

Aus der Klinik für Chirurgie der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H.-P. Bruch

**p53 Induktion
humaner kolorektaler Tumorzelllinien
- eine Multiproteomanalyse -**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
Aus der Medizinischen Fakultät

Vorgelegt von
Kaja Zimmermann
aus Schwanewede

Lübeck 2009

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Dr. phil. Uwe Roblick

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Nils Homann

Tag der mündlichen Prüfung: 01.06.2010

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 01.06.2010

Danksagung:

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben. Insbesondere geht mein Dank an:

Herrn Professor Dr. H.-P. Bruch für die Möglichkeit, die Dissertation an der Klinik für Chirurgie des UK-SH Campus Lübeck zu erarbeiten.

Herrn PD Dr. Dr. U. J. Roblick für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie für seine hervorragende fachliche Betreuung. Ohne seine ausgezeichnete Einweisung in das Forschungsgebiet, seine unzähligen Anregungen, seine Unterstützung und seine ständige Bereitschaft, mir bei Problemen zur Seite zu stehen, wäre die Dissertation nicht in dieser Form möglich gewesen. Auch hat er mir ermöglicht, die wunderbare Stadt Stockholm von einer ganz besonderen Seite kennen zu lernen.

Herrn Prof. Dr. G. Auer für die Möglichkeit, Teile der Dissertation im Labor der Unit of Cancer Proteomics, Div. of Cellular and Molecular Tumour Pathology, Department of Oncology and Pathology, Cancer Center Karolinska, Karolinska Institute and Hospital, Stockholm, Schweden erstellen zu können.

Mein Dank gilt ebenfalls den Mitarbeitern im Labor der Unit of Cancer Proteomics, Cancer Center Karolinska, Karolinska Institute and Hospital, Stockholm, Schweden. Insbesondere möchte ich mich hier bei Frau Susanne Becker bedanken. Sie hat mit viel Zeit ihr großes Fachwissen mit mir geteilt und mich auf eine ganz wunderbare Weise in die Grundlagen der 2D-Elektrophorese eingeführt. Ihrer besonderen Art ist es zu verdanken, dass ich meine Aufenthalte in Stockholm gerne immer weiter ausgedehnt hätte.

Auch möchte ich mich bei Frau Vera Grobleben aus dem Labor der Klinik für Chirurgie des UK-SH Campus Lübeck bedanken. Sie trug durch ihre Mitarbeit und ihr Fachwissen in der Zellkultur viel zum Gelingen der Arbeit bei.

Den Professoren Ulf Hellman und Hans Jörnvall für die statistische Auswertung und massenspektrometrische Analyse zur Identifikation der detektierten Proteine im Ludwig Institute for Cancer Research in Uppsala und im Institut für Biophysik am Karolinska Institut in Stockholm gilt ebenfalls mein besonderer Dank.

Weiterhin möchte ich mich bei der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck bedanken, die meine Dissertation im Rahmen des Promotions-Stipendiums „Experimentelle Medizin“ unterstützt hat.

Insbesondere möchte ich meinen Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist, danken. Sie haben mir die Universitätsausbildung ermöglicht und standen mir jederzeit und in jeder Hinsicht zur Seite.

Inhaltsverzeichnis (Seite)

1. Einleitung

- 1.1 Molekulare Grundlagen der Malignomentstehung (8)
- 1.2 Molekulare Mechanismen der Kolonkarzinogenese (KRK)
 - 1.2.1 Chromosomale Instabilität (CIN) und Mikrosatelliteninstabilität (MSI) (10)
 - 1.2.2 Das Vogelsteinmodell – Prinzipien der Adenom-Karzinom-Sequenz (10)
 - 1.2.3 Molekulare Pathomechanismen in der Tumorprogression des KRK (12)
- 1.3 P53 – “the Guardian of the Genome”
 - 1.3.1 Entdeckung und Bedeutung (15)
 - 1.3.2 Mutationen in kolorektalen Karzinomen und anderen Tumoren (17)
 - 1.3.3 Regulation (17)
 - 1.3.4 Targetgene (20)
 - 1.3.5 Zellzyklus - Arrest oder Apoptose? (22)
 - 1.3.6 P53 als therapeutisches Target (23)
- 1.4 Das kolorektale Karzinom (KRK)
 - 1.4.1. Epidemiologie (25)
 - 1.4.2. Histopathologie, Klassifikation und Prognose (26)
- 1.5 Cancer Proteomics (27)

2. Ziel der Arbeit (29)

3. Material und Methoden

- 3.1. Charakteristika der kolorektalen Zelllinien HCT 116 p53 +/- und HCT 116 p53 -/- (30)
- 3.2 Vorbehandlung der Zelllinien
 - 3.2.1 Kultur (30)

- 3.2.2 Zytostatikabehandlung mit Mitomycin C (MMC) (31)
- 3.3 Western-Blot Analysen (31)
- 3.4 PCR-Analysen (32)
- 3.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese
 - 3.5.1 Grundlagen (32)
 - 3.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung (33)
 - 3.5.3 Probenaufbearbeitung („Solubilisierung“) (33)
 - 3.5.4 Isoelektrische Fokussierung - 1. Dimension (33)
 - 3.5.5 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese - 2.Dimension (35)
- 3.6 Färbemethoden
 - 3.6.1 Silberfärbung (36)
 - 3.6.2 Sypro-Ruby Färbung (36)
 - 3.6.3 Pro-Q-Diamond Färbung (37)
- 3.7 Computergestützte Bildanalyse
 - 3.7.1 Detektion der Proteinspots im Gel (38)
 - 3.7.2 Matchseterstellung (39)
 - 3.7.3 Analyse des Matchsets (42)
- 3.8 Statistische Evaluation – Mann-Whitney-U-Test (42)
- 3.9 Massenspektrometrische Identifikation
 - 3.9.1 Grundlagen (43)
 - 3.9.2 „Spot-Picking“ und enzymatische Proteinfragmentierung (in gel-digestion) (45)
 - 3.9.3 MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) (45)
- 3.10 Promotoranalysen (46)

4. Ergebnisse

- 4.1. Versuchsaufbau I – Mitomycin C Behandlung
 - 4.1.1 Western-Blot Analyse zur Überprüfung der Zelllinien HCT 116 +/- und -/- (47)

- 4.1.2 2D-Gelelektrophorese (47)
 - 4.1.3 Validierung der Ergebnisse mittels Western-Blot (51)
 - 4.1.4 Validierung der Ergebnisse mittels PCR (51)
 - 4.1.5 Promotoranalysen der kodierenden Gene (52)
- 4.2 Versuchsaufbau II – Nachweis p53 abhängiger Phosphorylierungen
 - 4.2.1 Western-Blot Analyse zur Überprüfung der Zelllinien HCT 116 +/- und HCT 116 -/- (53)
 - 4.2.2 2D-Gelelektrophorese (54)
 - 4.2.3 Validierung der Ergebnisse mittels Western-Blot (57)
- 5. Diskussion (58)**
- 6. Zusammenfassung (68)**
- 7. Literaturverzeichnis (69)**
- 8. Anhang (88)**
- 9. Lebenslauf (89)**

1. Einleitung

1.1 Molekulare Grundlagen der Malignomentstehung

Maligne Tumoren sind sehr heterogene Erkrankungen. Allen gemein ist die Fähigkeit proliferationslimitierende Grenzen zu überwinden. Unabdingbare Voraussetzung hierfür sind Veränderungen innerhalb der Regulation einer begrenzten Anzahl von „Schlüssel-Pathways“, welche z.B. die Zellproliferation und das Überleben einer Zelle respektive den „programmierten Zelltod“ (Apoptose) kontrollieren. Dysregulationen im Prozess der Zellproliferation sowie die Suppression der Apoptose sind wichtige Grundlagen der Tumorprogression (52). Hanahan und Weinberg postulierten die sechs Säulen der malignen Transformation:

- Unabhängigkeit von Wachstumsregulation,
- ungehinderte Proliferation,
- unlimitedes Replikationsvermögen,
- Angiogenese,
- Invasionsfähigkeit und Metastasierungspotenz (86).

Konsekutiv entstehen maligne Neoplasien aus Vorläuferzellen, in denen sich Mutationen ereignen, woraufhin die Zellen transformieren und ungeordnet proliferieren können. Durch klonale Expansion entstehen Zellklone, innerhalb derer sich durch weitere genetische Veränderungen potentiell zur malignen Transformation befähigte Zellpopulationen bilden können. Als Voraussetzung für das Entstehen von Tumoren wird die Addition verschiedener Mutationsergebnisse betrachtet (71, 103). Angesichts einer hohen Zellmutationsrate und einer im Vergleich relativ seltenen Malignomentstehung deutet vieles auf effektive Reparatur- und Eliminationsmechanismen für mutierte Zellen hin (140). Die maligne Transformation gelingt somit erst, wenn diese Kontroll- und Regelmechanismen in ihrer Funktion eingeschränkt oder blockiert sind (54).

Charakteristisch für maligne Tumoren sind zwei Arten von Mutationen. Zum einen kann ein die Proliferation förderndes Gen (Proto-Onkogen) durch eine Mutation in eine hyperaktive Form überführt werden. Da diese Art von Mutation einen

dominanten Effekt hat, scheint das Auftreten in nur einer der beiden Genkopien für eine maligne Transformation auszureichen. Ein derartig verändertes Gen wird als Onkogen bezeichnet. Eine zweite Mutationsart führt zu einer Inaktivierung eines inhibitorisch wirkenden Gens, einem sogenannten Tumorsuppressorgen. In diesem Fall müssen jedoch beide Genkopien einer Mutation unterliegen, um die Funktion des Gens zu unterbinden (103). Die Inaktivierung des zweiten Allels eines Tumorsuppressorgens durch Rekombination, Deletion oder andere strukturelle Veränderungen wurde ursprünglich als LOH - loss of heterozygosity – bezeichnet.

1.2 Molekulare Mechanismen der Kolonkarzinogenese (KRK)

1.2.1 Chromosomale Instabilität (CIN) und Mikrosatelliteninstabilität (MSI)

Kolorektale Karzinome (KRK) sind, wie die meisten anderen Karzinome auch, durch molekulare Veränderungen charakterisiert (57). Diese werden bei Kolonkarzinomen in zwei große Kategorien unterteilt: Chromosomale Instabilität (CIN) und Mikrosatelliteninstabilität (MSI). Bislang wurde vermutet, dass bis zu 85-90% aller KRK ihren Ursprung in chromosomaler Instabilität nehmen, während nur für die verbleibenden 10-15% die Mikrosatelliteninstabilität als Ursache angenommen wurde. Neuere Studien belegen jedoch, dass der Karzinogenese des KRK kompliziertere Mechanismen zu Grunde liegen (90, 94).

In einer großen Anzahl an Tumoren kann ein abnormaler Chromosomensatz gemessen werden (Aneuploidie). Aneuploidie ist charakterisiert durch Veränderungen in der Struktur und Anzahl an Chromosomen (25). Sie beruht auf chromosomaler Instabilität (CIN), aufgrund derer Tumorzellen Chromosomen oder chromosomale Anteile entweder hinzugewinnen oder verlieren. Es wird angenommen, dass die CIN im Laufe der Karzinogenese zeitlich undeterminiert auftritt und dann die Mutationsrate der Tumorzellen beschleunigt (73).

Das Mismatch-Repair-System (MMR System) ist eine Einheit aus verschiedenen Proteinen (hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH6), die für die Reparatur von DNA-Schäden verantwortlich ist. Defekte in Genen des MMR-Systems führen zu einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI), worunter das Auftreten von Längenveränderungen repetitiver Nukleotidsequenzen verstanden wird (27, 62, 135, 136, 142). Die MSI zeigt sich bei etwa 10-15% der sporadischen Kolonneoplasien und kann bei der Mehrheit von HNPCC Tumoren (**hereditary non-polyposis colorectal cancer**) nachgewiesen werden (1, 188). Tumoren mit MSI zeigen im Vergleich zu MMR stabilen Tumoren charakteristische Merkmale. So sind diese Tumore häufiger im proximalen Kolon lokalisiert, histologisch weniger differenziert und zeigen einen früheren Lymphknotenbefall.

1.2.2 Das Vogelsteinmodell - Prinzipien der Adenom-Karzinom-Sequenz

Mehr als 70% der kolorektalen Karzinome entwickeln sich unabhängig von ihrer Ätiologie nach 5-10 Jahren aus einem primär adenomatösen Polypen (159). Das Entartungsrisiko steigt mit der Größe des Adenoms (>1,5 cm), dem Wachstumstyp

und dem histologischen Adenomaufbau (villös > tubulovillös > tubulär). Villöse Adenome entarten mehr als dreimal so häufig wie tubuläre Adenome. Alle Adenome zeigen in unterschiedlichem Ausmaß Zellatypien und eine aufgehobene Zellarchitektur (Abb.1).

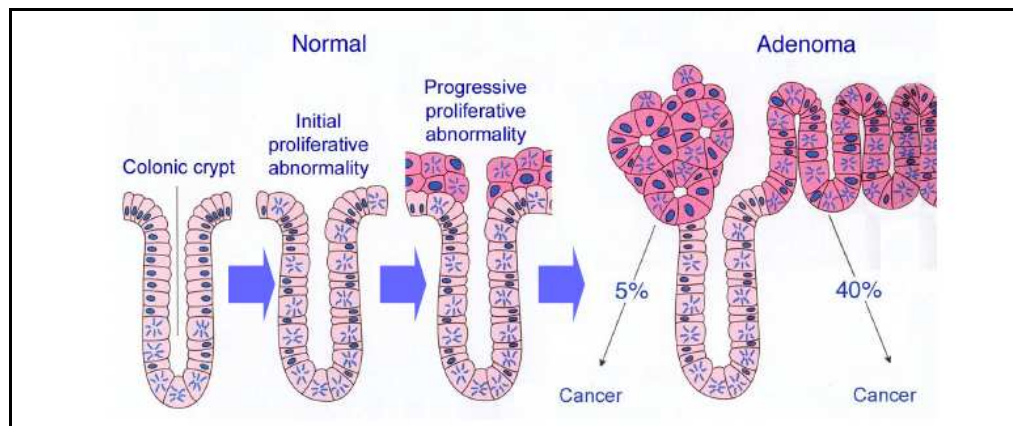


Abb.1: Entwicklung des KRK aus einer abnormen Kolonkrypte

Die meisten Polypen sind asymptomatisch und werden deshalb nicht oder erst spät diagnostiziert. Die genetischen Veränderungen im Rahmen der Karzinogenese des KRK wurden erstmals durch Fearon und Vogelstein als genetisches Tumorprogressionsmodell dargestellt. Das sogenannte Vogelstein-Modell beschreibt die konsekutive Entstehung von kolorektalen Karzinomen aus Adenomen als „Adenom-Karzinom-Sequenz“ (Abb.2). Es wird angenommen, dass auf dem Weg von der Normalschleimhaut hin zum Adenom und zum invasiven Karzinom eine Vielzahl an genetischen Veränderungen auftreten, wobei eher die Akkumulation an sich als ihre spezifische Abfolge als bedeutend erachtet wird (59, 193).

Der Allelverlust auf Chromosom 5q21 (APC Gen Locus) steht jedoch wahrscheinlich am Anfang der malignen Transformation. Im Verlauf kommt es zu einer Aktivierung des Proto-Onkogens K-ras. Mutationen von Chromosom 18q (DCC/SMAD4) und die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 auf Genlocus 17p treten gehäuft beim Übergang zum infiltrierend wachsenden Tumor auf.

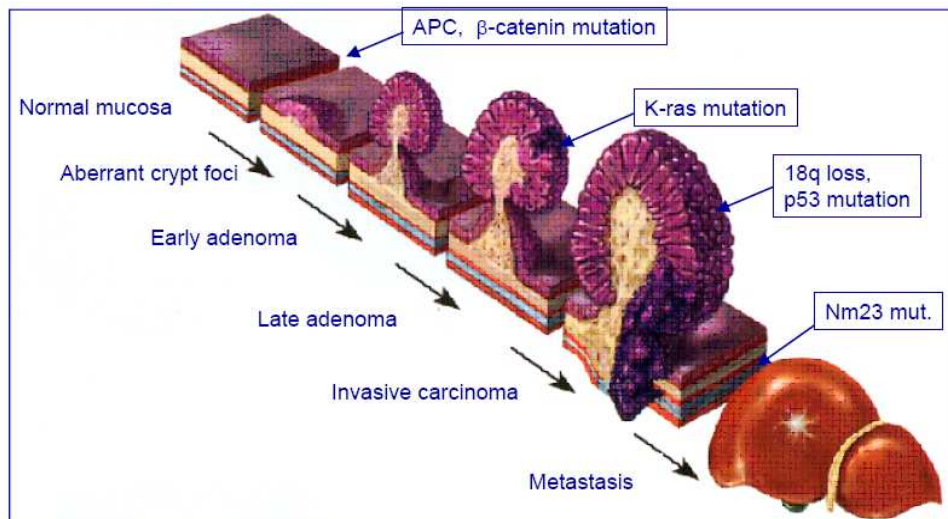


Abb.2: Fearon und Vogelstein Modell der Kolonkarzinogenese

1.2.3 Molekulare Pathomechanismen in der Tumorprogression des KRK

APC/ β -Catenin

Das Tumorsuppressor-Gen APC (**a**denomato**u**s **p**olyposis **c**oli **g**ene), dessen Mutation auch für die Entstehung der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) verantwortlich ist, ist auf Chromosom 5q21 lokalisiert (82, 101). Da die Bildung von Adenomen den Funktionsverlust des APC Gens erfordert, wurde es als der „gatekeeper“ der Adenomentstehung bezeichnet (Abb.3). Das APC-Protein, Mitglied der Wnt-Signalkaskade, bindet an β -Catenin, was zu einer Komplexbildung mit Axin und GSK-3 β und einem folgenden Abbau führt (179). Durch Inaktivierung von APC kommt es zu einem Akkumulieren von β -Catenin. Dieses gelangt von der Zellmembran zum Nukleus und wirkt dort als Transkriptionsfaktor unterschiedlicher, in die Karzinogenese involvierter Gene (z.B. c-myc, Cyclin-D und MMP-7). C-myc und Cyclin-D fungieren als potente Zellzyklusregulatoren. Eine vermehrte Expression dieser Gene bedeutet einen erheblichen Proliferationsvorteil. Catenine binden ebenfalls E-Cadherin und führen so zu dessen Funktionsverlust. E-Cadherin dient als primärer Mediator in der Zell-Zell-Adhäsion von Epithelzellen. Es wurde postuliert, dass ein Funktionsverlust des Proteins eine Voraussetzung für das Erlangen von invasiven Fähigkeiten und für die Fähigkeit von Tumorzellen zur Metastasierung darstellt (124).

