantifizierung apoptotischer Zellen

1 x 10⁶ Zellen wurden mit Ad.GFP, Ad.GRAMD4 und Ad.p73 β infiziert und in Abhängigkeit vom Experiment geerntet. Hierfür wurden die Zellen für 5 min bei 1200 rpm und 4 °C sedimentiert, anschließend in eiskaltem PBS suspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 4 °C, 1200 rpm) wurde das Pellet in 1 ml eiskaltem Ethanol (70 %) aufgenommen und üN bei -20 °C gelagert. Am folgenden Tag wurden die fixierten Zellen zentrifugiert (10 min, 4 °C, 4600 rpm), das Pellet mit eiskaltem PBS gewaschen, nochmals zentrifugiert (10 min, 4 °C, 4600 rpm) und anschließend in 500 μ l Färbemedium (PBS, 100 μ g/ml RNase, 100 μ g/ml Propidiumiodid) suspendiert und inkubiert (30 min, Eis). Die Detektion erfolgte im Durchflußzytometer FACSCalibur (Becton Dickenson) und die Analyse mit der CellQuest Software (Becton Dickenson). Die Propidiumiodid-Färbung ermöglicht die Bestimmung der Zellpopulationen, die sich in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus befinden (G1/G0, S, G2, M). Während der Apoptose wird die DNA degradiert, wodurch Propidiumiodid nicht mehr effizient in die DNA interkalieren kann. Infolge der schlechten Färbung der DNA kommt es zu einem steigenden Anteil der Zellpopulation in der sogenannten sub-G1-Phase. Die Zellen in der sub-G1-Phase stellen ein Maß für den Anteil an apoptotischen Zellen innerhalb der geernteten Gesamtpopulation dar.

2.2.4.8. Nachweis von Bax-Oligomeren nach Behandlung mit Bis-Maleimidohexan (BMH)

BMH (Bis-Maleimidhexan) gehört zu den Maleimid-Crosslinkern und ist in der Lage Sulfhydryl-Gruppen (-SH) miteinander zu verknüpfen. Durch die Reaktion der Sulfhydryl-Gruppen mit der Maleimid-Gruppe entstehen stabile Thioether-Bindungen, die weder durch reduzierende Agentien noch durch physiologische Pufferbedingungen gelöst werden können. Diese Reaktion ist bei einem pH von 6,5 bis 7,5 sehr spezifisch. Verwendung findet der Crosslinker im Allgemeinen bei der Erforschung und Charakterisierung von Proteinstrukturen (z. B. Oligomerisierung) und Proteininteraktionen.

Zum Nachweis der Bax-Oligomerisierung an den Mitochondrien wurden p53-negative H1299-Zellen mit Ad.GRAMD4, Ad.p53 und Ad.GFP infiziert und 48 h nach Transduktion die mitochondriale Fraktion nach Protokoll isoliert (2.2.3.1). Die gewonnenen Mitochondrienpellets wurden anschließend in Konjugatpuffer gelöst und in einer Konzentration von 1 mM mit BMH in DMSO versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C im Schüttler wurden die Proben durch die Zugabe der gleichen Menge an 2xSDS-Gelladepuffer lysiert, 10 min bei 95 °C gekocht und anschließend *Western Blot*-Analysen unterzogen. Die Mitochondrien von Ad.GFP infizierten Zellen und unbehandelte Lysate dienten als Negativkontrollen.

2xSDS-Gelladepuffer	Tris/HCl, pH 6,8	1	M
	SDS	20	% (w/v)
	Glycerin	4	ml
	0,1 % Bromphenolblau	0,2	ml
	β -Mercaptoethanol	0,8	ml (v/v)
	H ₂ O	2	ml
Konjugatpuffer	PBS (pH 7,2)	1	x
	EDTA	8	mM

2.2.5. Tierversuche

Sechs bis acht Wochen alten Nacktmäusen wurden in die rechte hintere Flanke 5×10^6 *p53*^{-/-} HCT116-Zellen subkutan injiziert. Mäuse, die einen sichtbaren Tumor entwickelt hatten, wurde intratumoral an Tag 0, 3, und 6 mit 5×10^8 Pfu der adenoviralen Vektoren Ad.GRAMD4 und Ad.GFP (Kontrolle) injiziert. Bei der Kombinationstherapie mit dem intratumoral verabreichten Chemotherapeutika Cisplatin (cDDP) wurde die erste Behandlung am Tag 7 und dann 5x alle 3 Tage durchgeführt (7., 10., 13., 16. und 19. Tag, jeweils 6 mg/kg). Die Tumorentwicklung wurde über den Zeitraum von insgesamt 21 Tagen beobachtet.

Zur Überprüfung des Tumorwachstums nach Inhibierung von GRAMD4, p73 und Cisplatin-Behandlung, wurden $7,5 \times 10^6$ *p53*^{-/-} HCT116-Zellen *ex vivo* mit shRNA-exprimierenden Ad-Vektoren gegen GRAMD4 und p73 infiziert und anschließend subkutan in die rechte hintere Flanke von Nacktmäusen (nu/nu) injiziert. Nach Entwicklung von sichtbaren Tumoren wurde das Chemotherapeutikum Cisplatin (cDDP, 6 mg/kg) 3x intraperitoneal verabreicht. Die Tumorentwicklung wurde über den Zeitraum von insgesamt 8 Wochen beobachtet.

3. Ergebnisse

3.1. Aktivierung von GRAMD4 in der E2F1-induzierten Apoptose

Im p53-unabhängigen Apoptoseweg kann der Transkriptionsfaktor E2F1 den programmierten Zelltod über die Induktion von GRAMD4 auslösen (Stanelle *et al.*, 2005). Bis dato ist jedoch nicht bekannt, durch welche direkten Mediatoren die Regulation von *GRAMD4* stattfindet. Zum einen könnte die direkte Aktivierung des *GRAMD4*-Promotors durch E2F1 in Betracht gezogen werden. Zum anderen könnten E2F1-induzierte Transkriptionsfaktoren an der Regulation von *GRAMD4* beteiligt sein und damit ein indirekter Mechanismus vorliegen. Um dies zu klären, wurden *in silico*-Analysen und Reporter-gen-Assays in humanen Krebszelllinien durchgeführt.

3.1.1. *In silico*-Analysen der *GRAMD4*-Promotorregion

Mittels bioinformatischer Analysen der *GRAMD4*-Promotorregion unter Verwendung der JASPAR-Datenbank (Sandelin *et al.*, 2004; Bryne *et al.*, 2008) konnten neben 12 möglichen E2F1-Bindestellen, zahlreiche putative p53/p73-Bindungsstellen ermittelt werden (Abb. 12, Tab. 1, Tab. 2). Allerdings befinden sich in der 5'-stromaufwärts liegenden Region des *GRAMD4*-Gens weder eine TATA-Box noch ein Inr (*Initiator*)-Element. Es waren jedoch zahlreiche GC-Boxen nachweisbar, die in vielen Genen zu finden sind, deren Promotoren keine TATA-Box besitzen (Azizkhan *et al.*, 1993) (Abb. 12, Tab. 3). Diese GC-Boxen dienen als Bindungsmotive für den ubiquitären Transkriptionsfaktor Sp1 (*Specificity protein 1*).

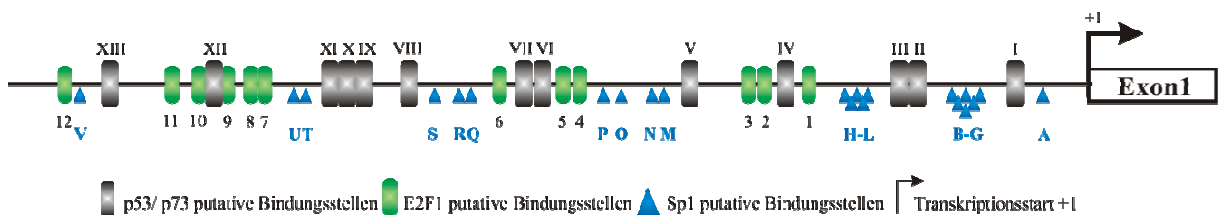


Abb. 12: Schematische Darstellung der *GRAMD4*-Promotorregion. Die Positionen der putativen p53/p73-, E2F1- und Sp1-Bindestellen 2064 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart +1 des *GRAMD4*-Gens (gene accession Nr. NM_015124) sind dargestellt.

Das Programm JASPAR identifizierte innerhalb der untersuchten Region von -2064 bp stromabwärts bis +8 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart (+1) 13 putative p53/p73-Bindestellen. Diese weisen im Vergleich mit der in JASPAR vorgegebenen Konsensussequenz (http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar_db.pl?ID=MA0106.1 & rm=present& collection=CORE) Ähnlichkeiten von 70 bis 90 % auf (Tab. 1).

Tab. 1: Putative p53/p73-Bindestellen in der GRAMD4-Promotorregion. Bs, Bindestelle; ^a, Lage der Bindestellen stromaufwärts vom Transkriptionsstart +1; ^b, Identität gibt die Anzahl der Nukleotide an, die mit der p53/p73-Konsensussequenz identisch sind, Übereinstimmungen sind durch Großbuchstaben gekennzeichnet; Pu, Purine; Py, Pyrimidine.

putative p53/p73-Bs	Sequenz 5'-(C/T/C/G)(C/G/A/T)PuPuPuCATGPyPyPy (G/T/A)(G/T/A)Pu(C/G/A)(A/T)(T/A)(G/T/C/A)(T/C/G/A)-3'	Position ^a	Identität ^b
Bs-I	CTGGACcgGCTgTGcCctGT	-97 bis -78	14/20
Bs-II	CTGGACcgGCCgTGcCctGC	-206 bis -187	14/20
Bs-III	GAAAGCtgGaCCGGcCgTGC	-211 bis -192	15/20
Bs-IV	TTtGGCATGgCTGGcCcTCC	-450 bis -431	16/20
Bs-V	CGGGGCcaGgTgGAGCAgGT	-621 bis -602	15/20
Bs-VI	CAcGGCAcaTCCGccCTTTG	-914 bis -895	15/20
Bs-VII	GCAGcgATGTggGGAGcAGT	-938 bis -919	15/20
Bs-VIII	TGGGAaATaCCCccGCcAGG	-1315 bis -1296	15/20
Bs-IX	GCAGGCATGTAgGAGCTgGA	-1390 bis -1371	18/20
Bs-X	CGGGGCAGGCaTGTAGgAGC	-1394 bis -1375	17/20
Bs-XI	TGGGGgcgGggCAGGCATGT	-1400 bis -1381	15/20
Bs-XII	CTGGGAcTCCGcGCcTCT	-1521 bis -1502	15/20
Bs-XIII	ACcAcCAcGCCCGGctAATT	-1751 bis -1732	15/20

Beim Vergleich der putativen E2F1-Bindungsdomänen mit der JASPAR Konsensussequenz (http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar_db.pl?ID=MA0024.1&rm=present&collection=CORE) konnten Sequenzhomologien von 75 bis 88 % erreicht werden. Die möglichen Sp1-Bindestellen weisen Identitäten von 60 bis 100 % zu der Konsensussequenz (http://jaspar.genereg.net/cgi-bin/jaspar_db.pl?ID=MA0079.1&rm=present&collection=CORE) der Datenbank auf.

Tab. 2: Putative E2F1-Bindestellen in der GRAMD4-Promotorregion. Bs, Bindestelle; ^a, Lage der Bindestellen stromaufwärts vom Transkriptionsstart +1; ^b, Identität gibt die Anzahl der Nukleotide an, die mit der E2F1-Konsensus-Sequenz identisch sind; Übereinstimmungen sind durch Großbuchstaben gekennzeichnet.

putative E2F1-Bs	Sequenz 5'-TTT(G/C)(G/C)CG(C/G)-3'	Position ^a	Identität ^b
Bs-1	cTgCGCGC	-396 bis -389	6/8
Bs-2	TTTGGCat	-450 bis -443	6/8

Bs-3	TTTCCaGG	-429 bis -422	7/8
Bs-4	TTaCGCGt	-876 bis -869	6/8
Bs-5	TTTGGCaC	-898 bis -891	7/8
Bs-6	TTTGGgGG	-972 bis -965	7/8
Bs-7	TTgGGgGC	-1401 bis -1394	6/8
Bs-8	TTTGGgGG	-1402 bis -1395	7/8
Bs-9	TgTGGCtC	-1502 bis -1495	6/8
Bs-10	cTcCGCGC	-1513 bis -1506	6/8
Bs-11	TTTGCaGC	-1591 bis -1584	7/8
Bs-12	TcTCGcTc	-1873 bis -1866	6/8

Tab. 3: Putative Sp1-Bindestellen in der *GRAMD4*-Promotorregion. Bs, Bindestelle; ^a, Lage der Bindestellen stromaufwärts vom Transkriptionsstart +1; ^b, Identität gibt die Anzahl der Nukleotide an, die mit der Sp1-Konsensus-Sequenz identisch sind; Übereinstimmungen sind durch Großbuchstaben gekennzeichnet.

putative Sp1-Bs	Sequenz 5'-(G/T)GGGCGGPuPuPy-3'	Position^a	Identität^b
Bs-A	GGGGCtGGa	-59 bis -50	7/10
Bs-B	GGGtCGGGGT	-120 bis -111	9/10
Bs-C	aGGGCGGGGT	-134 bis -125	9/10
Bs-D	GtGGCaGGGC	-139 bis -130	8/10
Bs-E	GaGGgacGGT	-147 bis -138	6/10
Bs-F	GtGGgaGGGa	-151 bis -142	6/10
Bs-G	GGGGCtGGa	-168 bis -159	7/10
Bs-H	GGGtCGGGGT	-229 bis -220	9/10
Bs-I	GGGcgGGGGT	-243 bis -234	8/10
Bs-J	aGGGCGGGGg	-244 bis -235	8/10
Bs-K	TGGGtGGGGT	-280 bis -273	9/10
Bs-L	TGGCctGGGT	-285 bis -276	9/10
Bs-M	TGGGCGGAGT	-640 bis -631	10/10
Bs-N	GGaGCaGtGT	-649 bis -640	7/10
Bs-O	GGGGCtGGGa	-791 bis -782	8/10
Bs-P	GaGGCaGGca	-803 bis -794	7/10
Bs-Q	GGGGCtGGGT	-1039 bis -1030	9/10

Bs-R	GGGGCtGGGg	-1045 bis -1036	8/10
Bs-S	GGGGacGGGg	-1092 bis -1083	7/10
Bs-T	GGGGCaGGca	-1393 bis -1384	7/10
Bs-U	GGGGCGGGGC	-1398 bis -1389	10/10
Bs-V	GtGGCGGGAT	-1844 bis -1835	9/10

3.1.2. *GRAMD4* ist ein direktes Zielgen von p73

Um die Art der Regulation durch die Transkriptionsfaktoren E2F1 bzw. p53/p73 genauer zu charakterisieren, wurde die *GRAMD4*-Expression bei Anwesenheit des Antibiotikums Cycloheximid (CHX) überprüft. CHX ist ein *de novo* Proteinsyntheseinhibitor mit dessen Hilfe zwischen direkter oder indirekter Transaktivierung unterschieden werden kann. Bei Regulation der *GRAMD4*-Expression in Gegenwart von CHX kann von einer direkten Bindung der untersuchten Transkriptionsfaktoren ausgegangen werden. Bei unveränderter *GRAMD4*-Transkriptmenge nach Zugabe von CHX sind andere Mediatoren für die Transaktivierung erforderlich.

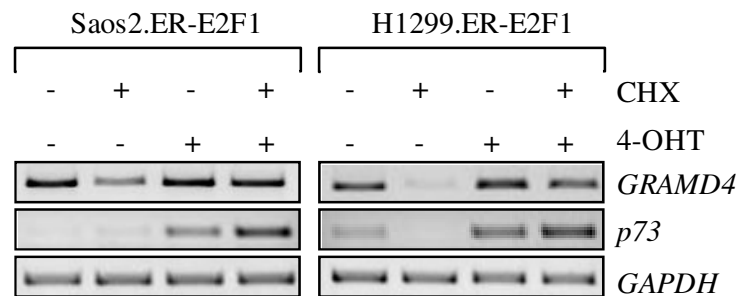


Abb. 13: E2F1 kann *GRAMD4* nicht direkt transaktivieren. *Semiquantitative* RT-PCR-Analyse der *GRAMD4*-Expression nach Induktion von E2F1 mit CHX nach 24 h. Unbehandelte Zellen dienen als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde *p73* mitgeführt. Das Gen *GAPDH* wurde als interne Ladekontrolle herangezogen.

Die Untersuchung der Bindung zwischen dem *GRAMD4*-Promotor und dem Transkriptionsfaktor E2F1 zeigen, dass der Promotor nicht direkt durch E2F1 reguliert wird. Hierfür wurden Zellsysteme verwendet, die E2F1, fusioniert an die Ligandenbindungsdomäne des murinen Östrogenrezeptors (ER), stabil exprimieren. In diesen Tumorzellen ist der Transkriptionsfaktor durch die Gabe des Liganden 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) aktivierbar (Stanelle *et al.*, 2002). Saos-2.ER-E2F1- und H1299.ER-E2F1-Zellen, die mit 4-OHT induziert und mit CHX behandelt wurden, zeigen keine Veränderung in der *GRAMD4*-Expression, d. h., die Regulation durch E2F1 ist demzufolge indirekt und benötigt die Proteinsynthese zusätzlicher Proteine. *p73*, das als ein direktes E2F1-Zielgen gilt, wurde als Positivkontrolle mitgeführt (Abb. 13) (Stiewe & Putzer, 2000).

Die Tatsache, dass GRAMD4 im E2F1-regulierten Signalweg Apoptose auslöst, jedoch von E2F1 nicht direkt transaktiviert wird, führte zu der Annahme, dass E2F1-Zielgene wie p73 an der Aktivierung des *GRAMD4*-Promotors beteiligt sein könnten. Diese Hypothese wurde durch die Detektion zahlreicher putativer p53/p73-Bindestellen im Promotor unterstützt.

Zur Bestimmung der Bindung von p73 an den *GRAMD4*-Promotor wurden unbehandelte H1299-Zellen und Zellen, die mit Ad.GFP und Ad.p73 infiziert wurden, 20 h nach Transduktion für 4 h mit CHX inkubiert, anschließend geerntet (24 h) und für RT-PCR-Untersuchungen verwendet. Die Überexpression von p73 führt im Vergleich zu den Kontrollen (unbehandelte bzw. GFP-infizierte H1299-Zellen) zu einer vermehrten Bildung der *GRAMD4*-Transkriptmengen. In Gegenwart von CHX ist ebenfalls ein Anstieg der *GRAMD4*-Expression sichtbar (Abb. 14). Dies ist ein Hinweis darauf, dass *GRAMD4* direkt durch den Transkriptionsfaktor p73 transaktiviert wird. *S100A2*, ein direktes Zielgen des p53-Homologen p73, diente als Positivkontrolle (Lapi *et al.*, 2006).

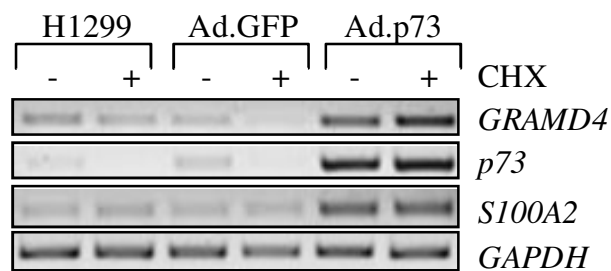


Abb. 14: Nachweis der direkten Transaktivierung von *GRAMD4* durch p73. *Semi-quantitative* RT-PCR-Analyse der *GRAMD4*-Expression nach Überexpression von p73 mit und ohne CHX nach 24 h. Unbehandelte und GFP-infizierte serumfreie Zellen dienten als Negativkontrollen. *S100A2* wurde als Positivkontrolle für ein direktes p73-Zielgen verwendet. Das Gen *GAPDH* diente als interne Ladekontrolle.

3.1.3. Nachweis der Bindung von p73 an den *GRAMD4*-Promotor mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Die bisherigen Untersuchungen zur Regulation der *GRAMD4*-Expression deuten auf eine direkte Transaktivierung durch p73 hin (Abb. 14). Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) herangezogen. Die ChIP ist eine etablierte Methode um Interaktionen zwischen DNA-bindenden Proteinen und DNA im Chromatinkontext lebender Zellen zu untersuchen (Orlando, 2000; Kaeser & Iggo, 2002). Zur genauen Identifizierung potenzieller p53/p73-Bindestellen im *GRAMD4*-Promotor wurden sowohl Saos-2- als auch H1299-Zellen für 24 h mit einem p73-exprimierenden adenoviralen Vektor transduziert. Nach dem *cross-linking* und anschließender Sonifizierung wurden die p73-DNA-Komplexe im Zelllysate mit einem p73-Antikörper und einem unspezifischen Kontroll-Antikörper (IgG) immunpräzipitiert. Vor Zugabe der Antikörper wurde *Input*-DNA

entnommen, die als Vergleichsprobe für die immunpräzipitierten DNAs dienen sollte. Nach dem Auflösen der Quervernetzungen zwischen Proteinen und DNA (*decross-linking*) und Entfernung der Proteine wurden die DNA-Fragmente sowohl mittels *semiquantitativ*- als auch quantitativer PCR (qPCR) analysiert. Durch Verwendung von spezifischen Primerkombinationen (2.1.6.4), die verschiedene Fragmente des Promotors (A-G) mit den putativen Bindestellen amplifizieren (Abb. 15), war es möglich die Chromatinregionen, die von p73 gebunden wurden, zu identifizieren.

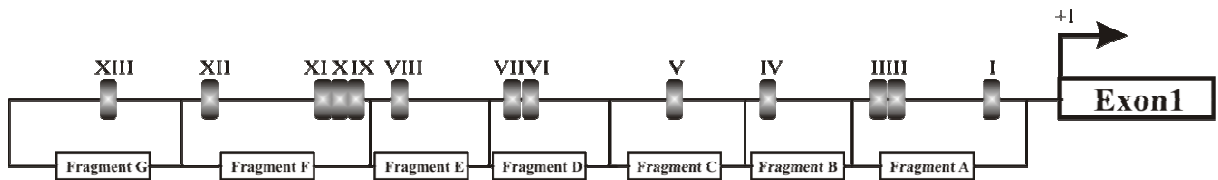
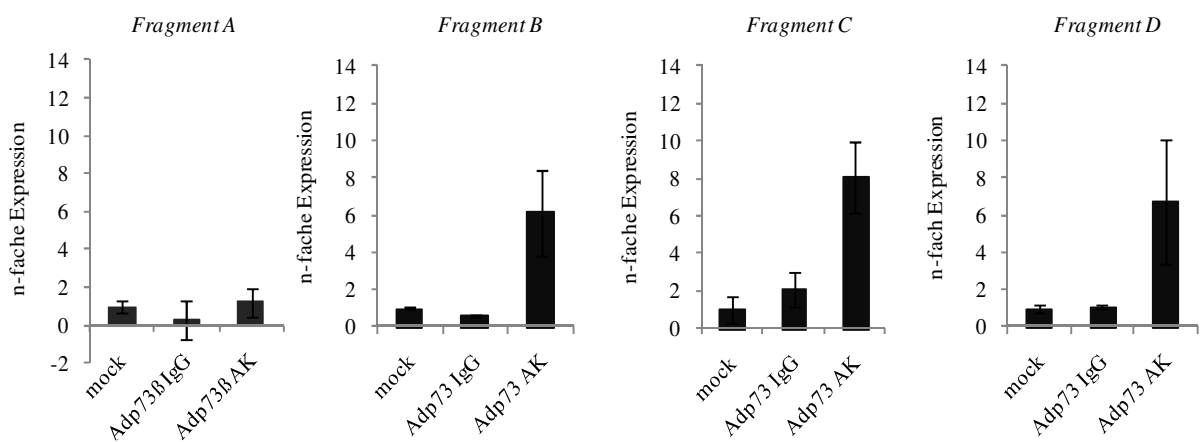


Abb. 15: Schematische Darstellung des *GRAMD4*-Promotors mit den potenziellen p53/p73-Bindestellen (I–XIII). Die Darstellung beinhaltet die Lage der potenziellen p53/p73-Bindestellen 2064 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart +1 in den von spezifischen Primerpaaren amplifizierten Fragmenten A-G.

Als Positivkontrolle für die Bindung von p73 an eine Chromatinstruktur wurde der p21WAF1-Promotor herangezogen. Bei der mock-Probe (Negativkontrolle) handelt es sich um unbehandelte Zellen, die keiner Immunpräzipitation unterzogen wurden. Wie aus der Abb. 16 ersichtlich, war in den p73-Immunpräzipitaten der Fragmente B, C, D, E und F eine 3- bis 10-fache Anreicherung von *GRAMD4*-Promotorsequenzen nachweisbar. Dagegen waren die genomischen Bereiche unter Verwendung der Primer für die Fragmente A und G (2.1.6.4) in keiner Weise angereichert. Auch bei den beiden mitgeführten Kontrollen mock und IgG konnte kein Bereich des *GRAMD4*-Promotors amplifiziert werden, d. h. es konnten keine spezifischen Protein-DNA-Komplexe immunpräzipitiert werden. Die Bindung von p73 an den Promotor von p21WAF1 führt zu einem 70-fachen Anstieg der Expression (Positivkontrolle).



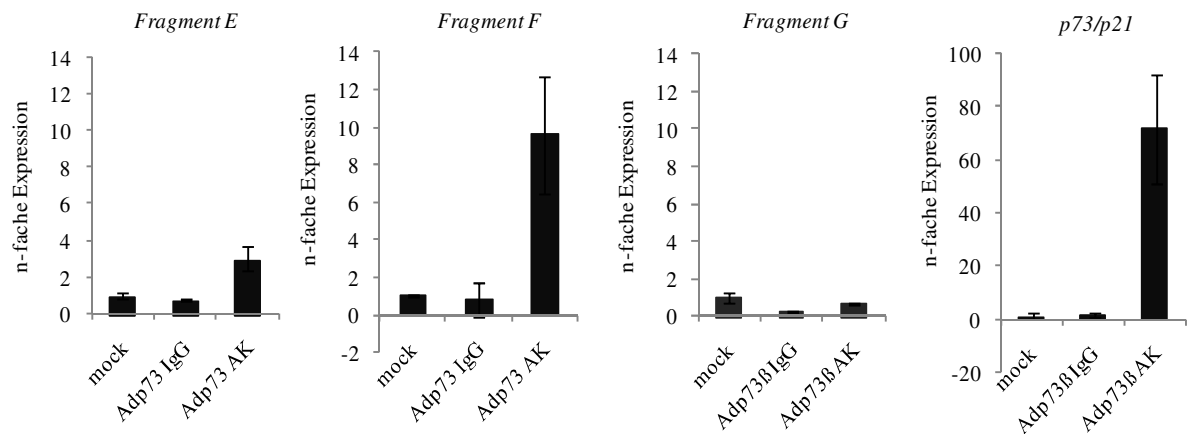


Abb. 16: Anreicherung von *GRAMD4*-Sequenzen (Fragmente A–G) in p73-Immünpräzipitaten *in vivo*. ChIP-Analyse von H1299-Zellen nach Transduktion mit einem p73 exprimierenden adenoviralem Vektor. Nach dem *cross-linking* und der Sonifizierung wurden die Zelllysate sowohl mit einem p73-Antikörper als auch einem unspezifischen Kontroll-Antikörper (IgG) immunpräzipitiert. Anschließend wurden die aus den Immunpräzipitaten isolierten DNA-Fragmente durch quantitative *real-time-PCR* mit den Primerpaaren A bis G untersucht. Die Normalisierung erfolgte durch die vor der IP entnommenen Inputs. Die relative Anreicherung der amplifizierten DNA-Fragmente wurde in Relation zur Negativkontrolle (mock) ermittelt, die den Wert 1 erhielt. Der p21WAF1-Promotor diente als Positivkontrolle.

Identische Resultate lieferten die *semiquantitativen* RT-PCRs (Abb. 17). In den H1299-Zellen kommt es in den p73/*GRAMD4*-Immünpräzipitaten (= Ad.p73β AK) zu einer Anreicherung der Fragmente B, C, D, E und F, während in den beiden verbleibenden Fragmenten A und G keine *GRAMD4*-Expression gezeigt werden kann. In den Kontrollen (= mock bzw. Ad.p73β IgG) konnte kein Bereich des *GRAMD4*-Promotors amplifiziert werden, d. h. es konnten keine spezifischen Protein-DNA-Komplexe immunpräzipitiert werden. Im *Input* wurde keine Anreicherung bestimmter DNA-Bereiche festgestellt. Die mitgeführte Positivkontrolle (p21WAF1-Promotor) zeigt wiederum eine stark erhöhte Expression in der mit p73 immunpräzipitierten Probe.

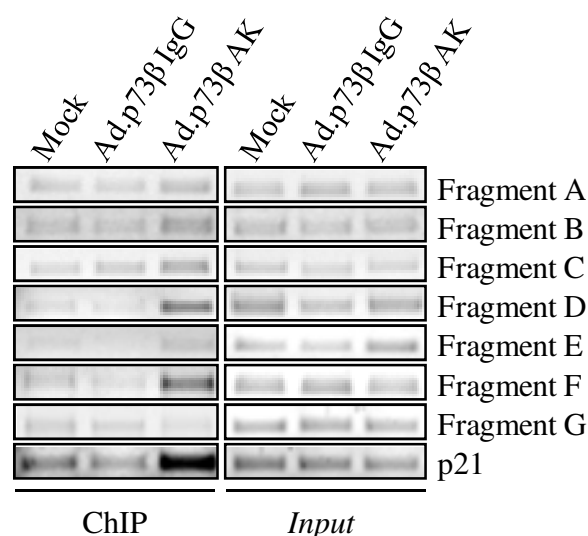


Abb. 17: Anreicherung von *GRAMD4*-Sequenzen (Fragmente A–G) in p73-Immünpräzipitaten *in vivo*. ChIP-Analyse von H1299-Zellen nach Transduktion mit einem p73 exprimierenden adenoviralem Vektor. Nach Vorbereitung der ChIP-Proben wurden die aus den *Inputs* und Immünpräzipitaten isolierten DNA-Fragmente durch *semiquantitative* RT-PCR mit 7 Primerpaaren untersucht. Der p21WAF1-Promotor diente als Positivkontrolle und die IP's mit Kontroll-IgG's und mock als Negativkontrollen.

In der p53-negativen Zelllinie Saos-2 konnten ebenfalls Amplifikate mit den Primerpaaren (2.1.6.4) für die Fragmente B, C, D, E und F mittels *real-time*-PCR detektiert werden (Abb. 18). So wurde für diese Fragmente in den p73/*GRAMD4*-Immünpräzipitaten (= Ad.p73 β AK) eine 3- bis 7-fache Anreicherung gezeigt, während die Amplifikation der Fragmente A bzw. G des *GRAMD4*-Promotors dagegen nicht möglich war. Auch die genutzten Negativkontrollen (= mock bzw. Ad.p73 β IgG) zeigten keine Anreicherung von *GRAMD4*-Promotorprodukten mittels *real-time*-PCR. Als Positivkontrolle wurde wiederum der p21WAF1-Promotor mitgeführt, dessen Expression in der mit p73 immunpräzipitierten Probe zunimmt.

Die Überexpression von p73 mittels adenoviralem Vektor führt somit in den p53-negativen Zelllinien Saos-2 und H1299 zur Ausbildung von spezifischen p73/*GRAMD4*-Komplexen. Hierbei sind vor allem die Bindungsstellen, die in den Fragmenten B, C, D, E und F des *GRAMD4*-Promotors gelegen sind, von besonderer Bedeutung.

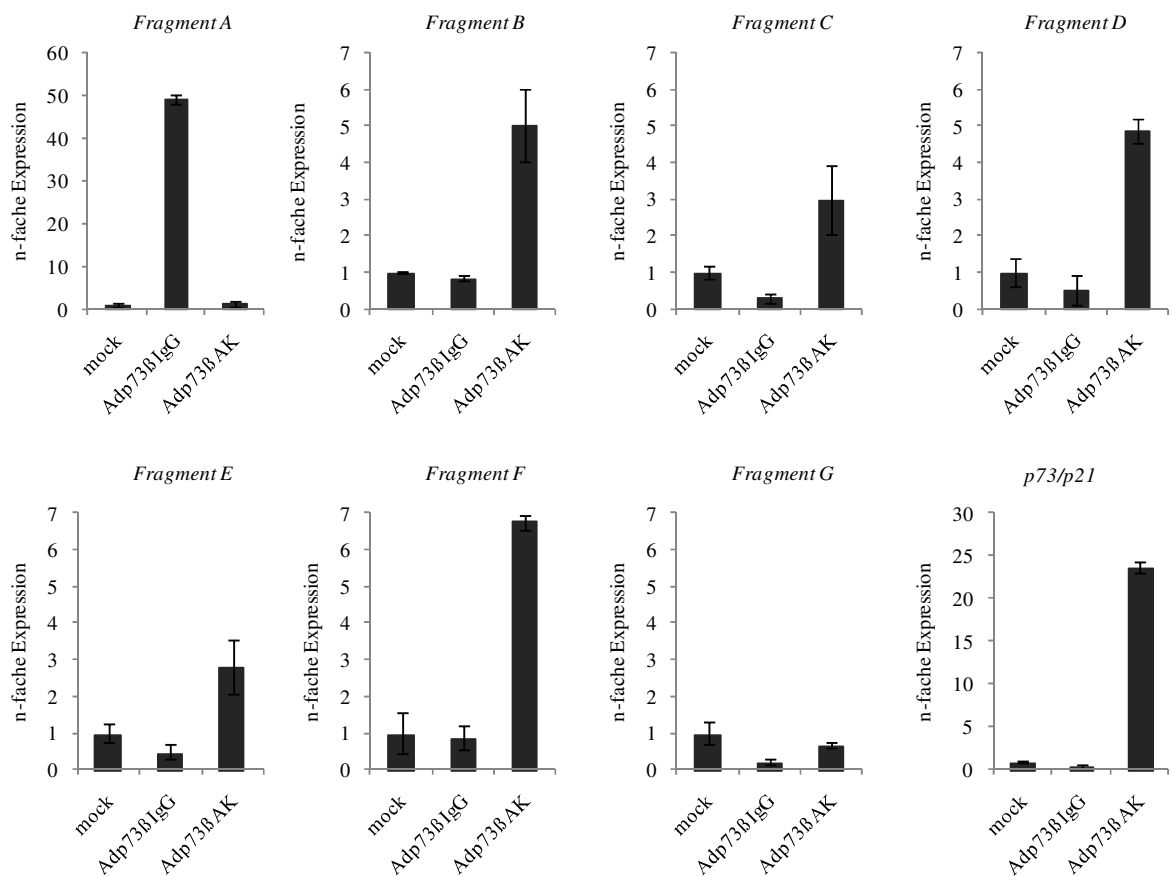


Abb. 18: Anreicherung von *GRAMD4*-Sequenzen (Fragmente A-G) in p73-Immünpräzipitaten *in vivo*. ChIP-Analyse von Saos-2-Zellen nach Transduktion mit einem p73 exprimierenden adenoviralem Vektor. Nach dem *cross-linking* und der Sonifizierung wurden die Zellysate sowohl mit einem p73-Antikörper als auch einem unspezifischen Kontroll-Antikörper (IgG) immunpräzipitiert. Anschließend wurden die aus den Immünpräzipitaten isolierten DNA-Fragmente durch quantitative *real-time-PCR* mit den Primerpaaren A bis G untersucht. Die Normalisierung erfolgte durch die vor der IP entnommenen Inputs. Die relative Anreicherung der amplifizierten DNA-Fragmente wurde in Relation zu mock (Negativkontrolle) ermittelt, der den Wert 1 erhielt. Der p21WAF1-Promotor diente als Positivkontrolle.