Der APC-Verlust bedeutet jedoch nicht nur Veränderungen in der Transkriptionsaktivität und der Zelladhäsion, sondern führt ebenfalls zu einer erhöhten Anzahl von Fehlern innerhalb der mitotischen Zellteilung (63). Dies kann

eine genetische Instabilität der betroffenen Zellen mit sich bringen und somit zu Aneuploidie, einer wichtigen Komponente der Tumorprogression, führen (165). APC-Mutationen können bei Adenomen in bis zu 70% und zu mehr als 70% auch in sporadischen Karzinomen gefunden werden (43, 79, 146, 174).

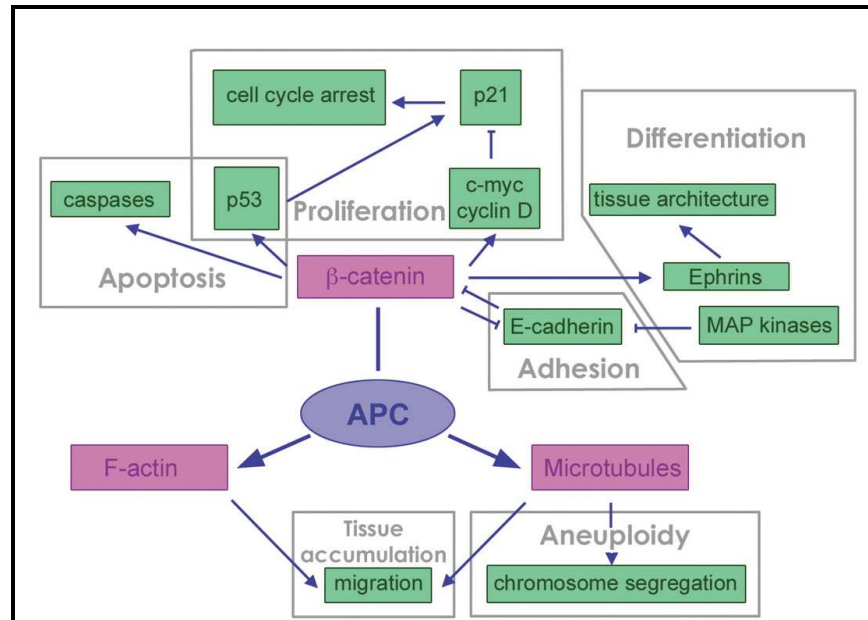


Abb.3: Zentrale Rolle des APC Gens in verschiedenen „pathways“ der Zellregulation

K-ras

Die Familie der Ras-Gene besteht aus drei Mitgliedern (K-, H-, N-ras). Ihre Genprodukte spielen eine zentrale Rolle in der Signalgebung für Proliferation und Mitose. Normalerweise sorgt das membranständige K-ras Protein p21 für eine Weiterleitung von Wachstumssignalen vom Rezeptor zum Zellkern. Mutationen verhindern eine Inaktivierung des Proteins und führen so zu einer fortlaufenden Anregung der Zellteilung. K-ras ist das bei kolorektalen Karzinomen am häufigsten mutierte Gen dieser Genfamilie (193). Eine Mutation kann zu ca. 50% bei sporadischen Adenomen und zu einem vergleichbaren Prozentsatz bei KRK nachgewiesen werden (4, 129). Die K-ras Mutation tritt relativ früh im Ablauf der Adenom-Karzinom-Sequenz auf (22).

DCC-Gen

Allelverluste (LOH) auf Chromosom 18q können in ungefähr 70% aller kolorektalen Karzinome gefunden werden. Die Prävalenz eines 18q Verlustes

steigert sich auf nahezu 90-100% bei Vorliegen von kolorektalen Lebermetastasen. Diese Tatsache lässt vermuten, dass eine Inaktivierung der auf Chromosom 18q lokalisierten Gene DCC (**d**eleted in **c**olorectal **c**ancer) und SMAD eine wichtige Rolle in späteren Phasen der Tumorprogression und der Metastasierung spielen (56, 58)

1.3 P53 – “the Guardian of the Genome”

1.3.1 Entdeckung und Bedeutung

P53 wurde 1979 durch Lane und Crawford als ein Protein, das einen Komplex mit dem SV40 T-Protein bildet, entdeckt (35, 107). Seit seiner Entdeckung hat es eine weitreichende Wandlung vom obskuren Onkogen zu einem Schlüsselgen im Rahmen der Karzinogenese durchlaufen. Ein äußerst wichtiger Hinweis in Bezug auf die p53 Funktion resultierte aus den Beobachtungen, dass Mäuse, die über eine Inaktivierung von Wild-Typ p53 (wt-p53) verfügen, in erheblichem Maße zur spontanen Entwicklung von Tumoren prädisponiert sind (49). P53 defiziente Mäuse zeigen sehr früh, obwohl sie sich normal entwickeln, eine hohe Rate an Sarkomen und Lymphomen. Einen weiteren Hinweis bot die Beobachtung, dass am Tumor disponierenden Li-Fraumeni Syndrom erkrankte Patienten über eine Keimbahnmutation innerhalb des p53 Gens verfügen.

P53 ist eines der am häufigsten mutierten Gene in humanen Malignomen (84). In über 50% aller Malignome liegt ein Funktionsverlust des Tumorsuppressors durch eine Mutation in der kodierenden Gensequenz vor. In den Tumoren, in denen das Wild-Typ p53 Gen (wt-p53) konserviert ist, können gehäuft Defekte im p53-Regelkreis gefunden werden (83, 194).

P53 spielt eine Schlüsselrolle als „Wächter“ des Genoms und wird als eines der wichtigsten Tumorsuppressorgene angesehen. Einleitung des programmierten Zelltods (Apoptose), Kontrolle des Zellzyklus, Zellalterung und –differenzierung sind nur einige der wesentlichen p53 Funktionen (55). P53 kann direkt zu einer Reparatur geschädigter DNA (3) und zu einer Unterdrückung von im Rahmen der Tumorprogression ablaufenden Angiogenese beitragen (194). Seine wichtigste Funktion wird jedoch in der Wachstumshemmung veränderter/geschädigter Zellen gesehen (169). Bei Auftreten eines DNA-Schadens kann p53 einen Stillstand des Zellzyklus in der G1 Phase herbeiführen, um die Reparatur des geschädigten DNA-Stranges zu ermöglichen. In den meisten Fällen jedoch führt eine Induktion von p53 zu einer irreversiblen Hemmung des Zellzyklus und zur Triggerung der Apoptose (Abb.5).

Viele Einflüsse, die im Rahmen der Karzinogenese eine Rolle spielen, können eine Aktivierung von p53 bewirken. So führen DNA-Schädigungen unterschiedlicher Genese wie z.B. γ -Strahlung, Chemotherapie, Hypoxie,

abnormale Wachstumsstimulation oder der Verlust von überlebenswichtigen Signalen zu einer Induktion des Tumorsuppressors (6, 7, 8, Abb.4) Im allgemeinen wird diese Aktivierung durch eine Stabilisierung des Proteins und einer hieraus resultierenden Akkumulation im Zytoplasma oder Zellkern hervorgerufen.

Aufgrund seiner großen Bedeutung wird p53 auch als „cellular gatekeeper“ (112), „death star“ oder „guardian of the genome“ bezeichnet (106, 173).

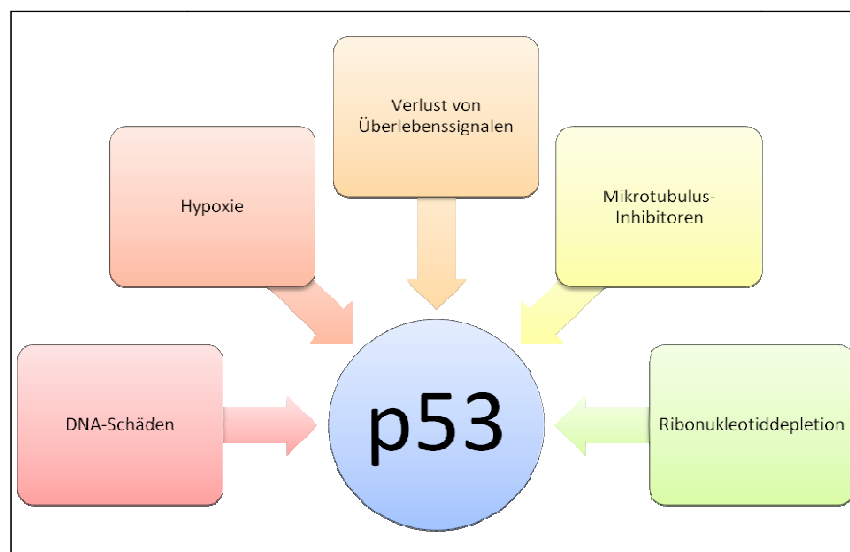


Abb.4: Möglichkeiten der p53 Aktivierung

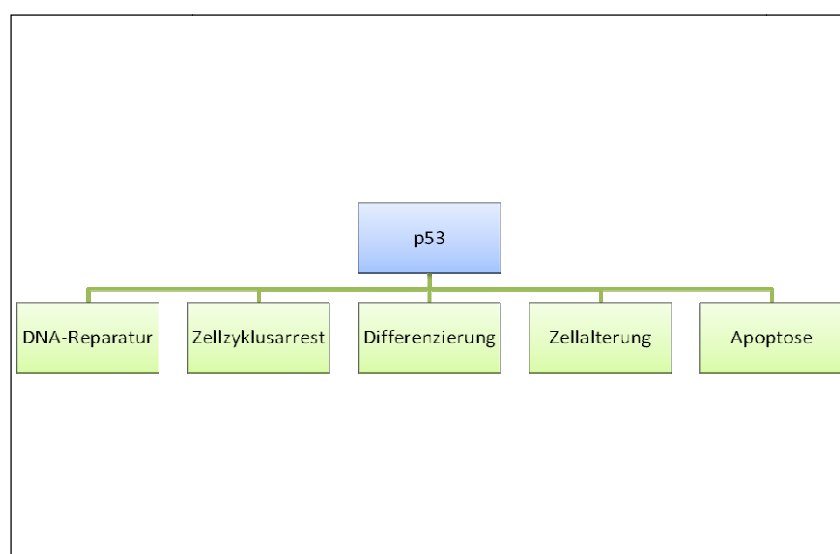


Abb.5: Formen der p53 induzierten Zellantwort

1.3.2 Mutationen in kolorektalen Karzinomen und anderen Tumoren

P53 Mutationen sind das häufigste genetische Ereignis, welches in einer großen Anzahl verschiedenster Tumore einschließlich Tumoren des Ovars, Magens, Kolons, Ösophagus, der Lunge und der Brust gefunden werden kann.

Baker et al. gehörten zu den ersten, die über p53-Mutationen in kolorektalen Karzinomen berichteten (9, 10). Eine Mutation kann in ungefähr der Hälfte aller KRK nachgewiesen werden, mit einer höheren Frequenz in distalen und rektalen Tumoren sowie einer geringeren in proximalen Tumoren und in Tumoren mit MSI. Etwa 43% aller p53 Mutationen in KRK entstehen in nur 5 verschiedenen Codons (172, 173). Der funktionelle p53 Verlust wird als eines der späten genetischen Ereignisse im Rahmen der Adenom-Karzinom-Sequenz angesehen (194). Man nimmt an, dass je nach Mutationsart Unterschiede in Prognose und Therapieresponse vorliegen (133, 180).

Ein Funktionsverlust von p53 kann in Tumoren durch eine Vielzahl von Mechanismen hervorgerufen werden. So z.B. durch Veränderungen, die seine Aktivierung behindern, durch Mutationen in der kodierenden Gensequenz oder durch Mutationen innerhalb der verschiedenen Mediatoren des p53-Regelkreises. Tumor-assoziierte p53 Mutationen sind im überwiegenden Anteil Punktmutationen (ca. 93%), die in der Expression eines mutierten p53-Proteins mit veränderten Eigenschaften resultieren. Mutiertes p53 (mut-p53) ist gekennzeichnet durch eine höhere Stabilität und kann in Tumorzellen in hohen Konzentrationen gefunden werden. Eine Erklärung für den selektiven Vorteil solch mutierter Zellen während der Tumorprogression liefert die Annahme, dass mut-p53 eine „dominant-negative“ Hemmung auf das wt-p53 ausübt und dieses durch Bindung in seiner Funktion behindert (47).

Es gibt Hinweise, dass das mutierte p53 über zusätzliche Funktionen verfügt, die im Rahmen der Tumorprogression im Sinne einer „gain of function“ eine wichtige Rolle spielen (167). Welche genauen Mechanismen hier zu Grunde liegen bleibt jedoch bislang unklar (69).

1.3.3 Regulation

Eine funktionsfähige Regulation des Tumorsuppressors ist wichtig, um einerseits das Wachstum normaler Zellen zuzulassen und andererseits eine schnellstmögliche Induktion nach Stresseinwirkung zu ermöglichen. Die p53

Regulation erfolgt sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinniveau, wobei jedoch die größte Bedeutung in der Regulation des Proteinlevels zu sehen ist. Diese wird v.a. durch die Kontrolle der Proteinstabilität beeinflusst (8, 11, 147, 206).

Stabilisierung

In den meisten Normalgeweben wird der p53 Proteinspiegel durch einen schnellen Abbau gering gehalten. Einer der wichtigsten Regulatoren der p53 Stabilität ist MDM2, welches über mehrere Wege in der Lage ist, die p53-Aktivität zu hemmen (104). So kann durch Bindung an die Transaktivierungsregion von p53, durch eine p53 Ubiquitinierung und den darauf folgenden Abbau (87, 112), durch Hemmung der p53 Acetylierung oder über einen vermehrten Transport von p53 aus dem Nukleus in das Zytoplasma eine Hemmung erfolgen. MDM2 fungiert als eine E3 Ligase, welche den Endpunkt einer Enzymkaskade darstellt, die zu der Bindung von Ubiquitin an Zielproteine und den folgenden Abbau des entstandenen Komplexes durch das Proteasom führt. Es bindet und ubiquitiniert p53 schon im Nukleus und befördert es von dort in das Zytoplasma. MDM2 ist ein p53 Targetgen, über das p53 in der Lage ist, sein eigenes Expressionsniveau zu kontrollieren (12). In vielen Tumoren, in denen es nicht zu einem Verlust von wt-p53 gekommen ist, kann eine mutationsbedingte Aktivitätsänderung von MDM2 gefunden werden (139, 150).

Einige Stress-Signale modulieren nicht direkt die p53 Aktivität, sondern führen über eine MDM2 Aktivitätsmodifikation zu einer indirekten Regulation. Bedeutend ist in diesem Rahmen die Aktivierung der Kinase AKT (182). AKT wird durch Wachstumsfaktoren aktiviert. Es ist in der Lage, MDM2 durch Phosphorylierung zu aktivieren und so den Abbau von p53 zu beschleunigen (127). Im Gegenzug führt die durch ARF bedingte Hemmung von MDM2 zu einer erhöhten p53 Aktivität (163). ARF spielt eine wichtige Rolle, transformierte Zellen für die Apoptose zu sensibilisieren. Mäuse, die eine Deletion für ARF aufweisen, zeigen eine verstärkte Neigung zur Entwicklung von Tumoren.

Deubiquitinierung von p53 durch den ursprünglich als p53 assoziierten Faktor HAUSP hingegen führt zu einer vermehrten Stabilität von p53. Neben den erwähnten Mechanismen sind in der Literatur noch viele weitere Regulationswege beschrieben (115, 116).

Aktivierung

Nach seiner Aktivierung wird die p53 Funktion vielfach über Proteininteraktionen und hier im Besonderen über posttranslationale Modifikationen bestimmt.

MDM2 bindet p53 in unmittelbarer Nähe zu seiner Transaktivierungsdomäne und verhindert so die p53 vermittelte Transkription.