Neben dem Einfluss von ektopen p73 auf die Promotoraktivität sollte im Folgenden auch die Bindung von endogenem p73 an den humanen *GRAMD4*-Promotor gezeigt werden. Dazu wurden H1299-Zellen über einen Zeitraum von 24 h sowohl ohne als auch mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin (cDDP, 30 μ M), das zu einer Erhöhung der Proteinexpression von endogenem p73 führt, kultiviert (Abb. 26). Im Verlauf der Chromatin-Immünpräzipitation (2.2.3.6) wurden die geernteten Zellysate sowohl mit einem p73-Antikörper als auch einem unspezifischen Kontroll-Antikörper (IgG) immunpräzipitiert. Anschließend wurden die erhaltenen DNA-Fragmente mittels *semiquantitativer* PCR unter der Verwendung der Primer für das Fragment A bzw. Fragment F (2.1.6.4) analysiert.

Abb. 19 zeigt, dass nach der Zugabe von Cisplatin (cDDP) in der mit p73 immünpräzipitierten Probe (= Fragment F, p73 AK + cDDP) das *GRAMD4*-Promotorfragment F detektiert wird, während Fragment A nach Zugabe des Chemotherapeutikums nicht amplifiziert wird. Endogenes p73 ist somit in der Lage an die potenziellen p53/p73-Bindungsstellen im Fragment F des *GRAMD4*-Promotors zu binden, während kein DNA-Protein-Komplex zwischen p73 und Fragment A ausgebildet wird. In den mit einem unspezifischen Kontroll-Antikörper (IgG) immünpräzipitierten Proben wurde keine Anreicherung der untersuchten *GRAMD4*-Promotorfragmente mittels PCR nachgewiesen.

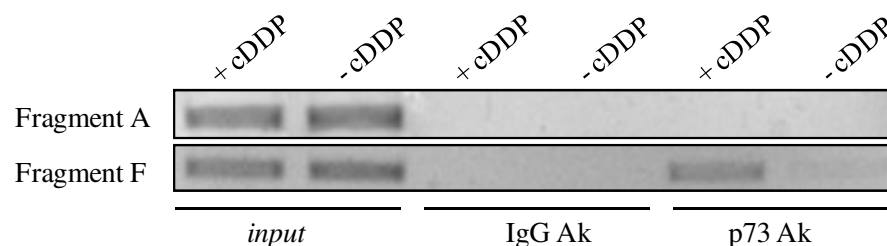


Abb. 19: Anreicherung von *GRAMD4*-Sequenzen (Fragmente A bzw. F) in p73-Immünpräzipitaten *in vivo*. ChIP-Analyse von H1299-Zellen nach Kultivierung ohne und mit Cisplatin (cDDP, 30 μ M, 24 h). Nach dem *cross-linking* und der Sonifizierung wurden die Zellysate sowohl mit einem p73-Antikörper als auch einem unspezifischen Kontroll-Antikörper (IgGs) immünpräzipitiert. Anschließend wurden die isolierten DNA-Fragmente mittels *semiquantitativer* PCR mit den Primerpaaren für Fragment A bzw. F untersucht.

Die Resultate der ChIP-Analysen, die sowohl mit überexprimiertem als auch endogenem p73 durchgeführt wurden, zeigen, dass der Transkriptionsfaktor p73 an den *GRAMD4*-Promotor

bindet. Von Bedeutung sind vor allem die potenziellen p53/p73-Bindestellen IV bis XII, die in den Fragmenten B bis F gelegen sind, während die Fragmente A und G mit den Bindestellen I, II, III und XIII für die Transaktivierung von GRAMD4 durch p73 keine Rolle spielen.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Aktivierbarkeit des *GRAMD4*-Volllängenpromotors und verschiedener 5'-Deletionsmutanten durch p73 in Reporter-Gen-Assays überprüft.

3.1.4. Transaktivierung des humanen *GRAMD4*-Promotors durch p73

3.1.4.1. Konstruktion der *GRAMD4*-Promotorfragmente

Als Ausgangsmaterial für die Konstruktion des zu untersuchenden *GRAMD4*-Promotors diente der Bac Klon # RPCI-3-439F8 von BACPAC Resources (Oakland, CA, USA). Durch Verwendung der sequenzspezifischen Oligonukleotide -2064 *KpnI* sense und +8 *BglIII* antisense (2.1.6.5) konnte ein 2072 bp großes Promotorfragment amplifiziert werden (Sequenz siehe Anhang). Dieses PCR-Produkt wurde anschließend über eine TA-Klonierungsstelle in den *pGEM*[®]-*T*-Vektor mit 3'dT-Überhängen ligiert, in *E. coli* JM109 transformiert, rekombinante Klone über das Blau-Weiß-Screening identifiziert (2.2.1.6) und im Anschluss sowohl einer Kontrollrestriktion (2.2.1.1) (Abb. 20) als auch Sequenzierung (*seqlab*) unterzogen.

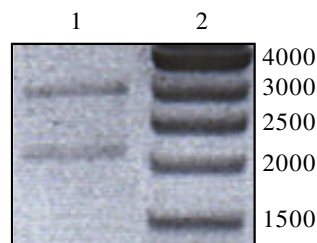


Abb. 20: Kontrollrestriktion von *pGEM*[®]-*T*-*GRAMD4*_FL mit *KpnI* und *BglIII*. 1, Die Restriktion von *pGEM*[®]-*T*-*GRAMD4*_FL mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *BglIII* ergibt die erwarteten Größen von 3 kbp für *pGEM*[®]-*T*-Vektor und von ca. 2 kbp für das *GRAMD4*-Volllängen-Promotorfragment; 2, 1 kbp Marker (Fermentas)

Das Promotorfragment mit korrekter Gensequenz wurde mit den DNA-Endonukleasen *KpnI* und *BglIII* aus dem *pGEM*[®]-*T*-*GRAMD4*_FL-Konstrukt entfernt und in den mit *KpnI/BglIII* geschnittenen *pGL3*-basic-Vektor umklontiert (2.2.1.5). Basierend auf diesem *GRAMD4*-Volllängenpromotor-Konstrukt wurden 5'-Deletionen mit den Primern -1361 *KpnI* sense/+8 *BglIII* antisense, -1295 *KpnI* sense/+8 *BglIII* antisense, -601 *KpnI* sense/+8 *BglIII* antisense, -430 *KpnI* sense/+8 *BglIII* antisense und -77 *KpnI* sense/+8 *BglIII* antisense (2.1.6.5) amplifiziert und ebenfalls über *pGEM*[®]-*T* in den *pGL3*-basic Vektor vor das *Firefly-Luciferase*-Reporter gen kloniert. Anschließend wurde deren Aktivierbarkeit durch E2F1, p53

und p73 überprüft. Bei Interaktion der zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren mit der *GRAMD4*-Promotorregion wird die Transkription des Luciferasegens initiiert. Hierbei verhält sich die Expression des Reportergens im eukaryontischen Testsystem proportional zum Aktivierungspotential des klonierten DNA-Fragments. Abb. 21 gibt einen Überblick über die klonierten pGL3_*GRAMD4*-Vektorkonstrukte (Vollängenkonstrukt bzw. 5'-Deletionsmutanten) mit den potenziellen p53/p73-Bindungsstellen.

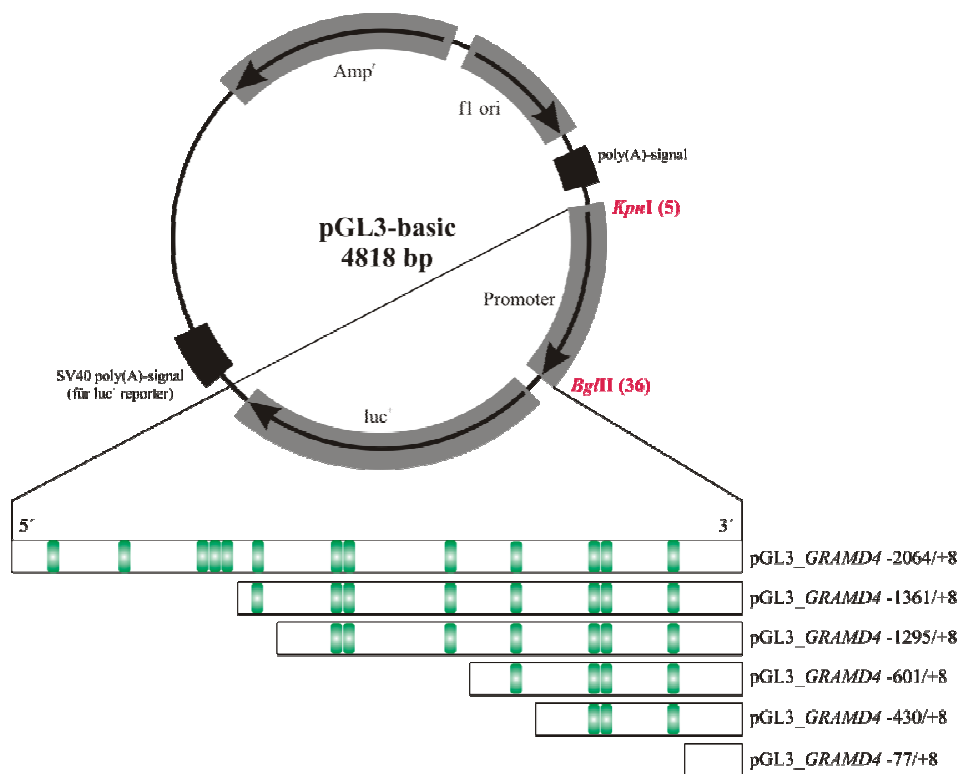


Abb. 21: Schematischer Aufbau der pGL3_*GRAMD4*-Promotorkonstrukte mit den potenziellen p53/p73-Bindungsstellen. Darstellung des pGL3-basic Vektors mit Amp^r (Beta-Lactamase-Gen), fl ori (*origin of replication* von filamentösen Phagen abstammend), poly A signal (mRNA-Polyadenylationssignal), Luc⁺ (cDNA codierend für die modifizierte Firefly-Luciferase) und der über *KpnI* und *BglIII* eingefügten *GRAMD4*-Promotorfragmente (Vollängenpromotor und 5'-Deletionsmutanten).

Nach Kontrollrestriktionen mit *KpnI* und *BglIII* (Abb. 22) und abschließenden Sequenzierungen standen die unterschiedlichen pGL3_*GRAMD4*-Promotorkonstrukte dann für die darauf folgenden Reportergenanalysen zur Verfügung.

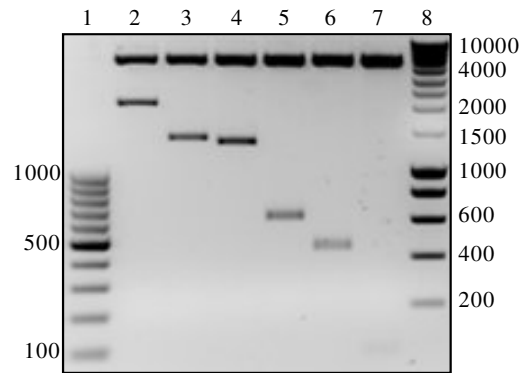
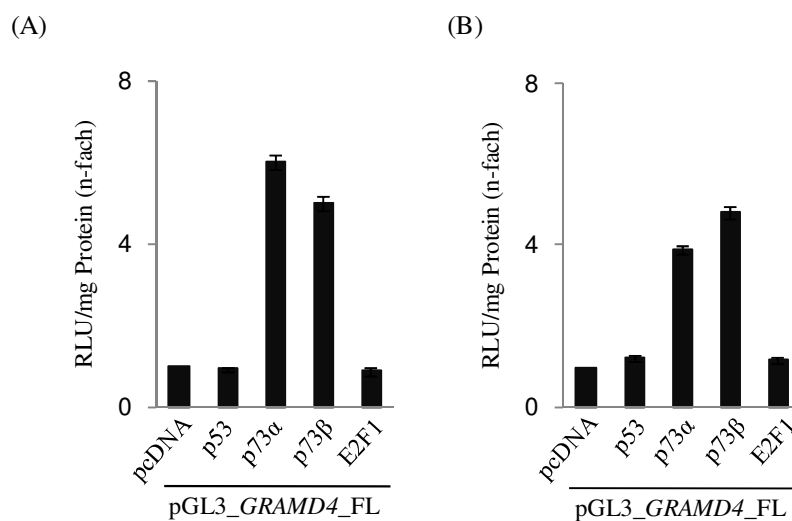


Abb. 22: Analyse der pGL3_GRAMD4-Promotorkonstrukte. Auftrennung des mit den Restriktionsenzymen *Kpn*I und *Bgl*II geschnittenen *GRAMD4*-Volllängenpromotors (2) und der 5'-Deletionsmutanten (3-7) in einem 0,8 %-igen Agarosegel. 1, 100 bp Marker; 2, pGL3_GRAMD4_FL; 3, pGL3_GRAMD4 -1361/+8; 4, pGL3_GRAMD4 -1295/+8; 5, pGL3_GRAMD4 -601/+8; 6, pGL3_GRAMD4 -430/+8; 7, pGL3_GRAMD4 -77/+8; 8, 1 kbp Marker

3.1.4.2. Aktivität des *GRAMD4*-Volllängenpromotors unter dem Einfluss verschiedener Transkriptionsfaktoren in p53-negativen Zelllinien

Die bisherigen Untersuchungen zur Regulation von *GRAMD4* zeigen, dass das Gen direkt von p73, aber nicht E2F1, transaktiviert wird. Zur genaueren Analyse des Mechanismus sowie zur Verifizierung der CHIP-Experimente wurden Reporteranalysen mit dem *GRAMD4*-Volllängenpromotor und den Transkriptionsfaktoren p73, E2F1, aber auch p53 als Homologon von p73, durchgeführt. Hierfür wurden die p53-negativen Zelllinien H1299, Saos-2 und *p53*^{-/-} HCT116 mit dem Leervektor pGL3-basic und dem Konstrukt pGL3_GRAMD4_FL nach Protokoll (2.2.4.2) mit den entsprechenden Expressionsplasmiden pcDNA3.1, pcDNA3.1-p53WT, pcDNA3.1-p73 α , pcDNA3.1-p73 β und pCMV-E2F1 kotransfiziert und die relative Luciferaseaktivität (relative luciferase units, RLU) normalisiert auf die Proteinkonzentration nach 24 h bestimmt.



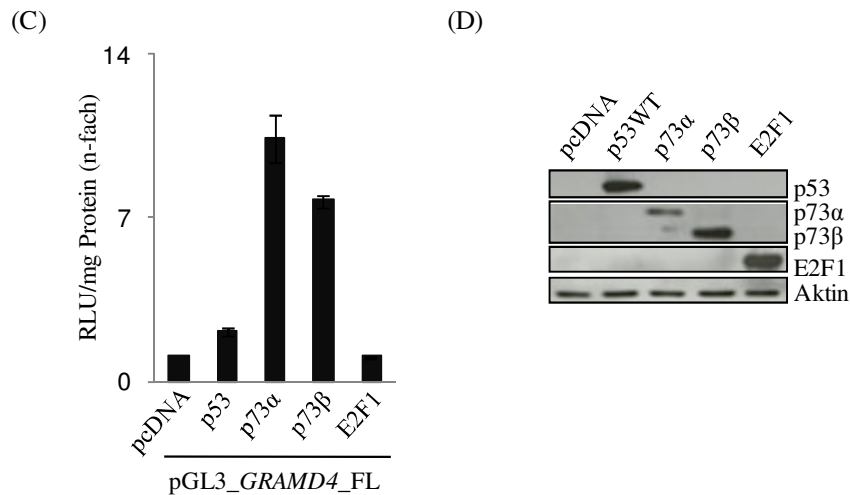


Abb. 23: p73-vermittelte Transaktivierung des *GRAMD4*-Vollängenpromotors in p53-negativen Zelllinien. (A) H1299-, (B) Saos-2- und (C) *p53*^{-/-} HCT116-Zellen wurden mit pGL3_*GRAMD4*_FL (0,5 μ g) und den Transkriptionsfaktoren p53, p73 α , p73 β und E2F1 kotransfiziert. Die Messung der Luciferaseaktivität (relative luciferase units, RLU) erfolgte 24 h nach der Transfektion und wurde gegen die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe normalisiert (RLU/mg Protein). Als Kontrolle dienten mit pGL3-basic/pcDNA3.1 transfizierte Zellen. Die Standardabweichungen beruhen auf drei unabhängigen Messungen. (D) Exemplarische Expressionskontrolle der verwendeten Expressionsplasmide (je 20 μ g) pcDNA3.1, pcDNA3.1-p53WT, pcDNA3.1-p73 α , pcDNA3.1-p73 β und pCMV-E2F1 in H1299-Zellen. Aktin diente als Ladekontrolle.

In den drei verwendeten p53-negativen Zelllinien konnte pGL3_*GRAMD4*_FL durch die Überexpression der p73-Isoformen α und β aktiviert werden. Sowohl in den H1299- als auch den Saos-2-Zellen führte p73 α zu einer 4- bis 6-fachen Aktivitätssteigerung des Promotors, während die β -Isoform die Aktivität von *GRAMD4*_FL um das 5-fache steigerte (Abb. 23 A/B). In der *p53*^{-/-} HCT116-Zelllinie konnte sogar eine 10-fache höhere Aktivität durch p73 α und eine 7,5-fache Aktivierung nach Überexpression von p73 β erreicht werden (Abb. 23 C). Dagegen führte die Transfektion der Transkriptionsfaktoren p53 und E2F1 zu keiner Aktivierung des Promotors. Die gemessenen Aktivitäten verhielten sich wie die mit pGL3-basic/pcDNA3.1 transfizierten Zellen, die die Kontrolle darstellen und auf 1 normalisiert wurden. Eine ausreichende Transfektion der Zelllinien mit den verwendeten Transkriptionsfaktoren wurde in den Extrakten auf Proteinebene überprüft und ist exemplarisch in H1299-Zellen dargestellt (Abb. 23 D).

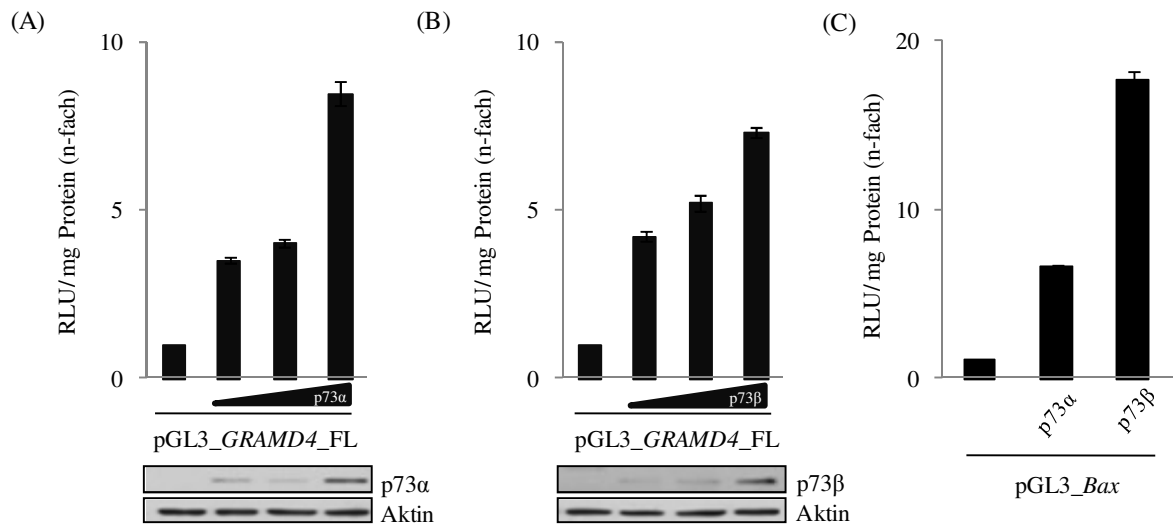


Abb. 24: Konzentrationsabhängige Aktivierung des *GRAMD4*-Vollängenpromotors durch p73 α und p73 β in H1299-Zellen. Luciferase-Assay von H1299-Zellen, die mit pGL3_*GRAMD4*_FL (0,5 μ g) und steigenden Konzentrationen (0,25; 0,5 und 0,75 μ g) an (A) p73 α und (B) p73 β kotransfiziert wurden. (C) Kotransfektion von pGL3_*Bax* (p73-abhängiger Promotor = Positivkontrolle). 24 h nach der Transfektion erfolgte die Bestimmung der Luciferaseaktivität. Als Kontrolle dienten mit pGL3-basic/pcDNA3.1 transfizierte Zellen. Die Standardabweichungen beruhen auf drei unabhängigen Messungen. Die Expressionskontrolle der verwendeten Expressionsplasmide pcDNA3.1, pcDNA3.1-p73 α und pcDNA3.1-p73 β in steigenden Konzentrationen erfolgte unter Verwendung spezifischer Antikörper. Aktin diente als Ladekontrolle.

Der *GRAMD4*-Vollängenpromotor pGL3_*GRAMD4*_FL unterliegt hierbei einer dosisabhängigen Stimulation durch die beiden Isoformen p73 α und p73 β (Abb. 24). In H1299-Zellen, die mit 0,5 μ g pGL3_*GRAMD4*_FL und steigenden Konzentrationen (0,25; 0,5 und 0,75 μ g) an p73 α bzw. p73 β kotransfiziert wurden, ist 24 h nach Transfektion ein Anstieg der Promotoraktivität im Luciferase-Assay zu verzeichnen. Bei beiden Isoformen ist schon bei geringen Konzentrationen (0,25 bzw. 0,5 μ g) eine Erhöhung der Luciferaseaktivität um das 4- bis 5-fache messbar, die bei 0,75 μ g p73 nochmals um das 2- (p73 β) bis 4-fache (p73 α) verstärkt wird. Als Positivkontrolle wurde der *bax*-Promotor mitgeführt, der direkt durch p73 aktiviert werden kann.

Um den Einfluss von endogenem p73 auf die Transaktivierung des *GRAMD4*-Promotors eingehender zu untersuchen, wurden 293- und H1299-Zellen mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin (cDDP, 30 μ M) kultiviert. Acht Stunden nach Zugabe des Zytostatikums wurden die Zellen mit Ad.shp73 β infiziert, um sie nach weiteren 12 h mit pGL3_*GRAMD4*_FL zu transfizieren. 24 Stunden nach der Virusinfektion erfolgten die Zellernte und die Bestimmung der Luciferaseaktivität.

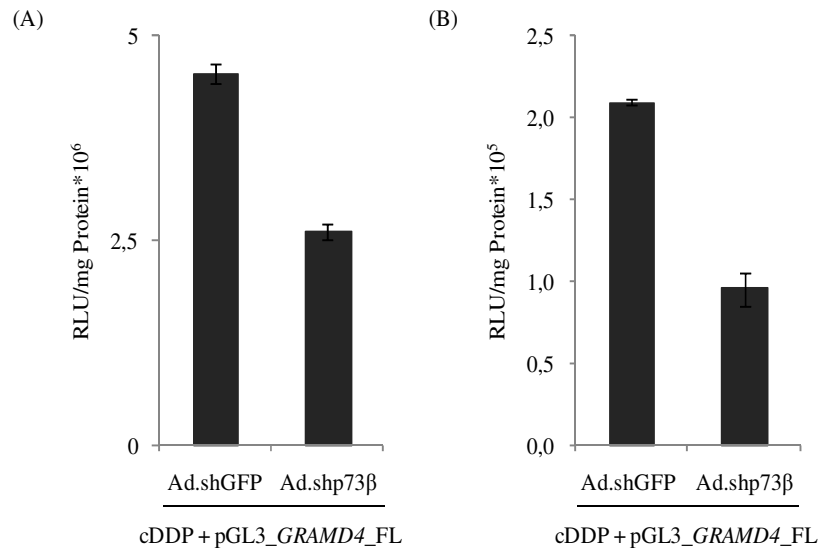


Abb. 25: Inhibierung der p73-vermittelten Transaktivierung des *GRAMD4*-Vollängenpromotors durch Ad.shp73. (A) 293- und (B) H1299-Zellen wurden mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin (cDDP, 30 μ M) kultiviert und anschließend sowohl mit Ad.shp73 β infiziert als auch mit pGL3_*GRAMD4*_FL (0,5 μ g) transfiziert. Die Messung der Luciferaseaktivität (relative luciferase units, RLU) erfolgte 24 h nach der Transduktion und wurde gegen die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe normalisiert (RLU/mg Protein). Als Kontrolle dienten mit Ad.shGFP transduzierte Zellen. Die Standardabweichungen beruhen auf drei unabhängigen Messungen.

Die Behandlung der Zellen mit dem Chemotherapeutikum cDDP führt im Kontrollansatz mit Ad.shGFP zum Anstieg der *GRAMD4*-Promotoraktivität (Abb. 25). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Proteinexpression des endogenen p73 in den beiden verwendeten Zelllinien durch cDDP hochreguliert wird und direkt zur Transaktivierung von *GRAMD4* führt. Dieser Effekt wird durch die Transduktion von Ad.shp73 β sowohl in den 293- als auch in den H1299-Zellen teilweise (um 50%) aufgehoben. Die Expression von shp73 inhibiert die Synthese des durch das Zytostatikum aktivierten endogenen p73, sodass die Aktivität des *GRAMD4*-Promotors ebenfalls eingeschränkt ist (Abb. 25). Die Funktionalität des verwendeten shp73-exprimierenden Adenovirus wurde in cDDP behandelten H1299-Zellen im Vergleich zu Ad.shGFP (Kontrolle) auch auf Proteinebene nachgewiesen. Die Behandlung mit dem Chemotherapeutikum cDDP führt einer verstärkten Expression von endogenem p73, die durch Ad.shp73 teilweise inhibiert werden kann (Abb. 26).

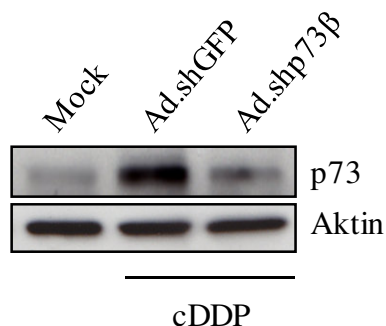


Abb. 26: Nachweis der Funktionalität von Ad.shp73 nach Inkubation mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin (cDDP). Der Gesamtzellextrakt von H1299-Zellen wurde 48 h nach der Transduktion mit Ad.shGFP, Ad.shp73 β und simultaner Inkubation mit cDDP isoliert und die endogene Expression von p73 im *Immunblot* mittels anti-p73-Antikörper (ER15) detektiert. Aktin diente als Ladekontrolle.

3.1.4.3. Effekt von Δ TAp73 auf die Aktivität des *GRAMD4*-Volllängenpromotors

Differentielle mRNA-Spleißmechanismen führen zur Entstehung von Δ TAp73-Isoformen, die ein zum p73-Wildtypprotein antagonistisches Potenzial aufweisen. Während das Volllängenprotein p53-abhängige Zielgene anschaltet und Zellzyklusarrest und Apoptose induziert (Ishimoto *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2002; Zaika *et al.*, 2002), agieren die N-terminalen trunkierten p73-Isoformen als dominant-negative Inhibitoren. Diese verhindern durch direkte Konkurrenz der DNA-Bindung und/oder durch Bildung von inaktiven Heteroduplex-Strukturen mit TAp73 und p53 den Zellzyklusarrest und Apoptose (Stiewe *et al.*, 2002; Zaika *et al.*, 2002; Slade *et al.*, 2004).

Da bereits gezeigt werden konnte, dass p73 als Transkriptionsfaktor an den *GRAMD4*-Promotor bindet, sollte des Weiteren der Einfluss der dominant-negativen Isoformen p73 $\alpha\Delta$ Ex2/3 und p73 $\beta\Delta$ Ex2/3 auf die Promotoraktivität in der p53-negativen Zelllinie H1299 analysiert werden (Abb. 27).

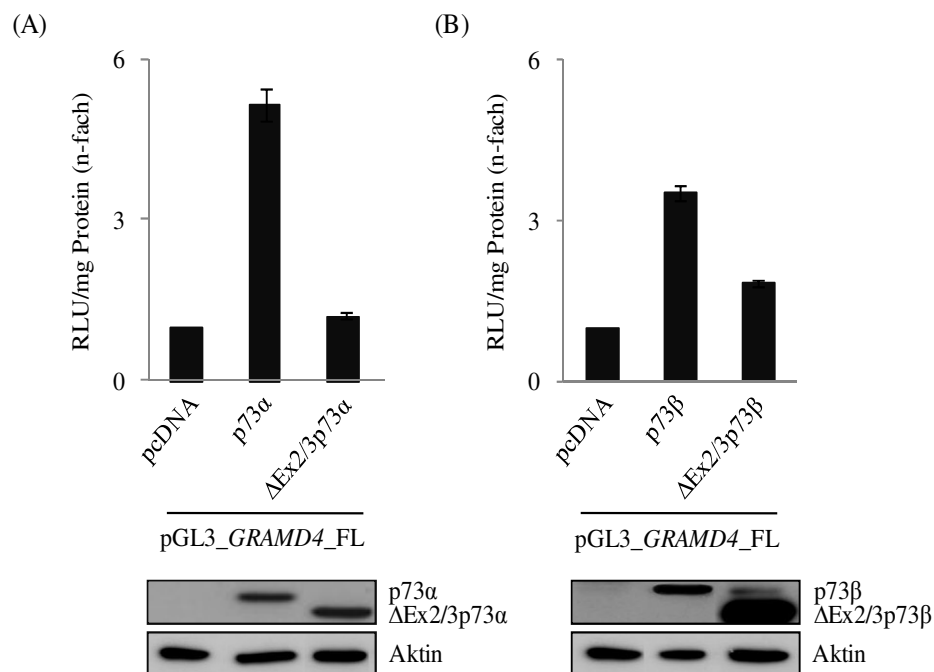


Abb. 27: Effekt des transaktivierungs-defizienten Δ TAp73 auf die *GRAMD4*-Promotoraktivität. Luciferase-Assay von H1299-Zellen, die mit pGL3_*GRAMD4*_FL (0,5 μ g) und den Expressionsplasmiden (A) pcDNA3.1-p73 α bzw. pcDNA3.1- Δ Ex2/3p73 α und (B) pcDNA3.1-p73 β bzw. pcDNA3.1- Δ Ex2/3p73 β (je 0,5 μ g) kotransfiziert wurden. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Bestimmung der Luciferaseaktivität. Als Kontrolle dienten mit pGL3-basic/ pcDNA3.1 transfizierte Zellen. Die Standardabweichungen beruhen auf drei unabhängigen Messungen. Die

Expressionskontrolle der verwendeten Expressionsplasmide erfolgte unter Verwendung spezifischer Antikörper. Aktin diente als Ladekontrolle.

Während die beiden Vollängenproteine p73 α und p73 β zu einer signifikanten Aktivierung des *GRAMD4*-Promotors führen (Abb. 27 A, Abb. 27 B), konnten die Transaktivierungsdefizienten Isoformen p73 $\alpha\Delta$ Ex2/3 und p73 $\beta\Delta$ Ex2/3 den Promotor erwartungsgemäß nicht aktivieren (Abb. 27 A, Abb. 27 B). Als Kontrolle wurden pGL3-basic/pcDNA3.1 transfizierte Zellen mitgeführt. Eine ausreichende Transfektion mit den verwendeten Expressionsplasmiden wurde in den Extrakten auf Proteinebene überprüft und ist im unteren Teil der Abb. 27 dargestellt.

3.1.4.4. Lokalisationsbestimmung der für die *GRAMD4*-Promotoraktivität verantwortlichen p73-Region

Um die genaue Position der durch p73 induzierten Transaktivierung innerhalb des *GRAMD4*-Promotors zu identifizieren, wurden 5'-Deletionsmutanten des humanen *GRAMD4*-Promotors hergestellt (3.1.4.1). Wie in Abb. 28 ersichtlich, wurden verschiedenen Fragmente des Promotors (A-G) mit den putativen p73-Bindestellen entfernt. Bei der Mutante pGL3_*GRAMD4* -1361/+8 erfolgte die Deletion der potenziellen Bindestellen der Fragmente F und G, das Konstrukt pGL3_*GRAMD4* -1295/+8 enthält nicht die Bindestellen von F, G und Fragment E. Die Deletionsmutante pGL3_*GRAMD4* -601/+8 weist noch vier potenzielle p73-Bindestellen auf. pGL3_*GRAMD4* -430/+8 enthält drei. In der Mutante pGL3_*GRAMD4* -77/+8 sind alle p73-Bindestellen entfernt worden.

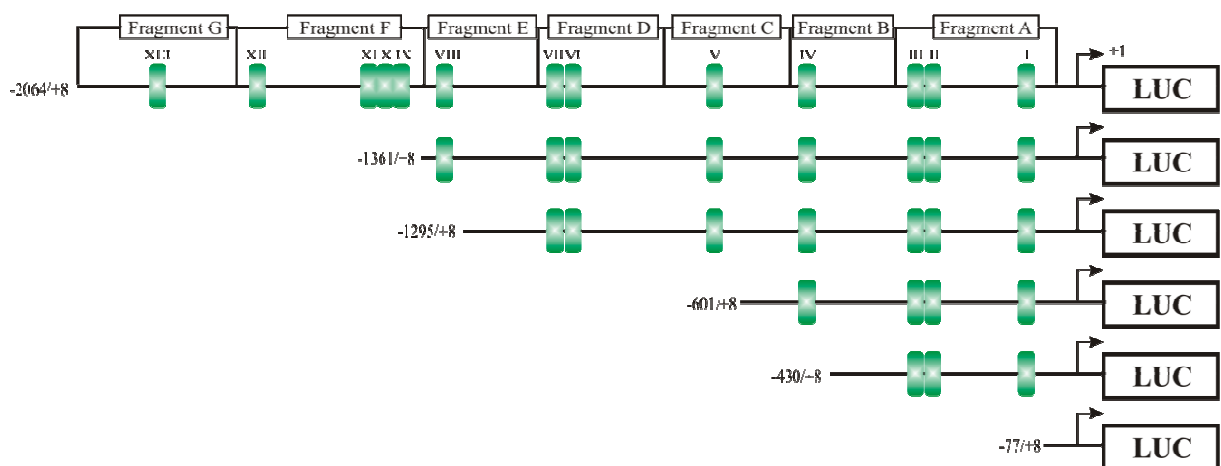


Abb. 28: Schematischer Aufbau der 5'-Deletionsmutanten des humanen *GRAMD4*-Promotors. Darstellung des Vollängenpromotors und der pGL3-*GRAMD4*-Deletionsmutanten pGL3_*GRAMD4*-1361/+8, pGL3_*GRAMD4* -1295/+8, pGL3_*GRAMD4* -601/+8, pGL3_*GRAMD4* -430/+8 und pGL3_*GRAMD4* -77/+8 mit Angabe der in den Mutanten enthaltenen putativen p53/p73-Bindestellen.