Eine neuere Studie zeigt, dass das RNA Bindungsprotein hnRNP K, beteiligt an unterschiedlichsten Zellprozessen, ein MDM2-Targetprotein darstellt und als ein p53 Co-Aktivator fungiert. HnRNP K bindet in Verbindung mit p53 an die Promotorregion der Zielgene und übt so eine Schlüsselfunktion in der p53 abhängigen Transkription aus (137).

In vielen Studien wurde gezeigt, dass die Bindung von p53 an DNA und dessen Aktivität über posttranslationale Modifikationen beeinflusst wird (6-8). So kommt es nach Einwirkung von zellschädigenden Faktoren an verschiedenen Stellen der N- und C-terminalen Regionen zu einer p53 Phosphorylierung, resultierend in einer p53 Stabilisierung und Aktivierung seiner DNA Bindungsfähigkeit. Neben den Schlüsselregulatoren ATM und ATR wird auch DNA-PK eine wichtige Funktion in der Phosphorylierung von p53 an der N-terminalen Region zugeschrieben. Eine große Bedeutung für die Fähigkeit zur Apoptoseinduktion scheint in diesem Rahmen der Phosphorylierung von p53 an Serin 46 zuzukommen (3, 137). Sie ist u.a. notwendig, um die Expression von proapoptotischen Genen wie p53AIP1 zu induzieren.

Die Phosphorylierung von p53 am C-terminalen Ende durch CDK's, PKC und CKII an Ser315, Ser378 und Ser392 vermitteln ebenfalls eine sequenzspezifische Bindung von p53 an DNA. Phosphorylierung von p53 an Ser46 durch die Kinase DYRK2 als Antwort auf schwerwiegende DNA-Schäden führt über eine p53 vermittelte Transaktivierung des Pro-Apoptose Gens p53AIP zu einer gesteigerten Apoptose. HIPK2, ebenfalls eine Kinase, phosphoryliert p53 an Ser46 und führt so zu einer Dissoziation des p53/MDM2 Komplexes mit folgender p53 Stabilisierung.

Auf der anderen Seite kann durch das Verhindern der p53 Phosphorylierung wiederum auch eine Inaktivierung des Tumorsuppressors hervorgerufen werden. Einen Überblick über p53 und posttranslationale Modifikationen bieten Vousden und Lu (195).

Andere für die p53 Aktivität wichtige Modifikationen sind Ubiquitinierungen, Acetylierungen und Methylierungen (109). Durch DNA-Schäden hervorgerufene Phosphorylierungen erhöhen die Bindung von p300 an p53 resultierend in einer p53 Acetylierung und gesteigerter Aktivität. In Abwesenheit von zellulären Stressoren wird diese Interaktion wiederum durch MDM2 gehemmt. Es ist ebenfalls anzunehmen, dass p53 einige seiner Funktionen über posttranslationale Modifikationen von Targetproteinen ausübt.

Lokalisation

Import und Export von p53 aus dem Nukleus ist ein stark kontrollierter Prozess. Eine nukleäre Lokalisation ist für seine Funktion als Transkriptionsfaktor nötig, wohingegen der Abbau von p53 eine zytoplasmatische Lokalisation erfordert. Für einen effizienten Export von p53 aus dem Nukleus ist die Aktivität von MDM2 notwendig. Mutationen der Lysin-Regionen am C-terminalen Ende von p53, an dem die MDM2 induzierte Ubiquitinierung erfolgt, verhindern einen MDM2 vermittelten Transport und induzieren somit eine gesteigerte Aktivität.

1.3.4 Targetgene

P53 fungiert hauptsächlich als ein sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor. So bindet es mit seiner Core-Domäne an die DNA und aktiviert oder inhibiert hierdurch eine große Zahl von Targetgenen (59). Bislang konnten über 4000 Gene identifiziert werden, die über eine potentielle p53 Bindungsstelle verfügen (200). Die p53 Targetgene können funktionell unterteilt werden (23):

- Inhibitoren des Zellwachstums
- DNA-Reparatur
- Regulatoren der Angiogenese
- Aktivierung der Apoptose

Seine Funktionen als Induktor des Zellzyklusarrests und der Apoptose verleihen p53 seine Bezeichnung als Tumorsuppressor (130).

Apoptose

Viele Studien belegen, dass p53 eine bedeutende Rolle in der Induktion des natürlichen Zelltodes „der Apoptose“ spielt (145). Einige dieser Studien postulieren, dass die Fähigkeit von p53 als Transkriptionsfaktor zu wirken für die Induktion der Apoptose unabdingbar sei. Diese These wurde jedoch im Laufe der Zeit widerlegt und heute weiss man, dass ein transaktivierungsinsuffizientes p53 immer noch zu einer Induktion der Apoptose in der Lage ist (35). Bislang gelang es, viele transkriptionsabhängige und –unabhängige p53 Targets zu identifizieren, jedoch scheinen nur wenige hiervon für die Induktion der Apoptose wirklich essentiell zu sein. Solche Targets können sowohl dem extrinsischen als auch dem intrinsischen Apoptosepathway zugeordnet werden (Abb.6).

Ein äußerst wichtiger Mechanismus der Apoptoseinduktion scheint die p53 induzierte Triggerung der Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom C mit der Folge einer Aktivierung von Caspase-9 zu sein (157, 170). Diese Freisetzung wird durch eine Vielzahl an proapoptotischen p53 Targetgenen wie etwa Bax oder PUMA hervorgerufen.

Der Antiapoptose-Faktor Bcl-2 stellt ebenfalls ein transkriptionelles p53 Target dar. Anders als in den oben erwähnten Fällen wird jedoch die Expression von Bcl-2 p53 abhängig gehemmt (Transrepression). Bcl-2 fungiert, wenn überexprimiert in Tumoren, als Onkogen.

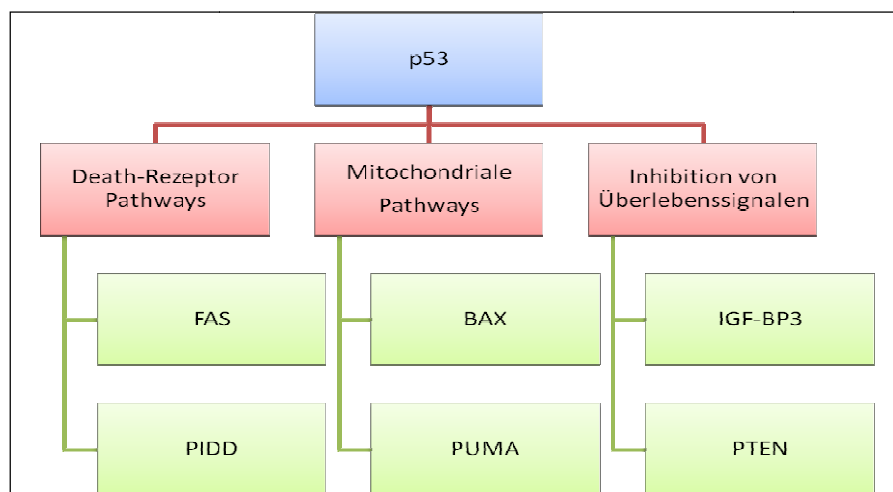


Abb.6: Darstellung durch p53 aktivierter Apoptose-Pathways

Zellzyklusarrest

Der Zellzyklus ist ein komplexer Prozess und wird über multiple Regulatoren beeinflusst. Wichtige Komponenten innerhalb dieses Prozesses stellen Cycline und ihre korrespondierenden Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK's) dar. Von großer Bedeutung für die Induktion des Zellzyklusarrests hat sich das p53-Targetgen p21/WAF1 erwiesen. P21/WAF1 ist in der Lage, den Arrest in der G1 und G2 Phase durch die Inaktivierung von CyclinE/CDK2 und CyclinB/CDK1 hervorzurufen (30).

Ein weiteres Target 14-3-3sigma (stratifin) gehört zu einer Familie an Proteinen, welche die zelluläre Aktivität über das Binden und Sequestrieren von phosphorylierten Proteinen regulieren. Aktiviertes 14-3-3sigma inaktiviert Cdc25 und Cdc2 und triggert so einen Block in der G2/M Phase des Zellzyklus. Außerdem konnte gezeigt werden, dass 14-3-3sigma in der Lage ist, den Proapoptosefaktor Bax aus dem Nukleus zu befördern und so zu einer Behinderung der Apoptose und einem konsekutiven Stillstand der Zelle in der G2 Phase zu führen.

1.3.5 Zellzyklus - Arrest oder Apoptose?

Welche Zellantwort einem erhöhten p53-Level folgt ist unter anderem abhängig vom Ausmaß der zellulären Schädigung, von der Zellart, den einwirkenden Umgebungsfaktoren und dem Vorliegen weiterer onkogener Veränderungen (169). Einige Studien belegten, dass für die Aktivierung der Apoptose eine höhere Konzentration von p53 als für die Induktion des Zyklusarrests notwendig ist (38, 119). Dies führte zu der Annahme, dass Promotoren, welche die Transkription von „Apoptose-Genen“ regulieren, p53 mit einer geringeren Affinität binden.

Viele andere Mechanismen spielen ebenfalls eine Rolle in der Targetgen-Selektivität von p53. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass posttranslationale Modifikationen die Selektivität beeinflussen.

Wichtig in der Selektion der Targetgene und somit der p53 Antwort scheint die Wechselwirkung von p53 mit unterschiedlichen Co-Faktoren zu sein. Diese können entweder direkt an p53 binden (z.B. ASPP oder JMY) oder einer Bindung an die DNA indirekt assistieren (p63 und p73) (15). So führt z.B. eine Interaktion von p53 mit ASPP oder JMY zu einer Aktivierung proapoptotischer Targetgene wie PUMA oder BAX (112, 154, 166).

1.3.6 P53 als therapeutisches Target

Tumorzellen mit wt-p53 zeigen eine größere Sensitivität gegenüber Bestrahlung oder Chemotherapie als solche mit mutiertem p53. Das Wissen über die essentielle Rolle von Defekten innerhalb des p53 Regelkreises im Rahmen der Tumorentstehung und –progression nimmt immer mehr zu und lässt p53 zu einem interessanten Target der Tumorthherapie werden. Unterschiedliche Ansätze mit der Zielsetzung verlorene p53 Funktionen wieder herzustellen, nehmen deshalb im aktuellen wissenschaftlichen Feld eine zunehmend bedeutende Rolle ein (198).

Bereitstellung von exogenem p53 - p53 Gentherapie

Als Strategie der molekularen Tumorthherapie zur Wiederherstellung von p53 Funktionen wurde das Einbringen von cDNA-Kopien des p53 Gens in die Tumorzelle unter Verwendung viraler Vektoren untersucht. Präklinische Studien zeigten, dass über die artifiziell erzeugte Expression von p53 Tumorzellen wieder vermehrt der Apoptose zugeführt werden konnten. Innerhalb klinischer Studien konnte die Adenovirus-vermittelte p53 Gentherapie (ADP53) schon bei Patienten mit Tumoren unterschiedlicher Entitäten angewandt werden (68).

Aktivierung oder Verstärkung der endogenen p53 Funktion oder dessen Familienmitgliedern mittels exogener Peptide

Aufgrund ihrer Potenz und Spezifität werden exogene Peptide oft zur Beeinflussung von Proteinfunktionen verwendet. Daher ist es Gegenstand der aktuellen Forschung Peptide zu ermitteln, die durch Einwirkungen in den p53 Regelkreis in der Lage sind, p53 Funktionen wieder zu erstellen oder bestehende Aktivität zu verstärken. Schwerpunkt hierbei bildet neben der Einwirkung auf p53 selbst die Beeinflussung der MDM2-Aktivität und der MDM2/p53 Interaktionen. Jedoch auch auf das Design von Peptiden, welche das p53 abbauende Proteasom oder den nukleären p53 Export beeinflussen können wird fokussiert (160, 161, 191).

Wiederherstellung der Funktion von mutiertem p53

Untersuchungen haben gezeigt, dass durch Mutationen auftretende Änderungen innerhalb der p53 Konformation und hiermit verbundene Einschränkungen der p53 Funktion durch exogene Beeinflussung reversibel sein können. In diesem

Zusammenhang ist z.B. CP-31398 zu nennen. CP-31398 ist ein Peptid, welches nicht nur in der Lage ist, Funktionen von mutiertem p53 durch Konformationsänderungen wieder herzustellen, sondern auch zu einer signifikanten Erhöhung des wt-p53 Proteinlevels und zu dessen Aktivitätserhöhung führt (64, 151, 161).

Ähnliche Wirkungen können durch das Peptid PRIMA (p53 reactivation and induction of massive apoptosis) hervorgerufen werden. PRIMA ist in der Lage, Zellen mit mutiertem p53 Status der Apoptose zuzuführen. Im Gegensatz zu CP-31398, dessen Wirkung auch in wt-p53 tragenden Zellen gesehen werden kann, scheint die Funktion von PRIMA auf Zellen mit p53 Mutation beschränkt zu sein, welches es zu einem interessanten Agens für die Entwicklung neuer Therapeutika werden lässt (31).

1.4 Das kolorektale Karzinom (KRK)

1.4.1 Epidemiologie

KRK sind die zweithäufigste Krebstodesursache beider Geschlechter in Deutschland. Die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms unterscheidet sich weltweit in den verschiedenen Bevölkerungsgruppen. Auch innerhalb der einzelnen Populationen sind wiederum Unterschiede in Abhängigkeit vom Lebensstil zu erkennen. Während die Mehrheit aller kolorektalen Karzinome sporadisch auftritt (85-90%), sind 10-15% auf erbliche Defekte zurückzuführen. Von diesen können wiederum ca. 15% familiären Syndromen wie der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) oder den Non-Polyposis-Syndromen (HNPCC) zugeordnet werden (187).

Die sporadische Form ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters. 90% aller Karzinome werden bei Patienten diagnostiziert, die das 50. Lebensjahr überschritten haben. Hoerner et al. beschrieben, dass Patienten, bei denen eine Diagnose vor dem 40. Lebensjahr gestellt wird, Tumoren mit geringerer Differenzierung und mit einer aggressiveren Wachstums- und Metastasierungstendenz zeigen (14).

Die Ätiologie des kolorektalen Karzinoms wurde vielfältig untersucht, konnte jedoch noch immer nicht abschließend geklärt werden. Sicher erscheint, dass exogene Faktoren zur Entstehung der Krankheit beitragen. Unter den exogenen Faktoren kommen der Nahrung und ihren Abbauprodukten eine wesentliche Bedeutung zu. In epidemiologischen Studien wurde gezeigt, dass eine direkte Korrelation zwischen der Erkrankungsrate an kolorektalen Karzinomen und dem Pro-Kopf-Konsum von Kalorien, tierischem Eiweiß, sowie tierischen Nahrungsfetten besteht (50, 74).

Geographische Unterschiede der Inzidenz scheinen nicht mit genetischen Unterschieden in Verbindung zu stehen, da Migranten dazu neigen, sich der Erkrankungsrate des Einwanderungslandes anzupassen (207).

Andererseits konnte festgestellt werden, dass Personen, deren Nahrung reich an Früchten, Gemüse und Ballaststoffen ist, einem geringeren Risiko unterliegen (60).

Die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) ist eine seltene autosomal dominant vererbte Erkrankung, die durch das Auftreten von tausenden von Polypen mit einer hohen Entartungstendenz im Dickdarm gekennzeichnet ist (17, 18, 162). Grundlage dieser Disposition stellt eine Mutation im FAP-Gen auf Chromosom 5q21 dar. Dem hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinom (HNPCC, Lynch-Syndrom) liegt ebenfalls ein autosomal dominanter Erbgang zugrunde (120). Das HNPCC assoziierte kolorektale Karzinom ist durch ein besonders frühzeitiges Auftreten der vor allem im proximalen Kolon lokalisierten Karzinome charakterisiert. Auch chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa sind mit einem erhöhten Entartungsrisiko behaftet.

1.4.2 Histopathologie, Klassifikation und Prognose

Histologisch unterscheidet man das Adenokarzinom, das einen Anteil von 85-90% der kolorektalen Tumore ausmacht, das muzinöse Adenokarzinom mit extrazellulärer Schleimbildung (10%) und das Siegelringkarzinom (1%). Einen geringen Anteil bilden zudem Sarkome (Leiomyosarkome), Lymphome, Plattenepithel-Karzinome und Karzinoide.

Der Differenzierungsgrad („grading“) wird nach Kriterien wie Drüsenmorphologie, Kernatypien und Mitosehäufigkeiten semiquantitativ bestimmt. Der Erhalt einer glandulären Kolonstruktur ist gewöhnlich mit mäßig bis gut differenzierten Tumoren verbunden. Der Verlust der glandulären Architektur unter der Bildung von Zellkonglomeraten deutet auf das Vorliegen eines geringgradig differenzierten Karzinoms hin. Der Differenzierungsgrad (G1-4) eines Karzinoms erlaubt eine Aussage über dessen Malignitätspotential.

Die Prognose des kolorektalen Karzinoms ist eng mit der Eindringtiefe des Tumors in die Darmwand sowie dem Befall von regionären Lymphknoten und dem Vorhandensein von Fernmetastasen verknüpft. Eine genaue Aussage über die Tumorausbreitung erfolgt durch die Stadieneinteilung mittels Dukes-Klassifikation (51) oder des bevorzugt verwendeten TNM-Systems. Dieses System schließt die Ausdehnung des Primärtumors, eine Aussage über den Befall von Lymphknoten und über das Vorliegen von Fernmetastasen ein.