Die hergestellten Deletionsmutanten wurden in H1299-Zellen mit dem Expressionsplasmid pcDNA3.1-p73 kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Proben geerntet und der

Luciferase-Assay durchgeführt. Wie in Abb. 29 A zu sehen, führt die Kotransfektion von p73 und dem Volllängenpromotor pGL3_*GRAMD4*_FL zu einer Erhöhung der Luciferaseaktivität, während bei den Deletionsmutanten pGL3_*GRAMD4* -1361/+8, pGL3_*GRAMD4* -1295/+8 und pGL3_*GRAMD4* -601/+8 die größte Abnahme der p73-induzierten Promotoraktivität nachweisbar ist. Eine weitere Deletion des 5'-Endes (pGL3_*GRAMD4* -430/+8) beeinträchtigt sukzessiv die Empfindlichkeit des *GRAMD4*-Promotors für den Transkriptionsfaktor. Bei der pGL3_*GRAMD4* -77/+8 Mutante, die keine potenziellen p73-Bindestellen mehr aufweist, ist die Transaktivierung der Promotoraktivität durch p73 komplett aufgehoben. Eine ausreichende Transfektion mit dem verwendeten Expressionsplasmid wurde in den Extrakten auf Proteinebene überprüft (Abb. 29 B).

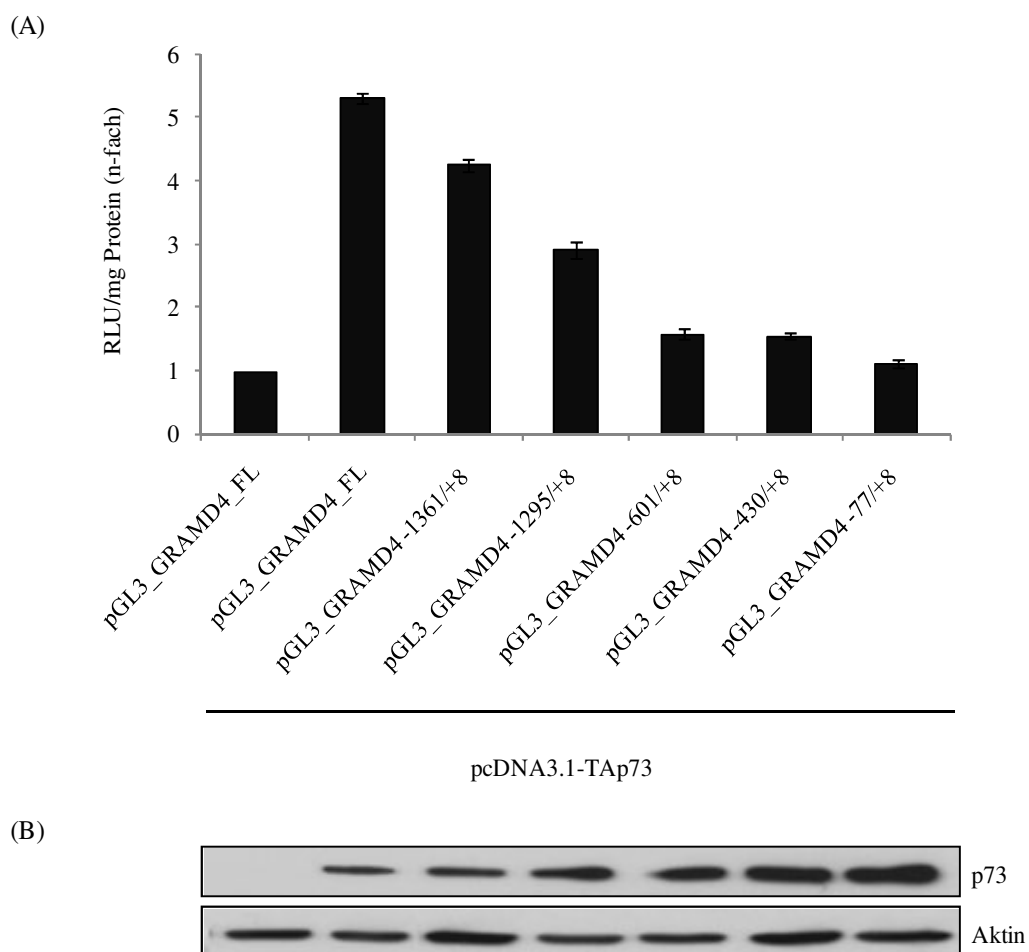


Abb. 29: Lokalisationsbestimmung der für die *GRAMD4*-Promotoraktivität verantwortlichen p73-Region. (A) Luciferase-Assay von H1299-Zellen, die mit dem pGL3_*GRAMD4*-Volllängenpromotor bzw. den 5'-Deletionsmutanten (0,5 µg) und dem Expressionsplasmid pcDNA3.1-TAp73 (1 µg) kotransfiziert wurden. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Bestimmung der Luciferaseaktivität. Als Kontrolle dienten mit pGL3-basic/pcDNA3.1 transfizierte Zellen. Die Standardabweichungen beruhen auf drei unabhängigen Messungen. (B) Die Expressionskontrolle von pcDNA3.1-TAp73 erfolgte unter Verwendung spezifischer Antikörper. Aktin diente als Ladekontrolle.

3.1.5. Detektion der GRAMD4-Expression nach p73-Transduktion

Unsere Daten zeigen, dass der Transkriptionsfaktor p73 an den *GRAMD4*-Promotor bindet. Dies führt wiederum zur erhöhten Expression von *GRAMD4* auf mRNA- und Proteinebene, die nach adenoviraler Überexpression der beiden Vollängenproteine p73 α und p73 β nachgewiesen werden konnte. Dagegen führt die Transduktion mit dem Transkriptionsfaktor p53, der nicht in der Lage ist den *GRAMD4*-Promotor zu transaktivieren (Abb. 23), zu keiner Steigerung der *GRAMD4*-Transkriptmengen.

Wie in Abb. 30 ersichtlich, führt die Überexpression von p73 α und p73 β in p53-negativen H1299-Zellen zu einer signifikanten Zunahme der *GRAMD4* mRNA im Vergleich zur nicht-infizierten Probe, während p53 auf *GRAMD4* keinen Einfluss hat. Hier bleiben die Transkriptmengen unverändert. Die Expression von *GRAMD4* nach Transduktion mit den p73-Isoformen α und β wird unterschiedlich induziert. Während die Überexpression von p73 α bereits nach 8 h zu erhöhten *GRAMD4*-Transkriptmengen führt, die im Verlauf der Kinetik konstant bleiben, zeigt sich nach p73 β -Überexpression erst nach 16 h ein verstärkter Anstieg der *GRAMD4* mRNA-Expression.

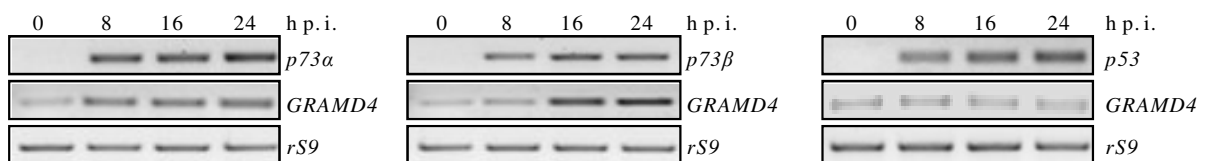


Abb. 30: Expressionsmuster von *GRAMD4* nach Transduktion mit Ad.p73 α , Ad.p73 β und Ad.p53 auf RNA-Ebene. Darstellung der endogenen *GRAMD4*-Expression mittels *semiquantitativer* RT-PCR nach Überexpression von p73 α , p73 β und p53 in H1299 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten. Das Haushaltsgen *RPS9* diente als Ladekontrolle.

Außerdem wurde der Einfluss von p73 auf die *GRAMD4*-Proteinexpression mittels *Western Blot*-Analysen gezeigt (Abb. 31). Hierfür wurden H1299-Zellen mit Ad.p73 α und Ad.p73 β infiziert, 48 h nach Transduktion geerntet und die mitochondrialen und zytoplasmatischen Proteine unter Verwendung des ApoAlert[®] Cell Fractionation Kit (2.2.3.1) extrahiert. Abb. 31 zeigt eine Erhöhung der Expression von endogenem *GRAMD4* durch die beiden Tumorsuppressoren p73 α und β im Vergleich zu den mit Ad.GFP (Kontrolle) infizierten Proben. Dabei war eine Zunahme des *GRAMD4*-Proteins nach p73 β -Überexpression sowohl im Zytosol als auch in den Mitochondrien zu verzeichnen, während *GRAMD4* nach der adenoviralen Infektion mit Ad.p73 α nur in der mitochondrialen Fraktion detektiert wurde. CoxIV diente als Ladekontrolle für die mitochondriale Proteinfraction.

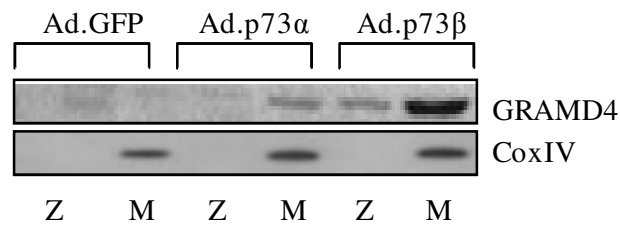


Abb. 31: Expression von GRAMD4 nach Transduktion mit Ad.p73 α und Ad.p73 β auf Proteinebene. Nachweis der endogenen GRAMD4-Expression (50 μ g) mittels *Western Blot* nach Überexpression durch die adenoviralen Vektoren Ad.p73 α , Ad.p73 β und Ad.GFP (Kontrolle) in H1299-Zellen nach 48 h. Das Protein CoxIV diente als Ladekontrolle für die mitochondriale Proteinfraktion. Z, Zytosol; M, Mitochondrien

Die erhöhte Proteinexpression von endogenem GRAMD4 nach Infektion mit Ad.p73 wurde ebenfalls durch Immunfluoreszenz nachgewiesen (Abb. 32). Hierfür wurden sowohl unbehandelte als auch p73-überexprimierende H1299-Zellen 24 h nach Transduktion fixiert, mit dem GRAMD4-Primärantikörper inkubiert und mit einem Rot-fluoreszierenden Sekundärantikörper (Alexa Fluor[®]633 anti-Kaninchen) angefärbt.

In den H1299-Zellen konnte nach Überexpression des Tumorsuppressors p73 eine deutlich erhöhte GRAMD4-Proteinexpression detektiert werden (Abb. 32, VII). In den unbehandelten Zellen dagegen war endogenes GRAMD4 kaum nachweisbar, was die Funktion von GRAMD4 als ein pro-apoptisches Protein unterstützt (Abb. 32, IV). Um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers auszuschließen, wurde dieser ohne Primärantikörper zu den Zellen gegeben (Abb. 32, I). Da hier keine rote Fluoreszenz detektiert werden konnte, ist von einer korrekten Bindung des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper (anti-GRAMD4) auszugehen. Der Nachweis nukleärer DNA erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Abb. 32, II, V, VIII).

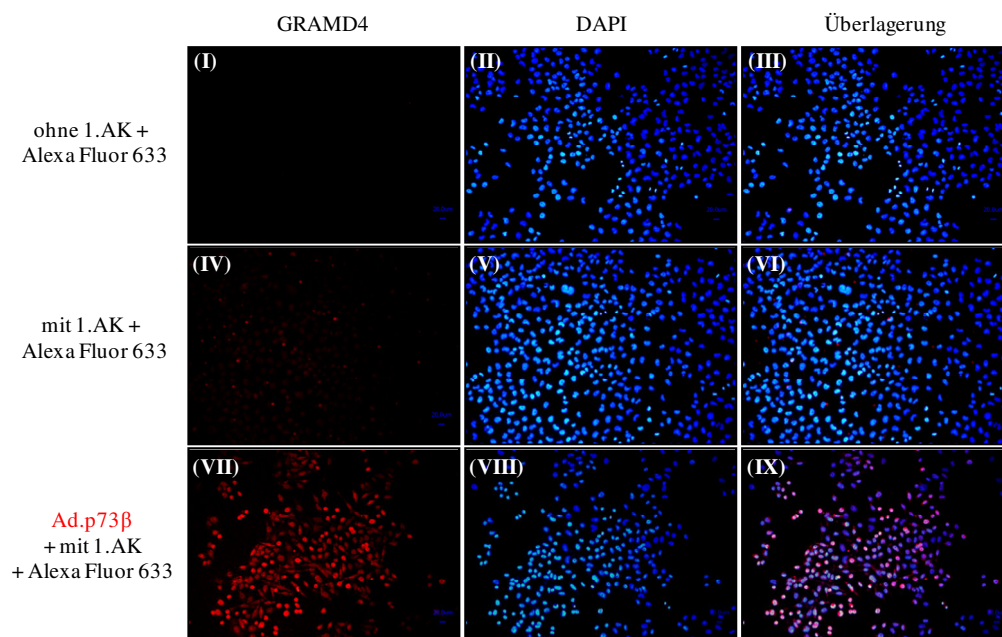


Abb. 32: p73-vermittelte Hochregulation der endogenen GRAMD4-Proteinexpression. Immunfluoreszenzaufnahmen von unbehandelten (I, IV) und p73-überexprimierenden (VII) H1299-Zellen 24 h nach Transduktion mit Ad.p73 β . Die einzelnen Ansätze wurden mit dem GRAMD4-Primärantikörper inkubiert und mit dem Rot-fluoreszierenden Sekundärantikörper (Alexa Fluor[®]633) detektiert, sodass endogenes GRAMD4 eindeutig über ein rotes Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden konnte (IV, VII). Die spezifische Bindung des Sekundärantikörpers wurde getestet, indem kein Erstantikörper verwendet wurde (I). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Vergrößerung: I-IX, 10x

3.1.6. Einfluss von endogen-induziertem p73 auf die GRAMD4-Expression

Eine Zunahme der endogenen GRAMD4-Expression nach Überexpression von p73 wurde in bereits vorangegangenen Experimenten nachgewiesen (3.1.5). Um die physiologische Bedeutung von GRAMD4 innerhalb des p53-unabhängigen Apoptoseweges genauer zu bestimmen, sollte der Einfluss von endogen-induziertem p73 auf die GRAMD4-Expression untersucht werden.

Hierzu wurde die H1299.ER-E2F1-Zelllinie verwendet, die das Fusionsprotein ER-E2F1 exprimiert. Dieses Protein ist ohne den Estrogen-Rezeptor-Liganden 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT) transkriptionell inaktiv. Erst durch Zugabe von 1 μ M 4-OHT in das Zellkulturmedium erfolgt die Translokation von ER-E2F1 aus dem Zytosol in den Zellkern. Hier kommt es zur Aktivierung E2F1-abhängiger Gene (Pützer *et al.*, 2000). Da TP73 ein direktes E2F1-Zielgen darstellt, kann dessen Expression durch die Bindung des transkriptionell aktiven E2F1 an den p73-Promotor angeschaltet werden.

H1299.ER-E2F1-Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 einerseits mit 4-OHT stimuliert und zum anderen mit einem adenoviralen Vektor, der eine spezifische shRNA zur Hemmung des endogenen p73 exprimiert (Buhlmann *et al.*, 2008), infiziert (Abb. 33). Nach 0, 8, 16, 24 bzw. 48 h wurde die Expression von p73, GRAMD4 und rS9 (Kontrolle) mittels *semiquantitativer* RT-PCR analysiert. Die Induktion der H1299.ER-E2F1-Zellen mit 4-OHT führt bereits nach 8 h zu einem Anstieg der GRAMD4-Transkriptmengen, die mit dem Anstieg von p73 korrelieren. Nach 24 h resultierte die Adenovirus-vermittelte shRNA-Expression dagegen in einer deutlichen Verringerung der endogenen p73-Transkriptmengen und somit auch in der Inhibition der GRAMD4-Expression. Die Infektion mit dem Kontrollvirus Ad.shGFP hat dagegen keinen Einfluss auf die Expression von GRAMD4 und p73. Zwischen der p73- und GRAMD4-Expression besteht somit ein unmittelbarer Zusammenhang. Die Aktivierung von GRAMD4 durch p73 scheint daher für die durch p73-vermittelte Apoptose von hoher physiologischer Bedeutung zu sein.

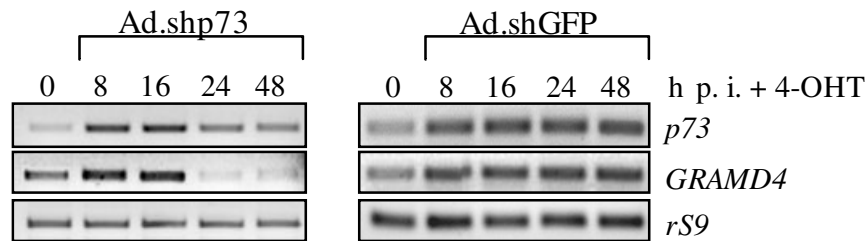


Abb. 33: Korrelation zwischen der *p73*- und *GRAMD4*-Expression nach Induktion mit 4-OHT und simultan ablaufender Repression mit Ad.shp73. Semiquantitative RT-PCR-Analyse der endogenen *GRAMD4*- und *p73*-Expression nach Induktion von ER-E2F1 mit 4-OHT und Infektion mit einem shp73- bzw. GFP- exprimierenden adenoviralen Vektor zu den angegebenen Zeitpunkten. Das Gen *rS9* diente als interne Ladekontrolle.

3.1.7. GRAMD4 als Bestandteil der p73-induzierten Apoptose

Da GRAMD4 transkriptionell und translationell durch p73 induziert wird und die Überexpression von GRAMD4 zur Einleitung der Apoptose führt (Stanelle *et al.*, 2005), liegt die Vermutung nahe, dass GRAMD4 am p73-induzierten Zelltod beteiligt ist. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden H1299-Zellen mit Ad.p73 β und einem shRNA-GRAMD4 exprimierenden Adenovirus (Stanelle *et al.*, 2005), dessen Funktionalität vor Beginn des Experiments überprüft wurde, koinfiziert.

Hier führt die Überexpression mit Ad.p73 β in Kombination mit Ad.GFP und Ad.shGFP (Kontrollen) zu einer verstärkten Expression von endogenem GRAMD4 auf Protein-Ebene, während die Kotransduktion von Ad.p73 β und Ad.shGRAMD4 einen Abfall in der Proteinexpression von GRAMD4 zur Folge hat. Somit ist der verwendete „knockdown“-Virus fähig, die durch p73 aktivierte GRAMD4-Expression zu inhibieren (Abb. 34).

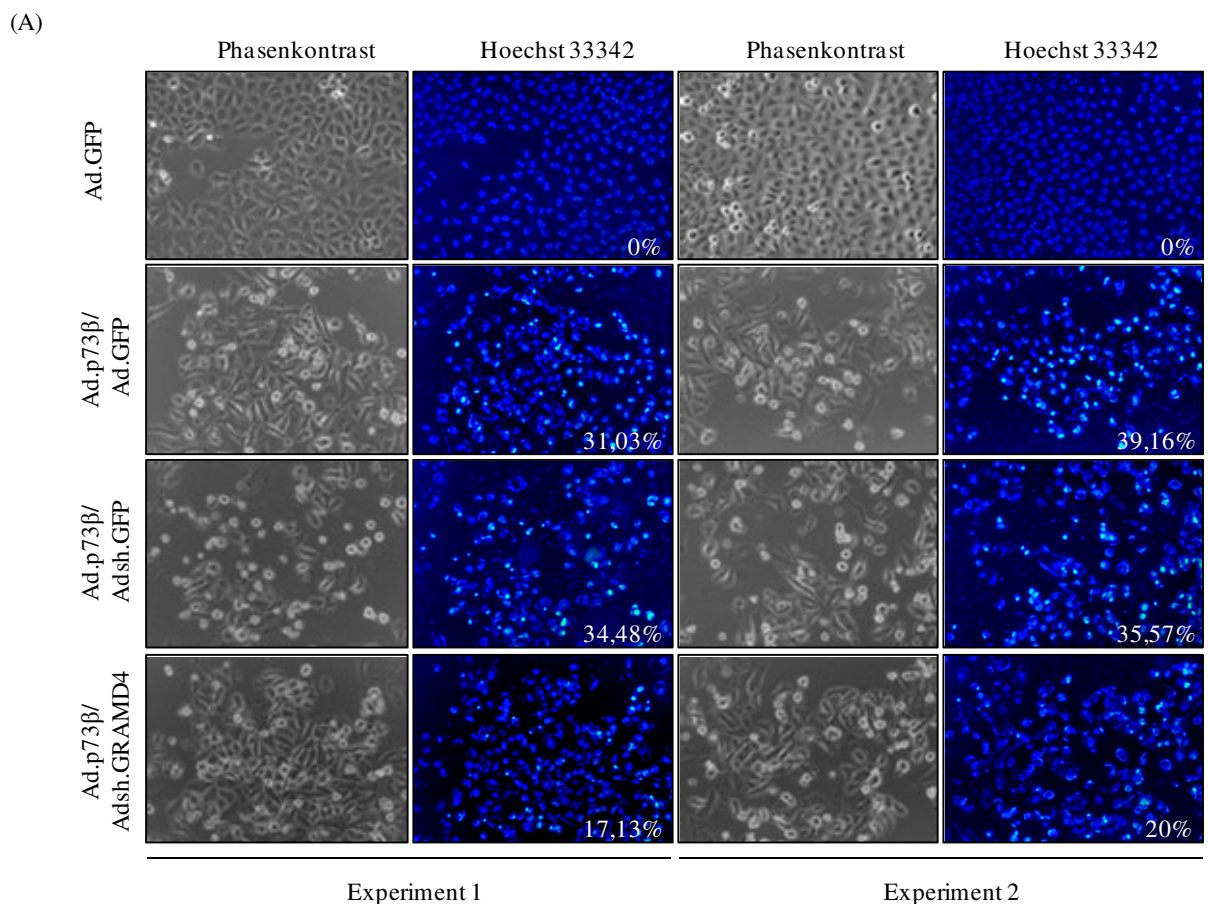


Abb. 34: Nachweis der Funktionalität von Ad.shGRAMD4. Die mitochondriale Fraktion von H1299-Zellen wurde 48 h nach der Transduktion mit Ad.GFP, Ad.GFP/Ad.p73 β , Ad.shGFP/Ad.p73 β und Ad.shGRAMD4/Ad.p73 β isoliert und die endogene Expression von GRAMD4 im Immunblot mittels anti-GRAMD4-Antikörper detektiert. Das mitochondriale Protein CoxIV diente als Ladekontrolle.

Achtundvierzig Stunden nach Transduktion wurde der Anteil apoptotischer Zellen durch Zugabe von Hoechst 33342 (H342) ins Medium (1 μ g/ml) bestimmt. H342 ist ein

Fluoreszenzfarbstoff, der eine hohe Affinität zu kondensierter DNA besitzt und durch die charakteristische weiß-blaue Färbung die Identifizierung apoptotischer Zellen ermöglicht. Zellen in Apoptose besitzen geschrumpfte oder fragmentierte Kerne mit kondensiertem Chromatin, die eine stärkere Fluoreszenz aufweisen als intakte Nuklei.

In der folgenden Abbildung sind zwei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente im Phasenkontrast und als Fluoreszenzaufnahmen dargestellt (Abb. 35 A). Die Transduktion von H1299-Zellen mit Ad.GFP (Kontrolle) führt zu keiner Induktion des programmierten Zelltods (\emptyset 0 %), während die Koinfektion des Tumorsuppressors p73 mit Ad.GFP zum erwarteten Anstieg der Apoptose führt (\emptyset 35,1 %). Im Vergleich dazu ist eine 50%-ige Reduktion der Apoptose nach Kotransduktion von Ad.p73 β mit Ad.shGRAMD4 zu verzeichnen (\emptyset 18,6 %). Dagegen liegt die Apoptoserate der mit Ad.p73 β und Ad.shGFP infizierten Zellen bei durchschnittlich 35 % und ist mit dem durch Ad.p73 β /Ad.GFP induzierten Zelltod identisch. Ad.GFP und Ad.shGFP dienen als Kontrollen. In Abb. 35 B sind die durchschnittlichen Apoptosewerte für die unterschiedlichen Virusinfektionen nochmals grafisch zusammenfassend dargestellt.



(B)

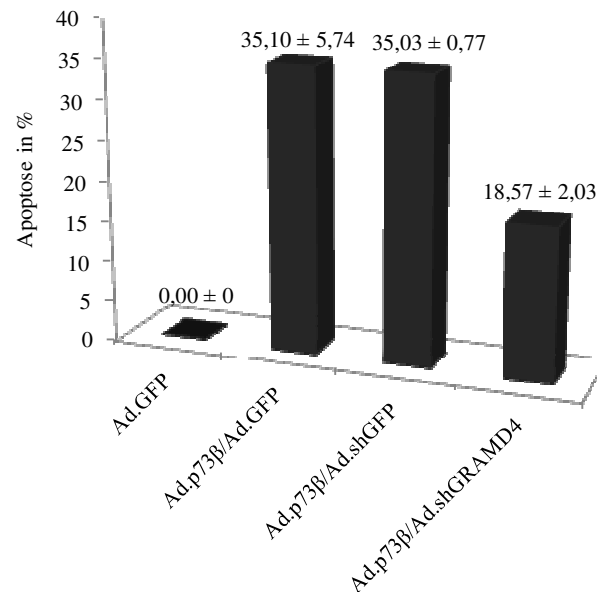


Abb. 35: Rolle von GRAMD4 in der p73-vermittelten Apoptose. (A) Darstellung der Fluoreszenzaufnahmen nach der Kernfärbung mit Hoechst 33342 und die Phasenkontrastaufnahmen des gleichen Bildausschnitts 48 h nach der Transduktion mit Ad.p73 und Ad.shGRAMD4, Ad.GFP oder Ad.shGFP. Vergrößerung 10x. (B) Graphische Darstellung der Apoptose (in %) 48 h nach der Transduktion mit Ad.p73 and Ad.shGRAMD4, Ad.GFP oder Ad.shGFP. Die Standardabweichungen beruhen auf zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Beim Betrachten dieser Resultate wird deutlich, dass GRAMD4 in der p73-induzierten Apoptose eine entscheidende Rolle einnimmt. Die Hoechst-Daten zeigen eine 50%-ige Reduktion p73-induzierter Apoptose (35,03 % in Ad.shGFP/Ad.p73- versus 18,57 % in Ad.shGRAMD4/Ad.p73-infizierten Zellen) bei unterdrückter GRAMD4-Expression 48 h nach Transduktion. Daher wird durch die Inhibierung von GRAMD4 die p73 eingeleitete Apoptose teilweise gestört. Dies zeigt, dass die Aktivierung von GRAMD4 durch p73 von physiologischer Bedeutung für den programmierten Zelltod ist.

Die zusammenfassende Betrachtung der erhaltenen Daten bezüglich der Aktivierung von *GRAMD4* lässt die Aussage zu, dass GRAMD4 ein spezifisches p73-Zielgen darstellt. So führt der Transkriptionsfaktor p73 zu einer direkten Transaktivierung des *GRAMD4*-Promotors und somit zu einer erhöhten Expression von GRAMD4 auf RNA- und Protein-Ebene. Die Aktivierung von *GRAMD4* durch p73 ist hierbei für die Einleitung des programmierten Zelltods von physiologischer Bedeutung (3.1.7). Für die Transaktivierung von *GRAMD4* ist vor allem die Promotorregion zwischen -2064 und -601 ausschlaggebend, in der die potenziellen p73-Bindestellen V-VIII liegen. Die Bindungsstellen außerhalb dieser Sequenz spielen für die Aktivierung von *GRAMD4* keine Rolle. Die Transkriptionsfaktoren p53 und E2F1 sind dagegen nicht in der Lage, den *GRAMD4*-Promotor zu binden und zu aktivieren. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Transaktivierungs-defizienten

Isoformen p73 $\alpha\Delta$ Ex2/3 und p73 $\beta\Delta$ Ex2/3, die für den Spezifitätsnachweis der *GRAMD4*-Abhängigkeit von p73 verwendet wurden, die Transaktivierung durch p73 unterbinden und selbst keinen Einfluss haben.

3.2. Einfluss von GRAMD4 auf Proteine des mitochondrialen Apoptoseweges

Sowohl aus den Promotor- (3.1.4) als auch den Expressionsanalysen (3.1.5) geht hervor, dass der Transkriptionsfaktor p73 *GRAMD4* in p53-negativen Tumorzellen aktivieren kann. Zusammen mit den Apoptosedaten (3.1.7) stellt *GRAMD4* somit einen Bestandteil des p73-vermittelten Zelltods dar.

Für p73 wie auch für das Familienmitglied p53 wurde deren Beteiligung an der mitochondrialen Apoptose, in der die pro- und anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie eine Schlüsselfunktion einnehmen, beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass beide Transkriptionsfaktoren in der Lage sind, das pro-apoptotische Bax zu transaktivieren (Miyashita & Reed, 1995; Zhu *et al.*, 1998; Thornborrow *et al.*, 2002). Darüber hinaus kann p53 Bcl-2 transkriptionell reprimieren (Miyashita *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 2001). Daneben kann p53 auch über Transkriptions-unabhängige Mechanismen zur Apoptose führen. Dazu transloziert es aus dem Zytosol direkt an die Mitochondrien, interagiert hier mit Bcl-2/Bcl-X_L und führt zur Freisetzung von Bax bzw. Bak (Mihara *et al.*, 2003). Deren anschließende Oligomerisierung führt zur Permeabilisierung der mitochondrialen Membran, zur Freisetzung apoptotischer Faktoren wie Cytochrom C und Smac und somit zu Aktivierung der Caspase-Kaskade.

Die Tatsache, dass endogenes *GRAMD4* nach Überexpression von p73 im Zytosol und den Mitochondrien detektierbar ist (3.1.5) und ein Bestandteil der p73-induzierten Apoptose ist (3.1.7), lässt die Annahme zu, dass *GRAMD4* eine mit p53 vergleichbare Funktion an den Mitochondrien übernehmen kann. Um diese postulierten Effekte zu überprüfen, wurde der Einfluss von *GRAMD4* auf die mitochondrialen Proteine sowie deren Auswirkungen auf die Mitochondrien untersucht. Zuvor sollte jedoch die subzelluläre Lokalisation von *GRAMD4* nach Überexpression von p73 bestimmt werden.

3.2.1. Zelluläre Lokalisation von GRAMD4 unter dem Einfluss von p73

Die gesteigerte Expression von endogenem *GRAMD4* nach Transduktion von p73 konnte bereits nachgewiesen werden (3.1.5). Aber wie sieht die subzelluläre Lokalisation von *GRAMD4* unter dem Einfluss des Aktivators p73 aus? Um diese Frage zu beantworten, wurden *Western Blot*-Analysen und Immunfluoreszenzaufnahmen durchgeführt.

Hierfür wurden die Proteine der mitochondrialen, zytosolischen und nukleären Fraktionen von H1299-Zellen nach ektopter Expression von p73 zu den angegebenen Zeitpunkten (0, 24,

48 bzw. 72 h) extrahiert und *Western Blot*-Analysen unterzogen. Wie in Abb. 36 ersichtlich, kann bereits im Nukleus (N) in der 0 h Probe endogenes GRAMD4 nachgewiesen werden, dessen Expression 24 h nach Transduktion von Ad.p73 β , das als Apoptose-Stimuli fungiert, zunimmt. Im Zeitraum zwischen 24 h und 48 h nach p73-Überexpression transloziert GRAMD4 aus dem Nukleus (N) in das Zytosol (Z) und die Mitochondrien (M), in denen es 72 h nach p73-Transduktion vollständig akkumuliert ist. Diese Daten korrelieren mit vorangegangenen Arbeiten, in denen gezeigt wurde, dass GRAMD4 nach E2F1-Aktivierung mitochondrial lokalisiert ist (Stanelle *et al.*, 2005).

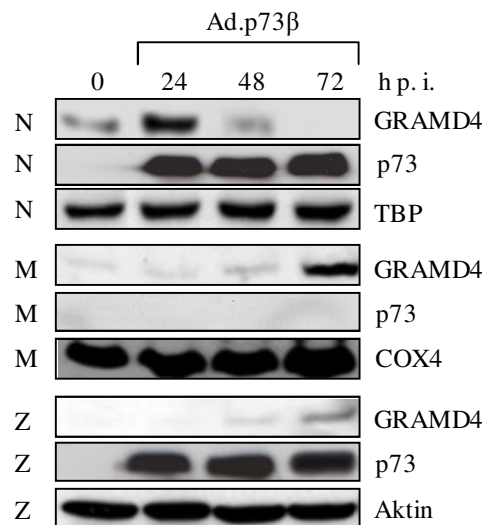


Abb. 36: Translokation von endogenem GRAMD4 nach p73-Überexpression. *Western Blot*-Analysen (20 μ g) der mitochondrialen, zytosolischen und nukleären Fraktionen von H1299-Zellen nach Ad.p73 Transduktion. Der Nachweis von endogenem GRAMD4 und ektopen p73 erfolgte im *Immunblot* mittels anti-GRAMD4- und anti-p73 (ER15)-Antikörper. Das Protein CoxIV diente als Ladekontrolle für die mitochondriale Proteinfraktion, Aktin für das Zytosol, während TBP (TATA-binding protein) als nukleäre Ladekontrolle verwendet wurde. Nukleus (N), Zytosol (Z), Mitochondrien (M), Stunden nach Infektion (h p.i.)

Die *Western Blot*-Analysen wurden mittels Immunfluorezenzaufnahmen bestätigt (Abb. 37). Nach der Transfektion von H1299-Zellen mit pcDNA3.1-p73 β konnte nach 72 h ein erhöhtes GRAMD4-Proteinlevel detektiert werden (Abb. 37 IX, XII-A), während in den unbehandelten Zellen (Kontrolle) nur eine geringe endogene GRAMD4-Expression nachzuweisen war (Abb. 37 V). In Abwesenheit von p73 ist GRAMD4 im Nukleus lokalisiert (Abb. 37 VIII), die Überexpression des Tumorsuppressors führt zur deutlichen Verlagerung des hochregulierten GRAMD4-Proteins aus dem Nukleus in die Mitochondrien (Abb. 37 XII, XII-D).

Um eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers auszuschließen, wurde im Kontrollansatz kein Primärantikörper zu den Zellen gegeben (Abb. 37, I). Da hier keine grüne Fluoreszenz detektiert werden konnte, ist von einer korrekten Bindung des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper (anti-GRAMD4) auszugehen. Der Nachweis

nukleärer DNA erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (Abb. 37, III, VII, XI, XII-C), die Mitochondrien wurden mit MitoTracker®orange angefärbt (Abb. 37 II, VI, X, XII-A).

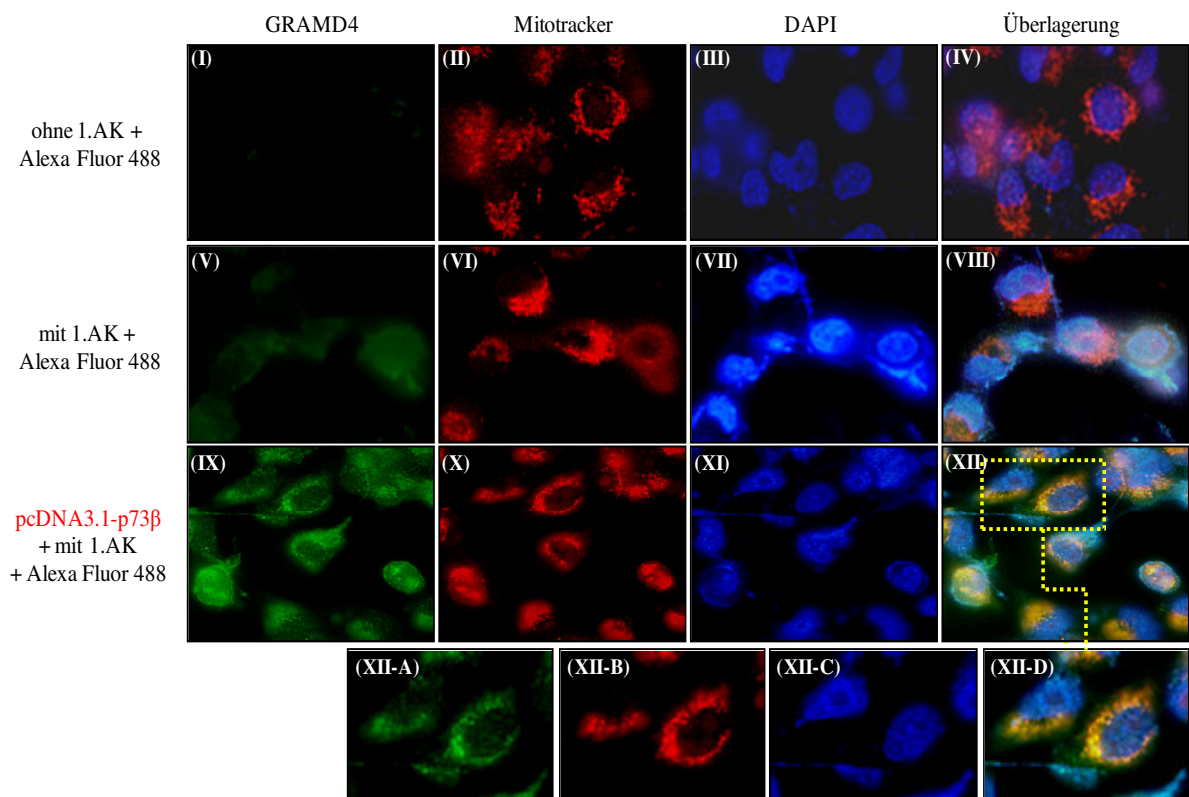


Abb. 37: p73-vermittelte Hochregulation der endogenen GRAMD4-Proteinexpression. Immunfluoreszenzaufnahmen von unbehandelten (I-VIII) und p73-überexprimierenden (IX-XII, XII-A-XII-D) H1299-Zellen 72 h nach Transfektion mit pcDNA3.1-p73β. Die einzelnen Ansätze wurden mit dem GRAMD4-Primärantikörper inkubiert und mit dem grün-fluoreszierenden Sekundärantikörper (Alexa Fluor®488 anti-Kaninchen) detektiert, sodass endogenes GRAMD4 über ein grünes Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden konnte (V, IX, XIII). Die spezifische Bindung des Sekundärantikörpers wurde getestet, indem kein Erstantikörper verwendet wurde (I). Die Zellkerne wurden mit DAPI (III, VII, XI, XII-C) und die Mitochondrien mit Hilfe von MitoTracker®orange (II, VI, X, XII-B) angefärbt. Vergrößerung: I-XII, 30x; XII-A bis XII-D, 60x

3.2.2. Einfluss von GRAMD4 auf die Proteinexpression von Bax, Bak und Bcl-2

Um eine mögliche Beteiligung der Proteine der Bcl-2-Familie an der GRAMD4-induzierten Apoptose abzuklären, wurde die Expression von Bax, Bak und Bcl-2 eingehender untersucht. Hierfür wurden die Zelllinien H1299, *p53*^{-/-} HCT116 und *p53*^{+/+} HCT116 mit den adenoviralen Vektoren Ad.GRAMD4.GFP und Ad.GFP als Kontrolle infiziert und zu Beginn die Transduktionseffizienz des Vektors über einen Zeitraum von drei Tagen anhand der Expression des Grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) überprüft.

In Abb. 38 sind repräsentative Ausschnitte von infizierten (A) H1299-, (B) *p53*^{-/-} HCT116- und (C) *p53*^{+/+} HCT116-Zellen in Form von Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen dokumentiert. Die Effizienz der Transduktion beträgt dabei nach 48 h

(Fluoreszenz, A-III, B-III, C-III) nahezu 100 %. Die Überexpression von GRAMD4 führt zu einem veränderten Phänotyp der Zellen, der bereits beschrieben wurde (Stanelle *et al.*, 2005). Sowohl H1299- als auch HCT116-Zellen zeigten nach 24-stündiger Expression von GRAMD4 normal proliferierende Zellen (Phasenkontrast, A-II, B-II, C-II). Nach 48 h wiesen einige Zellen aufgeblähte Membranen auf („*membrane blebbing*“) und rundeten sich ab (Phasenkontrast, A-III, B-III, C-III). Nach 72 h führte GRAMD4 (Phasenkontrast, A-IV, B-IV, C-IV) im Vergleich zu nicht-transduzierten Kontrollzellen (Phasenkontrast, A-I, B-I, C-I) zur Verminderung der Zellzahl.

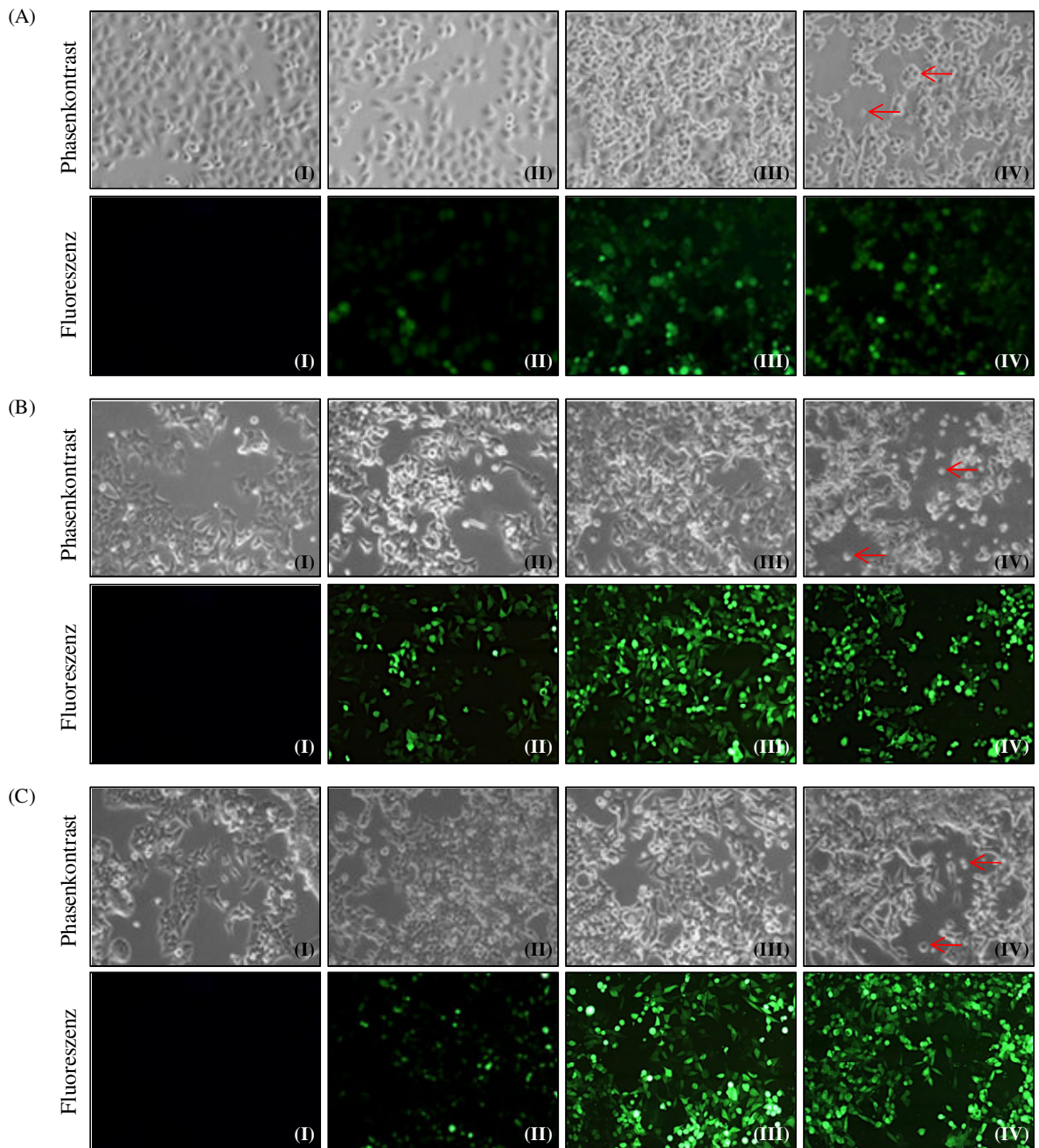


Abb. 38: Phänotypische Expressionskontrolle nach Transduktion von (A) H1299-, (B) *p53*^{-/-} HCT116- und (C) *p53*^{+/+} HCT116-Zellen mit Ad.GRAMD4.GFP. Dargestellt sind repräsentative

Ausschnitte in Form von Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahmen über einem Zeitraum von 3 d (II, 24 h; III, 48 h; IV, 72 h). Nicht-transduzierte Zellen dienen als Negativkontrolle (I, 0h). Rote Pfeile kennzeichnen apoptotische Zellen. Vergrößerung 10x.

Vierundzwanzig, 48 bzw. 72 h nach der Transduktion wurden die Proben geerntet und die Proteinexpression der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak und des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 mittels *Western Blot* untersucht. Als Negativkontrollen dienten mit Ad.GFP infizierte Zellen. Wie in der Abbildung ersichtlich, kommt es in allen untersuchten Zelllinien unabhängig von deren p53-Status zu einem signifikanten Anstieg der Bax-Proteinexpression nach Überexpression von GRAMD4, während in Ad.GFP transduzierten Zellen kein Bax-Anstieg nachweisbar ist (Abb. 39). Der GRAMD4-induzierte Anstieg von Bax ist zeitabhängig mit einem Maximum nach 48 h in H1299- und 72 h in Kolonkarzinom-Zellen. Im Gegensatz dazu kann für das Bax-Homologon Bak, welches bereits in nicht-infizierten Zellen detektierbar ist, keine Veränderung im Expressionsniveau festgestellt werden. Des Weiteren wurde in allen Zelllinien eine signifikante Reduktion der Expression von Bcl-2 nach GRAMD4-Überexpression im Vergleich zur Kontrolle (Ad.GFP) nachgewiesen. Damit resultieren die GRAMD4-induzierte Abnahme der Bcl-2-Expression und die gleichzeitige Hochregulation von Bax in einem erniedrigten Bcl-2/Bax-Verhältnis, welches ein charakteristisches Merkmal der Apoptose darstellt.

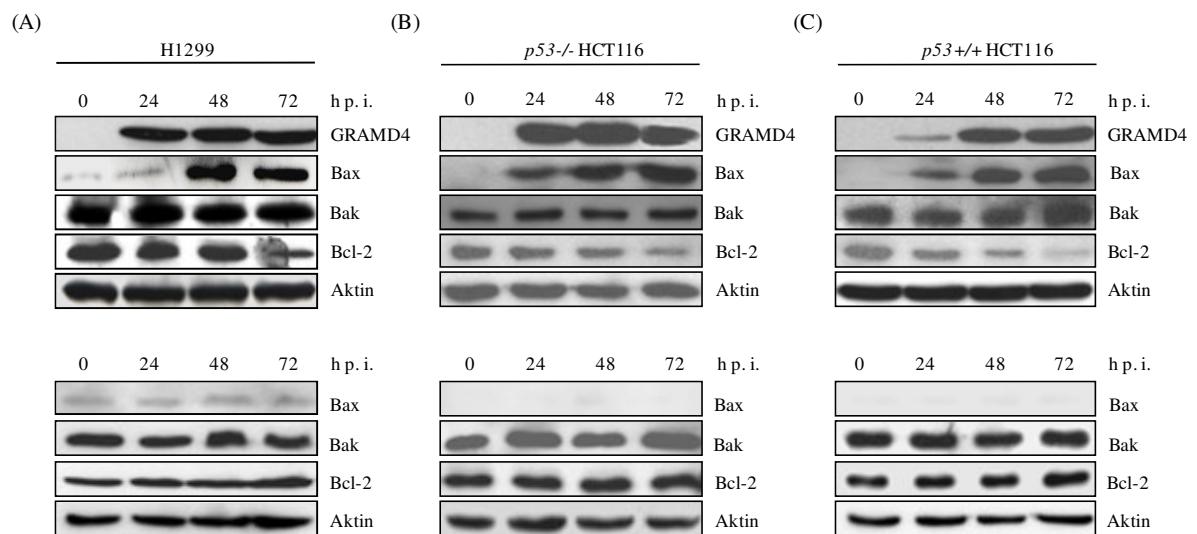


Abb. 39: GRAMD4-Überexpression führt zur Hochregulation des pro-apoptotischen Bax und zur Abnahme der Bcl-2-Proteinexpression. Western Blot-Analysen von (A) H1299, (B) *p53*^{-/-} und (C) *p53*^{+/+} HCT116-Zellen nach Transduktion mit Ad.GRAMD4 (obere Reihe) und Ad.GFP (untere Reihe, Kontrolle). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Proben geerntet und anschließenden mit geeigneten Antikörpern immunoblottet. Aktin diente als Ladekontrolle.

3.2.3. Zelluläre Lokalisation von Bax unter dem Einfluss von GRAMD4

In nicht-apoptotischen Zellen befindet sich Bax entweder als inaktives Monomer im Zytosol oder liegt gebunden an Organellen vor, inseriert aber nach einem apoptotischen Stimuli in die Mitochondrien und führt dort zur Freisetzung von Cytochrom C (Wolter *et al.*, 1997; Nechushtan *et al.*, 1999). Um den möglichen Einfluss des pro-apoptotischen GRAMD4 auf die zelluläre Lokalisation von endogenem Bax während der Apoptose zu untersuchen, wurden p53-negative H1299-Zellen mit Ad.GRAMD4 infiziert. Die Überexpression von GRAMD4 führt 48 h nach Transduktion zur erhöhten Expression von endogenem Bax (Abb. 40 VII) und zellulären Umverteilung des Proteins. So weist Bax in der konfokalen Mikroskopie in den nicht mit GRAMD4 behandelten Zellen eine diffuse Verteilung auf (Abb. 40 IV), zeigt aber in infizierten Zellen eine punktierte Verteilung (Abb. 40 VII), die mit den Mitochondrien kolokalisiert (Abb. 40, IX versus VI, orange Fluoreszenz). GRAMD4 ist demnach in der Lage, die Translokation von Bax aus dem Zytosol direkt in die Mitochondrien zu bewirken. Zur Kontrolle der korrekten Sekundärantikörperbindung wurde eine der Proben nicht mit dem Primärantikörper inkubiert (Abb. 40, I). Da in dieser keine Fluoreszenz detektiert werden konnte, kann eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers ausgeschlossen werden.

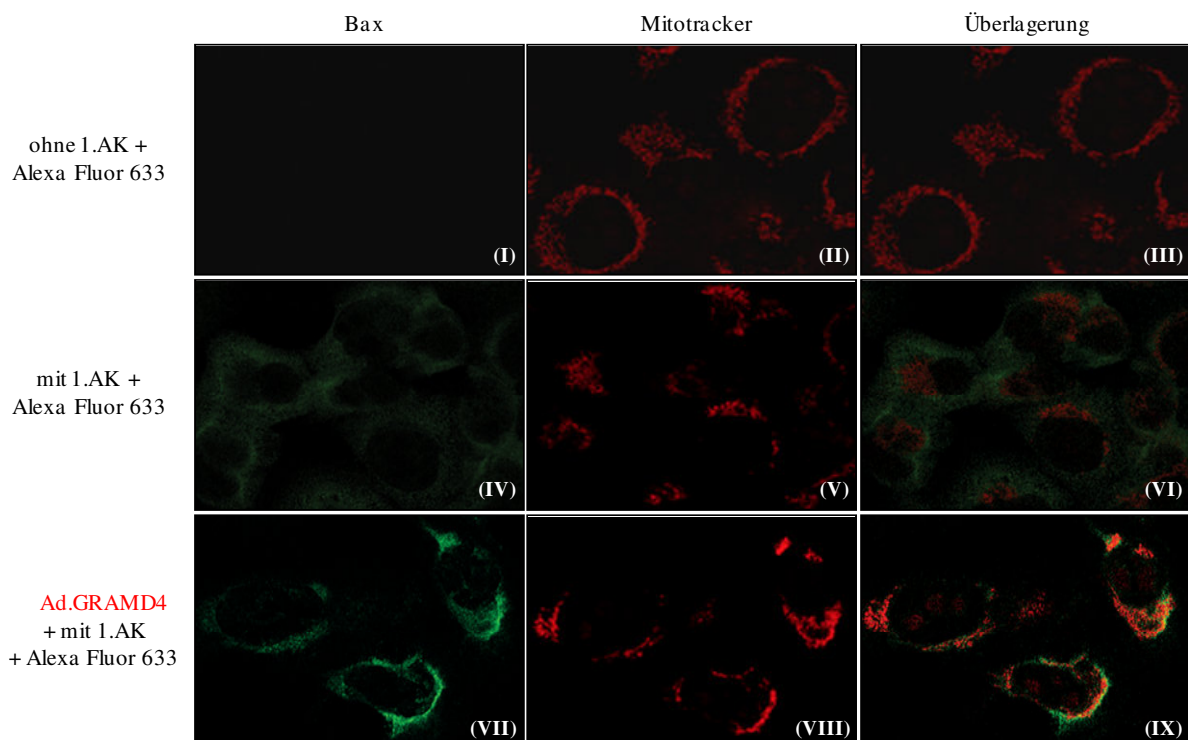


Abb. 40: GRAMD4 vermittelte Translokation vom endogenen Bax. Immunfluoreszenzaufnahmen von unbehandelten (I - IV) und GRAMD4-überexprimierenden (VII - IX) H1299-Zellen 48 h nach Transduktion mit Ad.GRAMD4. Die einzelnen Ansätze wurden mit dem Bax-Primärantikörper (clone 6A7, BD Pharmingen, Heidelberg) inkubiert und dem Sekundärantikörper Alexa Fluor[®] 633 detektiert, sodass endogenes Bax über ein Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden konnte (IV, VII). Die spezifische Bindung des Sekundärantikörpers wurde getestet, indem kein Erstantikörper

verwendet wurde (I). Die Mitochondrien wurden mit Mito-Tracker™ orange CMXRos angefärbt (II, V, VIII); Überlagerung III, VI, IX; Vergrößerung: 63x.

Die GRAMD4-induzierte mitochondriale Translokation von Bax wurde des Weiteren mittels *Western Blot*-Analysen bestätigt. Wie in Abb. 41 A gezeigt, führt die Überexpression von GRAMD4 in der mitochondrialen Fraktion von H1299-Zellen bereits nach 24 h zu einem Anstieg der Bax-Proteinexpression, die im weiteren Verlauf der Kinetik zunimmt. Das erhöhte Vorkommen von Bax in den Mitochondrien korreliert mit der Abnahme des Proteins im Zytosol. In diesem Kompartiment wurde in den nicht mit GRAMD4 infizierten Zellen (0 h) die höchste Bax-Expression detektiert, die nach GRAMD4 Überexpression bereits nach 24 h abnimmt. In den mit dem Kontrollvirus Ad.GFP infizierten H1299-Zellen konnte dagegen keine Translokation von Bax aus dem Zytosol in die Mitochondrien nachgewiesen werden (Abb. 41 B).

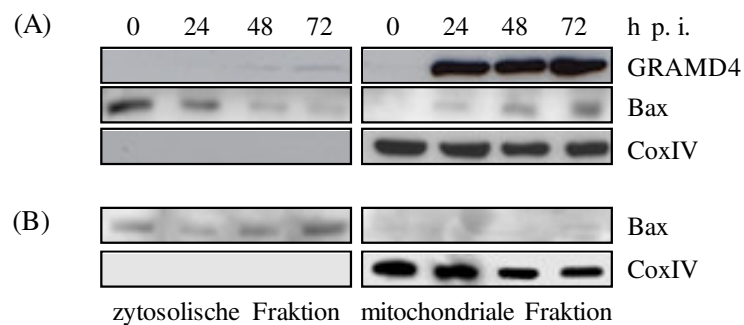


Abb. 41: Evaluierung von GRAMD4 und endogenem Bax in der mitochondrialen und der zytosolischen Fraktion. Western Blot-Analysen nach adenoviral-vermittelter (A) GRAMD4- und (B) GFP-Überexpression in H1299-Zellen. Die Detektion von GRAMD4 und Bax erfolgte mit geeigneten Antikörpern. Das Protein CoxIV diente als Ladekontrolle für die mitochondriale Proteinfraction.

Bei zusammenfassender Betrachtung dieser Daten wird deutlich, dass GRAMD4 die Translokation von endogenem Bax aus dem Zytosol in die Mitochondrien positiv beeinflusst und somit im mitochondrialen apoptotischen Signalweg eine wichtige Rolle spielt. Aber wie bewirkt GRAMD4 die Translokation von Bax?

3.2.4. Mitochondriales GRAMD4 interagiert mit Bcl-2

Der Transkriptionsfaktor p53 kann eine Vielzahl von pro-apoptotischen Genen transkriptionell regulieren, aber auch Transkriptions-unabhängig agieren. So interagiert mitochondriales p53 mit anti-apoptotischen Bcl-Proteinen (z. B. Bcl-2, Bcl-X_L) um deren inhibitorische Effekte auf pro-apoptotische Familienmitglieder (z. B. Bax, Bak) aufzuheben, die Oligomerisierung der beiden Proteine zu induzieren sowie die mitochondriale Membran zu permeabilisieren. Dies resultiert in der Freisetzung von Cytochrome C und der Aktivierung der Caspase-Kaskade (Chipuk *et al.*, 2004; Leu *et al.*, 2004; Tomita *et al.*, 2006).

Da GRAMD4 nach p73-Überexpression ebenfalls in die Mitochondrien transloziert (Abb. 36) und zugleich die Translokation von Bax aus dem Zytosol in die Mitochondrien hervorruft, wurde eine p53-vergleichbare Funktion von GRAMD4 in den Mitochondrien untersucht. Dazu wurden p53-negative H1299-Zellen mit pcDNA3.1-GRAMD4/His/V5 und pRC-CMV-Bcl-2 alleine oder in Kombination transfiziert (Abb. 42 A) und im Anschluss Koimmunpräzitationen (2.2.3.5) unterzogen. Diese wurden mit Bcl-2-Antikörper (2.1.7.1) durchgeführt, um im *Immunblot* (2.2.3.4) kopräzipitiertes GRAMD4 nachzuweisen. Eine mit pcDNA3.1 infizierte Probe wurde als Kontrolle mitgeführt und eine ausreichende Transfektion mit den genutzten Plasmiden mittels *Western Blot* überprüft (Abb. 42 A). In der Koimmunpräzitation wurde ein spezifischer Bcl-2/GRAMD4-Komplex detektiert (Abb. 42, Spur 4). Dieser spezifische endogene Komplex findet sich aber auch in schwächerer Konzentration in Zellen, die nur mit pcDNA3.1- GRAMD4/His/V5 transfiziert wurden (Abb. 42 A, Spur 3). Der Grund dafür liegt in der basalen Expression von Bcl-2 (Abb. 42 A, Spur 1, 3) in den hier verwendeten H1299-Zellen, das Protein-Protein-Interaktionen mit dem überexprimierten GRAMD4 eingehen kann.

Vergleichbare Resultate konnten ebenfalls mittels Ni-NTA pull-down-Experimenten erreicht werden, in denen die mit einem His-Tag versehenden GRAMD4-Proteine über Ni-NTA (Qiagen, Hilden) gebunden wurden, um anschließend im *Immunblot* kopräzipitiertes Bcl-2 nachzuweisen. Auch hier wurden spezifische Bcl-2/GRAMD4-Komplexe nachgewiesen (Abb. 42 B, Spur 2, 3). Durch Verwendung der SMART-Database (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) wurde eine Region, die eventuell für die Protein-Protein-Interaktion verantwortlich ist, identifiziert. Die partielle Analyse der ersten 444 Aminosäuren von GRAMD4 ergibt einen Hinweis darauf, dass eine Region, die die Aminosäuren 92-176 umfasst, möglicherweise eine Bcl (B-Cell lymphoma)-ähnliche Domäne sein könnte. Durch die Herstellung einer Bcl-ähnlichen-Deletionsmutante pcDNA3.1-GRAMD4 Δ BH/V5/His (2.2.1.13) konnte in anschließenden Ni-NTA pull down-Experimenten der Nachweis erbracht werden, dass die Entfernung dieser Domäne zur Auflösung der Interaktion sowohl zwischen GRAMD4 und endogenem (Abb. 42 B, Spur 2) als auch überexprimiertem Bcl-2 (Abb. 42 B, Spur 3) führt. Dagegen ist nach Transfektion von pcDNA3.1-GRAMD4 Δ BH/V5/His allein oder in Kombination mit pRC-CMV-Bcl-2 (Abb. 42 B, Spur 4 bzw. 5) nach dem Ni-NTA pull-down kein immunpräzipitiertes Bcl-2-Protein nachweisbar. Die Expression der verwendeten Plasmide pcDNA3.1-GRAMD4/V5/His und pcDNA3.1-GRAMD4 Δ BH/V5/His für dieses Experiment wurde mittels His-Tag-Antikörper überprüft. Während der GRAMD4/V5/His-Vektor die komplette GRAMD4-Gensequenz beinhaltet und ein Protein von etwa 66 kDa exprimiert, enthält das pcDNA3.1-GRAMD4 Δ BH/V5/His-Plasmid eine um 255 kbp deletierte GRAMD4-Sequenz und exprimiert ein 56 kDa Protein.

Hieraus läßt sich schlußfolgern, dass die detektierte Region für eine Protein-Protein-Interaktion von Bcl-2 und GRAMD4 verantwortlich ist. Die Komplexbildung der beiden

Proteine kann daraufhin möglicherweise die Freisetzung von Bax aus dem Bcl-2/Bax-Komplex bewirken und somit die Apoptose an den Mitochondrien auslösen.

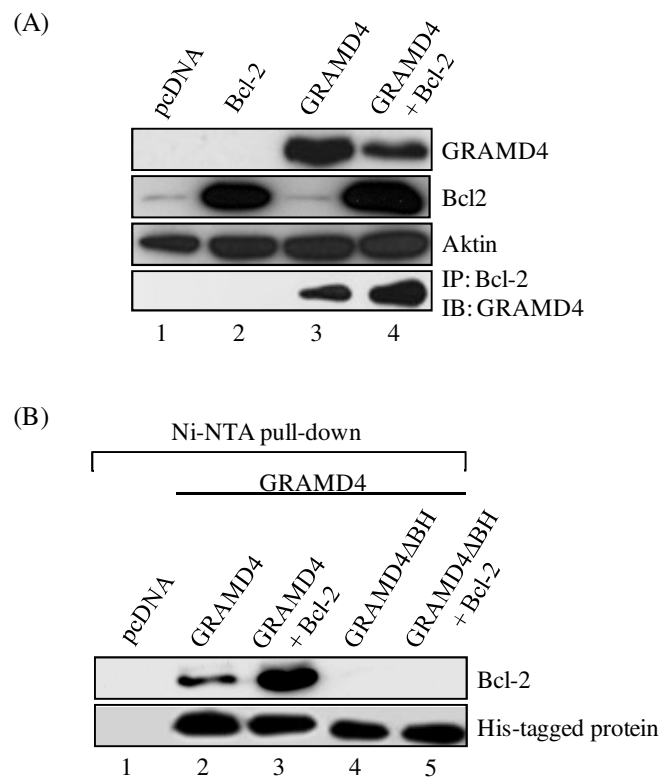


Abb. 42: Koimmunpräzipitation zur Untersuchung der direkten Interaktion zwischen Bcl-2 und GRAMD4 bzw. der BCL-ähnlichen-Deletionsmutante GRAMD4ΔBH. (A) Nachweis der Proteinexpression und Koimmunpräzipitation 48 h nach Transfektion von H1299-Zellen mit pRC-CMV-Bcl-2 (2 µg), pcDNA3.1-GRAMD4/V5/His (2 µg) allein bzw. in Kombination. Es wurden 500 µg Proteinextrakt mit dem Bcl-2-Antikörper (Santa Cruz, N-19) präzipitiert, und kopräzipitiertes GRAMD4 mit dem GRAMD4-Antikörper im *Immunblot* detektiert. Die Expressionskontrolle der verwendeten Plasmide erfolgte im *Western Blot* mit geeigneten Antikörpern. Aktin diente als Ladekontrolle. (B) Nachweis der Bcl-2/GRAMD4-Komplexbildung mittels Ni-NTA pull-down-Experiment. 48 h nach Transfektion von H1299-Zellen mit pRC-CMV-Bcl-2 (2 µg), pcDNA3.1-GRAMD4/V5/His (2 µg), pcDNA3.1-GRAMD4ΔBH/V5/His (2 µg) allein bzw. in Kombination wurden 500 µg Proteinextrakt mit 50 µl Ni-NTA vermengt, 3 h bei 4 °C inkubiert, das pull-down-Experiment durchgeführt und anschließend im *Western Blot* Bcl-2 detektiert. Die Proteinexpression der mit einem His-Tag versehenen GRAMD4-Proteine erfolgte mit einem His-Tag-Antikörper.

3.2.5. GRAMD4-induzierte Oligomerisierung von Bax

Die Tatsache, dass GRAMD4 direkt mit Bcl-2 interagiert (3.2.4), führt zu der Annahme, dass GRAMD4 wie p53 die Oligomerisierung von Bax induzieren kann (Wolff *et al.*, 2008). Um nachzuweisen, dass GRAMD4 an den Mitochondrien Bax-Oligomere bildet, wurden H1299-Zellen mit Ad.GFP, Ad.GRAMD4 und Ad.p53 infiziert, die Mitochondrien 48 h nach Transduktion isoliert, in Konjugatbuffer aufgenommen, mit BMH (1mM) versetzt (2.2.4.8) und anschließend *Western Blot*-Analysen durchgeführt. Wie in Abb. 43 A dargestellt, kann

GRAMD4 die Oligomerisierung von Bax in den Mitochondrien induzieren. Die mitgeführte Positivkontrolle p53 führt, wie bereits in anderen Arbeiten beschrieben, zur Ausbildung von Oligomeren (Wolff *et al.*, 2008). Dagegen konnten in Ad.GFP infizierten Zellen, aber auch in den Lysaten, die nicht mit dem Crosslinker BMH behandelt wurden, keine Oligomere nachgewiesen werden. Das weist auf die Spezifität der mit BMH vernetzten und detektierten oligomeren Banden hin. Die Bax-Oligomerisierung nach GRAMD4-Überexpression kann bereits nach 24 h im Gesamtzellproteinextrakt von H1299 nachgewiesen werden und steigt 72 h nach Transduktion nochmals an (Abb. 43 B). Die Detektion der ausgebildeten Oligomere erfolgte mit Bax 6A7, einem Antikörper, der an die aktive Membran-gebundene Form von Bax bindet.

Aus den erhaltenen Daten lässt sich schlussfolgern, dass GRAMD4 Bax aktiviert indem es mit Bcl-2 interagiert und Bax damit aus dem inhibitorischen Bcl-2/Bax-Komplex heraus löst. Aktivierte Bax-Monomere inserieren in die mitochondriale Membran, oligomerisieren und bilden Poren durch die das Cytochrom C ausströmen kann (3.2.6).

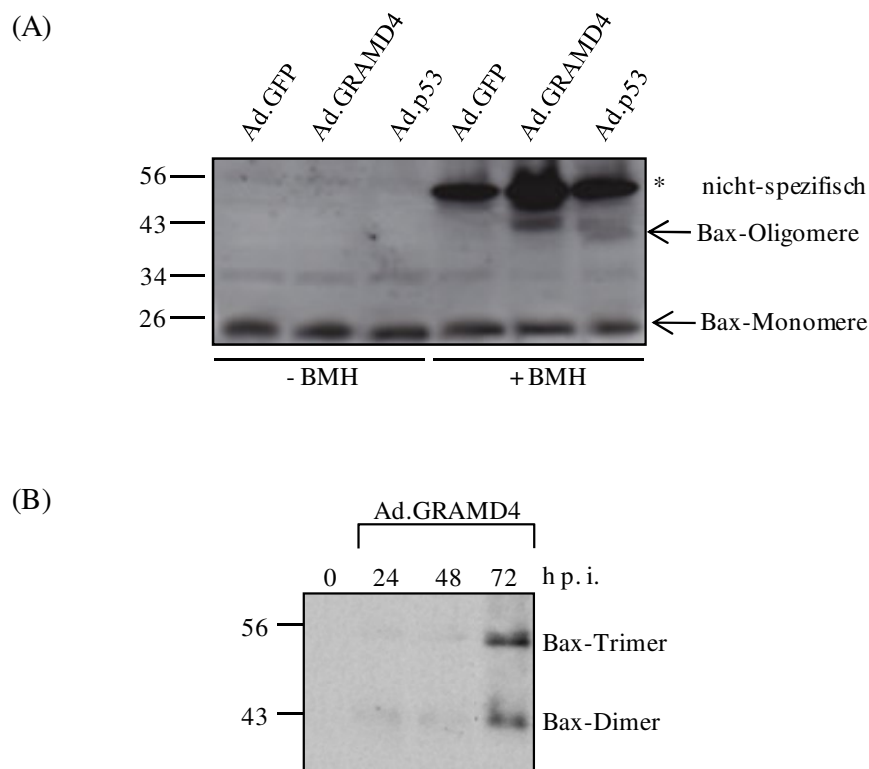


Abb. 43: GRAMD4 induziert die Oligomerisierung von Bax. (A) Mitochondrien von H1299-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit Ad.GRAMD4 und Ad.p53 in Konjugatpuffer gelöst, mit 1 mM BMH versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der Lyse in 2xSDS-Buffer erfolgte der Nachweis der Bax-Oligomerisierung im *Immunblot* mit einem geeigneten Bax-Antikörper (Santa Cruz, N-20). Die Mitochondrien von Ad.GFP infizierten Zellen und unbehandelte Lysate dienten als Negativkontrollen. (B) Der Gesamtzellextrakt von H1299-Zellen wurde nach adenoviraler Infektion mit GRAMD4 zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und im *Immunblot* mit dem Antikörper Bax clone 6A7, der an das aktivierte Membran-gebundene Bax bindet, detektiert.

3.2.6. GRAMD4 führt zur Permeabilisierung der mitochondrialen Membran

p53 übernimmt in der Zelle die Funktion eines Sensors für Schäden der zellulären DNA (genotoxischer Stress) wie er zum Beispiel durch ultraviolette Strahlen oder auch durch Chemotherapeutika hervorgerufen wird. Durch die Schädigung der DNA wird p53 aktiviert, akkumuliert in der Zelle und transaktiviert eine Vielzahl pro-apoptotischer Gene der Bcl2-Familie (Bax, Bid, Puma, Noxa). Über direkte Bindung an Bcl-2 und Bcl-X_L und der damit verbundenen Freisetzung von Bax oder Bak aus Komplexen mit den anti-apoptotischen Bcl2-Mitglieder kann p53 auch direkt an den Mitochondrien agieren und die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP) induzieren (Chipuk *et al.*, 2004; Petros *et al.*, 2004). Dieser Mechanismus ist mit der Beobachtung verbunden, dass p53 zur Oligomerisierung von Bax bzw. Bak führt infolgedessen Cytochrom C und andere Intermembranproteine wie Smac und Omi/HtrA2 freigesetzt werden (Mihara *et al.*, 2003).