1.5 Cancer Proteomics

Die Proteomforschung („**Proteins expressed by a genome**“) ist ein neues Feld der Wissenschaft, in dem Zusammensetzung, Struktur, Funktion und Interaktion von Polypeptiden untersucht werden. Diese Polypeptide können dann u.a. als potentielle Biomarker zur Früherkennung von Erkrankungen fungieren.

Nach Abschluss des „Human Genome Projekt“ wurde beanstandet, dass das Wissen über eine spezielle DNA-Sequenz noch keinen Aufschluss über den Aufbau, die Funktion und die zelluläre Lokalisation des von ihr kodierten Proteins und somit über die dynamische Komponente innerhalb einer Zelle liefert. Auf einer Tagung der Electrophoresis Society in Siena 1994 wurde erstmals der Begriff „Proteome“ als eine Bezeichnung der Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt beschrieben und „Proteomics“ als Analyse des Proteinmusters einer Zelle definiert (205).

Es wird geschätzt, dass ungefähr 60.000 Proteine durch das menschliche Genom verschlüsselt werden. Durch die Entwicklung der 2D-Elektrophorese von Klose und Farrell 1975 gab es erstmals die Möglichkeit zur Auftrennung von mehreren tausend Proteinen (102, 138). Daraufhin wurden viele Anstrengungen unternommen, diese Methode in ihrer Effizienz und Reproduzierbarkeit zu verbessern. Sie stellt bis zum heutigen Tag den „Brückenpfeiler“ der Proteomforschung dar.

Das Gebiet „Cancer Proteomics“ befasst sich mit der Untersuchung des Proteinexpressionsmusters von Tumorzellen (208, 209). Die 2D-Elektrophorese ermöglicht eine systematische Studie verschiedener Gewebe und bietet eine Aussagekraft über sich ereignende qualitative und quantitative Veränderungen in der Proteinexpression einer Zelle. Über den Vergleich von normalem mit pathologisch verändertem Gewebe kann dies zur Identifikation krankheitsspezifischer Proteine führen (73, 175). Diese können dann z.B. als biologischer Marker zur frühen Entdeckung/Verlaufsbeobachtung maligner Veränderungen oder als Protein-basierte Angriffspunkte neuer Medikamente dienen (29).

Stulik et al. waren die ersten, die einen systematischen Vergleich des Proteinexpressionsmusters von makroskopisch normaler Darmmukosa mit entartetem Gewebe anstellten (176, 177). Sie waren so über die 2D-

Elektrophorese in der Lage, neue Proteine zu identifizieren, die im Rahmen der kolorektalen Tumorprogression beobachtet werden konnten. Friedman et al. setzten diese Arbeit unter Verwendung der 2D-DIGE Methode fort (66). Derzeit ist die Identifikation von biologischen Markern Gegenstand vieler Studien.

2. Ziel der Arbeit

Aufgrund der bedeutenden Rolle, die p53 im Rahmen der Tumorentstehung und Tumorprogression zukommt, ist es wichtig, die Mechanismen der p53 vermittelten Zellantwort näher zu untersuchen.

Viele Studien zur Analyse der p53 induzierten Zellantwort wurden bisher mit Hilfe der Microarray-Technik auf mRNA-Niveau durchgeführt (114). Da jedoch ein Gen seine Funktion über sein Genprodukt, das Protein, erfüllt, ist es von großer Bedeutung, die p53-Zellantwort ebenfalls auf Proteinebene zu betrachten.

Im ersten Schritt wurde das p53-regulierte Proteinexpressionsmuster von HCT116 Kolonkarzinomzellen mit wt-p53 (HCT 116 p53 +/+) und seiner genetisch veränderten Variante (HCT 116 p53 -/-) verglichen. Nach p53 Induktion durch Mitomycin C wurden mittels 2D-Elektrophorese p53 abhängig regulierte Proteine identifiziert.

In einem zweiten Schritt wurde das globale Proteinexpressionsmuster der beiden Zelllinien mit dem Auftreten p53 abhängiger Phosphorylierungen verglichen. Hierzu wurden die Gele der mit Mitomycin C behandelten Zellen einer speziellen Färbung unterzogen (Pro-Q Diamond).

Ziel der Studie war es, neue Informationen über das p53 regulierte Proteom zu erlangen, um so ein verbessertes Verständnis über die molekularen Mechanismen der p53 induzierten Zellantwort zu ermöglichen. Dies könnte über die Identifikation von p53 regulierten Proteinen zu neuen Therapieansätzen führen und so einen Beitrag zur Verbesserung der Krebstherapie leisten.

3. Material und Methoden

3.1 Charakteristika der kolorektalen Zelllinien HCT116 p53 +/+ und HCT116 p53 -/-

Die etablierten humanen kolorektalen Karzinomzelllinien HCT116 p53 +/+ und HCT116 p53 -/- wurden freundlicherweise vom Labor von Prof. Bert Vogelstein (The Johns Hopkins Oncology Center, Baltimore) zur Verfügung gestellt.

Die Zelllinie HCT116 wurde aus einem primären Kolonkarzinom durch MG Brattain et al. isoliert (Brattain 1981). HCT116 p53 +/+ ist charakterisiert durch die Expression von wt-p53. Sie zeigt eine Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und eine homozygote Deletion des Codon 13 auf Chromosom 16 (ras-Protoonkogen) bei einem diploiden Chromosomensatz. Bei HCT116 p53 -/- handelt es sich um eine identische Schwesternzelllinie, welche sich nur durch eine mutationsbedingte p53 Inaktivierung unterscheidet. Sie wurden am NIH in Washington (Prof. Thomas Ried, Genetics Branch, NIH) bezüglich numerischer und struktureller Chromosomenaberrationen mittels SKY, CGH und Multicolor-FISH charakterisiert.

3.2 Vorbehandlung der Zelllinien

3.2.1 Kultur

Die Zelllinien HCT 116 p53 +/+ und p53 -/- wurden unter kontrollierten Bedingungen bei 37°C und 5% CO₂ für 1-3 Tage in Kultur gehalten. Als Kulturmedium wurde McCoy's 5A Medium verwendet. Dem Medium wurde 1.5mM L-Glutamin 90% und fetales Rinderserum (FBS) 10% zugefügt.

Nach Erreichen einer konfluierenden Schicht in einer 150 cm³ Kulturschale, wurden die Zellen geerntet. Hierzu wurde das Medium abgegossen, die Zellen mit PBS (phosphate buffered saline) gespült und, nach Zugabe von weiteren 5ml kaltem PBS, vorsichtig mit einem Zellschaber von ihrem Untergrund abgelöst. Das PBS-Zellgemisch wurde daraufhin in eine 15ml Tube gegeben, der Inhalt 3x für 5min zentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen.

3.2.2 Zytostatikabehandlung mit Mitomycin C (MMC)

Um das endogene p53 zu aktivieren, wurden die Zelllinien nach Erreichen einer konfluierenden Schicht in der Zellkultur mit jeweils 10µg/ml Mitomycin C (Sigma, St. Louis, MO) für 0, 8, 16 und 24 Stunden behandelt. Mitomycin C ist ein Zytostatikum, welches an der DNA von Tumorzellen angreift, indem es die beiden DNA-Stränge miteinander vernetzt und so ein Auseinanderweichen dieser während der Mitose verhindert. Nach Behandlung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

3.3 Western-Blot Analysen

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden Western-Blot Analysen durchgeführt. Mittels Zelldenaturierung wurden hierzu Proteinextrakte erstellt (100mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) pH8, 150mM Natriumchloridlösung, 1% Nonoxynol-40 (NP-40), 1:100 Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), und 1:100 Protease-Inhibitor (Sigma, St. Louis, MI, USA)). Die Proteinkonzentrationen wurden nach der Bradford Methode unter Anwendung des Bio-Rad Protein Assays gemessen (31). 250-800µg Protein der behandelten und unbehandelten Zelllinien wurden mit Ladungspuffer (100mM Tris pH6.8, 200mM Dithiothreitol, 4% Natriumdodecylsulfat (SDS), 0,2% Bromphenol-Blau und 20% Glycerol) versehen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese (PAGE) erfolgte anhand standardisierter Protokolle. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF Membran (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) transferiert.

Zum Nachweis wurden folgende Antikörper verwendet:

p53 monoklonal und MDM-2 polyklonal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); hTERT monoklonal (Novocastra, Newcastle, UK); p21 und Wig-1 monoklonal (Pharmingen, San Diego, CA). Im Anschluss wurden mit Peroxidase verlinkte sekundäre Antikörper (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) hinzugefügt und mittels Chemolumineszenz sichtbar gemacht.

Um p53-abhängige Proteinphosphorylierungen zu detektieren wurden Immunpräzipitate mit dem für Phosphoserine/Threonine/Thyrosine spezifischen monoklonalen Mausantikörper anti-pSTT (Abcam, Cambridge, UK) angefertigt. Protein-AK Komplexe wurden mittels Protein G Dynabeads (Invitrogen, Oslo,

Norwegen) isoliert und per Western-Blot unter Verwendung spezifischer Antikörper analysiert: monoklonaler Mausantikörper anti-ANXA1 (BD Pharmingen, CA); polyklonaler Kaninchenantikörper anti-DJ-1 (Abcam, Cambridge, UK); polyklonaler Kaninchenantikörper anti-p53 (Santa Cruz, CA).

3.4 PCR-Analysen

Die Real-Time PCR Analysen wurden am Karolinska Institut in Stockholm und im Forschungslabor der chirurgischen Klinik Lübeck unter Verwendung einer ABI Prism 7500 PCR Einheit durchgeführt.

3.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese

3.5.1 Grundlagen

Die Technik der 2D-Elektrophorese hat ihren Ursprung 1975 in den Arbeiten von O'Farrell (138). Sie ist die effizienteste Technik zur Auftrennung und quantitativen Analyse eines komplexen Proteingemisches. Mit der 2D-Elektrophorese ist es möglich, in Abhängigkeit von Probenqualität, Aufbereitung, pH-Bereich, Gelgröße und Detektionsmethode, bis zu 10.000 Proteine, im Durchschnitt ca. 2.000 pro Gel, zu detektieren.

Die Technik setzt sich zusammen aus zwei unterschiedlichen Separationsmethoden, der isoelektrische Fokussierung, IEF (1.Dimension), und der Sodium-dodecylsulfat-polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAGE (2.Dimension).

In der 1. Dimension macht man sich die Ladungseigenschaften von Proteinen zunutze. Die Proteine werden anhand ihres isoelektrischen Punktes, pI, aufgetrennt. Der pI-Wert ist der pH-Wert, bei dem sich die Ladungen negativer und positiver Aminosäurereste eines gelösten Proteins aufheben, es sich somit elektrisch neutral verhält und sich deshalb in einem von außen angelegten elektrischen Feld nicht mehr bewegt. Der benötigte pH-Gradient wird in der Trennmatrix (Polyacrylamid) mit Hilfe von Ampholyten erzeugt. Da jedes Protein über einen charakteristischen isoelektrischen Punkt verfügt, ermöglicht dies eine Separierung der Polypeptide.

In der 2. Dimension werden die Proteine dann entsprechend ihres Molekulargewichtes, MW, aufgetrennt. Die Massenunterschiede drücken sich hier in unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten der Polypeptide aus.

Weitere wichtige Einflussgrößen auf die Auftrennung im Gel sind die chemisch-physikalischen Eigenschaften der Proteinoberfläche, die Löslichkeit und die relative Menge eines Proteins in dem zu separierenden Proteingemisch (77, 78).

3.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben wurden gemäß der Methode nach Bradford (24) bestimmt. Zu jeder Probe wurde auf einer 96-Loch Mikrotiterplatte, nach Verdünnung von 1µl der vorbehandelten Zellmasse mit 100µl destilliertem Wasser, 25µl konzentriertes Assay-Reagenz (Bio-Rad, Sundbyberg, Sweden) hinzugefügt. Die Proteinkonzentration wurde in einem Multiscan-Reader (LabSystems, Ramsey, Minnesota) unter der Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von Rinderserumalbumin anhand einer Standardkurve ermittelt.

3.5.3 Probenaufbearbeitung („Solubilisierung“)

Um die Gelelektrophorese durchführen zu können, ist es nötig, die Proteine in Lösung zu bringen („Solubilisierung“). Hierzu wurden 250µg jeder Probe für die pH-Bereiche 3.9-5.1, 4.7-5.9, 5.5-6.7 und 800µg für den pH-Bereich 6.3-8.3 mit Rehydrierungspuffer (7 M Urea, 2 M Thiourea, 1% 3-(3-Chloramidopropyl) dimethylammonio-1-propanesulfonate (CHAPS), 0,4% immobilized pH gradient IPG Puffer, 0,3% Dithiothreitol (DTT) und etwas Bromophenol Blau) versehen.

3.5.4 Isoelektrische Fokussierung – 1. Dimension

Die Einführung von immobilisierten pH-Gradienten in Gelstreifen (IPG-Strips) war eine wichtige Voraussetzung für die Reproduzierbarkeit und damit den Durchbruch der 2-DE basierten Proteomforschung (77, 78, 148).

Die aufgearbeiteten Proben werden in die Schächte des IPGphor Isoelectric Focusing Systems (PROTEAN IEF®, BioRad) gegeben und für 10 Stunden rehydriert.

Die Gelstreifen wurden hierzu mit der Gelseite nach unten im jeweiligen Schacht platziert, so dass das Gel vollständig vom Puffer umflossen war, und anschließend mit Mineralöl (BioRad) bedeckt.

Ein Weg um gering exprimierte Proteine in der 2D-Elektrophorese sichtbar zu machen, stellt die Verwendung sich im pH-Bereich überlappender narrow pH-Bereich IPG-Streifen dar (77, 204). Diese bieten die Möglichkeit der Ausdehnung eines schmalen pH-Bereiches über die gesamte Breite eines Geles und verfügen somit über eine höhere Ladungskapazität als reguläre IPG-Streifen. In dieser Studie wurden die pH-Bereiche 3.9-5.1, 4.7-5.9, 5.5-6.7 und 6.3-8.3 für die mit MMC behandelten Zellen und die pH Bereiche 4.7-5.9 und 5.5-6.7 für die mit MMC behandelten und anschließend mit Pro-Q Diamond gefärbten Zelllinien verwendet. Die Fokussierung erfolgte unter Verwendung von Protean IEF Cells (BioRad) für 10.5 Stunden, in denen 52 900 Vhr erreicht wurden. Die Temperatur innerhalb des Gerätes lag während des gesamten Vorganges bei konstant 20°C.

Da die großen Mengen an CHAPS eine Bindung von SDS an die fokussierten Proteine behindern, ist es notwendig, dieses nach der IEF zu entfernen. Diese Equilibrierung erfolgte für zweimal 15 min durch Zugabe von je 10 ml SDS-Elektrophoresepuffer (50mM Tris-HCL (pH8.8), 6M Urea, 30% Glycerol und 2% SDS), dem 65mM DTT und 135mM Iodacetamid beigefügt wurden (Abb.7).

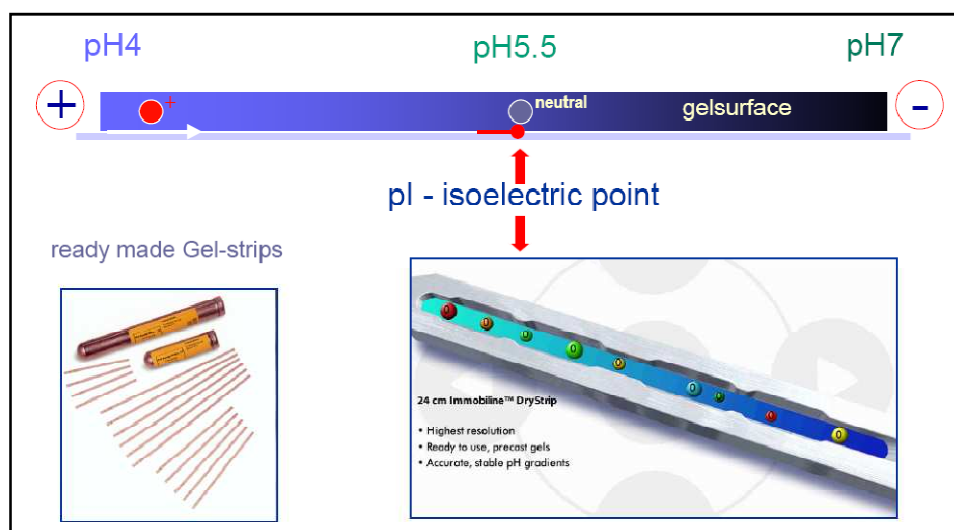


Abb.7: Schematische Darstellung der 1. Dimension; industriell hergestellte IPG-Streifen (Fa. BioRad)

3.5.5 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese – 2. Dimension

In der 2. Dimension werden die Proteine ihrer Größe entsprechend innerhalb des Gels aufgetrennt. SDS (Sodium-dodecylsulfat) ist ein stark denaturierendes Detergens welches alle nicht-kovalenten Bindungen, die die Proteinstruktur bestimmen, aufhebt. Proteine mit großer Molekülmasse bilden im Gegensatz zu solchen mit kleiner Masse lange Polypeptidfäden. Längere Polypeptidfäden wandern aufgrund ihrer andersartigen Wechselwirkungen mit dem „Netzwerk“ der Gel-Matrix (z.B. Reibung) langsamer als kleine Proteine.