Aufgrund der Tatsache, dass für GRAMD4 die Bindung an Bcl-2 und die Oligomerisierung von Bax nachgewiesen wurde, sollte der Einfluss von GRAMD4 auf die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP) untersucht werden. Hierfür wurden H1299-Zellen mit Ad.GRAMD4 und Ad.GFP als Kontrolle infiziert. Vierundzwanzig, 48 und 72 h nach der Transduktion erfolgte die Extraktion mitochondrialer und zytosolischer Proteine (2.2.3.1), die anschließend im *Immunblot* mit Antikörpern gegen Cytochrom C, Smac und GRAMD4 untersucht wurden. Wie in Abb. 44 A zu erkennen, ist überexprimiertes GRAMD4 24 h nach der Infektion in Vergleich zu nicht-infizierten Zellen vor allem in der mitochondrialen Proteinfraction zu detektieren, während im Zytosol nur geringe Proteinmengen nachweisbar. Der Anstieg der GRAMD4-Konzentrationen in den Mitochondrien korreliert gleichzeitig mit der Freisetzung der pro-apoptotischen Moleküle Cytochrom C und Smac aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytosol. Zwischen 0 h und 24 h kommt es sowohl bei Cytochrom C als auch bei Smac zur Zunahme der Proteinmengen in der zytosolischen Fraktion, während ihre Proteinkonzentration in der mitochondrialen Fraktion abnimmt. Der Abfall beider Proteine in der zytosolischen Fraktion nach 72 h begründet sich dadurch, dass die Antwort auf apoptotische Stimuli, in diesem Fall GRAMD4, zeit- und konzentrationsabhängig ist. Des Weiteren können die aus den Mitochondrien in das Zytosol freigesetzten Proteine zu diesem Zeitpunkt bereits degradiert vorliegen, sodass entsprechend geringere Proteinmengen vorhanden sind. Nach der Überexpression des Kontrollvirus Ad.GFP konnte kein Cytochrom C bzw. Smac im Zytosol detektiert werden (Abb. 44 B). Somit ist GRAMD4 Auslöser für die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran. Als Ladekontrollen im *Western Blot* dienten das mitochondriale Protein CoxIV und Aktin.

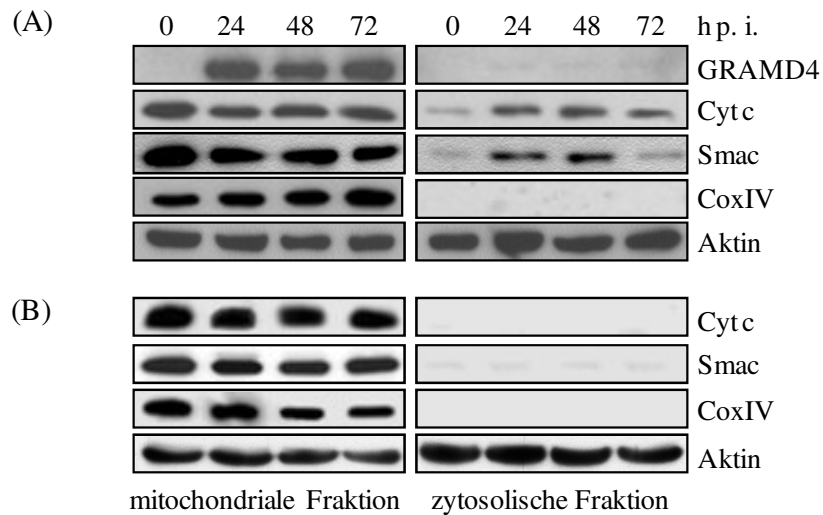


Abb. 44: Mitochondriales GRAMD4 führt zur Freisetzung der apoptotischen Faktoren Cytochrom C und Smac. Nachweis der Proteinexpression in der mitochondrialen und zytosolischen Fraktion nach Transduktion von (A) Ad.GRAMD4 und (B) Ad.GFP (Kontrolle) in H1299-Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten (0, 24, 48 bzw. 72 h). Die Detektion der Proteine erfolgte mit geeigneten Antikörpern. Das mitochondriale Protein CoxIV und Aktin dienten als Ladekontrollen.

Die Veränderung des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\psi_m$) als ein Zeichen der Permabilisierung der inneren mitochondrialen Membran (MIMP) spielt eine entscheidende Rolle beim Ablauf der Apoptose innerhalb einer Zelle (Henry-Mowatt *et al.*, 2004). Um diese Veränderungen an den Mitochondrien detektieren zu können, wurde das „Mitochondrial Membrane Potential Assessment Kit“ (MitoPT $\Delta\psi_m$) eingesetzt. Vierundzwanzig Stunden nach der Transduktion von GFP, p53 und GRAMD4-exprimierenden adenoviralen Vektoren erfolgte die Vorbereitung der Zellen nach Protokoll des Herstellers und die Bestimmung der RFU (*relative fluorescence unit*) im Fluoreszenz Spektrometer. Wie in Abb. 45 ersichtlich, kommt es nach Infektion mit GRAMD4 in p53-negativen H1299-Zellen zur Abnahme des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\psi_m$). Die Effizienz von GRAMD4 Membranpermeabilisierung auszulösen (RFU 38 %) ist hierbei mit der von p53 vergleichbar (RFU 41 %), während Ad.GFP keine Veränderungen an den Mitochondrien auslöst (RFU 100 %). Zellen, die mit dem Protonenpumpenhemmer CCCP (Carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone) behandelt wurden, dienten als Positivkontrolle für den Zusammenbruch von $\Delta\psi_m$.

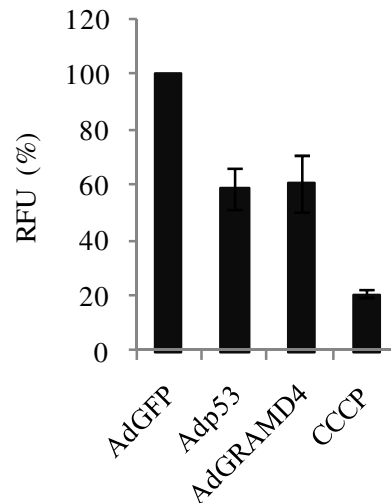


Abb. 45: Detektion des mitochondrialen Transmembranpotentials ($\Delta\psi_m$) mittels TMRE nach GRAMD4-Transduktion. H1299-Zellen wurden 24 h nach Infektion mit Ad.GFP, Ad.p53 und Ad.GRAMD4 nach Angaben des Herstellers aufbereitet und die *relative fluorescence unit* (RFU) unter Verwendung eines Fluoreszenz Spektrometers für 96-well Platten bei 550 nm Excitation und 580 nm Emission bestimmt. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit CCCP behandelt (50 μ M, 30 min, 37 °C).

Bei Betrachtung der erhaltenen Daten ist davon auszugehen, dass mitochondriales GRAMD4 inaktiv ist, Veränderungen an der inneren und äußeren Mitochondrienmembran herbeizuführen. Dies führt zur Freisetzung von Intermembranproteinen wie Cytochrom C und Smac, die die Caspase-Kaskade und somit letztendlich die Apoptose aktivieren (Du *et al.*, 2000; Shi, 2002; Hill *et al.*, 2003).

3.2.7. Transkriptionelle Aktivierung von GRAMD4 als Antwort auf Schädigung der DNA und antitumorale Wirksamkeit von GRAMD4 *in vitro* und *in vivo*

Um die biologische Relevanz von GRAMD4 innerhalb der Apoptose genauer bestimmen zu können, wurde die Expression von endogenem GRAMD4 nach einer Reihe von Stresssignalen, die die DNA schädigen können, untersucht. Des Weiteren sollte die antitumorale Wirksamkeit von GRAMD4 in der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 allein oder in Kombination mit klinisch relevanten Chemotherapeutikakonzentrationen an Cisplatin (cDDP) und 5-Fluoruracil (5-FU) *in vitro* und *in vivo* bestimmt werden.

Zur Ermittlung einer optimalen Zytostatikakonzentration, die zum einen die Expression von GRAMD4 beeinflusst und zum anderen die Messung von Effekten in Kombination mit Ad.GRAMD4 und Ad.73 β ermöglicht und somit eine Aussage über die Chemosensibilisierung der Zellen durch GRAMD4 bzw. p73 zulässt, wurden RT-PCR- (2.2.1.11) bzw. FACS-Analysen (2.2.4.7) durchgeführt. Hierfür wurden sowohl p53 $^{-/-}$ als auch p53 $^{+/+}$ HCT116-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an cDDP und 5-FU über einen Zeitraum von 24 h inkubiert.

Mittels *semiquantitativer* PCR konnte nachgewiesen werden, dass die *GRAMD4*-Expression nach Schädigung der DNA durch die Chemotherapeutika cDDP und 5-FU sowohl in *p53*^{-/-} HCT116-Zellen als auch in *p53*^{+/+} HCT116-Zellen verstärkt wird (Abb. 46 A, B). Cisplatin (30 μ M) führt in *p53*-negativen Zellen in Vergleich zu unbehandelten Zellen nach 12 h zu einer erhöhten Expressions von *GRAMD4*, die nach 24 h nochmals ansteigt. Die Inkubation mit 40 μ M cDDP induziert keine weitere Erhöhung des *GRAMD4*-Expressionsniveaus. In *p53*-positiven Zellen kann erst nach 24 h eine stark erhöhte *GRAMD4*-Expression nachgewiesen werden, die bei 30 μ M und 40 μ M cDDP auftritt (Abb. 46 A). Die Behandlung der *p53*^{-/-} HCT116-Zellen mit 5-FU führt bei einer Dosis von 300 μ M bereits zu einem Anstieg der Expression, die aber weder nach 24 h noch nach 400 μ M zunimmt (Abb. 46 B). Dagegen kann in den *p53*-positiven Zellen bereits nach 12 h mit 300 μ M 5-FU ein erheblicher Anstieg der *GRAMD4*-Expression festgestellt werden, die nach 24 h wieder abnimmt. Dies ist auch nach der Behandlung mit 400 μ M 5-FU zu sehen (Abb. 46 B). Als Positivkontrolle wurde *p73* verwendet, das nach DNA-Schädigung durch Zytostatika reguliert wird (Irwin *et al.*, 2003). Bei Betrachtung der Expression von *p73* und *GRAMD4* wird die Korrelation zwischen dem Transkriptionsfaktor und *GRAMD4* erneut deutlich.

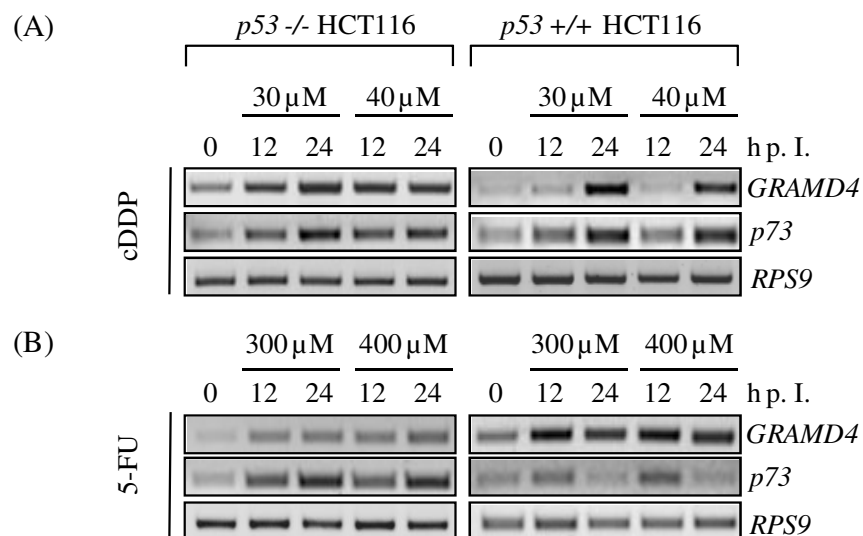


Abb. 46: Bestimmung der Chemotherapeutikakonzentration in *p53*-negativen bzw. *p53*-positiven HCT116-Zellen mittels *semiquantitativer* RT-PCR. Analyse der endogenen *GRAMD4*- und *p73*-Expression nach Schädigung der DNA mit unterschiedlichen Konzentrationen der Zytostatika Cisplatin (cDDP, 30 μ M bzw. 40 μ M), 5-Fluoruracil (5-FU, 300 μ M bzw. 400 μ M). Das Haushaltsgen *RPS9* diente als Ladekontrolle. h p. I., Stunden nach Infektion

Wie in Abb. 47 zu sehen, zeigen die *p53*^{-/-} HCT116-Zellen nach Inkubation mit beiden Zytostatika geringere Apoptosewerte als *p53*^{+/+} HCT116-Zellen. Dies ist auf den Status des Tumorsuppressors *p53* in den *p53*-positiven Zellen zurückzuführen, der durch die Zugabe von Chemotherapeutika aktiviert wird und aufgrund dessen Apoptose auslöst. Die Inkubation mit cDDP führt in *p53*^{-/-} HCT116-Zellen mit steigenden Zytostatikakonzentrationen zu einem

geringen Anstieg der Apoptose (0 μM 2,6 %; 10 μM 5,5 %; 20 μM 5,4 %; 40 μM 7,7 %; 60 μM 11,8 %). Bei den *p53*^{+/+} HCT116-Zellen ist bis 20 μM eine vergleichbare Apoptoserate zu verzeichnen (0 μM 1 %; 10 μM 6,3 %; 20 μM 7,6 %), die jedoch bei 40 μM und 60 μM cDDP auf 21 % bzw. 29 % ansteigt. Die Behandlung mit 5-FU führte in *p53*^{+/+} HCT116-Zellen mit steigenden Konzentrationen zum Anstieg der Apoptose (0 μM 1 %; 50 μM 7,8 %; 100 μM 10,8 %; 200 μM 11,9 %; 300 μM 13 %, 400 μM 22 %). In den *p53*-negativen HCT116-Zellen dagegen nimmt die Apoptose mit Erhöhung der Chemotherapeutikakonzentration nur in geringem Maße zu. Sie steigt von 3 % (0 μM) auf 8 % (400 μM).

Für die folgenden Experimente wurden 30 μM Cisplatin und 375 μM 5-Fluoruracil verwendet, da diese Konzentrationen bereits nach 12 h Inkubation zu einer verstärkten *GRAMD4*-Expression führen. Dies ermöglicht die Messung der Effekte in Kombination mit *GRAMD4*.

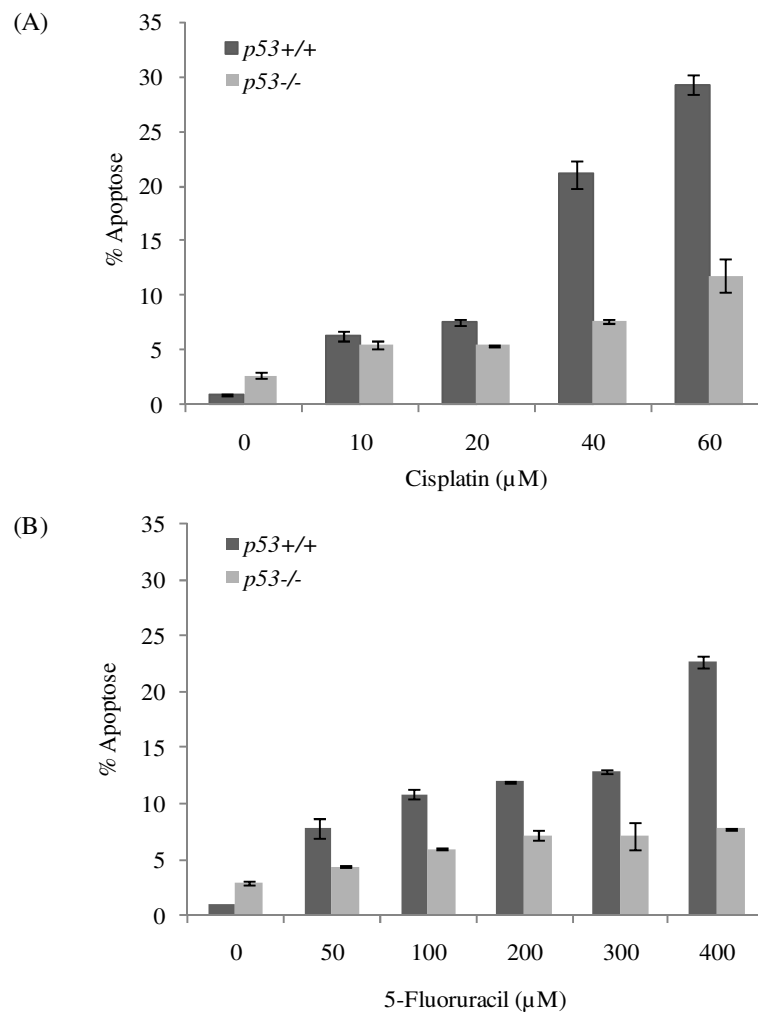


Abb. 47: Bestimmung der optimalen Chemotherapeutikakonzentration in *p53*-negativen bzw. *p53*-positiven HCT116-Zellen mittels FACS-Analysen. Analyse der Apoptose (in %) nach Schädigung der DNA mit unterschiedlichen Konzentrationen der Zytostatika Cisplatin und 5-Fluoruracil. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 24 h Inkubation mit den Zytostatika.

Wie in Abb. 48 ersichtlich, führt die Behandlung der Zellen mit den Zytostatika cDDP (30 μ M) und 5-FU (375 μ M) zum Anstieg der endogenen *GRAMD4*-Transkriptmengen. Der Anstieg der *GRAMD4*-mRNA ist dabei unabhängig vom p53-Status der verwendeten Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116. Sowohl in *p53*^{-/-} als auch *p53*^{+/+} Zellen ist die *GRAMD4*-Expression erhöht, jedoch treten Unterschiede in der Kinetik auf. Nach Behandlung mit cDDP ist in p53-negativen HCT116-Zellen bereits nach 8 h eine Erhöhung der *GRAMD4*-Transkriptmengen ersichtlich, die nach 16 h nochmals ansteigt. Auch in p53-positiven Zellen ist nach 8 h ein geringer Anstieg zu verzeichnen, der aber erst nach 24 h die Expressionsmenge von p53-negativen Zellen erreicht. Nach Zugabe von 5-FU ist *GRAMD4* in *p53*^{-/-} HCT116-Zellen nach 8 h im Vergleich zu unbehandelten Zellen hochreguliert, die Transkriptmengen sind jedoch geringer als in p53-positiven Zellen, in denen *GRAMD4* bereits nach 8 h stark exprimiert wird.

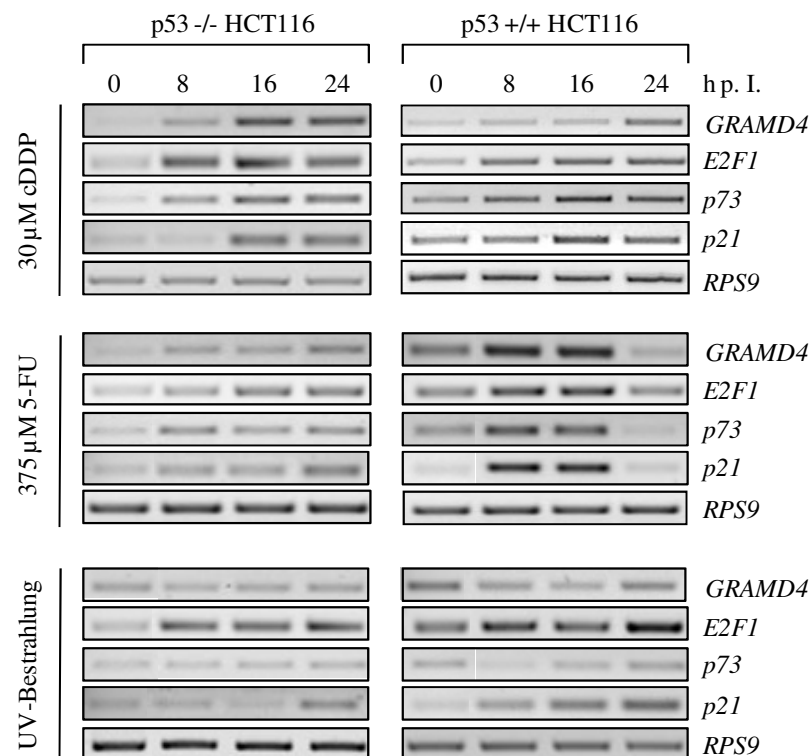


Abb. 48: Transkriptionelle Aktivierung von *GRAMD4* nach Schädigung der DNA in p53-negativen bzw. p53-positiven HCT116-Zellen. Analyse der endogenen *GRAMD4*-, *p73*-, *E2F1*- und *p21*-Expression mittels *semiquantitativer* RT-PCR nach Schädigung der DNA mit den Zytostatika Cisplatin (cDDP, 30 μ M), 5-Fluoruracil (5-FU, 375 μ M) und nach UV-Bestrahlung. Das Haushaltsgen *RPS9* diente als Ladekontrolle. h p. I., Stunden nach Infektion.

Interessanterweise korreliert die transkriptionelle Aktivierung von *GRAMD4* nach Behandlung mit den Chemotherapeutika mit den *p73*-Transkriptmengen. Vor allem in *p53*^{-/-} HCT116-Zellen ist die *p73*/*GRAMD4*-Beziehung erkennbar. Die Verwendung von cDDP führt nach 8 h zu einem Anstieg der *p73*-mRNA und somit auch von *GRAMD4*, deren

Transkriptmengen nochmals nach 16 h ansteigen. Nach 5-FU-Behandlung steigt nach 8 h im Vergleich zu unbehandelten Zellen sowohl das *p73*- als auch das *GRAMD4*-Expressionsniveau, welches im Verlauf weiterer Probennahmen konstant bleibt. Nach UV-Bestrahlung ist jedoch keine verstärkte Expression von *GRAMD4* in den beiden Zelllinien nachzuweisen. Somit kann *GRAMD4* wie *p73* durch UV-Irradiation nicht induziert werden (Stiewe & Putzer, 2001; Ozaki & Nakagawara, 2005).

Aufgrund dieser Korrelation zwischen *GRAMD4/p73* kann angenommen werden, dass die Reaktion von *GRAMD4* nach Chemotherapeutika-Behandlung zumindest teilweise auf der durch die Zytostatika ausgelösten Stimulation von *p73* beruht (Irwin *et al.*, 2003). Diese Annahme wurde durch die Inhibierung von endogenem *p73* bestätigt werden (Abb. 49). Die Behandlung mit den Zytostatika cDDP (Abb. 49 A) und 5-FU (Abb. 49 B), die dem Medium 8 h vor der Virusinfektion zugefügt wurden, führt zur verstärkten Expression von endogenem *p73*, deren Transkription nach Infektion mit Ad.shp73 wieder abnimmt. Dies hat wiederum den Abfall der endogenen *GRAMD4*-Expression zur Folge. Die Infektion mit dem Kontrollvirus Ad.shGFP hat dagegen keinen Einfluss auf die Expression von *p73* und *GRAMD4*. Die durch die Chemotherapeutika ausgelöste Stimulation von *p73* und *GRAMD4* kann durch GFP nicht reguliert werden (Abb. 49).

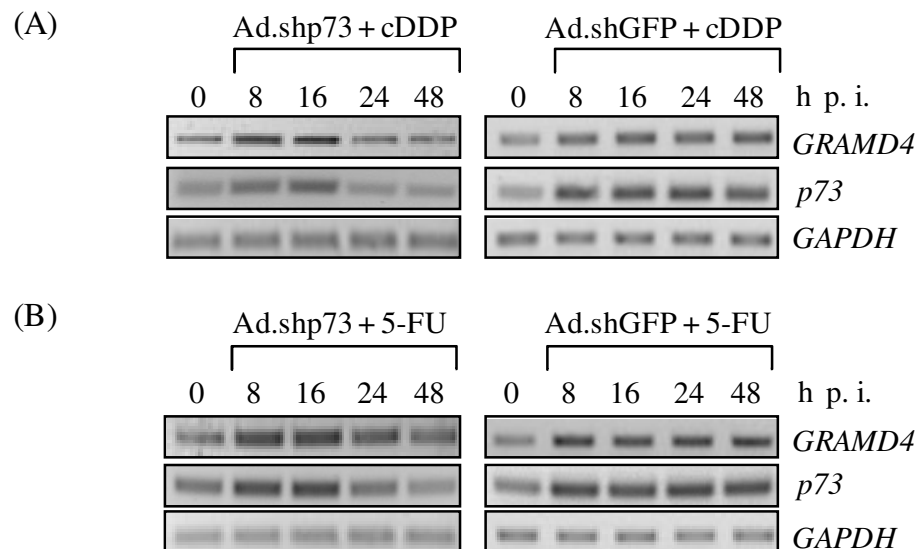
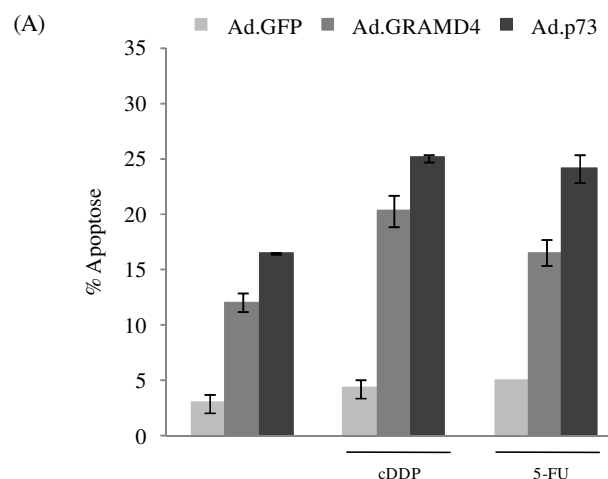


Abb. 49: Transkriptionelle Inhibierung von *GRAMD4* nach Transduktion mit Ad.shp73 und Zytostatika-Behandlung in *p53*^{-/-} HCT116-Zellen. Analyse der endogenen *GRAMD4*- und *p73*-Expression nach Inkubation mit den Chemotherapeutika (A) Cisplatin (cDDP, 30 μ M) und (B) 5-Fluoruracil (5-FU, 375 μ M) und gleichzeitiger Infektion mit einem shp73- bzw. shGFP-exprimierenden Ad-Vektor. Das Haushaltsgen *GAPDH* diente als Ladekontrolle. h p. I., Stunden nach Infektion

p73 kann, wie bereits in vorangegangenen Arbeiten nachgewiesen, in einer Vielzahl von Tumorzelllinien durch eine Reihe unterschiedlichster Chemotherapeutika induziert werden (Irwin *et al.*, 2003). Des Weiteren führt *p73* in Kombination mit Zytostatika zur

Chemosensitivierung von zahlreichen Tumorzelllinien, welches *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden konnte (Das *et al.*, 2005; Tuve *et al.*, 2006).

In Anbetracht dessen, dass die transkriptionelle Expression von endogenem *GRAMD4* nach Stresssignalen wie cDDP und 5-FU analog zu *p73* ansteigt, wurde untersucht, ob eine erhöhte Konzentration an exogenem *GRAMD4* die Sensitivität der Kolonkarzinom-Zelllinien *p53*^{-/-} HCT116 und *p53*^{+/+} HCT116 für Chemotherapeutika steigert. Hierfür wurden die Zellen mit Ad.GFP, Ad.*GRAMD4* und Ad.*p73* infiziert, alleine oder in Kombination mit den Chemotherapeutika Cisplatin (cDDP, 30 μ M) und 5-Fluoruracil (5-FU, 375 μ M) inkubiert und FACS-Analysen unterzogen (2.2.4.7). Es wurde mit sublethalen Zytostatikadosen gearbeitet um den zusätzlichen Effekt von *GRAMD4* auf den Zelltod darstellen zu können. Wie in Abb. 50 zu sehen, führt die alleinige Überexpression sowohl von *p73* als auch *GRAMD4* unabhängig vom *p53*-Status zur Apoptose der Zellen. Im Vergleich zu Ad.GFP infizierten Zellen mit durchschnittlich 3 % apoptotischen Zellen (Abb. 50 A, B) kann *GRAMD4* 48 h nach Virusinfektion den Zelltod in *p53*^{-/-} und *p53*^{+/+} um etwa 10 % auf 12,1 % bzw. 13,6 % steigern. *p73* induziert in *p53*^{-/-} HCT116- 16 % und in *p53*^{+/+} HCT116-Zellen 19 % Apoptose. In Kombination mit cDDP ist nach *GRAMD4*-Überexpression ein additiver Effekt hinsichtlich der apoptotischen Zellen in den untersuchten Zelllinien erkennbar (etwa 20 % Apoptose). Die kombinierte Inkubation von Ad.*GRAMD4* und 5-FU führt in *p53*^{+/+} HCT116-Zellen zu einer erhöhten Apoptoserate mit additiven Effekt (Abb. 50 B). Die Auswirkung von *p73* in Verbindung mit beiden verwendeten Zytostatika ist ebenfalls additiv, jedoch ist eine höhere Apoptoserate mit *p73* im Vergleich zu *GRAMD4* nachweisbar (Abb. 50 A, B). Im Gegensatz dazu hat die Infektion mit Ad.GFP keinen ersichtlichen Effekt auf die Sensitivität der Kolonkarzinom-Zelllinien für Chemotherapeutika.



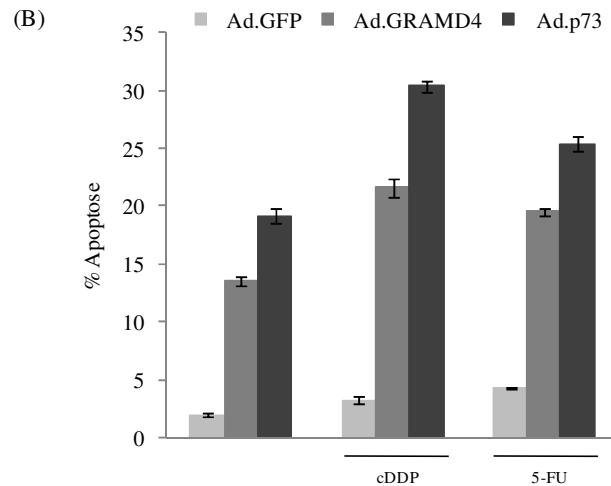


Abb. 50: Apoptotischer Effekt von GRAMD4 allein oder in Kombination mit Cisplatin bzw. 5-Fluoruracil in humanen Kolonkarzinom-Zellen. Transduktion von (A) *p53*^{-/-} HCT116- und (B) *p53*^{+/+} HCT116-Zellen mit Ad.GFP, Ad.GRAMD4 und Ad.p73 β alleine oder in Kombination mit Cisplatin (cDDP, 30 μ M) und 5-Fluoruracil (5-FU, 375 μ M). 48h nach Virusinfektion und 24 h nach Behandlung mit den Zytostatika wurden die Zellen geerntet und FACS-Analysen unterzogen. Die Standardabweichungen beruhen auf zwei unabhängigen Experimenten.

Andererseits kann die durch cDDP bzw. 5-FU ausgelöste Apoptose durch Inhibierung von GRAMD4 und p73 durch genspezifische shRNAs partiell aufgehoben werden (Abb. 51). Bei Infektion mit Ad.shGFP in Kombination mit den Chemotherapeutika 5-FU und cDDP sind Apoptoseraten von 35 % für 5-FU bzw. 20 % für cDDP zu verzeichnen. Nach Transduktion mit Ad.shGRAMD4 und Ad.shp73 β kann die durch die Zytostatika ausgelöste Apoptose teilweise inhibiert werden. Ad.shGRAMD4 verringert die Apoptoserate nach 5-FU Stimulation um ca. 7 % von 35 % auf 28 %, während nach Inkubation der Zellen mit cDDP eine 5%-ige Abnahme der Apoptose gemessen wurde (von 20 % auf 15 %). Nach Überexpression von Ad.shp73 β (Kontrolle) sind im Vergleich zu Ad.shGRAMD4 ähnliche Apoptosewerte nachgewiesen worden.

Bei zusammenfassender Betrachtung der Daten wird nochmals die Annahme unterstützt, dass der p73-vermittelte Zelltod zum Teil auf der Stimulation von GRAMD4 beruht. Des Weiteren ist GRAMD4 in der Lage Tumorzellen für Chemotherapeutika zu sensibilisieren.

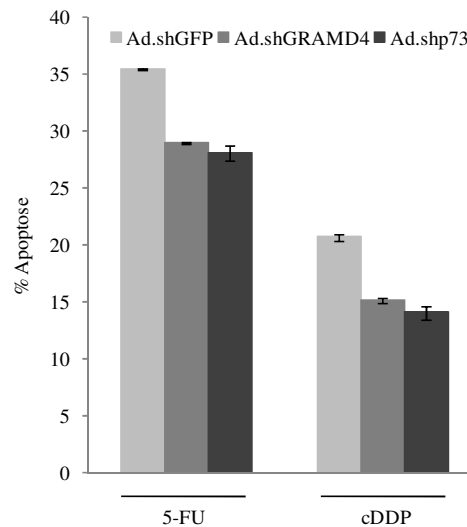


Abb. 51: Inhibierung der durch Chemotherapeutika vermittelten Apoptose in p53-negativen Kolonkarzinom-Zellen. Transduktion von *p53*^{-/-} HCT116-Zellen mit Ad.shGFP, Ad.shGRAMD4 und Ad.shp73 und simultane Behandlung mit Cisplatin (cDDP, 30 μ M) und 5-Fluoruracil (5-FU, 375 μ M). 72 h nach Virusinfektion und 48 h nach Behandlung mit den Zytostatika wurden die Zellen geerntet, FACS-Analysen unterzogen und die durchschnittliche Apoptoserate (in %) bestimmt. Die Standardabweichungen beruhen auf zwei unabhängigen Experimenten.

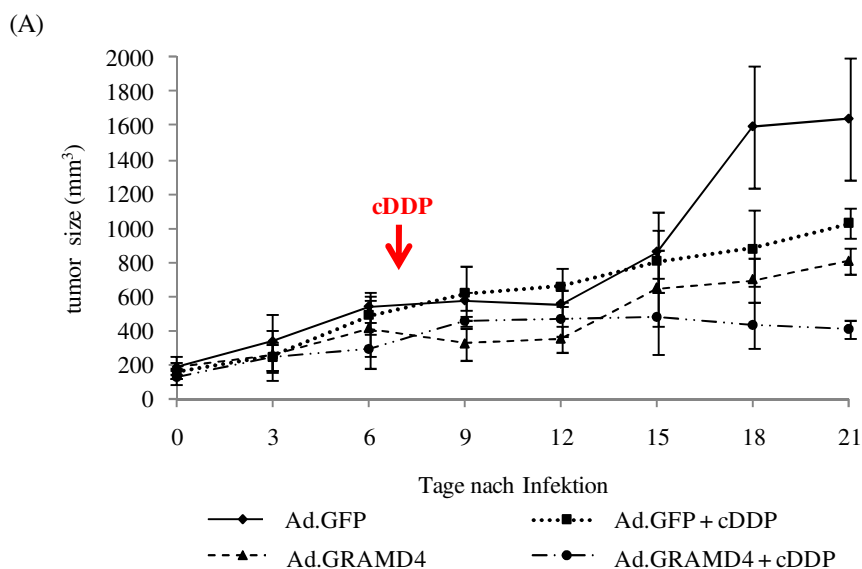
Aufbauend auf den *in vitro* Ergebnissen sollte anschließend die therapeutische Wirksamkeit der GRAMD4/cDDP-Kombinationstherapie und die Auswirkung einer GRAMD4 und p73-Hemmung durch shRNA-exprimierende Ad-Vektoren bei gleichzeitiger Zytostatika-Behandlung in Mäusen analysiert werden (Abb. 52).