Die SDS Polyacrylamid Gele haben eine Größe von 1,5 x 200 x 230 mm. Sie bestehen aus 12,5% Polyacrylamid. Zur Herstellung eines Gels wird eine Grundlösung aus 376 mM Tris Puffer (pH 8.8), 10% SDS und zweifach destilliertem Wasser benutzt. Zur Polymerisation wird 10% Ammonium Persulphat und TEMED hinzupipettiert. Nach Auffüllen der Gelkassetten müssen die Gele über mindestens 60 Minuten polymerisieren.

Die IPG- Streifen der ersten Dimension wurden vorsichtig auf der Geloberfläche platziert und dort mit warmer 0.5%iger Agarose fixiert. Verwendet wurde ein ISO-DALT Elektrophoresegerät (Hoefer, San Francisco, USA), in welchem die Gele von SDS-Elektrodenpuffer (0.25mM Tris, pH 8.6; 1.92M Glycin; 0,1% SDS) umgeben sind. Die Elektrophorese wurde für 18-20 Stunden bei 100V und einer konstanten Temperatur von 12°C durchgeführt, bis der Kontrollfarbstoff den Unterrand der Gele erreicht hatte. Für die anschließende Fixierung wurde eine Lösung mit 30% Ethanol/10% Essigsäure verwendet (Abb.8).

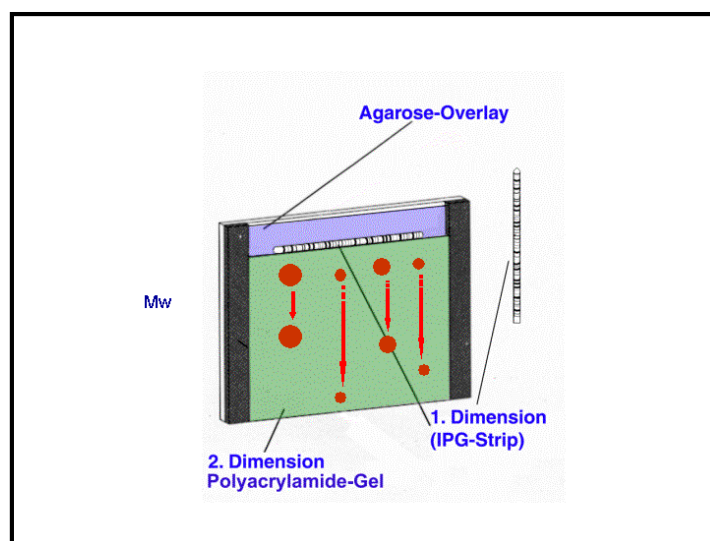


Abb.8: Schematische Darstellung der zweiten Dimension

3.6 Färbemethoden

Nach Beendigung der 2D-Gelelektrophorese kann zur Analyse eine Visualisierung der Proteine mittels verschiedener Färbungen erfolgen. Bei der Auswahl der jeweiligen Färbung ist hier zu beachten, ob es sich bei den zu färbenden Gelen um analytische Gele zur reinen Image Analyse (computergestützter Gelvergleich) oder um präparative Gele zur weiteren quantitativen Analyse der Gele (mittels Massenspektrometrie) handelt. Dies umso mehr, als einige Färbungen nicht massenspektrometrie-kompatibel sind.

3.6.1 Silberfärbung

Analytische Gele wurden mit Silbernitratfärbung behandelt (40). Die Gele wurden hierzu für mindestens 3 Stunden in einer 30%igen Ethanol (95%)/ 10% Essigsäure Lösung fixiert. Anschließend erfolgte eine Sensitivierung (0.5M Kaliumacetat, Ethanol (95%), Kaliumtetrathionat) über Nacht. Die Gele wurden dann 6x für jeweils 20 min mit destilliertem Wasser gewaschen und nach Zugabe der Silbernitratlösung (AgNO_3 , 1M 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), 37% Formaldehyd) für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Proteinspots in einer Lösung aus 3% Kaliumcarbonat, Na-Thiosulfat und 37% Formaldehyd sichtbar gemacht. Diese Färbetechnik ist nur schwer massenspektrometrisch analysierbar, zeigt jedoch die beste Visualisierung 2-DE separierter Proteinspots und benötigt keinen teuren Spotcutting-Roboter zur Exzision aus den Gelen.

3.6.2 SYPRO-Ruby Färbung

Zur quantitativen Analyse wurden die Gele mit Sypro-Ruby Fluoreszenzfärbung (Invitrogen) gefärbt. Hierzu wurden die Gele zuerst über Nacht in einer 50% Methanol/ 7% Essigsäure Lösung fixiert und anschließend mittels Sypro-Ruby Färbung (Sypro-Ruby gel stain; Invitrogen) über Nacht gefärbt. Danach wurden die Gele um die Hintergrundfärbung zu minimieren zuerst in einer Lösung bestehend aus 10% Methanol/ 7% Essigsäure und abschließend in destilliertem Wasser gewaschen. Vorteil dieser Technik ist die hohe Auflösung, die Möglichkeit gefärbte Gele wieder zu entfärben und die exzellenten Analyseigenschaften für

die Massenspektrometrie. Nachteil ist die Exzision mit einem an einen Laserscanner gekoppelten teuren Spotcutting-Roboter.

3.6.3 Pro-Q-Diamond Färbung

Pro-Q-Diamond ist eine spezielle fluoreszierende Färbung, die es ermöglicht, nur phosphorylierte Proteine darzustellen (125). Hierzu wurden die Gele über Nacht bei Raumtemperatur in einer 50% Methanol (95%)/ 10% Essigsäure Lösung fixiert. Die Gele wurden dann mit viermaliger Wiederholung für jeweils 15 min mit destilliertem Wasser gewaschen und nach Zugabe von jeweils 150-200 ml Pro-Q-Diamond Färbungslösung (Pro-Q-Diamond phosphoprotein gel stain; Invitrogen) für 4 Stunden inkubiert. Um die Hintergrundfärbung zu minimieren, wurden die Gele anschließend dreimalig in 80-100 ml Entfärbungslösung (Pro-Q-Diamond phosphoprotein gel destaining solution; Invitrogen) für jeweils 30 min inkubiert. Abschließend wurden die Gele wiederholt in destilliertem Wasser gewaschen. Wie bei der Sypro Ruby Färbung muss die Spot-Exzision mit einem an einen Laserscanner gekoppelten Spotcutting-Roboter erfolgen.

3.7 Computergestützte Bildanalyse

3.7.1 Detektion der Proteinspots im Gel

Die gefärbten Gele wurden unter Verwendung eines GS-710 Flachbrettscanners (BioRad) mit 84.7x84.7µm Auflösung gescannt. Das Proteinexpressionsmuster jeder Probe wurde mit der Software PDQuest 7.3 (Bio-Rad) erfasst und analysiert („spot detection“). Über die Funktion „find spot centers“ werden die Spotzentren automatisch aufgesucht und mit einem Kreuz markiert (Abb.9). Gleichzeitig wird der Hintergrund subtrahiert und das sog. „streaking“ (streifenförmige Artefakte) entfernt. Die richtige Position der Kreuzmarkierungen muss für alle Spots in allen relevanten Gelen manuell kontrolliert werden. Nur solche Proteinspots stehen der späteren Evaluation zur Verfügung, die in diesem Arbeitsschritt detektiert und markiert wurden. Die Funktion „Gaussian Model During Test“ erlaubt überlappende Spotcluster zu identifizieren, die Spots voneinander zu differenzieren und macht somit eine genaue Quantifizierung möglich. Jedem markierten Spot/Protein wird automatisch eine laufende Nummer („SSP number“) zugeordnet.

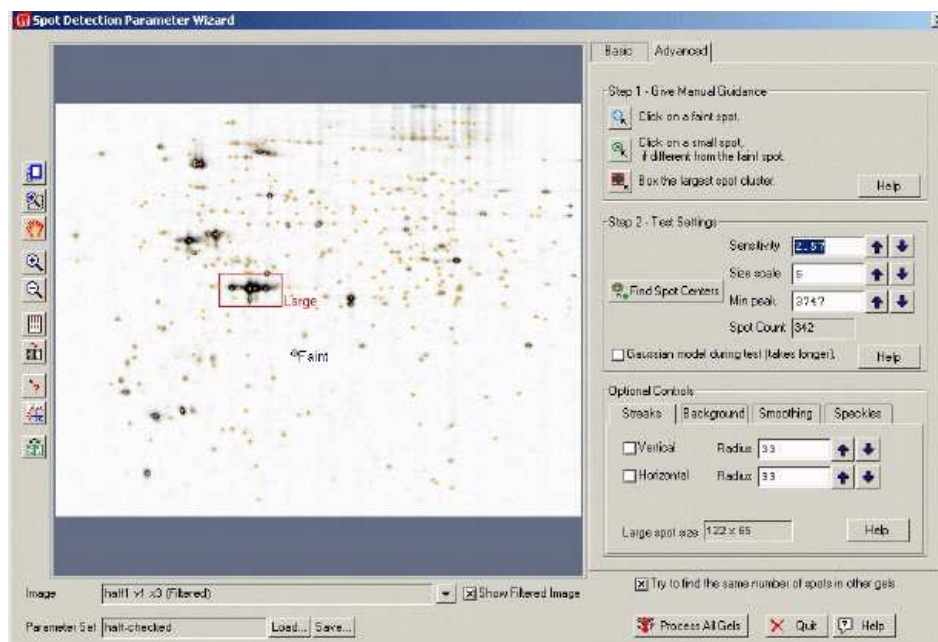


Abb.9: Durch die Software PDQuest erfasstes Proteinexpressionsmuster einer Probe

3.7.2 Matchseterstellung

Das Softwareprogramm PDQuest ermöglicht es, die Gele unter Erstellung eines gemittelten Referenzgels („master-gel“) aufeinander abzustimmen („gel-matching“) und miteinander zu vergleichen (Abb.10+11). Gele einer Versuchsserie werden zu einem „matchset“ zusammengefasst (70).

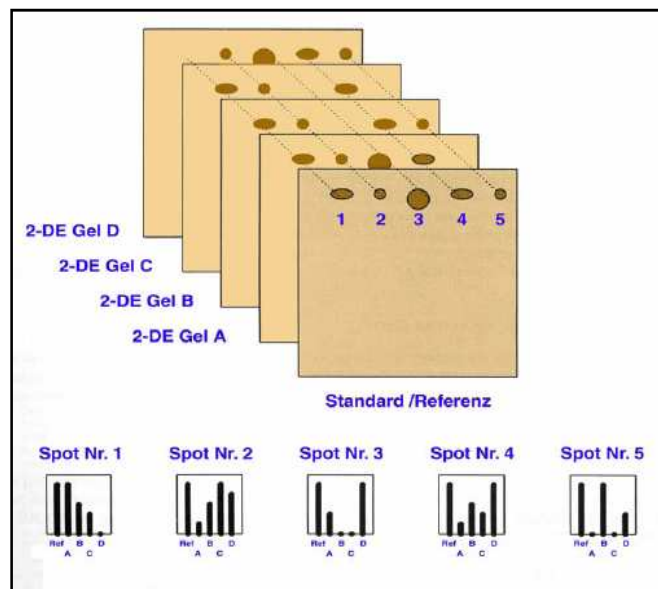


Abb.10: Schematische Darstellung eines Matchsets mit Standard/ Referenzgel

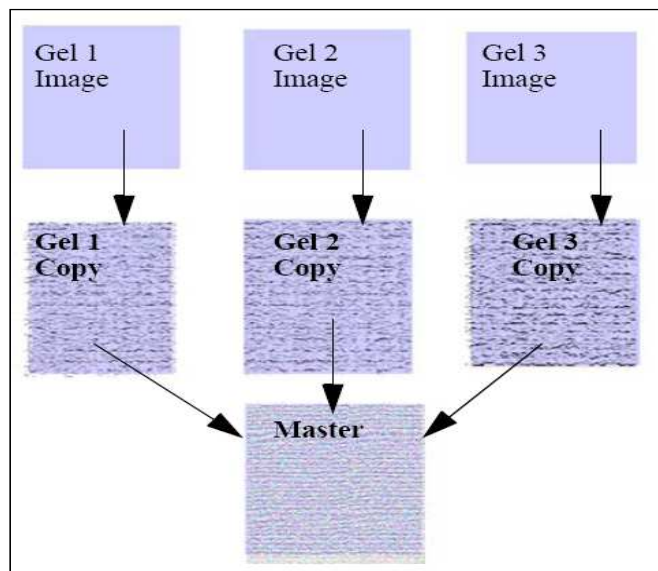


Abb.11: Erstellung eines Mastergels

In dieser Arbeit wurden jeweils aus den beiden Zelllinien (HCT 116 p53 +/- und die Kontrollzelllinie p53 -/-) Gele mit 3 Replikaten (Behandlungszeitpunkte: 0, 8, 16

und 24h) hergestellt. Die so generierten 2-DE Gele wurden in verschiedenen Matchsets (unterschiedliche pH Bereiche) zusammengefasst. Als Referenzgel diente in beiden Versuchsreihen das Gel mit der unbehandelten wt-Zelllinie HCT116 p53 +/+.

Proteine, die nicht im Referenzgel enthalten sind, werden manuell zu diesem hinzugefügt („add spot to master“), so dass das Mastergel am Ende alle Proteinspots dieser Gelserie enthielt. Durch die Struktur des Matchsets wird es möglich, alle Proteinspots im Matchset bezüglich quantitativer und qualitativer Unterschiede zu vergleichen („matching“). Hierdurch können p53 induzierte Veränderungen im direkten Vergleich zu detektiert werden. Die Intensitäten der Proteinspots werden normalisiert, der Hintergrund subtrahiert, Proteinpeaks detektiert und die relative Färbungsintensität der Spots gemessen. Die PDQuest Analyse Software besitzt hierzu eine „automated matching“ Funktion.

Um ein gutes Ergebnis des automatischen Spotvergleichs zu ermöglichen, werden sog. „landmarks“ festgelegt. Hierbei handelt es sich um prominente Spots, die in allen Gelen gut identifizierbar sind. Idealerweise werden solche Landmarken über alle Quadranten des Gels verteilt um ähnlich Satelliten eines GPS die Position von Proteinspots auf allen Gelen zu determinieren. Die Gele des Matchsets können so aneinander ausgerichtet, positioniert und so vergleichbar gemacht werden (Abb.12+13).

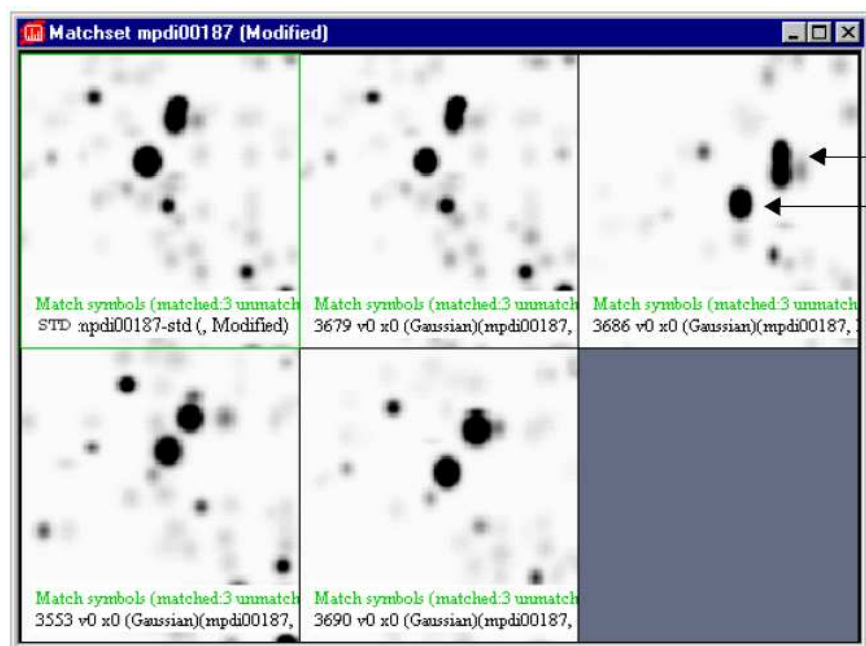


Abb.12: Festlegung prominenter Spots als sogenannte „Landmarken“

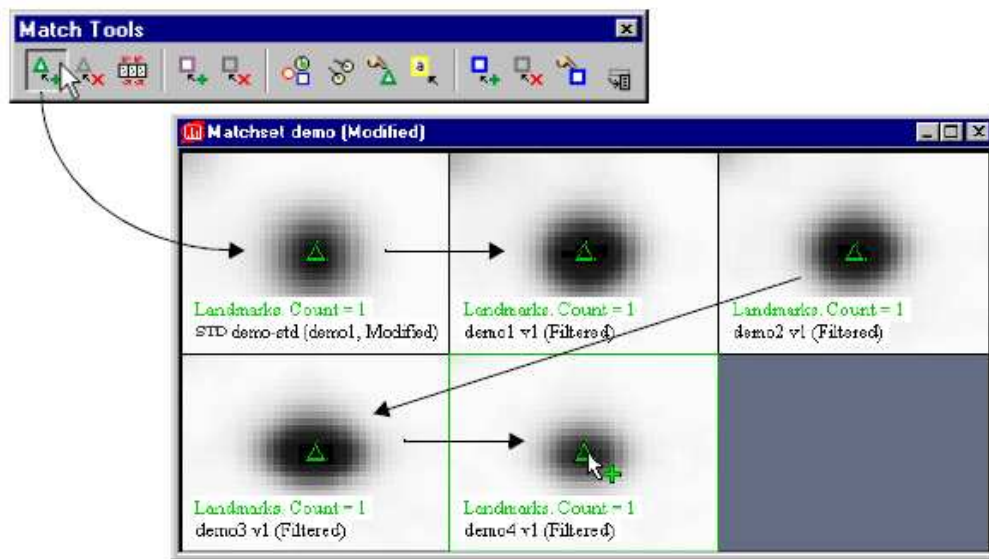


Abb.13: Markierung der gesetzten „Landmarken“

Mehrere Tools werden von PDQuest zur Verfügung gestellt, um das Matching zu kontrollieren. So zeigen vom Spotcenter ausgehende Vektoren („show vector offsets“) Distanz und Richtung jedes einzelnen Spots im Vergleich zum Mastergel und helfen durch Kontrolle der Ausrichtung und Distorsion eines jeden Spots sog. „missmatches“, also falsch gematchte Proteinspots, zu detektieren (Abb.14).

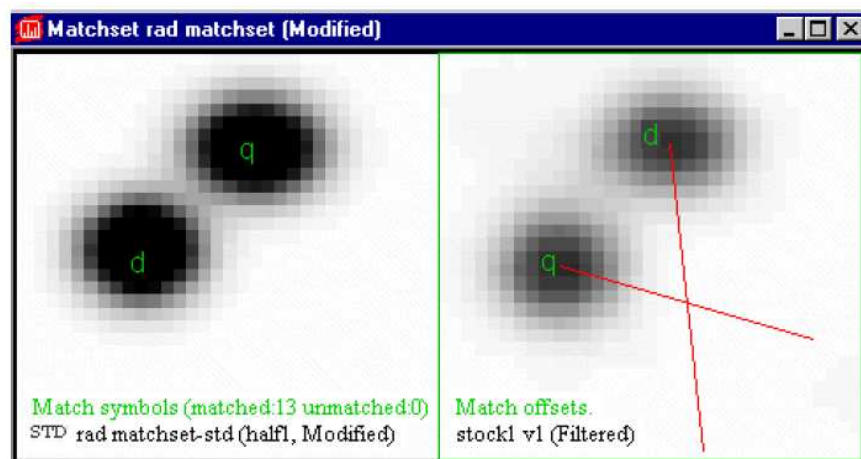


Abb.14: Vom Spotcenter ausgehende Vektoren zur Darstellung von Distanz und Richtung der einzelnen Spots im Vergleich zum Mastergel

Ist das Matchset abgeschlossen, können die detektierten Spots aller Gele miteinander verglichen und statistisch analysiert werden („matchset analysis“).

3.7.3 Analyse des Matchsets

Die Analysetools sind so programmiert, dass alle Spots im Matchset verglichen und als Datenbank organisiert werden können. Automatisch wird eine Liste der detektierten Proteinspots hergestellt, die ihre Koordination auf dem Gel, korreliert mit den entsprechenden mathematischen MW- und pI-Werten, der Fläche der Spots und deren integraler Intensität enthält. Analysesets definieren Proteinspots, die statistisch signifikant sind und ob ihrer Expressionsunterschiede biologisch relevant sein können. Um diese Signifikanz zu gewährleisten, bietet PDQuest ein entsprechend integriertes Statistikpaket an (Abb.15+16).

Nur Proteine, für die im Vergleich unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Test eine 1.5 fache Auf- oder Abregulation ermittelt werden konnte, wurden für die Identifikation in Erwägung gezogen.

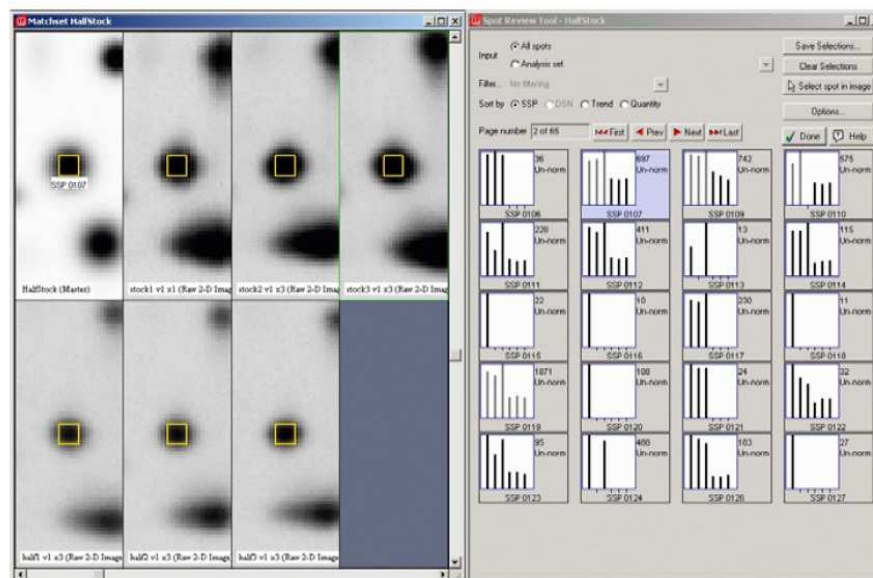


Abb.15: Analysetool der PDQuest Software

3.8 Statistische Evaluation – Mann-Whitney-U-Test

Der Mann-Whitney-Test ist ein parameterfreier statistischer Test. Der U-Test ist ein Homogenitätstest. Er dient zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen, also ob zwei unabhängige Verteilungen A und B zu derselben Grundgesamtheit gehören.

Man hat 2 Stichproben vor sich, die Stichprobe A mit n_1 Werten und die Stichprobe B mit n_2 Werten. Man vergleicht jeden Wert der Stichprobe A mit jedem Wert der

Stichprobe B. Es gibt also $n_1 \times n_2$ Vergleiche. Die Nullhypothese $H(0)$ besagt, dass es keinen Unterschied zwischen den Verteilungen gibt, d.h. $A=B$. Der Test funktioniert einseitig oder zweiseitig. Beim einseitigen Test wird geprüft, ob $A>B$ bzw. $A<B$, beim zweiseitigen Test wird geprüft, ob $A=B$ ist.

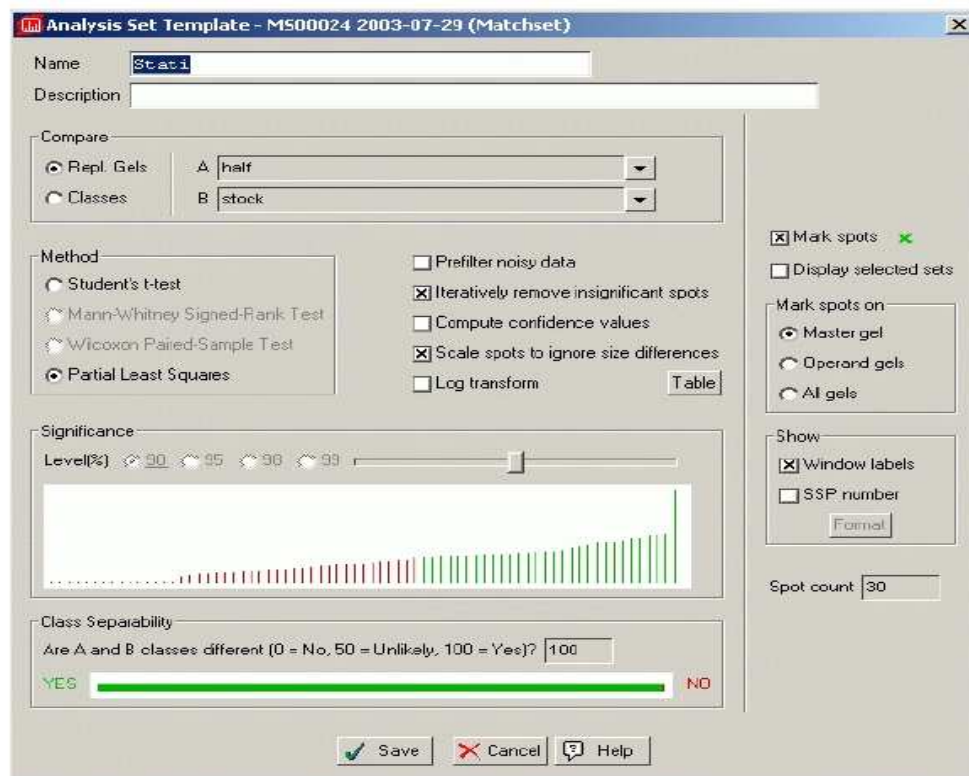


Abb 16.: Analysetool der PDQuest-Software – Möglichkeiten der statistischen Evaluation

3.9 Massenspektrometrische Identifikation

3.9.1 Grundlagen

Die molekularen Massen aller Peptide eines Proteins, die in einem Massenspektrum gefunden werden, werden als „peptide mass fingerprint“ (PMF) bezeichnet (189, 123, 210). Dieser PMF wird verwendet, um über einen Vergleich mit in Datenbanken vorhandenen Informationen das Protein zu identifizieren. Gelingt dieses alleine anhand des Molekulargewichtes nicht, wird im Rahmen einer Tandem-MS/MS Analyse die genaue Aminosäuresequenz des Proteins bestimmt.

Massenspektrometer setzen sich zusammen aus den Elementen Ionenquelle zur Erzeugung und Beschleunigung der Ionen, einem Massenanalysator und einem Detektorsystem, der die Intensitäten der Ionenströme registriert (Abb.17).

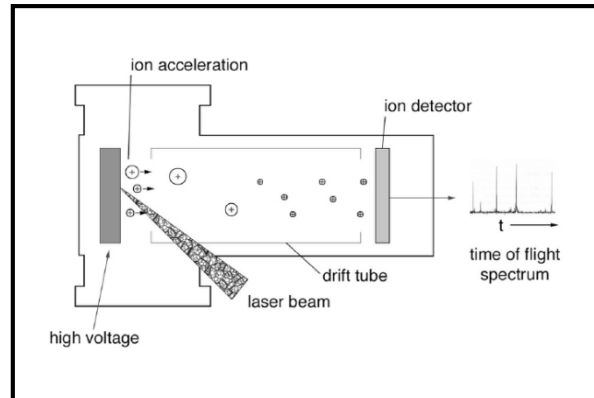


Abb.17: Schematischer Aufbau einer MALDI-TOF Massenspektrometrieinheit

Durch die Kombination dieser Elemente ist es möglich, das Molekulargewicht chemischer Komponenten durch Ionisierung, Separierung und Messung des Masse/Ladung Verhältnisses (m/z) der gewonnenen Ionen zu bestimmen.

Erster Schritt im Rahmen der MS ist die unbekannten Proteine durch ein proteolytisch wirkendes Enzym mit bekannter Spezifität (Trypsin) zu fragmentieren. Anschließend werden die so gewonnenen Peptide ionisiert.

Im Rahmen der MALDI (Matrix-Assisted-Laser-Desorption) - Ionisierungsmethode werden die Proben, die in eine kristalline stark absorbierende Matrix eingebettet werden, mit einem UV-Laserstrahl (in den meisten Instrumenten wird ein N_2 -Laser mit 337nm verwendet) beschossen. Dieser Vorgang führt zu einem Verdampfen der Matrix und zu einer Überführung der eingeschlossenen Peptidmoleküle in die Gasphase. Über Protonierungs- und Deprotonierungsreaktionen kommt es während dieses Vorganges zur Ionisierung und Beschleunigung der Moleküle. Die Ionen gelangen daraufhin in eine Flugröhre (Vacuum), werden hier in einem elektrischen Feld (10-30 kV) beschleunigt und entsprechend ihrer spezifischen Ladung (Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z)) aufgetrennt. Am Ende der Röhre können die Ionenflüsse dann durch den Detektor gemessen und in elektrische Signale umgewandelt werden.

Gelingt die Identifikation nicht alleine anhand des Molekulargewichtes, kann im Rahmen einer Tandem-MS/MS Analyse die genaue Aminosäuresequenz des

Proteins bestimmt werden. Ein Tandem-MS besteht aus der Kombination von zwei Massenspektrometern.

3.9.2 „Spot-Picking“ und enzymatische Proteinfragmentierung (in gel-digestion)

Zur Identifikation der Proteine ist es nötig, diese aus den Gelen herauszutrennen und zu fragmentieren. Statistisch ermittelte Spots werden durch Mausklick markiert, vom „spot picker“, einem Roboter zum Herausschneiden von Spots aus dem Gel, herausgeschnitten und direkt in eine „96-well plate“ transferiert. Diese „96-well plate“ kann wiederum direkt zur Trypsin vermittelten Fragmentierung („in-gel digestion“) verwandt werden. Trypsin spaltet ein Peptid spezifisch bei Arg-X und Lys-X Bindungen. Dieser geschlossene Ablauf ist wichtig, um Kontaminationen zu reduzieren.

Die Fragmentierung erfolgte unter Anwendung eines MassPREP robotic protein handling Systems (Micromass) (141). Die Gelstücke wurden durch zweimaliges Waschen mit 100µl 50mM Ammoniumbicarbonat (Ambic)/ 50% Acetonitril bei 40 Grad für zehn Minuten entfärbt. Zur Reduktion wurden die Gele dann für 30 Minuten in 10mM Dithiothreitol (DTT)/ 100mM Ambic gebadet und im Anschluss mit 55mM / 100mM Ambic für 20 Minuten alkyliert. Trypsin wurde hinzugegeben und die Lösung wurde für 4,5 h mit 40° C inkubiert. Die Peptide wurden nacheinander mit 30µl 5% Methansäure/ 2% Acetonitril und 24µl 2,5% Methansäure/ 50% Acetonitril extrahiert. Das Acetonitril verdunstete dann über Nacht.

3.9.3 MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation)

Die Identifikation erfolgte in Kooperation mit Prof. U. Hellman im Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Schweden, mittels einer Ultraflex MALDI TOF/TOF Massenspektrometrieinheit (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Vor Auftragen auf die Gel-Matrix wurden die extrahierten Peptide mittels C18 ZipTips (Millipore) konzentriert, interferierendes Salz entfernt und jeweils zweimal mit 10µl 70% Acetonitril / 0,1% Trifluoressigsäure (TFA), 10µl 50% Acetonitril / 0,1% TFA und 10µl 0,1% TFA equilibriert. Die Probe wurde durch Pipettieren auf den ZipTip aufgetragen. Die Reste des Trypsins wurden mit 60% Acetonitril / 1% Essigsäure ausgewaschen.

Als Matrix wurde eine Alpha-HCCA Matrix (Alpha-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure) verwendet. Bei unklarer Proteinidentität oder in Fällen noch unbekannter Proteine kann durch „ES ionization quadrupole time-of-flight (Q-TOF) tandem MS (Micromass)“ zur Sequenzierung die Identität ermittelt werden. Durch das MS-Fit Suchprogramm (<http://prospector.ucsf.edu/cgi-bin/msform.cgi?form=msfitstandard>) können die entsprechenden Identitätsergebnisse gefunden und benannt werden.

3.10 Promotoranalyse

Ebenfalls erfolgten nach Identifikation am Karolinska Institute in Stockholm Analysen der Promotorregionen der identifizierten Proteine unter Anwendung des p53MH Algorithmus (91) mit dem Ziel, mögliche p53 Bindungsstellen aufzudecken (202).

4. Ergebnisse

4.1 Versuchsaufbau I – Mitomycin C Behandlung

4.1.1 Western-Blot Analyse zur Überprüfung der Zelllinien HCT116 p53 +/+ und -/-

In der Western-Blot Analyse konnte sowohl eine Induktion von p53 als auch eine Phosphorylierung an Serin15 in der HCT116 p53 +/+ Zelllinie nachgewiesen werden. In der p53 -/- Zelllinie wurde keine p53 Expression verzeichnet. Ebenfalls war eine Hochregulation der bekannten p53 Targets p21, MDM2 und Wig-1 in der p53 +/+ Zelllinie festzustellen. Für hTERT, ein durch p53 negativ reguliertes Protein, ließ sich eine verminderte Transkription in der HCT116 p53 +/+ Zelllinie darstellen (Abb.18). Somit wurden die physiologischen Stressreaktionen der beiden Zelllinien entsprechend ihres p53 Wildtyps respektive der Mutation von p53 erfolgreich überprüft.

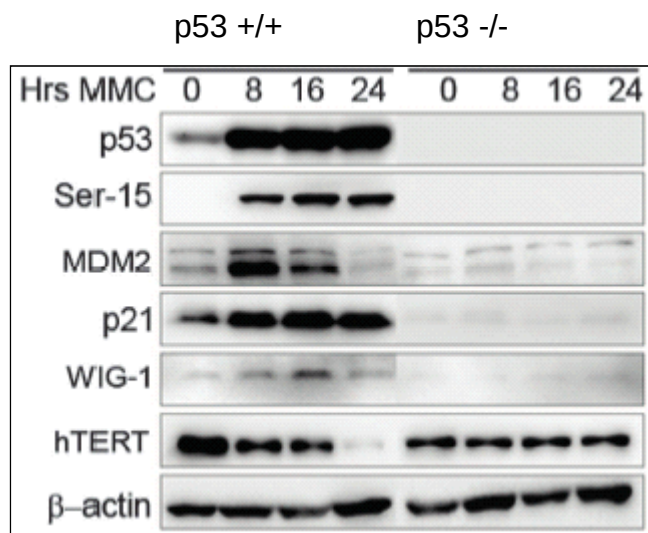


Abb.18: Western Blot Analysen mit Expressionsdarstellung der benannten Proteine nach MMC Behandlung der HCT p53 -/- und p53 +/+ Zelllinien zu den angegebenen Zeitpunkten. β-Actin wurde als Ladungskontrolle verwendet.