Hierzu wurden subkutane *p53*^{-/-} HCT116-Tumore (2.2.5) mit dem GRAMD4-exprimierenden Ad-Vektor allein oder in Kombination mit cDDP (intratumoral, 6 mg/kg) infiziert (Tuve *et al.*, 2006). Als Vergleich dienten Tumoren, die entweder mit dem Kontrollvirus Ad.GFP oder mit Ad.GFP/cDDP behandelt wurden. Das Wachstum der Tumore wurde anschließend über einen Zeitraum von 21 Tagen gemessen.

In Abb. 52 A wird ersichtlich, dass die Überexpression von GRAMD4 im Vergleich zu GFP zu einer Inhibierung des Tumorwachstums führt. Während das Volumen der mit dem Kontrollvirus Ad.GFP infizierten Tumoren innerhalb von 21 Tagen um das 9-fache zunimmt (Tag 0: 184,8 mm³; Tag 21: 1641,5 mm³), wachsen die mit Ad.GRAMD4 behandelten Tumore langsamer. Das durchschnittliche Tumolvolumen nimmt im Verlauf des Versuchszeitraums von 188,5 mm³ am Tag 0 auf 804,5 mm³ am Tag 21 zu. Das entspricht einer 4,3-fachen Volumenvergrößerung. Die Ad.GRAMD4/cDDP-Kombinationstherapie führt nochmals zu einer weiteren Hemmung des Tumorwachstums. Nach 21 Tagen haben sich die Tumoren durchschnittlich nur um das 3-fache vergrößert (Tag 0: 133 mm³; Tag 21: 412,2 mm³). Dagegen ist die Ad.GFP/cDDP-Kombinationstherapie im Vergleich zu GRAMD4 bzw. GRAMD4/cDDP nicht in der Lage das Tumorwachstum effektiver zu inhibieren. Das durchschnittliche Tumolvolumen nimmt im Verlauf des Versuchszeitraums um das 6,4-fache

zu (Tag 0: 158,8 mm³, Tag 21: 1028,4 mm³). Diese Vergrößerung des Tumorumfanges fällt somit geringer aus als im Vergleich zu den mit Ad.GFP infizierten Tumoren (9-fach), ist jedoch im Vergleich mit den Ad.GRAMD4 (4,3-fach) bzw. Ad.GRAMD4/cDDP (3-fach)-behandelten Tumoren um mindestens 1,5-fach höher.

Dagegen kann die Inhibition des Tumorzustandes durch Überexpression mit shRNA-Viren gegen GRAMD4 und p73 (Kontrolle) wieder aufgehoben werden (Abb. 52 B). Hierfür wurden *p53*^{-/-} HCT116-Zellen *ex vivo* mit Ad.shGFP, Ad.shGRAMD4 und Ad.shp73 β transduziert und anschließend in Nacktmäuse injiziert. Nach Entwicklung von sichtbaren Tumoren wurde das Chemotherapeutikum Cisplatin (cDDP, 6 mg/kg) intraperitoneal verabreicht und die Tumorentwicklung über den Zeitraum von insgesamt acht Wochen beobachtet. (Abb. 52 B). Während das verabreichte Chemotherapeutikum cDDP in Kombination mit dem Kontrollvirus Ad.shGFP zu einem verminderten Tumorzustand führt (Woche 2: 120,2 mm³; Woche 8 505,7 mm³), das auf der Wirksamkeit des Zytostatikums beruht, können sowohl Ad.shGRAMD4 als auch Ad.shp73 β , die durch cDDP ausgelöste Apoptose teilweise aufheben. Aufgründessen wachsen die mit cDDP/Ad.shGRAMD4 behandelten Tumoren von 79,9 mm³ in Woche zwei auf 1149,8 mm³ in Woche acht. Die mit cDDP/ Ad.shp73 β behandelten Tumoren vergrößern sich von 207 mm³ in Woche zwei auf 1011,8 mm³ in Woche acht.



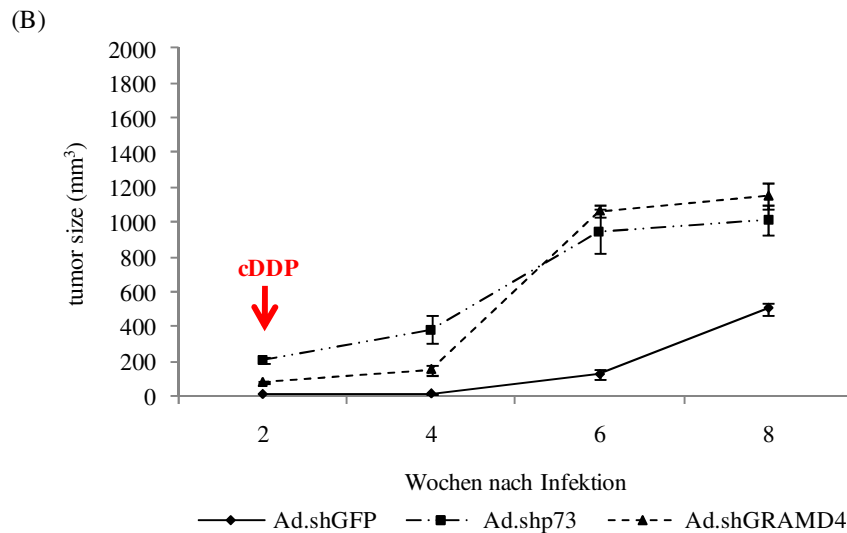


Abb. 52: Antitumorale Wirksamkeit von GRAMD4 *in vivo*. (A) Inhibition des Tumorwachstums nach dreimaliger intratumoralen Injektion von Ad.GRAMD4 allein oder in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin (cDDP, 6 mg/kg, 5x). Als Vergleich dienten Tumore, die entweder mit dem Kontrollvirus Ad.GFP oder mit Ad.GFP/cDDP behandelt wurden. Das Wachstum der Tumore wurde anschließend über einen Zeitraum von 21 Tagen beobachtet. t-Test: 21 Tage nach Infektion, Ad.GRAMD4+cDDP versus Ad.GRAMD4, Ad.GFP, and Ad.GFP+cDDP ($P < 0.05$); Ad.GRAMD4 versus Ad.GFP and Ad.GFP+cDDP ($P < 0.05$). Jede Gruppe $n = 4$. (B) Auswirkungen auf die Tumorentstehung nach Inhibierung der durch cDDP-ausgelösten Apoptose. Die Transduktion von *p53*^{-/-} HCT116-Zellen mit Ad.shGRAMD4 und Ad.shp73 und deren Infektion in *nu/nu* Nacktmäuse führen zur Hemmung des cDDP-ausgelösten Zelltods (3x, intraperitoneal, 6 mg/kg). Dies geht mit einem erhöhten Tumorwachstum im Vergleich zu den mit Ad.shGFP behandelten Malignomen einher. Die Tumorentwicklung wurde über einen Zeitraum von 8 Wochen beobachtet. t-Test: 8 Wochen nach Infektion, shGRAMD4 versus shGFP, $P \leq 0.037$; shp73 versus shGFP, $P \leq 0.015$. Jede Gruppe $n = 3$.

Anhand dieser Daten kann man zusammenfassend sagen, dass die Behandlung der Tumore sowohl mit GRAMD4 als auch mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin zu einer Hemmung des Tumorwachstums führt, die Kombination beider den antitumoralen Effekt aber noch signifikant steigern kann. Demnach stellt die Expression von GRAMD4 mittels adenoviraler Vektoren eine Möglichkeit dar, Tumore in Kombination mit Chemotherapeutika effizienter zu behandeln.

4. Diskussion

Das Überleben einer Zelle ist das Ergebnis einer fein abgestimmten Homöostase zwischen Zellproliferation und Zelltod. Störungen im Ablauf der Apoptose durch Inaktivierung oder Mutation der an der Regulation beteiligten Gene und die gleichzeitige Förderung der Proliferation können mit einer Vielzahl schwerer Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Krankheitsbilder, die mit dem Anstieg der Apoptoserate im Zusammenhang stehen, sind z. B. Autoimmunerkrankungen, wie Rheumatoide Arthritis und Multiple Sklerose, aber auch Krebs (Lowe & Lin, 2000; Zipp, 2000; Liu & Pope, 2003).

Der am häufigsten auftretende Verlust eines pro-apoptischen Regulators durch Mutationen oder epigenetische Mechanismen betrifft das Tumorsuppressorgen *TP53*. Die hieraus resultierende funktionelle Inaktivierung des p53-Proteins (Joerger & Fersht, 2007; Vousden & Lane, 2007) führt zur Inhibierung der p53-induzierten Apoptose, zur Beschleunigung der Tumorentstehung (Donehower *et al.*, 1992; Donehower *et al.*, 1995; Attardi & Jacks, 1999) und zu einer erhöhten Resistenz der Tumoren für die verwendeten Zytostatika, sodass eine wirksame Behandlung von Krebs nicht mehr erzielt werden kann. Diese Resistenzbildung der Tumore stellt ein wesentliches Problem in der Krebstherapie dar. Aufgrund dessen steht die Identifizierung von weiteren Signalwegen und deren Faktoren, mittels derer eine kranke oder durch Zytostatika geschädigte Zelle unabhängig von p53-Status in die Apoptose eintreten kann, im Vordergrund der Forschung.

Eine denkbare Rolle zur Entwicklung neuer therapeutischer anti-tumoraler Strategien könnte hierbei der Transkriptionsfaktor E2F1 und vor allem seine pro-apoptischen Zielgene übernehmen, die im Verlaufe der letzten Jahre identifiziert wurden (Polager *et al.*, 2002; Stanelle *et al.*, 2002; Engelmann *et al.*, 2009). In der Zelle ist der Transkriptionsfaktor E2F1 in der Lage, Apoptose auszulösen (Stanelle & Pützer, 2006), die über p53-abhängige Signalkaskaden (Qin *et al.*, 1994; Wu & Levine, 1994), aber auch über p53-unabhängige Netzwerke (Holmberg *et al.*, 1998) vermittelt wird. Im p53-abhängigen Apoptoseweg akkumuliert p53 nach E2F1-Expression durch die Aktivierung von CDKN2A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*). Dieser interagiert mit MDM2 (*mouse double minutes 2*) und verhindert somit die Degradation des Transkriptionsfaktors p53, der daraufhin zahlreiche pro-apoptische Gene transaktiviert (Bates *et al.*, 1998). Innerhalb des p53-unabhängigen Apoptoseweges löst E2F1 den Zelltod vor allem über die direkte Transaktivierung von pro-apoptischen Genen aus. Hier ist der p53-homologe Faktor p73 von entscheidender Bedeutung. Aufgrund struktureller und funktioneller Ähnlichkeiten zu p53 ist er in der Lage an p53-abhängige Promotoren zu binden, p53-responsive Gene zu transaktivieren und Zellzyklusarrest sowie Apoptose in Säugerzellen zu induzieren (Kaghad *et al.*, 1997). Er kann direkt von E2F1 durch dessen Bindung an funktionelle E2F-Bindestellen im p73-Promotor transaktiviert werden (Irwin *et al.*, 2000; Stiewe & Pützer, 2000; Seelan *et al.*, 2002).

4.1. Aktivierung des *GRAMD4*-Promotors in der E2F1-induzierten Apoptose

Wir konnten kürzlich im Rahmen von DNA-Microarray-Analysen *GRAMD4* als einen neuen E2F1-regulierten Faktor mit pro-apoptotischer Funktion identifizieren, über den E2F1 unabhängig vom p53-Status Apoptose induziert (Stanelle *et al.*, 2002; 2005). Bisher waren die molekularen Mechanismen, die zur Aktivierung von *GRAMD4* beitragen, unklar. Diese konnten in der vorliegenden Arbeit aufgeklärt werden.

Der hier untersuchte *GRAMD4*-Promotor enthält keine TATA-Box. Des Weiteren konnte kein Inr-Element nachgewiesen werden, welches die Funktion der TATA-Box übernehmen kann und zu einer effizienten wie auch exakten Transkriptioninitiation führt (Goodrich *et al.*, 1996). Promotoren, die weder eine TATA-Box noch ein Inr-Element tragen, weisen oftmals einen sehr hohen GC-Gehalt und eine Vielzahl von Bindestellen für den ubiquitären Transkriptionsfaktor Sp1 auf (Smale, 1994). An diesen Promotoren vermitteln die Proteine der Sp1-Familie (Sp1, Sp2, Sp3 und Sp4), die an die GC-reichen Sequenzen (GC-Boxen) binden, die Bildung des Präinitiationskomplexes an einer Region 40 bis 100 bp stromabwärts der Bindestelle (Smale *et al.*, 1990; Körner *et al.*, 1997). Innerhalb der *GRAMD4*-Vollängenpromotorsequenz (2072 bp), die einen GC-Gehalt von ca. 61 % (C: 28,1 %, G: 33,1 %) aufweist, konnten mittels *in silico*-Analysen unter Verwendung der JASPAR database (<http://jaspar.genereg.net/>) zahlreiche putative Sp1-Bindestellen (Tab. 3) ermittelt werden (Sandelin *et al.*, 2004; Bryne *et al.*, 2008), die für die Transkriptioninitiation von *GRAMD4* möglicherweise eine Rolle spielen. Des Weiteren wurden mehrere E2F1- und p53/p73-Bindungsstellen (3.1.1) gefunden, deren Funktionalität bezüglich der Aktivierung von *GRAMD4* genauer untersucht wurde. Sowohl die Sequenzen der potenziellen E2F1- als auch der möglichen p53/p73-Bindemotive weichen in mehreren Basen von den akzeptierten Konsensus-Sequenzen der JASPAR-Datenbank [(C/T/C/G)(C/G/A/T)PuPuPuCATGPyPyPy (G/T/A)(G/T/A)Pu(C/G/A)(A/T)(T/A)(G/T/C/A)(T/C/G/A)] für p53/p73 (Tab. 1) und [TTT(G/C)(G/C)CG(C/G)] für E2F1 (Tab. 2) ab. Da jedoch auch in anderen Studien Variationen von den E2F1- und p53/p73-Bindestellen gezeigt werden konnten, wurden diese DNA-Sequenzmotive innerhalb des *GRAMD4*-Promotors als mögliche E2F1 und p53/p73-interagierende Regionen in Betracht gezogen (Müller *et al.*, 1998; Furukawa *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2003; Osada *et al.*, 2006).

Erste Experimente mit dem *de novo* Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid (CHX) nach Aktivierung von ER.E2F1 in H1299-ER.E2F1 und Saos-2-ER.E2F1-Zellen zeigten, dass p73 nicht aber E2F1 direkt an der *GRAMD4*-Promotoraktivierung beteiligt ist (3.1.2). Anschließende ChIP-Assays bestätigten, dass die *GRAMD4*-Expression über die direkte Transaktivierung durch p73 reguliert wird (3.1.3). Von Bedeutung sind vor allem die potenziellen p53/p73-Bindestellen IV bis XII (-431 bis -1521 bp stromaufwärts vom Transkriptionsstart +1), die in den Fragmenten B bis F liegen, während die Fragmente A und

G mit den Bindestellen I (-97 bis -78 bp), II (-206 bis -187 bp), III (-211 bis -192 bp) und XIII (-1751 bis -1732 bp) für die Transaktivierung von *GRAMD4* durch p73 keine Rolle spielen (3.1.3). Dieser Effekt wurde sowohl in H1299 als auch Saos-2-Zellen mittels *semiquantitativer*- und *qRT-PCR* verifiziert. Basierend auf diesen Voruntersuchungen wurde die Aktivierbarkeit des *GRAMD4*-Volllängenpromotors und verschiedener 5'-Deletionsmutanten durch p73, p53 und E2F1 in Reporteranalysen überprüft. Diese ergaben, dass *GRAMD4* durch den Tumorsuppressor p73 (Isoformen p73 α und p73 β) aktiviert wird, während sowohl p53 als auch der Transkriptionsfaktor E2F1 keinen Einfluss auf die Expression von *GRAMD4* haben. Dieser Effekt wurde in den p53-negativen Zelllinien H1299, Saos-2 und p53 $^{-}$ -HCT116 gezeigt. *GRAMD4* stellt somit wie WNT-4 (*wingless-type MMTV integration site family, member 4*) und IL-4R α (*Interleukin-4-Receptor α*) ein p73-spezifisches Zielgen dar (Sasaki *et al.*, 2003; Osada *et al.*, 2006).

Nicht geklärt ist, welche strukturellen Merkmale oder Sequenzkonformationen der regulatorischen Elemente innerhalb des *GRAMD4*-Promotors zu dieser Bindungsspezifität von p73 führen. Für die 5'-Promotorregion des *WNT-4* Gens wurden zwei p63/p73-regulatorische Elemente, RE1 und RE2, beschrieben. RE1 ähnelt der p53-Konsensussequenz RRRCWWGYYY (El-Deiry *et al.*, 1992), die in aufeinanderfolgenden Wiederholungen angeordnet ist, während das GC-reiche RE2-Element spezifisch für die Bindung von p63 bzw. p73 ist. Beide regulatorischen Elemente sind für die transkriptionelle Aktivierung von *WNT-4* notwendig und weisen auf einen Aktivierungsmechanismus von Zielgenen durch p63 und p73 hin, der sich von p53 unterscheidet (Osada *et al.*, 2006). Auch die *GRAMD4*-Promotorregion enthält Elemente, die der p53-Konsensussequenz zu 70-90 % ähneln (3.1.1). Des Weiteren wurde eine Vielzahl GC-reicher Sequenzen identifiziert, die, ähnlich wie im *WNT-4*-Promotor, für die Aktivierung von *GRAMD4* durch p73 notwendig sein könnten. Die Aktivierung des *GRAMD4*-Promotors durch die beiden Isoformen p73 α und p73 β unterliegt hierbei einer dosisabhängigen Stimulation (Abb. 24). So führen steigende Konzentrationen an p73 (0,25 μ g, 0,5 μ g, 0,75 μ g) aufgrund der vollständigen Besetzung aller putativen p73-Bindestellen innerhalb des *GRAMD4*-Promotors zu einer erhöhten Promotoraktivität. Die stärkste *GRAMD4*-Promotoraktivität ist somit das Resultat einer erhöhten Anzahl an Bindestellen, die durch p73 besetzt werden.

E2F1 ist dagegen nicht in der Lage den *GRAMD4*-Promoter im Luciferase-Assays zu aktivieren, obwohl durch *in silico*-Analysen mehrere E2F-Bindungsstellen identifiziert wurden (3.1.1). Die Tatsache, dass sich der *GRAMD4*-Promotor in den Reporter-Analysen durch p73, aber nicht durch ektopye E2F1-Expression aktivieren ließ, war überraschend. Im Gegensatz dazu konnte in der stabilen H1299.ER-E2F1-Zelllinie mittels RT-PCR reproduzierbar gezeigt werden, dass die Induktion von E2F1 durch 4-OHT zu einer verstärkten Expression von p73 und somit auch von *GRAMD4* führt (3.1.6). Dies beruht darauf, dass E2F1 den Transkriptionsfaktor p73 über Bindung an funktionelle E2F-Bindestellen in dessen Promotor aktivieren kann (Stiewe & Pützer, 2000; Seelan *et al.*, 2002).

Die beobachtete Diskrepanz zwischen dem Luciferase-Assay und den RT-PCR-Experimenten ist wahrscheinlich auf die p73-Proteinkonzentration in den parentalen Zelllinien versus den stabilen H1299.ER-E2F1-Zellen zurückzuführen. Die für die PCR-Analysen verwendete Zelllinie exprimiert konstitutiv ER-E2F1. Die Aktivierung von E2F1 resultiert in erhöhten p73-Konzentrationen, die den *GRAMD4*-Promotor aktivieren und somit zur Steigerung der *GRAMD4*-Expression führen. Die Transaktivierung des *GRAMD4*-Promotors ist hierbei abhängig von der p73-Proteinkonzentration (3.1.4.2, Abb. 24). In den für die Luciferase-Assays verwendeten parentalen Zelllinien ist der endogene p73-Status nach E2F1-Transfektion möglicherweise zu gering, um den *GRAMD4*-Promotor zu aktivieren. Die fehlende p73-Aktivierung könnte auch auf einer Hemmung durch überexprimiertes E2F1 beruhen. Dies kann z. B. durch die hohen Expressionslevel von p14ARF in den verwendeten H1299-Zellen bedingt sein (Lu *et al.*, 2002), welche die E2F1-Transaktivierung blockieren (Eymin *et al.*, 2001). Hierdurch wäre endogenes p73 durch E2F1 nicht ausreichend aktivierbar, sodass die Transaktivierung des *GRAMD4*-Promotors nicht stattfindet. Des Weiteren könnte die Zeitkomponente für die Aktivierung von *GRAMD4* bei Überexpression von E2F1 im Vergleich zum ektope p73 entscheidend sein. Die Bestimmung der Luciferaseaktivität nach Kotransfektion des Vollängenpromotors mit den Expressionsplasmiden p73 α , p73 β und E2F1 erfolgte zum selben Zeitpunkt (24 h). Während die p73-Isoformen direkt an den Promotor binden und dadurch die Promotoraktivität erhöhen, kann E2F1 *GRAMD4* nur indirekt über p73 aktivieren (Abb. 23). Der Transkriptionsfaktor p73 muss hierbei erst durch E2F1 exprimiert werden, um dann seinerseits den *GRAMD4*-Promotor anschalten zu können.

4.2. Die Rolle des p73-induzierten GRAMD4 in der mitochondrialen Apoptose

Der nukleäre Tumorsuppressor p73 aktiviert *GRAMD4* sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene (3.1.5). Hierbei wird die Expression von *GRAMD4* durch die beiden p73-Isoformen α und β induziert, die fast im gleichen Maße Apoptose auslösen können (Jost *et al.*, 1997). Das Tumorsuppressorprotein p53 kann dagegen die *GRAMD4*-Expression nicht beeinflussen. Dies ist in Tumorzellen mit mutiertem oder funktionell inaktiviertem p53 von entscheidender Bedeutung.

Neben der *GRAMD4*-Induktion durch p73, wird durch den Transkriptionsfaktor auch die subzelluläre Lokalisation von *GRAMD4* beeinflusst. Das im Nukleus von p53-negativen Zellen basal exprimierte endogene *GRAMD4* wird nach ektope Expression von p73 hochreguliert und transloziert nach 48 h aus dem Nukleus über das Zytosol in die Mitochondrien, in denen es nach 72 h vollständig akkumuliert vorliegt (3.2.1). Eine vergleichbare Translokation aus dem Nukleus in das Zytosol nach Apoptose-auslösenden Signalen wurde für das nukleär lokalisierte cIAP1-Protein beschrieben (Samuel *et al.*, 2005).

cIAP1 gehört zu der IAP-Proteinfamilie (*Inhibitor of apoptosis protein*) und ist durch direkte Inhibition von Caspasen an der Regulation des Zelltods beteiligt (Deveraux & Reed, 1999; Liston *et al.*, 2003). Auch das Bcl-2-Familienmitglied Mcl-1 ist im Nukleus lokalisiert und weist inhibitorische Funktion durch die Interaktion mit Zellzyklus-regulierenden Proteinen auf (Jamil *et al.*, 2005).

Die Freisetzung von GRAMD4 nach einem Apoptose-auslösenden Stimulus (p73-Erhöpfung) aus dem Zellkern begünstigt die Translokation und Oligomerisierung von endogenem Bax (3.2.5). Infolge dessen kommt es zur Permeabilisierung der mitochondrialen Membran, was zur Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren wie Cytochrom C und Smac in das Zytosol führt. Die Sekretion dieser Faktoren stellt ein häufig beschriebenes Ereignis bei der Apoptose-Induktion dar (Hengartner, 2000). GRAMD4 fungiert hierbei als ein wichtiges Verbindungsglied zwischen p73 und dem mitochondrialen Signalweg. Der p73-vermittelte Zelltod beruht hierbei auf einen Transkriptions-abhängigen Mechanismus. p73 transaktiviert *GRAMD4*, das nach der Translokation aus dem Zellkern in das Zytosol zur Aktivierung von Bax führt. Der Transkriptionsfaktor p73 wurde ausschließlich im Zellkern und im Zytosol, nicht aber in den Mitochondrien nachgewiesen (Abb. 36). Bax transloziert dagegen aus dem zytosolischen Kompartiment in die Mitochondrien (Abb. 40, Abb. 41). Die Verbindung zwischen diesen beiden Proteinen, die in unterschiedlichen subzellulären Bereichen der Zelle lokalisiert sind, ist somit das durch p73 transaktivierte und regulierte GRAMD4.

Ein ähnlicher Mechanismus, der eine Übereinstimmung mit der GRAMD4-Regulation zeigt, wurde von Melino und Mitarbeitern beschrieben. Während des p73-vermittelten Zelltods aktiviert p73 direkt das „*BH3-only*“-Protein Puma (*p53 up-regulated modulator of apoptosis*), welches seinerseits auf die Konformation und mitochondriale Translokation von Bax Einfluss nimmt (Melino *et al.*, 2004). Auch hier verbleibt p73 im Verlauf der Apoptose im Zellkern, Bax wird jedoch aus dem Zytosol in die Mitochondrien transloziert. Der Zelltod beruht somit auch hier nicht auf einer direkten p73/Bax-Interaktion. Vielmehr führen Transkriptions-abhängige Effekte zur Aktivierung des mitochondrialen Apoptoseweges.

Über einen langen Zeitraum war es unklar, ob p73 auch Transkriptions-unabhängige pro-apoptotische Aktivität aufweist. In einer vor Kurzem veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass nach der TRAIL-induzierten Apoptose sowohl die Caspase 3 als auch Caspase 8 p73 spalten können. Sowohl die Fragmente als auch Vollängen-p73 lokalisieren daraufhin in die Mitochondrien und führen dort zur Ausschüttung von Cytochrom C (Sayan *et al.*, 2008).

Ob GRAMD4 aufgrund seiner nukleären Lokalisation auch Transkriptions-abhängige Funktionen ausübt, ist bisher nicht bekannt. Da GRAMD4 jedoch keine typische Struktur eines Transkriptionsfaktors mit einer Transaktivierungs- und DNA-Bindedomäne aufweist, ist es höchst unwahrscheinlich, dass GRAMD4 Zielgene direkt aktivieren kann.

Die Expression, Stabilisierung und Aktivierung des Tumorsuppressors p73 kann sowohl durch Chemo- als auch Strahlentherapie induziert werden. Dazu gehören zum einen die γ -Bestrahlung und zum anderen die Behandlung mit Cisplatin, Etoposid, Gemcitabin und

5-Fluoruracil (Agami *et al.*, 1999; Gong *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2005; Thottassery *et al.*, 2006). Die Exposition mit UV-Licht hat dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von p73 (Kaghad *et al.*, 1997; Ozaki & Nakagawara, 2005). Durch die Inhibierung von p73 durch siRNA oder einer dominant-negativen Mutante (ΔN) kann jedoch die Zytotoxizität der Chemotherapeutika in Tumorzellen und transformierten Zellen herabgesetzt werden (Irwin *et al.*, 2003; Concin *et al.*, 2005; Vayssade *et al.*, 2005; Meier *et al.*, 2006; Thottassery *et al.*, 2006).

Die Expression von GRAMD4 kann, wie bei p73, ebenfalls durch Chemotherapeutika aber nicht durch UV-Behandlung induziert werden (Abb. 48). Die in dieser Arbeit verwendeten Zytostatika Cisplatin (*cis-diamminedichloridoplatinum(II)*) und 5-Fluoruracil (*5-Fluor-1H-pyrimidin-2,4-dion*) sind in der Krebstherapie häufig genutzte Zytostatika. Diese werden sowohl als Einzelwirkstoff als auch in Kombination mit anderen Medikamenten bei der Behandlung von Hoden-, Bronchial- und Dickdarmkrebs bzw. Kopf- und Halstumoren eingesetzt (Giaccone, 2000; Gill *et al.*, 2003). Das Chemotherapeutikum cDDP gehört zu der Gruppe der alkylierenden Zytostatika, deren anti-tumorale Wirkung zumindest teilweise auf der Hemmung der DNA-Replikation durch Querverknüpfungen zwischen den beiden DNA-Strängen bzw. auf dem Arrest der Tumorzellen in der G₂-Phase beruht. Der Zellzyklusarrest könnte hierbei durch die Störung der Transkription von Genen hervorgerufen werden, die beim Übergang zur Mitose eine Rolle spielen (Sorenson & Eastman, 1988). 5-FU ist ein Antimetabolit, das hauptsächlich an zwei Stellen in den Stoffwechsel der Zelle eingreift. Aufgrund der Strukturähnlichkeit zu den Pyrimidinbasen Cytosin bzw. Thymin wird es in die RNA eingebaut und führt darauf hin zu einer Störung der Proteinbiosynthese. Des Weiteren kann 5-FU die Thymidilatsynthese hemmen, die für die *de-novo*-Synthese von Deoxythymidinmonophosphat (dTMP) verantwortlich ist. Der daraus resultierende Mangel an dTMP führt zu einem Substratmangel für die Ribonukleotidreduktase, sodass über einen Mangel an Deoxythymidintriphosphat (dTTP) auch die DNA-Synthese gestört wird und die Apoptose der Zelle eingeleitet wird. Beide Zytostatika beeinträchtigen somit die DNA-Replikation und damit die Zellteilung.

In den untersuchten Kolonkarzinomzellen *p53*^{-/-} HCT116 und *p53*^{+/+} HCT116 führten beide verwendeten Zytostatika zum Anstieg der endogenen GRAMD4-Transkriptmengen. Dabei ist die GRAMD4-Expression unabhängig vom p53-Status der verwendeten Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116. Die Aktivierung von GRAMD4 korreliert mit den *p73*-Transkriptmengen, sodass davon auszugehen ist, dass GRAMD4 beim *p73*-vermittelten Zelltod nach Behandlung mit Chemotherapeutika von Bedeutung ist. Diese Korrelation zwischen *p73* und GRAMD4 wurde durch die Inhibierung von Zytostatika induziertem *p73* bestätigt. Die Verwendung von siRNA gegen endogenes *p73* hat den Abfall der endogenen GRAMD4-Expression zur Folge (3.2.7, Abb. 49).

In vorangegangenen Studien wurde auch für das durch p53 bzw. *p73* transkriptionell regulierte „*BH3-only*“-Protein Puma gezeigt, das es durch die Gabe von Chemotherapeutika

induziert wird und Apoptose auslösen kann. Dies erfolgt sowohl abhängig als auch unabhängig von p53 (Nakano & Vousden, 2001; Yu *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). In der p53-induzierten Apoptose wird Puma direkt transkriptionell von p53 aktiviert. Es transloziert aus dem Zellkern in das Zytoplasma, bindet dort das anti-apoptotische Bcl-2 und setzt somit p53 aus dem inhibierenden Bcl-2/p53-Komplex frei. Hierdurch wird Bax aktiviert und Apoptose ausgelöst (Vousden, 2005). In p53-negativen Zellen kann p73 nach Inkubation mit DNA-zerstörenden Agenzien die Funktion von p53 übernehmen (Melino *et al.*, 2004), während GRAMD4 hier möglicherweise anstelle von Puma agiert.

Die Verwendung von Chemotherapeutika ist die am häufigsten eingesetzte und am besten etablierte Therapie gegen maligne Tumorerkrankungen. Unabhängig vom molekularen Kontext und der individuellen Entwicklung eines Tumors sind Zytostatika in der Lage, das Wachstum der Tumore zu inhibieren und Apoptose zu induzieren. Obwohl die Chemotherapeutika ein großes Einsatzspektrum aufweisen, sind zahlreiche Tumore resistent gegen Chemotherapie (Lionetto *et al.*, 1995; Rozenblum *et al.*, 1997). Dies ist ein großes Problem bei der Behandlung von Krebserkrankungen. Des Weiteren können Zytostatika auch in gesunden Geweben auf Zellen mit hoher Proliferationsaktivität einwirken und somit zu unerwünschten Nebenwirkungen wie Störungen des Blutbildes führen.

Aufgrunddessen gewinnt die Kombination von Chemo- und Genterapie, bei der Apoptose-induzierende Gene in die Zelle eingebracht werden, immer mehr an Bedeutung. Diese Behandlungsmethode zielt darauf ab, Tumorzellen durch die Überexpression eines pro-apoptotischen Proteins zu sensibilisieren. Nachfolgend werden geringere Dosen des Chemotherapeutikums benötigt, sodass dessen Toxizität verringert würde.

In einer vorangegangenen Studie wurde bereits belegt, dass die Transduktion von GRAMD4 zur Apoptose von Tumorzellen unabhängig von deren p53-Status führen kann (Stanelle *et al.*, 2005). Diese vorliegende Arbeit zeigt zudem, dass die Überexpression des GRAMD4-Gens die Zellsensitivität für die Chemotherapeutika cDDP und 5-FU *in vitro* steigert. Dies resultiert in einem additiven Effekt bei der Induktion der Apoptose (Abb. 50), der sowohl bei den p53-positiven als auch p53-negativen HCT116-Zellen nachgewiesen werden konnte. Zudem bewirkten die verwendeten Chemotherapeutika zusammen mit Ad.GRAMD4 eine Verbesserung der anti-tumoralen Wirksamkeit in einem *in vivo* Nacktmausmodell (Abb. 52). Die Kombinationstherapie war somit in den untersuchten Zelllinien und im Mausmodell effektiver als die Behandlung mit GRAMD4 oder dem Chemotherapeutikum allein. Aufgrunddessen stellt die kombinierte Chemo- und Genterapie von Cisplatin bzw. 5-Fluoruracil und einem adenoviralen Vektor, der GRAMD4 exprimiert, einen vielversprechenden Ansatz für die wirksame Behandlung von Tumoren dar. Die durch die Chemotherapeutika cDDP und 5-FU ausgelöste Apoptose konnte durch die Überexpression von Ad.shGRAMD4 und Ad.shp73 β wiederum inhibiert werden (Abb. 51). Dies weist darauf hin, dass sowohl p73, wie bereits in zahlreichen Studien gezeigt, als auch

GRAMD4 in der durch Zytostatika vermittelten Apoptose eine Rolle einnehmen (Vayssade *et al.*, 2005; Tuve *et al.*, 2006; Leong *et al.*, 2007).

Als Fazit kann man festhalten, dass dem direkt durch p73 reguliertem GRAMD4 eine entscheidende Rolle in der p73-vermittelten Apoptose zugesprochen werden kann. Des Weiteren weist es durch die Chemosensitivierung von Tumorzellen eine therapeutische Wirksamkeit auf.