4.1.2 2D-Gelelektrophorese

Im Anschluss an die 2D-Gelelektrophorese wurden 4 Matchsets (pH 3.9-5.1; pH 4.7-5.9; pH 5.5-6.7 und pH 6.3-8.3) erstellt, innerhalb derer mittels PD-Quest Software (Bio-Rad, Hercules, CA) 5789 Proteine detektiert und analysiert werden konnten. Die Matchsets II (4.7-5.9) und III (6.3-8.3) beinhalteten hierbei 2/3 aller

separierten Spots. Insgesamt wurden 115 statistisch signifikant unterschiedlich regulierte Proteine ($P < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test) detektiert, wobei als statistisch signifikant eine 1,5 fache Hoch- oder Herabregulation der Proteinexpression in der HCT116 p53 $+/+$ Zelllinie im Vergleich zur HCT116 p53 $-/-$ Zelllinie gewertet wurde. Der aus 3 Replikaten ermittelte mittlere Korrelationskoeffizient betrug 0,89 (Range: 0,86-9,93). 55 der signifikant dysregulierten Proteine konnten mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. 42 dieser Proteine zeigten eine Hochregulation und 13 waren herunterreguliert. Für die durch MMC-Behandlung induzierten Proteine konnte eine bis zu 100fache Hochregulation in der p53 $+/+$ Zelllinie detektiert werden, während sich das Expressionsniveau in den p53 $-/-$ Zellen kaum veränderte. Die von p53 inhibierten Proteine zeigten eine bis zu 10fache Expressionsverminderung (Tabelle 1 und Anhang Tabelle 3+4).

Protein	Veränderung des Expressionsniveaus						mögliche p53 Bindungsstelle
	p53 ^{+/+}			p53 ^{-/-}			
	8 h	16 h	24 h	8 h	16 h	24 h	
	Hochreguliert						
Caspase 3	4.19	6.41	—	—	—	—	Ja
eIF5A	1.94	11.26	13.01	—	—	1.42	Ja
hnRNP C1/C2	2.18	2.58	3.49	—	—	—	Nein
hnRNP K	7.67	8.3	—	—	—	—	Ja
Lamin A/C	3.69	67.2	133.7	3.7	11.1	18.0	Ja
Nm23-H1	1.46	2.21	1.38	—	—	—	Ja
Nucleophosmin	1.49	1.66	—	—	—	—	Ja
TAT-binding protein 1	—	1.48	13.43	—	—	—	Ja
Thioredoxin	1.43	8.11	11.03	1.3	1.7	1.77	Nein
14-3-3 sigma	—	2.06	6.07	—	—	—	Ja

Herrunterreguliert							
hnRNP K, Isoform a	-1.54	-3.69	-10.28	—	—	—	Ja
hnRNP C1/C2 a	—	-1.67	-4.96	—	1.32	1.39	Nein
PP2A	-1.5	-2.3	—	—	—	—	Nein
Prx II	—	-1.56	-2.85	—	—	—	Nein
TrpRS	-1.3	-1.9	-2.71	—	—	—	Ja

Tabelle 1: exemplarische Darstellung einer Auswahl der biologisch relevantesten identifizierten Proteine. Die angegebenen Werte geben Änderungen des Expressionsniveaus (x-fach) im Vergleich behandelte/unbehandelte Zelllinie wieder.

In Abbildung 19 werden exemplarisch Expressionsveränderungen einiger p53 abhängig hochregulierter Proteine zu den benannten Zeitpunkten dargestellt: eIF5A (eukaryotic translation factor 5A), hnRNP C1/C2 (heterogenous nuclear ribonucleoprotein C1/C2), hnRNP K (heterogenous nuclear ribonucleoprotein K), Laminin A/C, Nm23-H1. Weiterhin Darstellung von zwei der p53 abhängig herunterregulierten Proteine: Prx II (peroxiredoxin II) und TrpRS (tryptophanyl-tRNA synthetase).

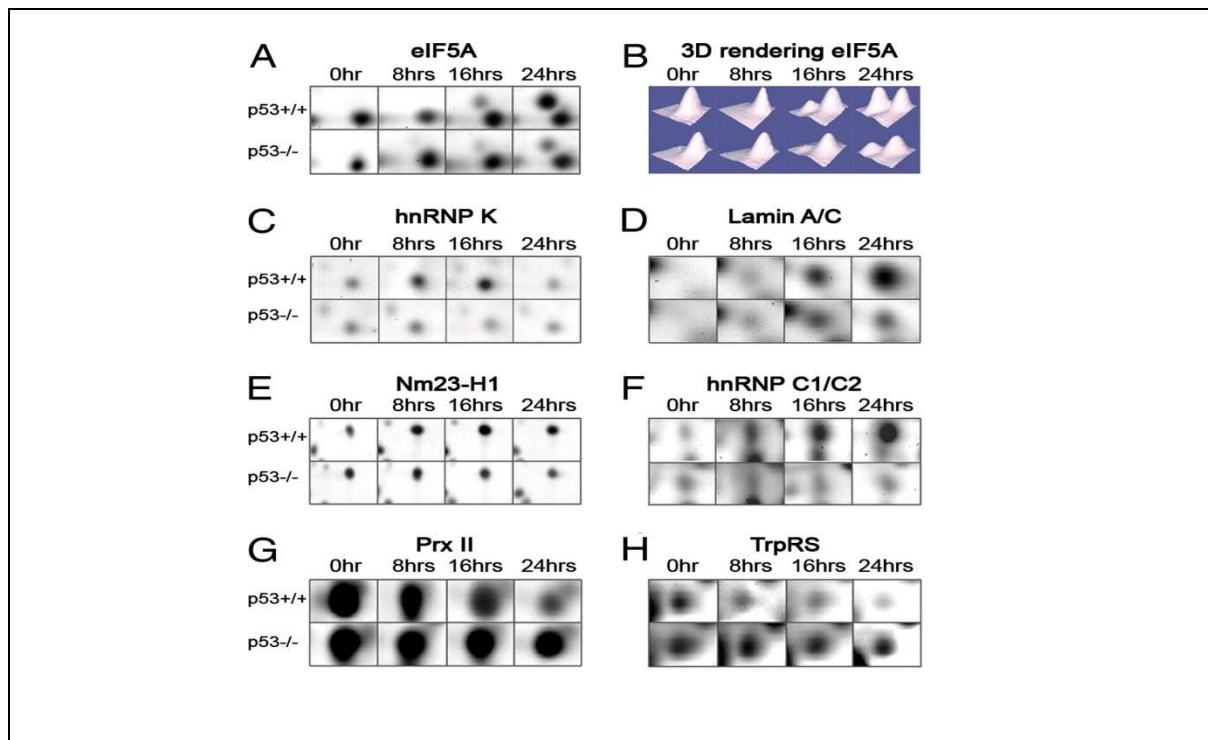


Abb.19: Darstellung der Expressionsveränderung einiger biologisch relevanter identifizierter Proteine. Die Gelausschnitte (A, C-H) zeigen das Expressionsniveau der benannten Proteine zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten der MMC-Behandlung.

Für eIF5A wurde im Vergleich zum Ausgangslevel eine mehr als 10fache Induktion des Proteinlevels zum Zeitpunkt 24 h in der p53 +/+ Zelllinie detektiert. Der hnRNP K Level zeigte zum Zeitpunkt 8 h und 16 h MMC Behandlung eine starke Erhöhung in der p53 +/+ Zelllinie und fiel dann nach 24 h ungefähr wieder auf das Ausgangsniveau ab. Laminin A/C konnte in den Zellen ohne Behandlung kaum nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich in den p53 +/+ Zellen eine Induktion nach 16 h Behandlung. Das Nm23-H1 Level erreichte in den p53 +/+ Zellen einen Peak nach 16 h, während hnRNP C1/C2 erst nach 24 h seinen höchsten Wert in der p53 +/+ Linie zeigte. Der Proteinlevel von Prx II und TrpRS wurde nach 24 h Behandlung bis auf einen Wert von 25-30% des Ausgangswertes reduziert.

Die optische Dichte aller Spots aus den 3 in Replikaten erstellten Matchsets wurde kalkuliert und anschließend in Form von Histogrammen dargestellt (Abb. 20, A-I).

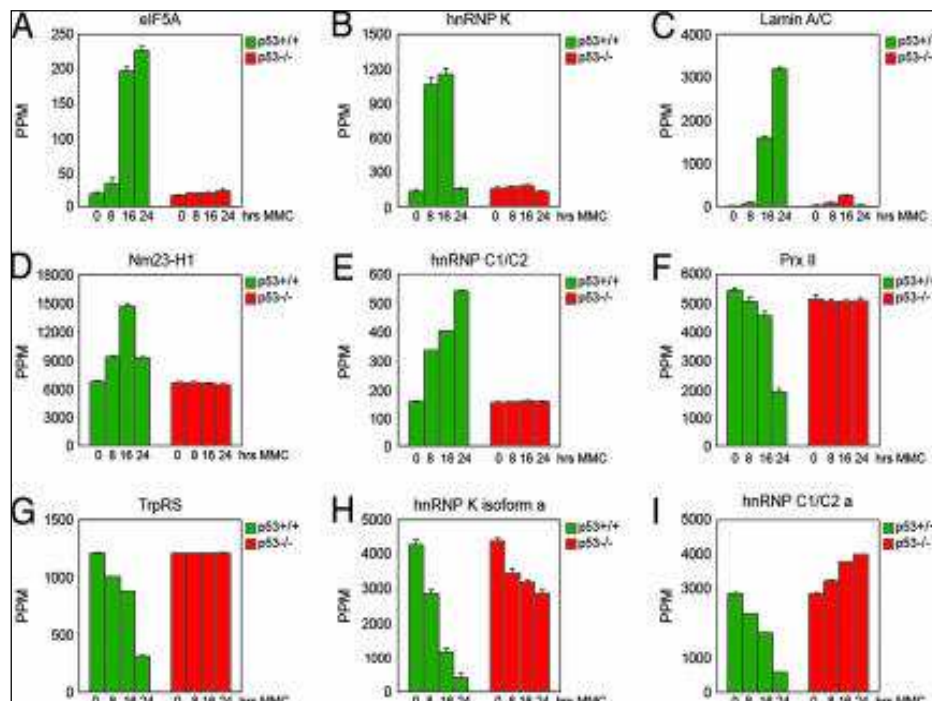


Abb.20: Graphische Darstellung der p53-regulierten Proteinexpression. Die optische Dichte der benannten Spots wurde mittels PDQuest Software ermittelt. Graphisch dargestellt die Mittelwerte aus 3 unterschiedlichen Gelläufen.

4.1.3 Validierung der Ergebnisse mittels Western-Blot

Zur Validierung unserer Ergebnisse führten wir für sieben der identifizierten Proteine Western-Blot Analysen durch. Die Ergebnisse zeigten sich überwiegend übereinstimmend mit den Daten der 2D-Elektrophorese. Nur die Induktion von hnRNP K und Laminin A/C stellte sich in der Western-Blot Analyse etwas weniger ausgeprägt dar. Weiterhin detektierten wir nicht die in der 2DE ermittelte Herabregulation von Prx II. TrpRS stellte sich im Western-Blot in Form von 2 Isoformen dar. Während die 53 kDa Form in den p53 +/+ Zellen herabreguliert war, zeigte die 70 kDa Form keine Veränderung des Expressionsniveaus (Abb. 21).

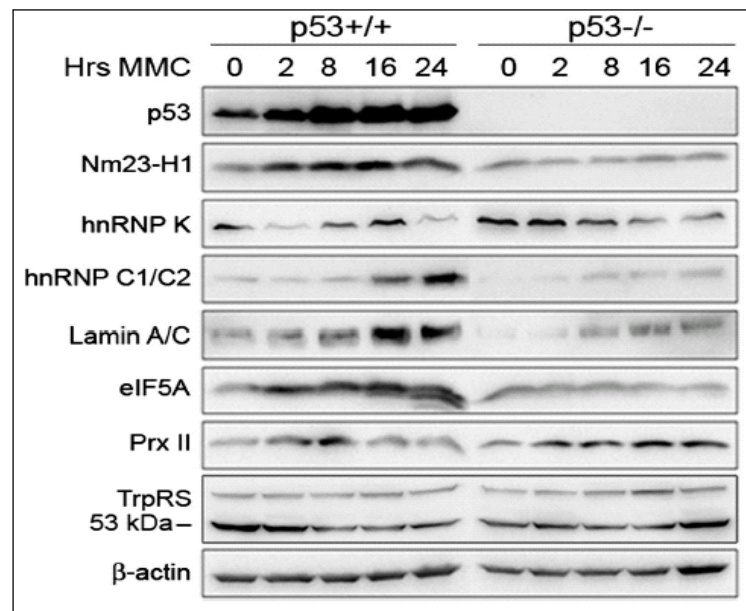


Abb. 21: Ergebnisse der Western-Blot Analysen. Darstellung der p53 abhängigen Proteinexpression der benannten Proteine zu den angegebenen Zeitpunkten in den MMC behandelten Zelllinien p53 +/+ und p53 -/-. β-Aktin wurde als Ladungskontrolle verwendet

4.1.4 Validierung der Ergebnisse mittels PCR

Die bekannten p53 Targets p21, MDM2 und Wig-1 wurden für die RT-PCR Untersuchungen als Positivkontrollen verwendet. Sowohl für die Kontrollproteine als auch für die Proteine eIF5A, hn RNP K, Laminin A/C, und Nm23-H1 konnten - korrelierend mit den 2DE Ergebnissen - erhöhte mRNA Spiegel in den HCT116 p53 +/+ Zellen nachgewiesen werden. In den p53 -/- Zellen wurden hingegen keine Änderungen im Expressionsniveau verzeichnet. Der mRNA Gehalt für hnRNP C1/C2 zeigte sich in den MMC behandelten Zellen signifikant reduziert,

dies jedoch unabhängig vom p53 Status. Der Prx II mRNA Spiegel zeigte ausschließlich in den p53 +/+ Zellen zum Zeitpunkt 16h eine kurzzeitige Hochregulation, fiel anschließend jedoch wieder auf die Ausgangswerte ab. Der TrpRS mRNA-Level zeigte eine geringe Downregulation, dies wiederum unabhängig vom p53 Status (Abb.22).

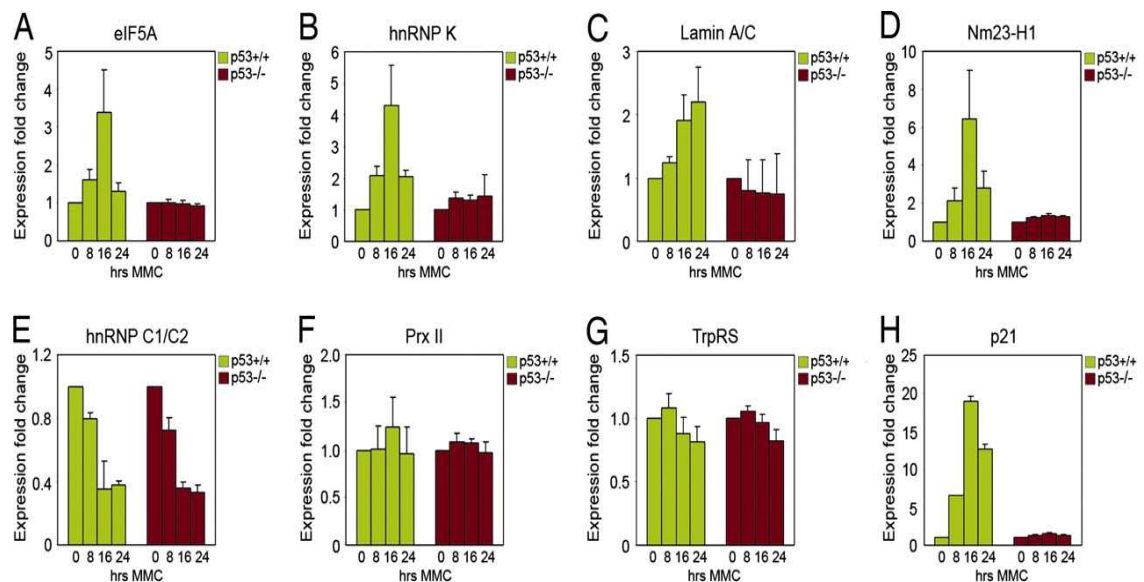


Abb.22: Graphische Darstellung der real-time PCR Analyse der benannten Proteine in den Zelllinien HCT 116 p53 +/+ und p53 -/- zu den angegebenen Zeitpunkten

4.1.5 Promoteranalysen der kodierenden Gene

In der Promotoranalyse (p53MH Algorithmus) wurden in 24 der für hochregulierte Proteine kodierenden Gene und in 8 der für herunterregulierte Proteine kodierenden Gene mindestens eine mögliche p53 Bindungsstelle nachgewiesen.