4.3. Einfluss von GRAMD4 auf die Proteine des mitochondrialen Apoptoseweges

An den Mitochondrien zeigt GRAMD4 dagegen zahlreiche funktionelle Gemeinsamkeiten mit dem Tumorsuppressor p53. Seine Wirkung als Tumorsuppressor wird p53 vorrangig aufgrund seiner Funktion als Transkriptionsfaktor zugeschrieben. Durch die Transaktivierung spezifischer Zielgene ruft p53 unterschiedliche Zellantworten wie Zellzyklusarrest und Apoptose hervor. Zu den besonders gut untersuchten p53-Zielgenen gehören p21 (el-Deiry *et al.*, 1993; Xiong *et al.*, 1993), 14-3-3 σ (Hermeking *et al.*, 1997) und GADD45 (Kastan *et al.*, 1992), deren Expression für den Zellzyklusarrest von Bedeutung ist. In der mitochondrialen Apoptose werden die pro-apoptischen Proteine Bax (Miyashita & Reed, 1995), Puma (Yu *et al.*, 2001), Noxa (Oda *et al.*, 2000) und Apaf-1 (Moroni *et al.*, 2001) positiv reguliert. Für den extrinsischen Signalweg sind die Rezeptoren Fas, TRAILR1 und TRAILR2 als p53-Zielgene beschrieben worden (Michalak *et al.*, 2005).

Neben seiner Funktion als Transkriptionsfaktor zeigen zahlreiche Studien, dass p53 auch Transkriptions-unabhängig Apoptose induziert. So verhindern p53-Mutationen, die zum Verlust der transkriptionellen Aktivität führen, den p53-induzierten Zelltod nicht (Chipuk *et al.*, 2003; Dumont *et al.*, 2003). Des Weiteren kann p53 in zellfreien Extrakten in Anwesenheit von Bax die direkte Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien induzieren (Schuler *et al.*, 2000). Weitere Studien legen die Vermutung nahe, dass p53 direkt in der mitochondrialen Apoptose von Bedeutung ist und möglicherweise eine den „BH3-only“-Proteinen verwandte pro-apoptische Aktivität besitzt (Marchenko *et al.*, 2000; Sansome *et al.*, 2001). p53 transloziert an die Mitochondrien und interagiert hier direkt mit den anti-apoptischen Proteinen Bcl-2 und Bcl-X_L (Mihara *et al.*, 2003; Erster *et al.*, 2004; Tomita *et al.*, 2006). Dies ermöglicht die Freisetzung der pro-apoptischen Proteine Bax und Bak aus ihrer inaktivierenden Bindung mit den anti-apoptischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie (Chipuk *et al.*, 2004; Leu *et al.*, 2004). Die Aktivierung von Bax und Bak führt daraufhin zur Ausschüttung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und zur Einleitung der Caspase-Kaskade (Mihara *et al.*, 2003; Chipuk *et al.*, 2004). Dieser Mechanismus wird durch die Beobachtungen bestärkt, dass rekombinantes p53 die Oligomerisierung von Bax und Bak induziert. p53-Mutanten können dagegen Bax und Bak nicht stimulieren (Pietsch *et al.*, 2007; Wolff *et al.*, 2008). In einem weiteren Modell verdrängt Puma p53 aus seinem Komplex mit

Bcl-2. Daraufhin kann das freigesetzte p53 direkt an Bax binden und dessen pro-apoptotische Aktivität induzieren (Chipuk *et al.*, 2005). Ein ähnlicher Mechanismus konnte für die Aktivierung von Bak gezeigt werden. Hier kommt es durch die direkte Interaktion von p53 mit Bak zur Aufhebung des Bak/Mcl-1-Komplexes (Leu *et al.*, 2004).

Die Bindung von p53 an Bcl-X_L bzw. Bcl-2 erfolgt über konservierte Reste (239-248) innerhalb der DNA-Bindedomäne (Tomita *et al.*, 2006; Sot *et al.*, 2007). Dies unterscheidet sich von den Proteinen der Bcl-2-Familie. Pro-apoptotische Proteine wie Noxa, Puma und Bad neutralisieren den inhibitorischen Effekt von Bcl-X_L bzw. Bcl-2 auf Bax und Bak durch die Interaktion mit den anti-apoptotischen Mitgliedern der Familie über ihre BH3-Domänen (Cheng *et al.*, 2001).

Für das mitochondrial lokalisierte GRAMD4 (Stanelle *et al.*, 2005) wurde mittels Interaktionsstudien ebenfalls eine direkte Bindung an das anti-apoptotische Protein Bcl-2 nachgewiesen (3.2.4.). Da GRAMD4 aber außer zwei Transmembrandomänen (Stanelle *et al.*, 2005) weder eine BH3-Domäne noch eine DNA-Bindedomäne besitzt, über welche die Bindung mit Bcl-2 erfolgen kann, muss davon ausgegangen werden, dass eine andere Proteinkomplex bildende Interaktionsdomäne existiert. Auch die pro-apoptotischen Proteine Siva-1 und p53AIP1 weisen keine BH3-Domäne auf, sind aber in der Lage, Bcl-X_L bzw. Bcl-2 zu binden und zu inaktivieren (Matsuda *et al.*, 2002; Xue *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2004). Unter Verwendung der SMART-Datenbank wurde im GRAMD4-Protein eine Bcl-like-Domäne, die die Aminosäuren 92 bis 176 umfasst, ermittelt. Diese ist für die GRAMD4/Bcl-2-Interaktion verantwortlich (3.2.4). Die Bindung zwischen GRAMD4 und Bcl-2 ermöglicht, vergleichbar mit dem p53-Mechanismus, die Freisetzung von Bax aus einem existierenden inhibierenden Bcl-2/Bax-Komplex, das anschließend in die Mitochondrien transloziert, oligomerisiert und Poren bildet. Sowohl die Proteintranslokation (3.2.3) als auch die Oligomerisierung von Bax (3.2.5) durch mitochondriales GRAMD4 wurde in dieser Arbeit verifiziert. Die Oligomerisierung der pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak konnte ebenfalls durch p53 gezeigt werden. p53-Mutanten sind dagegen nicht in der Lage Oligomerisierung auszulösen (Wolff *et al.*, 2008). Desgleichen ist das „BH3-only“-Protein tBid nach Apoptose-Stimulus in der Lage die Oligomerisierung von Bax und somit die Ausschüttung von Cytochrom C auszulösen (Roucou *et al.*, 2002). Durch die Ausbildung der Poren durch die Bax-Oligomere kommt es zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (MOMP) und dem damit verbundenen Ausstrom von Proteinen (z. B. Cytochrom C, Smac, AIF und EndoG) des Intermembranraum (Antonsson *et al.*, 1997). Dies resultiert im Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials $\Delta\psi_m$ (Liu *et al.*, 1996; Antonsson *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Ausschüttung der apoptotischen Faktoren Cytochrom C und Smac nach Überexpression von GRAMD4 gezeigt werden (3.2.6). Die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytosol ist im mitochondrialen Apoptoseweg von entscheidender Bedeutung (Li *et al.*, 1997). Im

Zytoplasma bildet es zusammen mit Apaf-1 und (d)ATP das Apoptosom, an dem die Pro-Caspase 9 prozessiert wird, um anschließend die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 zu aktivieren (Green & Reed, 1998; Reed, 1998). Das pro-apoptotische Protein Smac transloziert nach MOMP aus den Mitochondrien in das Zytosol und inhibiert die Funktion der anti-apoptotischen IAPs, die die Aktivität der Caspasen beeinflussen können (Verhagen *et al.*, 2000; Schimmer, 2004). GRAMD4 ist somit imstande die Integrität der mitochondrialen Membran (MOMP) und die Freisetzung von pro-apoptotischen Proteinen zu beeinflussen. Diese Funktion von GRAMD4 ist mit dem an den Mitochondrien agierenden Tumorsuppressor p53 vergleichbar, der ebenfalls MOMP induzieren kann. Aufgrund der Permeabilisierung der Organellen kommt es auch hier zur Freisetzung der Intermembranproteine Cytochrom C, Smac, EndoG und AIF, die entweder die Caspase-Kaskade aktivieren oder im Nukleus Caspasen-unabhängig zur DNA-Fragmentierung und Kondensation des Chromatins führen (Mihara *et al.*, 2003; Tomita *et al.*, 2006; Wolff *et al.*, 2008).

Des Weiteren kann GRAMD4 das mitochondriale Transmembranpotential $\Delta\psi_m$ der Mitochondrien beeinflussen. Unter normalen physiologischen Bedingungen wird das mitochondriale Transmembranpotential durch den Elektronentransport der Atmungskette über die innere Mitochondrienmembran aufrechterhalten und ist Grundlage für die ATP-Bildung durch die oxidative Phosphorylierung. Der Verlust des Transmembranpotentials wird durch das Öffnen von Poren (PTP, *permeability transition pores*), die zwischen innerer und äußerer Membran lokalisiert sind, hervorgerufen. Diese sind für Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 1,5 kDa durchlässig (Zoratti & Szabo, 1995; Crompton, 1999). Diese Funktion hat GRAMD4 wiederum mit dem Tumorsuppressor p53 gemein. Nach Induktion der Apoptose lokalisiert p53 direkt in die Mitochondrien und führt dort zur Veränderung von $\Delta\psi_m$ (Charlot *et al.*, 2004).

Neben der durch GRAMD4 ausgelösten mitochondrialen Apoptose scheint das Bcl-2/Bax-Verhältnis in den Zellen für die Einleitung des programmierten Zelltods durch GRAMD4 ebenfalls eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Überexpression des Proteins führt *in vitro* zu einer verstärkten Expression von Bax und zu einer verminderten Proteinexpression des anti-apoptotischen Bcl-2, während die Proteinexpression des Bax-Homologen Bak dagegen konstant bleibt (3.2.2). Die vermehrte Expression von Bax führt zu einer Verschiebung des Bcl-2/Bax-Verhältnisses in Richtung des pro-apoptotischen Proteins, welches mit der Einleitung der Apoptose einher geht. Die Regulation dieser Proteine erfolgt dabei am ehesten über indirekte Mechanismen, da GRAMD4 nicht die typischen strukturellen Eigenschaften eines Tumorsuppressors wie p53 bzw. p73 aufweist (Levrero *et al.*, 2000; Irwin & Kaelin, 2001; Muller *et al.*, 2006). Im Vergleich dazu kann p53, um auf das Bcl-2/Bax-Verhältnis einzuwirken, als transkriptioneller Aktivator die Bax-Expression direkt aktivieren (Miyashita & Reed, 1995; Li *et al.*, 1999), während die Bcl-2-Expression direkt über ein p53-abhängiges negatives „*response*“-Element oder indirekt reguliert wird (Miyashita *et al.*, 1994).

GRAMD4 weist damit zahlreiche Gemeinsamkeiten mit dem Tumorsuppressor p53 auf. Anders als dieser besitzt GRAMD4 aber wahrscheinlich keine Transkriptions-abhängige Funktion.

Bei der zusammenfassenden Betrachtung der bisherigen Daten ergibt sich für GRAMD4 und seiner Rolle in der p53-unabhängigen Apoptose folgendes Modell (Abb. 53): In p53-negativen Zellen kann das p53-Familienmitglied p73 GRAMD4 direkt und spezifisch aktivieren und dessen Expression sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene stimulieren. Im Anschluß daran führt der Transkriptionsfaktor p73 zur Translokation von nukleärem GRAMD4 in das Zytosol und in die Mitochondrien. An diesen Organellen zeigt GRAMD4 zahlreiche funktionelle Gemeinsamkeiten mit dem Tumorsuppressor p53. So kann GRAMD4 die Freisetzung von Bax steuern. Dieses Protein liegt unter normalen Bedingungen frei im Zytosol vor, transloziert jedoch nach einem Apoptose-auslösenden Stimuli wie GRAMD4 als Homodimer in die Mitochondrien (Wolter *et al.*, 1997). Die Bildung des Bax-Homodimers kann dabei durch Heterodimerisierung mit Bcl-2 bzw. Bcl-X_L verhindert werden. GRAMD4 kann direkt mit Bcl-2 interagieren und aufgrunddessen Bax aus dem inhibierenden Bcl-2/Bax-Komplex lösen. Das pro-apoptotische Protein oligomerisiert in der äußeren mitochondrialen Membran und bildet Poren. Die Organellen werden permeabilisiert und es kommt zum Ausstrom pro-apoptotischer Faktoren wie Cytochrom C und Smac. Diese Proteine aktivieren die Caspase-Kaskade, die zur Apoptose der Zelle führt.

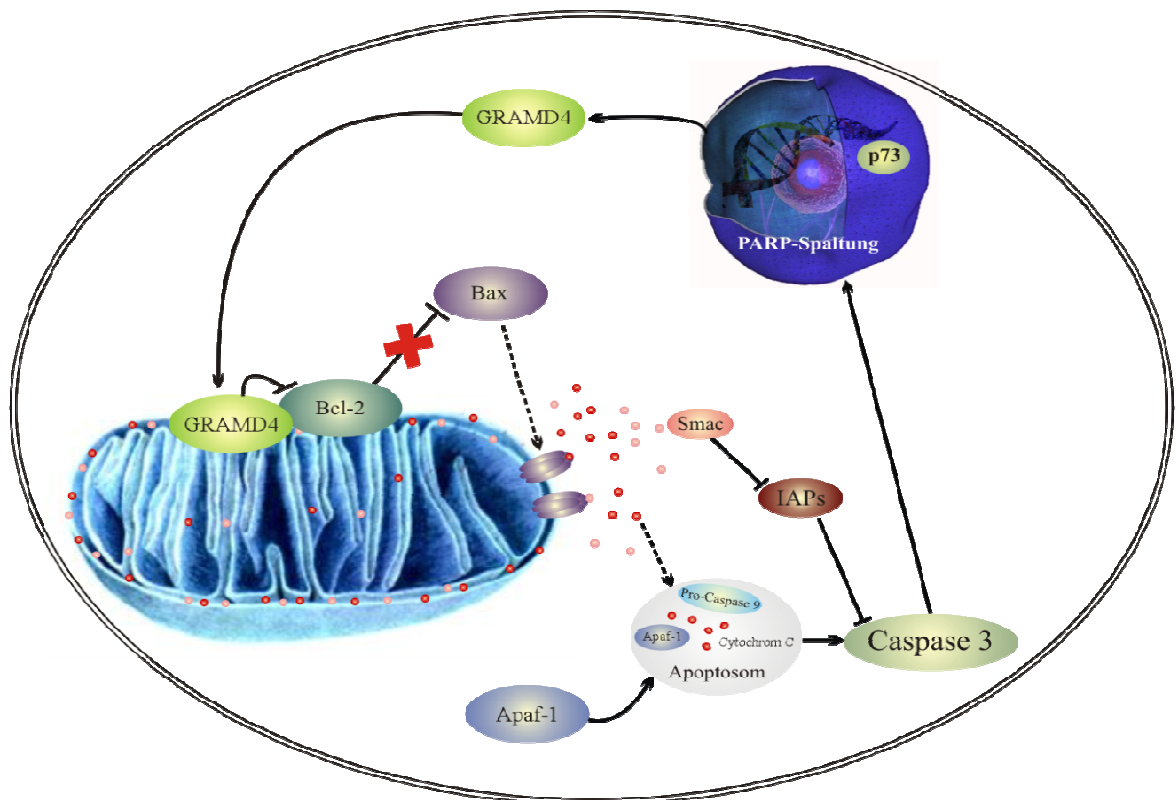


Abb. 53: Modell GRAMD4-induzierter Apoptose. GRAMD4 wird durch den Tumorsuppressor p73 aktiviert und transloziert aus dem Nukleus in die Mitochondrien. Hier interagiert es direkt mit dem anti-apoptotischen Protein Bcl-2 und führt aufgrunddessen zur Freisetzung von Bax aus einem inhibierenden Bcl-2/Bax-Komplex. Bax oligomerisiert in der mitochondrialen Membran und bildet Poren. Durch die Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP) kommt es zum Abfall des mitochondrialen Transmembranpotentials und zur Ausschüttung von Cytochrom C und Smac. Diese Proteine aktivieren die Caspase-Kaskade, die zur Apoptose der Zelle führt.

5. Zusammenfassung

In unserer Arbeitsgruppe konnte vor kurzem *GRAMD4* im Rahmen von DNA-Microarray-Analysen als ein neuer E2F1-regulierter Faktor mit pro-apoptotischer Funktion identifiziert werden, über den E2F1 unabhängig vom p53-Status Zelltod induziert. Die Rolle von *GRAMD4* innerhalb des Apoptosesignalweges war jedoch weitgehend unklar (Stanelle *et al.*, 2002; 2005).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte *GRAMD4* in den molekularen Kontext der p53-unabhängigen pro-apoptotischen Signalwege eingeordnet werden. Hierbei stand u. a. die Untersuchung seiner Beteiligung am mitochondrialen Apoptoseweg im Vordergrund. So konnte gezeigt werden, dass *GRAMD4* durch p73 direkt transaktiviert und reguliert wird. Die Transkriptionsfaktoren E2F1 und p53 sind dagegen nicht in der Lage, die Transkriptionsinitiation direkt einzuleiten. *GRAMD4* stellt somit ein p73-spezifisches Zielgen dar. Mittels Interaktionsstudien von *GRAMD4* und Proteinen des mitochondrialen Apoptoseweges konnte ein *GRAMD4*/Bcl-2-Komplex detektiert werden. Durch Bindung an das anti-apoptotische Protein Bcl-2 kann das pro-apoptotische Bax an die Mitochondrien translozieren, um Apoptose zu initiieren. Verantwortlich für diese Interaktion zwischen *GRAMD4* und Bcl-2 ist eine Bcl-2-like-Domäne, die die Aminosäuren 92 bis 176 der *GRAMD4*-Sequenz umfasst. Dies konnte mittels Deletionsmutanten nachgewiesen werden. Überexpressionsanalysen mit *GRAMD4* ziehen die Translokation von Bax aus dem Zytosol in die Mitochondrien nach sich, welches anschließend oligomerisiert. Es kommt zum Ausstrom weiterer pro-apoptotischer Faktoren, wie Cytochrom C und Smac, die für die Aktivierung der Caspase-Kaskade verantwortlich sind. Des Weiteren kann *GRAMD4* das mitochondriale Transmembranpotential $\Delta\psi_m$ der Mitochondrien beeinflussen.

Die vorliegende Arbeit zeigt zudem, dass die Überexpression des *GRAMD4*-Gens die Zellsensitivität für die Chemotherapeutika cDDP und 5-FU unabhängig vom p53-Status *in vitro* steigert. Zudem wurde durch die Kombination der verwendeten Chemotherapeutika mit Ad.*GRAMD4*-Infektion die anti-tumorale Wirksamkeit in einem *in vivo* Nacktmausmodell verbessert.

Die neuen Erkenntnisse über *GRAMD4* bezüglich seiner Regulation, seiner Mitwirkung in der mitochondrialen Apoptose und seiner anti-tumoralen Wirksamkeit *in vivo* geben Anlass zur Annahme, dass es sich hierbei um einen Faktor mit p53-ähnlichen Eigenschaften handelt, der unabhängig von p53 für eine effizientere Tumorthherapie genutzt werden könnte. Gerade vor dem Hintergrund, daß viele Tumore eine erhöhte Resistenz gegen p53-vermittelte Tumorsuppressorgentherapie zeigen, kann das durch p73 regulierte *GRAMD4* eine Alternative in der therapeutischen Behandlung darstellen.

6. Literaturverzeichnis

Acehan, D., X. Jiang, D. G. Morgan, *et al.* (2002). Three-Dimensional Structure of the Apoptosome: Implications for Assembly, Procaspase-9 Binding, and Activation. **9**(2): 423-432.

Adams, J. M. & S. Cory (1998). The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. **281**: 1322-1326.

Adams, J. M. & S. Cory (2001). Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. Trends in Biochemical Sciences **26**(1): 61-66.

Agami, R., G. Blandino, M. Oren, *et al.* (1999). Interaction of c-Abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis. Nature **399**(6738): 809-13.

Antonsson, B. (2001). Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. Cell and Tissue Research **306**(3): 347-361.

Antonsson, B., F. Conti, A. Ciavatta, *et al.* (1997). Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. Science **277**(5324): 370-2.

Antonsson, B., S. Montessuit, S. Lauper, *et al.* (2000). Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. Biochem J **345 Pt 2**: 271-8.

Antonsson, B., S. Montessuit, B. Sanchez, *et al.* (2001). Bax Is Present as a High Molecular Weight Oligomer/Complex in the Mitochondrial Membrane of Apoptotic Cells. **276**: 11615-11623.

Attardi, L. D. & T. Jacks (1999). The role of p53 in tumour suppression: lessons from mouse models. Cell Mol Life Sci **55**(1): 48-63.

Azizkhan, J. C., D. E. Jensen, A. J. Pierce, *et al.* (1993). Transcription from TATA-less promoters: dihydrofolate reductase as a model. Crit Rev Eukaryot Gene Expr **3**(4): 229-54.

Bates, S., A. C. Phillips, P. A. Clark, *et al.* (1998). p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. Nature **395**(6698): 124-5.

Borner, C. (2003). The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. Molecular Immunology **39**(11): 615-647.

Bryne, J. C., E. Valen, M. H. Tang, *et al.* (2008). JASPAR, the open access database of transcription factor-binding profiles: new content and tools in the 2008 update. Nucleic Acids Res **36**(Database issue): D102-6.

Buhlmann, S., T. Racek, A. Schwarz, *et al.* (2008). Molecular mechanism of p73-mediated regulation of hepatitis B virus core promoter/enhancer II: implications for hepatocarcinogenesis. J Mol Biol **378**(1): 20-30.

- Charlot, J. F., J. L. Pretet, C. Haughey, *et al.* (2004). Mitochondrial translocation of p53 and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) dissipation are early events in staurosporine-induced apoptosis of wild type and mutated p53 epithelial cells. Apoptosis **9**(3): 333-43.
- Cheng, E. H., M. C. Wei, S. Weiler, *et al.* (2001). BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. Mol Cell **8**(3): 705-11.
- Chipuk, J. E., L. Bouchier-Hayes, T. Kuwana, *et al.* (2005). PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. Science **309**(5741): 1732-5.
- Chipuk, J. E., T. Kuwana, L. Bouchier-Hayes, *et al.* (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. Science **303**(5660): 1010-4.
- Chipuk, J. E., U. Maurer, D. R. Green, *et al.* (2003). Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. Cancer Cell **4**(5): 371-81.
- Chu, F., A. Borthakur, X. Sun, *et al.* (2004). The Siva-1 putative amphipathic helical region (SAH) is sufficient to bind to BCL-XL and sensitize cells to UV radiation induced apoptosis. Apoptosis **9**(1): 83-95.
- Concin, N., G. Hofstetter, A. Berger, *et al.* (2005). Clinical relevance of dominant-negative p73 isoforms for responsiveness to chemotherapy and survival in ovarian cancer: evidence for a crucial p53-p73 cross-talk in vivo. Clin Cancer Res **11**(23): 8372-83.
- Cory, S. & J. M. Adams (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. Nat Rev Cancer **2**(9): 647-656.
- Crompton, M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. Biochem J **341** (Pt 2): 233-49.
- Croxton, R., Y. Ma, L. Song, *et al.* (2002). Direct repression of the Mcl-1 promoter by E2F1. Oncogene **21**(9): 1359-69.
- Das, S., S. Nama, S. Antony, *et al.* (2005). p73 beta-expressing recombinant adenovirus: a potential anticancer agent. Cancer Gene Ther **12**(4): 417-26.
- de Bruin, A., B. Maiti, L. Jakoi, *et al.* (2003). Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. J Biol Chem **278**(43): 42041-9.
- Deveraux, Q. L. & J. C. Reed (1999). IAP family proteins--suppressors of apoptosis. Genes Dev **13**(3): 239-52.
- Donehower, L. A., L. A. Godley, C. M. Aldaz, *et al.* (1995). Deficiency of p53 accelerates mammary tumorigenesis in Wnt-1 transgenic mice and promotes chromosomal instability. Genes Dev **9**(7): 882-95.

- Donehower, L. A., M. Harvey, B. L. Slagle, *et al.* (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. Nature **356**(6366): 215-21.
- Du, C., M. Fang, Y. Li, *et al.* (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. Cell **102**(1): 33-42.
- Dumont, P., J. I. Leu, A. C. Della Pietra, 3rd, *et al.* (2003). The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. Nat Genet **33**(3): 357-65.
- Eischen, C. M., G. Packham, J. Nip, *et al.* (2001). Bcl-2 is an apoptotic target suppressed by both c-Myc and E2F-1. Oncogene **20**(48): 6983-93.
- El-Deiry, W. S., S. E. Kern, J. A. Pietenpol, *et al.* (1992). Definition of a consensus binding site for p53. Nat Genet **1**(1): 45-9.
- el-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, *et al.* (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell **75**(4): 817-25.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicologic Pathology **35**(4): 495-516.
- Engelmann, D., S. Knoll, D. Ewerth, *et al.* (2009). Functional interplay between E2F1 and chemotherapeutic drugs defines immediate E2F1 target genes crucial for cancer cell death. Cell Mol Life Sci **67**(6): 931-48.
- Erster, S., M. Mihara, R. H. Kim, *et al.* (2004). In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. Mol Cell Biol **24**(15): 6728-41.
- Eskes, R., S. Desagher, B. Antonsson, *et al.* (2000). Bid Induces the Oligomerization and Insertion of Bax into the Outer Mitochondrial Membrane. **20**: 929-935.
- Eymin, B., L. Karayan, P. Seite, *et al.* (2001). Human ARF binds E2F1 and inhibits its transcriptional activity. Oncogene **20**(9): 1033-41.
- Fu, Y., J. Li & A. S. Lee (2007). GRP78/BiP inhibits endoplasmic reticulum BIK and protects human breast cancer cells against estrogen starvation-induced apoptosis. Cancer Res **67**(8): 3734-40.
- Furukawa, Y., N. Nishimura, Y. Furukawa, *et al.* (2002). Apaf-1 Is a Mediator of E2F-1-induced Apoptosis. J. Biol. Chem. **277**(42): 39760-39768.
- Gao, G., A. P. Bracken, K. Burkard, *et al.* (2003). NPAT expression is regulated by E2F and is essential for cell cycle progression. Mol Cell Biol **23**(8): 2821-33.
- Giaccone, G. (2000). Clinical perspectives on platinum resistance. Drugs **59 Suppl 4**: 9-17; discussion 37-8.
- Gill, S., R. R. Thomas & R. M. Goldberg (2003). Review article: colorectal cancer chemotherapy. Aliment Pharmacol Ther **18**(7): 683-92.

- Ginsberg, D. (2002). E2F1 pathways to apoptosis. FEBS Lett **529**(1): 122-5.
- Gong, J. G., A. Costanzo, H. Q. Yang, *et al.* (1999). The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. Nature **399**(6738): 806-9.
- Goodrich, J. A., G. Cutler & R. Tjian (1996). Contacts in context: promoter specificity and macromolecular interactions in transcription. Cell **84**(6): 825-30.
- Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell, *et al.* (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol **36**(1): 59-74.
- Green, J. C. & D. R. Reed (1998). Mitochondria and Apoptosis. **281**: 1309-1312.
- Guy, C. T., W. Zhou, S. Kaufman, *et al.* (1996). E2F-1 blocks terminal differentiation and causes proliferation in transgenic megakaryocytes. Mol Cell Biol **16**(2): 685-93.
- Hacker, G. (2000). The morphology of apoptosis. Cell Tissue Res **301**(1): 5-17.
- Harbour, J. W. & D. C. Dean (2000). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. Genes Dev **14**(19): 2393-409.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. Nature **407**(6805): 770-776.
- Henry-Mowatt, J., C. Dive, J. C. Martinou, *et al.* (2004). Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. Oncogene **23**(16): 2850-60.
- Hermeking, H., C. Lengauer, K. Polyak, *et al.* (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. Mol Cell **1**(1): 3-11.
- Hershko, T. & D. Ginsberg (2004). Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. J Biol Chem **279**(10): 8627-34.
- Hill, M. M., C. Adrain & S. J. Martin (2003). Portrait of a Killer: The Mitochondrial Apoptosome Emerges From the Shadows. **3**: 19-26.
- Hollingsworth, R. E., Jr., P. L. Chen & W. H. Lee (1993). Integration of cell cycle control with transcriptional regulation by the retinoblastoma protein. Curr Opin Cell Biol **5**(2): 194-200.
- Holmberg, C., K. Helin, M. Sehested, *et al.* (1998). E2F-1-induced p53-independent apoptosis in transgenic mice. Oncogene **17**(2): 143-55.
- Hsieh, J. K., S. Fredersdorf, T. Kouzarides, *et al.* (1997). E2F1-induced apoptosis requires DNA binding but not transactivation and is inhibited by the retinoblastoma protein through direct interaction. Genes Dev **11**(14): 1840-52.
- Huang, D. C. S. & A. Strasser (2000). BH3-Only Proteins--Essential Initiators of Apoptotic Cell Death. Cell **103**(6): 839-842.

- Irwin, M., M. C. Marin, A. C. Phillips, *et al.* (2000). Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. Nature **407**(6804): 645-648.
- Irwin, M. S. & W. G. Kaelin (2001). p53 family update: p73 and p63 develop their own identities. Cell Growth Differ **12**(7): 337-49.
- Irwin, M. S., K. Kondo, M. C. Marin, *et al.* (2003). Chemosensitivity linked to p73 function. Cancer Cell **3**(4): 403-10.
- Ishida, S., T. Yamashita, U. Nakaya, *et al.* (2000). Adenovirus-mediated transfer of p53-related genes induces apoptosis of human cancer cells. Jpn J Cancer Res **91**(2): 174-80.
- Ishimoto, O., C. Kawahara, K. Enjo, *et al.* (2002). Possible oncogenic potential of DeltaNp73: a newly identified isoform of human p73. Cancer Res **62**(3): 636-41.
- Iwakuma, T. & G. Lozano (2007). Crippling p53 activities via knock-in mutations in mouse models. Oncogene **26**(15): 2177-84.
- Jamil, S., R. Sobouti, P. Hojabrpour, *et al.* (2005). A proteolytic fragment of Mcl-1 exhibits nuclear localization and regulates cell growth by interaction with Cdk1. Biochem J **387**(Pt 3): 659-67.
- Jiang, M., Q. Wei, J. Wang, *et al.* (2006). Regulation of PUMA-alpha by p53 in cisplatin-induced renal cell apoptosis. Oncogene **25**(29): 4056-66.
- Joerger, A. C. & A. R. Fersht (2007). Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. Oncogene **26**(15): 2226-42.
- Jost, C. A., M. C. Marin & W. G. Kaelin, Jr. (1997). p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. Nature **389**(6647): 191-4.
- Joza, N., S. A. Susin, E. Daugas, *et al.* (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. Nature **410**(6828): 549-554.
- Kaesler, M. D. & R. D. Iggo (2002). Chromatin immunoprecipitation analysis fails to support the latency model for regulation of p53 DNA binding activity in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 95-100.
- Kaghad, M., H. Bonnet, A. Yang, *et al.* (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. Cell **90**(4): 809-19.
- Kastan, M. B., Q. Zhan, W. S. el-Deiry, *et al.* (1992). A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. Cell **71**(4): 587-97.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie & A. R. Currie (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer **26**(4): 239-57.
- Körner, K., L. A. Wolfrum, F. C. Lucibello, *et al.* (1997). Characterization of the TATA-less core promoter of the cell cycle-regulated cdc25C gene. Nucleic Acids Res **25**(24): 4933-9.

- Kowalik, T. F., J. DeGregori, J. K. Schwarz, *et al.* (1995). E2F1 overexpression in quiescent fibroblasts leads to induction of cellular DNA synthesis and apoptosis. J Virol **69**(4): 2491-500.
- Lapi, E., A. Iovino, G. Fontemaggi, *et al.* (2006). S100A2 gene is a direct transcriptional target of p53 homologues during keratinocyte differentiation. Oncogene **25**(26): 3628-37.
- Leong, C. O., N. Vidnovic, M. P. DeYoung, *et al.* (2007). The p63/p73 network mediates chemosensitivity to cisplatin in a biologically defined subset of primary breast cancers. J Clin Invest **117**(5): 1370-80.
- Leu, J. I., P. Dumont, M. Hafey, *et al.* (2004). Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. Nat Cell Biol **6**(5): 443-50.
- Levrero, M., V. De Laurenzi, A. Costanzo, *et al.* (2000). The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. J Cell Sci **113** (Pt 10): 1661-70.
- Li, L. Y., X. Luo & X. Wang (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. Nature **412**(6842): 95-99.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, *et al.* (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell **91**(4): 479-89.
- Li, P. F., R. Dietz & R. von Harsdorf (1999). p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2. Embo J **18**(21): 6027-36.
- Lin, K. W., S. Y. Nam, W. H. Toh, *et al.* (2004). Multiple stress signals induce p73beta accumulation. Neoplasia **6**(5): 546-57.
- Lionetto, R., V. Pugliese, P. Bruzzi, *et al.* (1995). No standard treatment is available for advanced pancreatic cancer. Eur J Cancer **31A**(6): 882-7.
- Liston, P., W. G. Fong & R. G. Korneluk (2003). The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. Oncogene **22**(53): 8568-80.
- Liu, H. & R. M. Pope (2003). The role of apoptosis in rheumatoid arthritis. Curr Opin Pharmacol **3**(3): 317-22.
- Liu, X., C. N. Kim, J. Yang, *et al.* (1996). Induction of Apoptotic Program in Cell-Free Extracts: Requirement for dATP and Cytochrome c. **86**(1): 147-157.
- Lowe, S. W. & A. W. Lin (2000). Apoptosis in cancer. Carcinogenesis **21**(3): 485-95.
- Lu, W., J. Lin & J. Chen (2002). Expression of p14ARF overcomes tumor resistance to p53. Cancer Res **62**(5): 1305-10.
- Lutz, R. J. (2000). Role of the BH3 (Bcl-2 homology 3) domain in the regulation of apoptosis and Bcl-2-related proteins. **28**: 51-56.

- Maiti, B., J. Li, A. de Bruin, *et al.* (2005). Cloning and characterization of mouse E2F8, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. J Biol Chem **280**(18): 18211-20.
- Marchenko, N. D., A. Zaika & U. M. Moll (2000). Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. J Biol Chem **275**(21): 16202-12.
- Matsuda, K., K. Yoshida, Y. Taya, *et al.* (2002). p53AIP1 regulates the mitochondrial apoptotic pathway. Cancer Res **62**(10): 2883-9.
- Meier, M., M. L. den Boer, J. P. Meijerink, *et al.* (2006). Differential expression of p73 isoforms in relation to drug resistance in childhood T-lineage acute lymphoblastic leukaemia. Leukemia **20**(8): 1377-84.
- Melino, G., F. Bernassola, M. Ranalli, *et al.* (2004). p73 Induces Apoptosis via PUMA Transactivation and Bax Mitochondrial Translocation. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY **279**(9): 8076-8083.
- Melino, G., X. Lu, M. Gasco, *et al.* (2003). Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. Trends Biochem Sci **28**(12): 663-70.
- Michalak, E., A. Villunger, M. Erlacher, *et al.* (2005). Death squads enlisted by the tumour suppressor p53. Biochem Biophys Res Commun **331**(3): 786-98.
- Mihara, M., S. Erster, A. Zaika, *et al.* (2003). p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. Mol Cell **11**(3): 577-90.
- Miyashita, T., M. Harigai, M. Hanada, *et al.* (1994). Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. Cancer Res **54**(12): 3131-5.
- Miyashita, T., S. Krajewski, M. Krajewska, *et al.* (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. Oncogene **9**(6): 1799-805.
- Miyashita, T. & J. C. Reed (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. Cell **80**(2): 293-9.
- Moberg, K., M. A. Starz & J. A. Lees (1996). E2F-4 switches from p130 to p107 and pRB in response to cell cycle reentry. Mol Cell Biol **16**(4): 1436-49.
- Moll, U. M. & N. Slade (2004). p63 and p73: roles in development and tumor formation. Mol Cancer Res **2**(7): 371-86.
- Moroni, M. C., E. S. Hickman, E. Lazzerini Denchi, *et al.* (2001). Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. Nat Cell Biol **3**(6): 552-8.
- Müller, M., T. Schilling, A. E. Sayan, *et al.* (2005). TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. Cell Death Differ **12**(12): 1564-77.

- Müller, M., S. Wilder, D. Bannasch, *et al.* (1998). p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. J Exp Med **188**(11): 2033-45.
- Muller, M., E. S. Schleithoff, W. Stremmel, *et al.* (2006). One, two, three--p53, p63, p73 and chemosensitivity. Drug Resist Updat **9**(6): 288-306.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, *et al.* (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. Biotechnology **24**: 17-27.
- Nahle, Z., J. Polakoff, R. V. Davuluri, *et al.* (2002). Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. Nat Cell Biol **4**(11): 859-64.
- Nakagawa, T., M. Takahashi, T. Ozaki, *et al.* (2002). Autoinhibitory regulation of p73 by Delta Np73 to modulate cell survival and death through a p73-specific target element within the Delta Np73 promoter. Mol Cell Biol **22**(8): 2575-85.
- Nakano, K. & K. H. Vousden (2001). PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. Mol Cell **7**(3): 683-94.
- Nechushtan, A., C. L. Smith, Y. T. Hsu, *et al.* (1999). Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. Embo J **18**(9): 2330-41.
- Nelson, J. D., O. Denisenko, P. Sova, *et al.* (2006). Fast chromatin immunoprecipitation assay. Nucleic Acids Res **34**(1): e2.
- Oda, E., R. Ohki, H. Murasawa, *et al.* (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. Science **288**(5468): 1053-8.
- Orlando, V. (2000). Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. Trends Biochem Sci **25**(3): 99-104.
- Osada, M., H. L. Park, Y. Nagakawa, *et al.* (2006). A novel response element confers p63- and p73-specific activation of the WNT4 promoter. Biochem Biophys Res Commun **339**(4): 1120-8.
- Ozaki, T. & A. Nakagawara (2005). p73, a sophisticated p53 family member in the cancer world. Cancer Sci **96**(11): 729-37.
- Park, K. M., D. J. Kim, S. G. Paik, *et al.* (2006). Role of E2F1 in endoplasmic reticulum stress signaling. Mol Cells **21**(3): 356-9.
- Perkins, G., E. Bossy-Wetzl & M. H. Ellisman (2009). New insights into mitochondrial structure during cell death. Experimental Neurology **218**(2): 183-192.
- Petros, A. M., A. Gunasekera, N. Xu, *et al.* (2004). Defining the p53 DNA-binding domain/Bcl-x(L)-binding interface using NMR. FEBS Lett **559**(1-3): 171-4.
- Phillips, A. C., M. K. Ernst, S. Bates, *et al.* (1999). E2F-1 potentiates cell death by blocking antiapoptotic signaling pathways. Mol Cell **4**(5): 771-81.

- Phillips, A. C. & K. H. Vousden (2001). E2F-1 induced apoptosis. Apoptosis **6**(3): 173-82.
- Pierce, A. M., S. M. Fisher, C. J. Conti, *et al.* (1998). Deregulated expression of E2F1 induces hyperplasia and cooperates with ras in skin tumor development. Oncogene **16**(10): 1267-76.
- Pietsch, E. C., J. I. Leu, A. Frank, *et al.* (2007). The tetramerization domain of p53 is required for efficient BAK oligomerization. Cancer Biol Ther **6**(10): 1576-83.
- Polager, S., Y. Kalma, E. Berkovich, *et al.* (2002). E2Fs up-regulate expression of genes involved in DNA replication, DNA repair and mitosis. Oncogene **21**(3): 437-46.
- Pomerantz, J., N. Schreiber-Agus, N. J. Liegeois, *et al.* (1998). The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. Cell **92**(6): 713-23.
- Pozniak, C. D., S. Radinovic, A. Yang, *et al.* (2000). An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. Science **289**(5477): 304-6.
- Pützer, B. M., T. Stiewe, F. Crespo, *et al.* (2000). Improved safety through tamoxifen-regulated induction of cytotoxic genes delivered by Ad vectors for cancer gene therapy. Gene Ther **7**(15): 1317-25.
- Puthalakath, H. & A. Strasser (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. Cell Death Differ **9**(5): 505-12.
- Qin, X. Q., D. M. Livingston, W. G. Kaelin, Jr., *et al.* (1994). Deregulated transcription factor E2F-1 expression leads to S-phase entry and p53-mediated apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 10918-22.
- Racek, T., S. Buhlmann, F. Rust, *et al.* (2008). Transcriptional repression of the prosurvival endoplasmic reticulum chaperone GRP78/BIP by E2F1. J Biol Chem **283**(49): 34305-14.
- Reed, J. C. (1998). Bcl-2 family proteins. Oncogene **17**: 3225 - 3236.
- Roucou, X., S. Montessuit, B. Antonsson, *et al.* (2002). Bax oligomerization in mitochondrial membranes requires tBid (caspase-8-cleaved Bid) and a mitochondrial protein. Biochem J **368**(Pt 3): 915-21.
- Rozenblum, E., M. Schutte, M. Goggins, *et al.* (1997). Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. Cancer Res **57**(9): 1731-4.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press **2nd**.
- Samuel, T., K. Okada, M. Hyer, *et al.* (2005). cIAP1 Localizes to the nuclear compartment and modulates the cell cycle. Cancer Res **65**(1): 210-8.

- Sandelin, A., W. Alkema, P. Engstrom, *et al.* (2004). JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. Nucleic Acids Res **32**(Database issue): D91-4.
- Sansome, C., A. Zaika, N. D. Marchenko, *et al.* (2001). Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. Detection by immunofluorescence on whole cells. FEBS Lett **488**(3): 110-5.
- Sasaki, Y., H. Mita, M. Toyota, *et al.* (2003). Identification of the interleukin 4 receptor alpha gene as a direct target for p73. Cancer Res **63**(23): 8145-52.
- Sayan, A. E., B. S. Sayan, V. Gogvadze, *et al.* (2008). p73 and caspase-cleaved p73 fragments localize to mitochondria and augment TRAIL-induced apoptosis. Oncogene **27**(31): 4363-72.
- Schimmer, A. D. (2004). Inhibitor of Apoptosis Proteins: Translating Basic Knowledge into Clinical Practice. **64**: 7183-7190.
- Schuler, M., E. Bossy-Wetzler, J. C. Goldstein, *et al.* (2000). p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. J Biol Chem **275**(10): 7337-42.
- Seelan, R. S., M. Irwin, P. van der Stoop, *et al.* (2002). The human p73 promoter: characterization and identification of functional E2F binding sites. Neoplasia **4**(3): 195-203.
- Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. Mol Cell **9**(3): 459-70.
- Slade, N., A. I. Zaika, S. Erster, *et al.* (2004). DeltaNp73 stabilises TAp73 proteins but compromises their function due to inhibitory hetero-oligomer formation. Cell Death Differ **11**(3): 357-60.
- Smale, S. T. (1994). Core promoter architecture for eukaryotic protein-coding genes. In Transcription: Mechanisms and regulation (ed. Conaway, R.C. and Conaway, J.W.). Raven Press, New York: 63-81.
- Smale, S. T., M. C. Schmidt, A. J. Berk, *et al.* (1990). Transcriptional activation by Sp1 as directed through TATA or initiator: specific requirement for mammalian transcription factor IID. Proc Natl Acad Sci U S A **87**(12): 4509-13.
- Sorenson, C. M. & A. Eastman (1988). Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks. Cancer Res **48**(16): 4484-8.
- Sot, B., S. M. Freund & A. R. Fersht (2007). Comparative biophysical characterization of p53 with the pro-apoptotic BAK and the anti-apoptotic BCL-xL. J Biol Chem **282**(40): 29193-200.
- Stanelle, J. & B. M. Pützer (2006). E2F1-induced apoptosis: turning killers into therapeutics. Trends Mol Med **12**(4): 177-85.

- Stanelle, J., T. Stiewe, C. C. Theseling, *et al.* (2002). Gene expression changes in response to E2F1 activation. Nucleic Acids Res **30**(8): 1859-67.
- Stanelle, J., H. Tu-Rapp & B. M. Putzer (2005). A novel mitochondrial protein DIP mediates E2F1-induced apoptosis independently of p53. Cell Death Differ **12**(4): 347-57.
- Stiewe, T. & B. M. Pützer (2000). Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. Nat Genet **26**(4): 464-9.
- Stiewe, T. & B. M. Putzer (2000). Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. Nat Genet **26**(4): 464-9.
- Stiewe, T. & B. M. Putzer (2001). p73 in apoptosis. Apoptosis **6**(6): 447-52.
- Stiewe, T., C. C. Theseling & B. M. Pützer (2002). Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. J Biol Chem **277**(16): 14177-85.
- Stiewe, T., C. C. Theseling & B. M. Putzer (2002). Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. J Biol Chem **277**(16): 14177-85.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, N. Zamzami, *et al.* (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. Nature **397**(6718): 441-446.
- Tanaka, H., I. Matsumura, S. Ezoe, *et al.* (2002). E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF-kappaB activity that facilitates MnSOD-mediated ROS elimination. Mol Cell **9**(5): 1017-29.
- Thornborrow, E. C., S. Patel, A. E. Mastropietro, *et al.* (2002). A conserved intronic response element mediates direct p53-dependent transcriptional activation of both the human and murine bax genes. Oncogene **21**(7): 990-9.
- Thottassery, J. V., L. Westbrook, H. Someya, *et al.* (2006). c-Abl-independent p73 stabilization during gemcitabine- or 4'-thio-beta-D-arabinofuranosylcytosine-induced apoptosis in wild-type and p53-null colorectal cancer cells. Mol Cancer Ther **5**(2): 400-10.
- Tomita, Y., N. Marchenko, S. Erster, *et al.* (2006). WT p53, but not tumor-derived mutants, bind to Bcl2 via the DNA binding domain and induce mitochondrial permeabilization. J Biol Chem **281**(13): 8600-6.
- Trimarchi, J. M., B. Fairchild, J. Wen, *et al.* (2001). The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1519-24.
- Tuve, S., T. Racek, A. Niemetz, *et al.* (2006). Adenovirus-mediated TA-p73beta gene transfer increases chemosensitivity of human malignant melanomas. Apoptosis **11**(2): 235-43.
- Vayssade, M., H. Haddada, L. Faridoni-Laurens, *et al.* (2005). p73 functionally replaces p53 in Adriamycin-treated, p53-deficient breast cancer cells. Int J Cancer **116**(6): 860-9.

- Verhagen, A. M., P. G. Ekert, M. Pakusch, *et al.* (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. Cell **102**(1): 43-53.
- Vousden, K. H. (2005). Apoptosis. p53 and PUMA: a deadly duo. Science **309**(5741): 1685-6.
- Vousden, K. H. & D. P. Lane (2007). p53 in health and disease. Nat Rev Mol Cell Biol **8**(4): 275-83.
- Wang, X., M. Li, J. Wang, *et al.* (2006). The BH3-only protein, PUMA, is involved in oxaliplatin-induced apoptosis in colon cancer cells. Biochem Pharmacol **71**(11): 1540-50.
- Wolff, S., S. Erster, G. Palacios, *et al.* (2008). p53's mitochondrial translocation and MOMP action is independent of Puma and Bax and severely disrupts mitochondrial membrane integrity. Cell Res **18**(7): 733-44.
- Wolter, K. G., Y. T. Hsu, C. L. Smith, *et al.* (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. J Cell Biol **139**(5): 1281-92.
- Wu, X. & A. J. Levine (1994). p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3602-6.
- Wu, Y., J. W. Mehew, C. A. Heckman, *et al.* (2001). Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. Oncogene **20**(2): 240-51.
- Xiong, Y., G. J. Hannon, H. Zhang, *et al.* (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. Nature **366**(6456): 701-4.
- Xue, L., F. Chu, Y. Cheng, *et al.* (2002). Siva-1 binds to and inhibits BCL-X(L)-mediated protection against UV radiation-induced apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A **99**(10): 6925-30.
- Yamasaki, L., T. Jacks, R. Bronson, *et al.* (1996). Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. Cell **85**(4): 537-48.
- Yang, A., M. Kaghad, D. Caput, *et al.* (2002). On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. Trends Genet **18**(2): 90-5.
- Yang, A., N. Walker, R. Bronson, *et al.* (2000). p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. Nature **404**(6773): 99-103.
- Yin, X. M., Z. N. Oltvai, D. J. Veis-Novack, *et al.* (1994). Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death. Cold Spring Harb Symp Quant Biol **59**: 387-93.
- Yu, J., L. Zhang, P. M. Hwang, *et al.* (2001). PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. Mol Cell **7**(3): 673-82.

Zaika, A. I., N. Slade, S. H. Erster, *et al.* (2002). DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. J Exp Med **196**(6): 765-80.

Zhang, Y., Y. Xiong & W. G. Yarbrough (1998). ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. Cell **92**(6): 725-34.

Zhu, J., J. Jiang, W. Zhou, *et al.* (1998). The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. Cancer Res **58**(22): 5061-5.

Zipp, F. (2000). Apoptosis in multiple sclerosis. Cell Tissue Res **301**(1): 163-71.

Zoratti, M. & I. Szabo (1995). The mitochondrial permeability transition. Biochim Biophys Acta **1241**(2): 139-76.

Anhang

Die Sequenzen der *GRAMD4*-Promotorkonstrukte (Volllänge bzw. 5'-Deletionsmutanten) sind mit den putativen p53/p73-Bindestellen (grau hervorgehoben; nach <http://jaspar.genereg.net/>) im Folgendem abgebildet. Die Konstruktion des Vollängenpromotors erfolgte unter Verwendung des Bac Klons # RPCI-3-439F8 von BACPAC Resources (Oakland, CA, USA) und sequenzspezifischer Oligonukleotide (2.1.6.5). Die Sequenzen der putativen p53/p73-Bindestellen, deren Position innerhalb des Vollängenpromotors und deren Homologie in % zu der p53-Konsensussequenz sind in Tab. 1 aufgelistet. Die ersten 8 Nukleotide des Exons 1 sind rot hinterlegt.

GRAMD4-Vollängenpromotor (2072 kbp)

Der Vollängenpromotor enthält 13 putative p53/p73-Bindestellen.

```

-2064 CCTATATGGG AAGCTTTTCC AAATGGCTGG CTCATGCTCC CTCAGCCTAT
-2014 GAGCAGCAGT TGCTACCTCC CCATCACCCA CATCCCCCTC CTGGGGTCCT
-1964 CCCAGCTTCC AGGGGATGCT GGGCATCAGG ACAGCTCCCC GTAGAGCCTG
-1914 TGTCTGTGG GATTTTTTTT TTTTTTTTTT TTGAGACAGA GTCTCGCTCT
-1864 GTCACCCAGG CTGGAGTGCA GTGGCGGGAT CTCAGCTCAC TTCAAGCTCC
-1814 GCCTCCTGGG TTCATGCCAT TCTCCTGCCT CAGCCTCCTG AGTAGCTGGG
-1764 ACTACAGGCG CCCACCACCA CGCCCGGCTA ATTTTTTGTA TTTTATAGTAG
-1714 AGATGGGGTT TCACCGTGTC AGCCAAGATG GTCTCAATCT CCTGACCTTG
-1664 TGATCCGCCC GCCTCGGCCT CCCAAAGTGC TGAATTACA GCGGTGAGCC
-1614 ACCGCGCCCA GCGTCTGTG GGTTTTGAG CAGGGCCGGC ATCAGGAATA
-1564 CTCAAGTGCC CATCCAGGA GAGCCTCCCC TCCCCTCACC ATGCTGGGAA
-1514 CCTCCGCGCC TCTGTGGCTC AGAGTGGGTT CTAGTGCCTT CTGTGTCTTC
-1464 GGTCTCACT GTTAATGAGT CTTCTTGCCA CGAACTGTGA TGCTGAGGAG
-1414 AGCGGAGGAG GCTTTGGGGG CGGGGCAGGC ATGTAGGAGC TGGAGCTGAC
-1364 CTTGCTCTCA GTGCTTCCTT GCCATGCTGC CCGCCCAAG CAGGAAGTTT
-1314 GGGAAATACC CCCGCCAGGG ATCACTCCCC GCCCATCTC CTTGCTCCTG
-1264 GCCCAGTTGC CCTGTCTTCT TGAATTCCTG GATACCTTTG CCTTACTGGC
-1214 ATCTTTCCAT TTTCAGAGGC AAAAATGTCA GCTCAGAAAAG CTGGTCAGTG
-1164 GCAGGACAGG CTTTCAGCCC AGGTGTGTAC AGAGCAGTCC TCCCACGGGG
-1114 ACCCAGTTGT CTTGGACAAG TTGGGGACGG GGTTTTGGGA GAGGCATCCA
-1064 GGCCATGGAG CTGCGTGATG GGGCTGGGGC TGGGTGGCCT CTCCTGCCT
-1014 GGCTGGCCCC TCCTGTGGGC CACTGATCCT GGCCTCCAGG CTTTGGGGG
-964 TGCCTTGGTG TTGCTGGCCA GGTGCGGCAG CGATGTGGGG AGCAGTACCC
-914 CACGGCACAT CCGCCCTTTG GCACGTGGTG TGTGTGAATT ACGCGTGTCC
-864 TGATGCAGCA CACAGTGA CTGCACCTCAG TGTGACCAGG TTTCTGTGTT
-814 GATTGGAGGA GGAGGCAGGC ATGGGGGCTG GGACAGGAGG CCCAGCTGGC
-764 CATGGGTGCC TGACCCCGCT GTCTCTGGGA GGGCTTCTGG GAGGTGGTGC
-714 GATCTGAATG TGTCTCAGAG TATGAGCCTG GTCGCATGGC GAGTAGGAAC
-664 ACGCTTTAGG CAGAGGGAGC AGTGTGGGCG GAGTCCTGGG AGCGGGGCC
-614 AGGTGGAGCA GGTGGGACAC AAGGCCAGGT CCCCTAGGTC CAGGAGAGAA
-564 TCAACCGAGG CATCCCTAGC ACACGCATCT GCTGGTTTCC AGGCGTGGCT
-514 GCCGTCCTGG TGGTGTATGT GGCCGTCGTG TTGACCACGT TCTTGACGGT
-464 TTGTTAGGCA ACCTTTTGGC ATGGCTGGCC CTCCTTCCCA ATGCCAGAGC

```

```

-414 AGCATTCTTC CCTTGCGCCT GCGCGCCGCC TCGCCGAGCC AGGCTGAGAA
-364 CCCTGGCTTC CTTCTGCCTG CTGGGAGCCG GGGGCCTCGC TTGGTGGGAG
-314 GCAAGGACGC AGCTCAGCAC TGACCAGGCT GGCCTGGGTG GGGTGGCCAA
-264 GGGCCCCACC TGATGGGTGC AGGGCGGGGG TCTCTGGGTC GGGGTTTTCT
-214 TTGGAAAGCT GGACCGGCCG TGCCCTGCGT GTGGGAGCTG GCTCGTGGGG
-164 CTTGGAGGTG TGTGTGGGAG GGACGGTGGC AGGGCGGGGT CTCTGGGTGC
-114 GGGTTTTCTT TGGAAAGCTG GACCGGCTGT GCCCTGTGTG TGGGAGCTGG
-64 CTCGTGGGGC TTGGAGGTGG CGAGCGGGAG AGTGACCACG CCCCTCTCTT
-14 GCAGGGAACC CGAGCGTCAT GT

```

GRAMD4-5'-Deletionsmutante (1369 kbp)

Die *GRAMD4-5'*-Deletionsmutante (1369 kbp) enthält 8 putative p53/p73-Bindestellen.

```

-1361 GCTCTCAGTG CTTCTTGCC ATGCTGCCCG CCCCAAGCAG GAAGTTGGG
-1311 AAATACCCCC GCCAGGGATC ACTCCCCGCC CCATCTCCTT GCTCCTGGCC
-1261 CAGTTGCCCT GTCTTCTTGA ATTCCTGGAT ACCTTTGCCT TACTGGCATC
-1211 TTTCCATTTT CAGAGGCAA AATGTCAGCT CAGAAAGCTG GTCAGTGGCA
-1161 GGACAGGCTT TCAGCCCAGG TGTGTACAGA GCAGTCCTCC CACGGGGACC
-1111 CAGTTGTCTT GGACAAGTTG GGGACGGGGT TTTGGGAGAG GCATCCAGGC
-1061 CATGGAGCTG CGTGATGGGG CTGGGGCTGG GTGGCCTCTC CCTGCCTGGC
-1011 TGGCCCCTCC TGTGGGCCAC TGATCCTGGC CTCCAGGCTT TTGGGGGTGC
-961 CTTGGTGTG CTGGCCAGGT CGGGCAGCGA TGTGGGGAGC AGTACCCAC
-911 GGCACATCCG CCCTTTGGCA CGTGGTGTGT GTGAATTACG CGTGTCTGA
-861 TGCAGCACAC AGTGA CTGC ACCTCAGTGT GACCAGGTTT CTGTGTGAT
-811 TGGAGGAGGA GGCAGGCATG GGGGCTGGGA CAGGAGGCC AGCTGGCCAT
-761 GGGTGCCTGA CCCCCTGTC TCTGGGAGGG CTTCTGGGAG GTGGTGCAT
-711 CTGAATGTGT CTCAGAGTAT GAGCCTGGTC GCATGGCGAG TAGGAACACG
-661 CTTTAGGCAG AGGGAGCAGT GTGGGCGGAG TCCTGGGAGC CGGGGCCAGG
-611 TGGAGCAGGT GGGACACAAG GCCAGGTCCC CTAGGTCCAG GAGAGAATCA
-561 ACCGAGGCAT CCCTAGCACA CGCATCTGCT GGTTCAGG CGTGGCTGCC
-511 GTCCTGGTGG TGTATGTGGC CGTCTGTGTTG ACCACGTTCT TGACGTTTG
-461 TTAGGCAACC TTTTGGCATG GCTGGCCCTC CTTCCCAATG CCAGAGCAGC
-411 ATTCTTCCCT TGCCTGCTG CGCCGCTCG CCGAGCCAGG CTGAGAACCC
-361 TGGCTTCCCT CTGCCTGCTG GGAGCCGGGG GCCTCGCTTG GTGGGAGGCA
-311 AGGACGCAGC TCAGCACTGA CCAGGCTGGC CTGGGTGGGG TGGCCAAGGG
-261 CCCACCTGA TGGGTGCAGG GCGGGGGTCT CTGGGTCGGG GTTTTCTTTG
-211 GAAAGCTGGA CCGGCCGTGC CCTGCGTGTG GGAGCTGGCT CGTGGGGCTT
-161 GGAGGTGTGT GTGGGAGGGA CGGTGGCAGG GCGGGGTCTC TGGGTGCGGG
-111 TTTTCTTTGG AAAGCTGGAC CGGCTGTGCC CTGTGTGTGG GAGCTGGCTC
-61 GTGGGGCTTG GAGGTGGCGA GCGGGAGAGT GACCACGCC CTCTCTTGCA
-11 GGGAAACCGA GCGTCATGT

```

GRAMD4-5'-Deletionsmutante (1303 kbp)

Die *GRAMD4-5'*-Deletionsmutante (1303 kbp) enthält 7 putative p53/p73-Bindestellen.

```

-1295 GATCACTCCC CGCCCCATCT CCTTGCTCCT GGCCCAGTTG CCCTGTCTTC
-1245 TTGAATTCCT GGATACCTTT GCCTTACTGG CATCTTTCCA TTTTCAGAGG
-1195 CAAAAATGTC AGCTCAGAAA GCTGGTCAGT GGCAGGACAG GCTTTCAGCC
-1145 CAGGTGTGTA CAGAGCAGTC CTCCACGGG GACCCAGTTG TCTTGGACAA

```



```

-1095 GTTGGGGACG GGGTTTTGGG AGAGGCATCC AGGCCATGGA GCTGCGTGAT
-1045 GGGGCTGGGG CTGGGTGGCC TCTCCCTGCC TGGCTGGCCC CTCCTGTGGG
-995 CCACTGATCC TGGCCTCCAG GCTTTTGGGG GTGCCTTGGT GTTGCTGGCC
-945 AGGTCGGGCA GCGATGTGGG GAGCAGTACC CCACGGCACA TCCGCCCTTT
-895 GGCACGTGGT GTGTGTGAAT TACGCGTGTC CTGATGCAGC ACACAGTGAC
-845 TCGCACCTCA GTGTGACCAG GTTTCTGTGT TGATTGGAGG AGGAGGCAGG
-795 CATGGGGGCT GGGACAGGAG GCCCAGCTGG CCATGGGTGC CTGACCCCGC
-745 TGTCTCTGGG AGGGCTTCTG GGAGGTGGTG CGATCTGAAT GTGTCTCAGA
-695 GTATGAGCCT GGTCGCATGG CGAGTAGGAA CACGCTTTAG GCAGAGGGAG
-645 CAGTGTGGGC GGAGTCCTGG GAGCCGGGGC CAGGTGGAGC AGGTGGGACA
-595 CAAGGCCAGG TCCCCTAGGT CCAGGAGAGA ATCAACCGAG GCATCCCTAG
-545 CACACGCATC TGCTGGTTTC CAGGCGTGGC TGCCGTCCTG GTGGTGTATG
-495 TGGCCGTCGT GTTGACCACG TTCTTGACGG TTTGTTAGGC AACCTTTTGG
-445 CATGGCTGGC CCTCCTTCCC AATGCCAGAG CAGCATTCTT CCCTTGCGCC
-395 TGCGCGCCGC CTCGCCGAGC CAGGCTGAGA ACCCTGGCTT CCTTCTGCCT
-345 GCTGGGAGCC GGGGGCCTCG CTTGGTGGGA GGCAAGGACG CAGCTCAGCA
-295 CTGACCAGGC TGGCCTGGGT GGGGTGGCCA AGGGCCCCAC CTGATGGGTG
-245 CAGGGCGGGG GTCTCTGGGT CGGGGTTTTT TTTGGAAAGC TGGACCGGCC
-195 GTGCCCTGCG TGTGGGAGCT GGCTCGTGGG GCTTGGAGGT GTGTGTGGGA
-145 GGGACGGTGG CAGGGCGGGG TCTCTGGGTC GGGGTTTTCT TTGGAAAGCT
-95 GGACCGGCTG TGCCCTGTGT GTGGGAGCTG GCTCGTGGGG CTTGGAGGTG
-45 GCGAGCGGGA GAGTGACCAC GCCCCTCTCT TGCAGGGAAC CCGAGCGTCA
+6 TGT

```

GRAMD4-5'-Deletionsmutante (609 kbp)

Die *GRAMD4-5'*-Deletionsmutante (609 kbp) enthält 6 putative p53/p73-Bindestellen.

```

-601 GGGACACAAG GCCAGGTCCC CTAGGTCCAG GAGAGAATCA ACCGAGGCAT
-551 CCCTAGCACA CGCATCTGCT GGTTCACAG CGTGGCTGCC GTCCTGGTGG
-501 TGTATGTGGC CGTCGTGTTG ACCACGTTCT TGACGGTTTG TTAGGCAACC
-451 TTTTGGCATG GCTGGCCCTC CTTCCCAATG CCAGAGCAGC ATTCTTCCCT
-401 TGCGCCTGCG CGCCGCCTCG CCGAGCCAGG CTGAGAACC TGGCTTCCTT
-351 CTGCCCTGCTG GGAGCCGGGG GCCTCGCTTG GTGGGAGGCA AGGACGCAGC
-301 TCAGCACTGA CCAGGCTGGC CTGGGTGGGG TGGCCAAGGG CCCACCTGA
-251 TGGGTGCAGG GCGGGGTCT CTGGGTCGGG GTTTTCTTTG GAAAGCTGGA
-201 CCGGCCGTGC CCTGCGTGTG GGAGCTGGCT CGTGGGGCTT GGAGGTGTGT
-151 GTGGGAGGGA CGGTGGCAGG GCGGGGTCTC TGGGTCGGGG TTTTCTTTGG
-101 AAAGCTGGAC CGGCTGTGCC CTGTGTGTGG GAGCTGGCTC GTGGGGCTTG
-51 GAGGTGGCGA GCGGGAGAGT GACCACGCC CTCTCTTGCA GGAACCCGA
-1 GCGTCATGT

```

GRAMD4-5'-Deletionsmutante (438 kbp)

Die *GRAMD4-5'*-Deletionsmutante (438 kbp) enthält 4 putative p53/p73-Bindestellen.

```

-430 TTCCCAATGC CAGAGCAGCA TTCTTCCCTT GCGCCTGCGC GCCGCCTCGC
-380 CGAGCCAGGC TGAGAACCCT GGCTTCCTTC TGCCTGCTGG GAGCCGGGGG
-330 CCTCGCTTGG TGGGAGGCAA GGACGCAGCT CAGCACTGAC CAGGCTGGCC
-280 TGGGTGGGGT GGCCAAGGGC CCCACCTGAT GGGTGCAGGG CGGGGGTCTC
-230 TGGGTCGGGG TTTTCTTTGG AAAGCTGGAC CGGCCGTGCC CTGCGTGTGG

```

```
-180 GAGCTGGCTC GTGGGGCTTG GAGGTGTGTG TGGGAGGGAC GGTGGCAGGG  
-130 CGGGGTCTCT GGGTCGGGGT TTTCTTTGGA AAGCTGGACC GGCTGTGCCC  
-80 TGTGTGTGGG AGCTGGCTCG TGGGGCTTGG AGGTGGCGAG CGGGAGAGTG  
-30 ACCACGCCCC TCTCTTGCAG GGAACCCGAG CGTCATGT
```

GRAMD4-5'-Deletionsmutante (85 kbp)

Die *GRAMD4-5'*-Deletionsmutante (85 kbp) enthält keine der 13 putativen p53/p73-Bindestellen.

```
-77 GTGTGGGAGC TGGCTCGTGG GGCTTGGAGG TGGCGAGCGG GAGAGTGACC  
-27 ACGCCCCTCT CTTGCAGGGA ACCCGAG CGT CATGT
```

Danksagung

In erster Linie möchte ich Frau Prof. Dr. Dr. Pützer für die Möglichkeit der Anfertigung dieser interessanten Arbeit in ihrer Abteilung, für die Diskussionsbereitschaft, guten Hinweise sowie Korrektur der Arbeit danken.

Ein großes Dankeschön geht an all die Leute in der Vektorologie, die mich im Verlaufe meiner Promotion begleitet haben (und mich ertragen mussten ☺). Ein gigantöses Dankeschön und eine Elefantenumarmung gehen hierbei an meine Lieblings-TA Anja Stoll, auf deren wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Unterstützung ich sowohl an guten als auch schlechten Laboralltagen immer zählen konnte. Ich sage nur: „Blutsbrüderschaft“. Des Weiteren danke ich Vijay Alla und Claudia Meier, die mich bei der Anfertigung meiner Veröffentlichung so tatkräftig unterstützt haben. Weiterhin bedanke ich mich bei Annett Niemetz, Sven Buhlmann, Julia Schulz, Anke Schmidt und Ingrid Winkler.

Es war eine tolle Zeit mit Euch.

Eine Mammutumarmung geht auch an all meine Bekannten und Freunde, allen voran Marion und Julia Eisenhut, Claudia Meier und Anja Sellin die meine Stimmungsschwankungen, die man während einer Doktorarbeit durchmacht, mit Gelassenheit, Rat und Tat ertragen haben.

Ein großes Dankeschön geht auch in Richtung der Mikrobiologie mit all den netten Leuten, die mich im letzten Jahr mit offenen Armen empfangen haben.

DANKE, DANKE, DANKE.

Mein größter Dank, der nicht in Worte fassen ist, gilt meinen wunderbaren Eltern, Annegret und Roland John, meinen grandiosen Brüdern, Micha und Andi, die immer hinter ihrer kleinen Schwester stehen, meinen tollen Schwägerinnen, Maren und Romana, meinen fantastischen Nichten Celine, Michelle und Lilly, meinen knuffigen Neffen Piet und meinen Lebensgefährten Dirk. Ich danke Euch für die grenzenlose moralische Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vorname: Katja
Nachname: John
Geburtsdatum: 02.06.1978
Geburtsort: Teterow
Familienstand: ledig

Werdegang

8/2011-1/2012	wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Uppsala, Schweden
4/2011-7/2011	Agentur für Arbeit
3/2011	wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Abteilung Mikrobiologie
1/2011-2/2011	Agentur für Arbeit
9/2009-12/2010	wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Abteilung Mikrobiologie
2005-2009	Promotionsstudium an der Universität Rostock, Medizinische Fakultät, BMFZ, Vektorologie und Experimentelle Gentherapie
2004	Diplom, Prädikat 1,8
2000-2004	Hauptstudium an der Universität Rostock, Schwerpunkte: Mikrobiologie, Molekularbiologie, Biochemie, Biotechnologie Diplomarbeit: <i>Sphagnum</i> -assoziierte Mikroorganismen-Analyse des antagonistischen Potentials entlang von Gradienten
1999-2000	Hauptstudium an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Schwerpunkte: Mikrobiologie, Molekularbiologie, Biochemie
1997-1999	Grundstudium
1997	Immatrikulation an der Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Studiengang Biologie
1991-1997	Gymnasium Malchin Abschluss: Abitur
1985-1991	W. J. Lenin Schule Malchin

Publikationen

Tannapfel A, **John K**, Mise N, Schmidt A, Buhlmann S, Ibrahim SM, and Putzer BM. (2008). Autonomous growth and hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing the p53 family inhibitor DNp73. Carcinogenesis, **29**, 211-218.

Emmrich S, Wang W, **John K**, Li W, Pützer BM. (2009). Antisense gapmers selectively suppress individual oncogenic p73 splice isoforms and inhibit tumor growth in vivo. Mol. Cancer; **8**(1):61.

John K, Alla V, Meier C, Pützer BM. (2010). GRAMD4 mimics p53 and mediates the apoptotic function of p73 at the mitochondria. Cell Death & Differentiation

Konferenzbeiträge (Poster/Vorträge)

John K, Tannapfel A, Miše N, Schmidt A, Buhlmann S, Ibrahim SM, Pützer BM. Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in DNp73-transgenic mice: Significance of N-terminally truncated p73 species for liver cancer therapy. Hong Kong-Shanghai International Liver Congress (ILC) 2008, Hong Kong (2008).

Buhlmann S, Racek T, **John K**, Schaefer S, Pützer BM. Differential regulation of hepatitis B virus core promoter/enhancer II by TAp73 and its oncogenic counterpart DNp73: Implications for hepatocarcinogenesis. Hong Kong-Shanghai International Liver Congress (ILC) 2008, Hong Kong (2008).

Schmidt A, Alla V, Buhlmann S, **John K**, Niemetz A, Engelmann D, Emmrich S, Rimpler U, Knoll S, Stoll A, Pützer BM. Krebstherapie kennt kein Einheitsprinzip: Molekulare Tumordiagnostik als Grundlage für die Entwicklung zielgerichteter Krebstherapeutika. LNdW, Rostock, Germany (2008).

Erklärung der Selbstständigkeit

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Katja John

Rostock, den 24.02.2011