4.2 Versuchsaufbau II – Nachweis p53 abhängiger Phosphorylierungen

4.2.1 Western-Blot Analyse zur Überprüfung der Zelllinien HCT 116 +/+ und HCT 116 -/-

Die Western-Blot Analysen erfolgten anhand standardisierter Protokolle unter Verwendung der folgenden Antikörper: anti-p53 monoklonaler Mausantikörper (DO-1, Eurogenetics, Tessenderlo, Belgien); anti-MDM2 monoklonaler Mausantikörper (2A10, Sonia Lain, Universität Dundee); anti-p21 monoklonaler Mausantikörper (BD Pharmingen, CA), anti- β -Actin monoklonaler Mausantikörper (Sigma, St. Louis, MI). Für den Nachweis der p53 Phosphorylierungen wurden die polyklonalen Kaninchenantikörper anti-p53 Ser15, Ser20 und Ser392 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) verwendet (Abb.23). Eine Induktion von p53 und seiner bekannten Targets MDM2 und p21 zeigte sich erwartungsgemäss ausschließlich in der p53 +/+ Zelllinie.

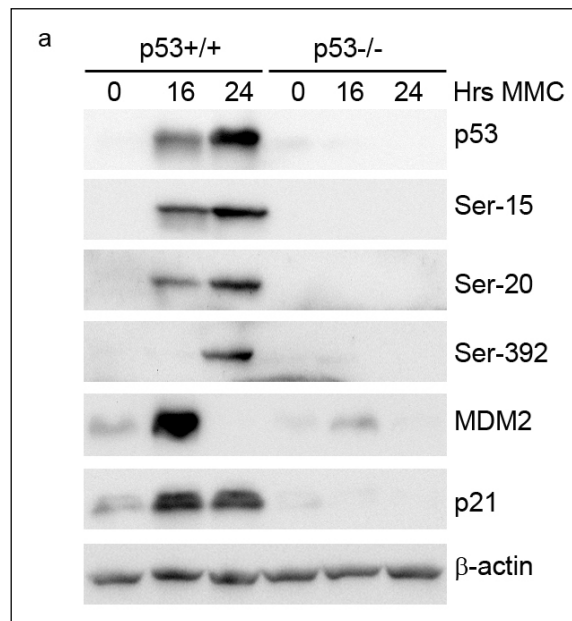


Abb.23: HCT116 p53 +/+ und p53 -/- wurden mit MMC für jeweils 16 und 24 Stunden behandelt. Mittels Western-Blot erfolgte eine Analyse der Zelllysate auf Expression von p53, p21, MDM2 und hinsichtlich der Phosphorylierung von p53 an Ser15, ser20 und Ser392. Die Analyse der β -Actin Expression wurde als Kontrolle verwendet.

4.2.2 2D-Gelelektrophorese

In den beiden Matchsets (pH 4.7-5.9 und 5.5-6.7) konnten insgesamt 3029 Proteinspots detektiert werden. 279 dieser Proteine zeigten Änderungen ihres Phosphorylierungsstatus nach MMC Behandlung, wobei 44 hiervon ausschließlich in der behandelten HCT116 p53 +/+ Zelllinie zu finden waren. Mit Hilfe der Massenspektrometrie gelang es, 21 dieser Proteine zu identifizieren.

Die identifizierten Proteine konnten in zwei Gruppen eingeteilt werden. Proteine der 1. Gruppe zeigten Änderungen ihres Phosphorylierungsstatus in Verbindung mit einer Veränderung des Proteinexpressionsniveaus. Bei Proteinen der 2. Gruppe hingegen traten Änderungen des Phosphorylierungsstatus ohne nennenswerte Veränderungen des Proteinspiegels auf. Zur ersten Kategorie gehörten u.a. das Proteinprodukt von NM23-H1 und ANXA1. NM23-H1 wurde in den p53 +/+ Zellen nach Behandlung induziert und gleichzeitig auch phosphoryliert. Im Gegensatz hierzu konnte eine Phosphorylierung des DJ-1 Proteins in behandelten p53 +/+ Zellen verzeichnet werden, jedoch veränderte sich sein gesamter Proteinspiegel nicht (Tabelle 2).

Protein	Symbol	Accession
Actin beta	ACTB	AAH08633
Annexin 1	ANXA1	NP_000691
Chaperonin TCP1 su 6 ^a isoform a	CCT6A	NP_001753
Dihydrolipamide dehydrogenase	DLD	AAH18648
DJ-1 protein	PARK7	NP_009193
Glutathione S-transferase pi	GSTP1	AAH10915
hnRNP-E1	HNRPE1	NP_006187
hnRNP L isoform b	HNRPL	NP_001005335
Isocitrate dehydrogenase 3	IDH3A	NP_005521
Mago-nashi homolog 2	FLJ10292	NP_060518
NM 23A isoform b	NME1	NP_000260
Peroxiredoxin 2 isoform a	PRDX2	NP_005800
Peroxiredoxin 3 isoform b	PRDX3	NP_054817
Phospho-glycerate dehydrogenase	PHGDH	AAH32110
Phosphoglycerate mutase 1 (och 2)	PGAM1	NP_002620
Proteasome beta 6 sub unit	PSMB6	NP_002789
Protein disulfide isomerase related protein 5	ERP5	AAB50217
Pyrophosphatase 1	PPA1	NP_066952
RuvB-like 2	RUVBL2	NP_006657
Tropomyosin 3	TPM-gamma	AAA42263
Vacuolar prot sorting 29 isoform 2	VPS29	NP_476528

Tab.2: Exemplarische Darstellung phosphorylierter Proteine nach p53 Aktivierung

In Abbildung 24 werden die mit Pro-Q-Diamond gefärbten 2DE Gele der Zelllinien HCT p53 $+/+$ und p53 $-/-$ angefertigt nach 16 stündiger MMC Behandlung dargestellt. Exemplarisch vergrößert und ebenfalls als 3DE ist die Darstellung von ANXA1 zu sehen. Die Abbildungen zeigen eine ausschließliche Phosphorylierung von ANXA1 in der p53 $+/+$ Zelllinie.

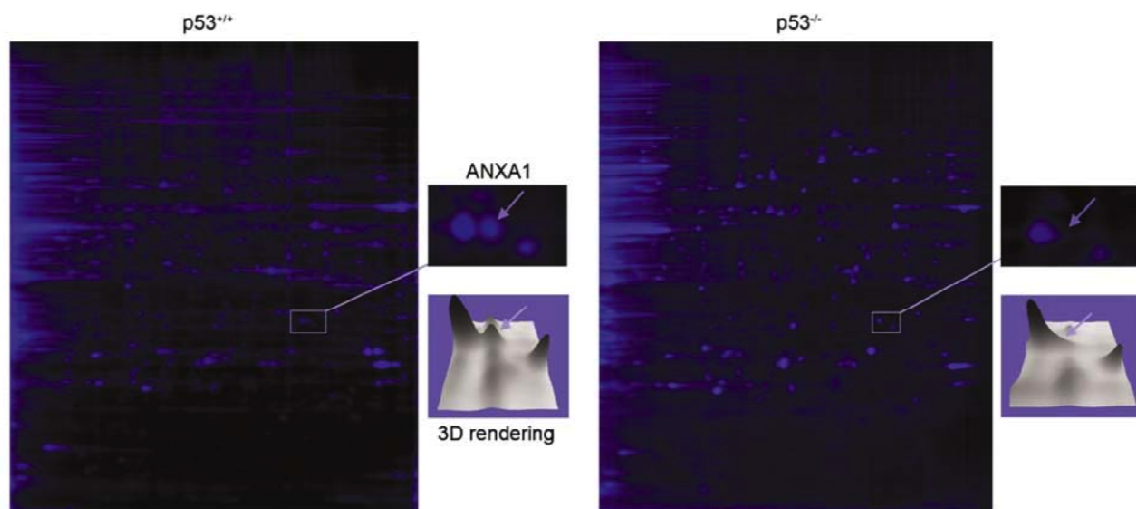


Abb.24: 2D-Elektrophorese der HCT116 p53 $+/+$ und p53 $-/-$ Zelllysate nach 16 Stunden MMC Behandlung. Die ausgewählten Abbildungen zeigen eine Phosphorylierung von ANXA1 ausschließlich in den p53 $+/+$ Zellen nach p53 Aktivierung.

Zum direkten Vergleich des Expressionsniveaus in Zusammenhang mit dem Phosphorylierungsstatus erfolgte nach Färbung der Gele mit Sypro-Ruby (rot) und Pro-Q-Diamond (blau) eine Analyse mittels Overlay im Multi-Channel Viewer. Exemplarisch in Abb. 25 dargestellt ANXA1 in den unbehandelten Zellen und nach 16 stündiger MCC Behandlung. Zu verzeichnen war eine ausschließlich in den p53 $+/+$ Zellen auftretende Induktion und Phosphorylierung von ANXA1 nach MMC Behandlung.

Ebenfalls exemplarisch in Abbildung 26a+b dargestellt die p53 induzierte Veränderung des Expressionsniveaus von NM23-H1 und DJ1.

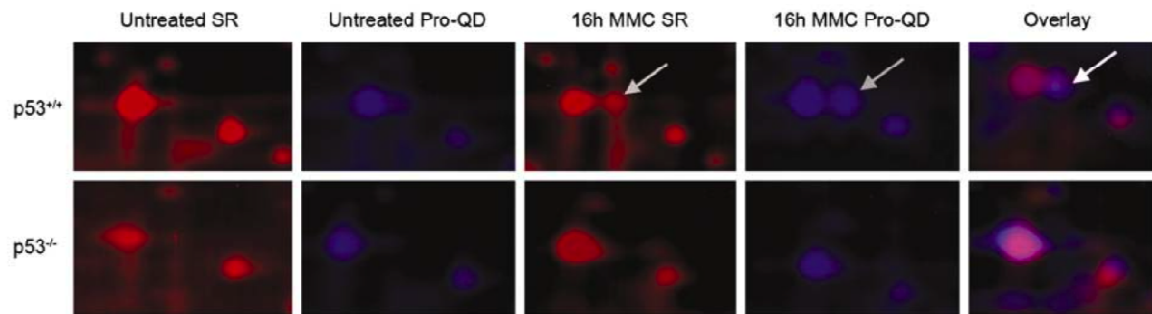


Abb.25: Darstellung des Proteinlevels (Sypro-Ruby Färbung; rot) und des Phosphorylierungsstatus (Pro-QD Färbung, blau) von ANXA1 nach MMC-Behandlung in HCT116 p53 ^{+/+} und p53 ^{-/-} Zelllinien mittels Multi-Channel-Viewer

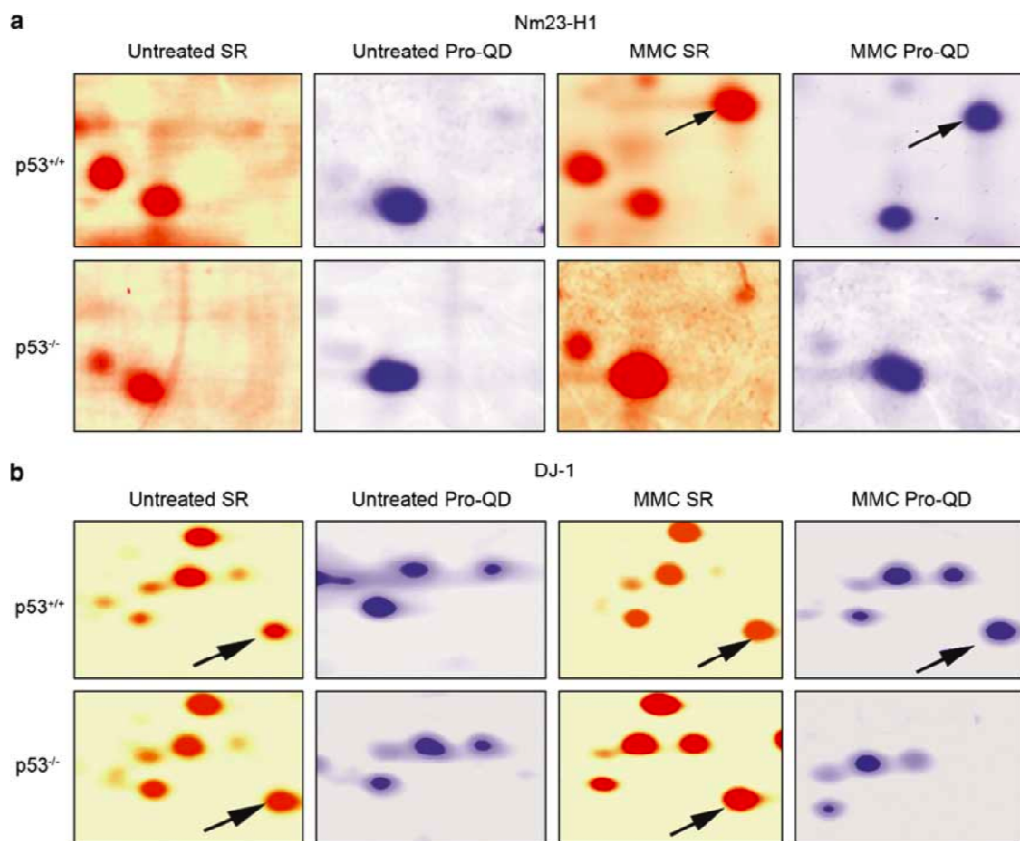


Abb.26: a) Induktion von Nm23-H1 in den HCT116 p53 ^{+/+} Zellen detektiert mittels Sypro-Ruby Färbung und Ermittlung der p53 abhängigen Phosphorylierung mittels Pro-QD Färbung; b) Phosphorylierung des DJ-1 Proteins in den p53 ^{+/+} Zellen nach MMC Behandlung; eine Änderung des Expressinsstatus wurde nicht ermittelt.

4.2.3 Validierung der Ergebnisse mittels Western-Blot

Zur Validierung der 2DE Ergebnisse wurden für 2 der identifizierten Proteine Western-Blot Analysen durchgeführt. Mittels des Mausantikörpers anti-pSTT (Abcam, Cambridge, UK) konnten in der Immunpräzipitation mit den 2DE Ergebnissen übereinstimmende p53 abhängige Phosphorylierungen für die Proteine ANXA-1 und DJ-1 detektiert werden (Abb. 27+28).

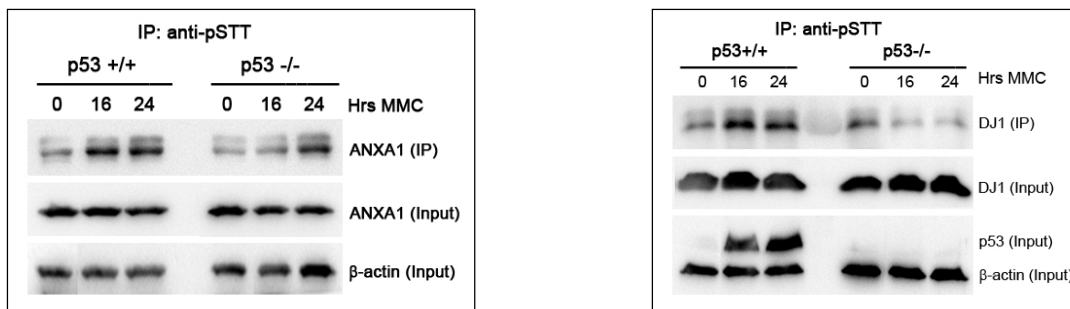


Abb.27+28: Darstellung der p53 abhängigen Phosphorylierung von ANXA-1 und DJ1 mittels Western-Blot unter Verwendung des spezifischen monoklonalen Mausantikörpers anti-pSTT (Abcam, Cambridge, UK)

5. Diskussion

Unsere Analysen führten zur Identifikation einer großen Anzahl an Proteinen, welche möglicherweise direkt oder indirekt durch p53 reguliert werden. Viele dieser Proteine wurden bislang noch nicht in Zusammenhang mit p53 genannt oder es ist der Mechanismus, auf welchen sie mit p53 in Verbindung stehen, bisher noch unbekannt. Basierend auf unseren Ergebnissen können wir p53 mit Vorgängen der mRNA Bearbeitung (hnRNP C1/C2), Translation (TrpRS), Redoxprozessen (Prx II), Apoptose (Caspase 3, eIF5A), Zellwachstumskontrolle (14-3-3sigma, NM23-H1), Zellalterung (Laminin A/C, Prx II) und Phosphatasesignalkaskaden (PP2A, PP1) in Beziehung setzen.

Mitomycin C Behandlung

Um eine Aktivierung von p53 zu induzieren wurden die Zelllinien HCT116 p53 +/+ und p53 -/- mit dem Zytostatikum Mitomycin C (MMC) behandelt. Es gelang in dieser Studie ca. 5800 Proteine zu separieren und zu detektieren. 115 dieser Proteine zeigten signifikante p53 abhängige Veränderungen des Proteinspiegels. Folglich waren ca. 2% aller detektierten Proteine durch p53 beeinflusst. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit früheren Microarray Untersuchungen, welche ergaben, dass p53 wahrscheinlich auf 2-4% aller menschlichen Gene einen Einfluss ausübt (212).

Mittels der 2-DE konnten die klassischen p53 Targets 14-3-3sigma und Caspase-3 identifiziert werden, und so die Validität unseres Versuchsaufbaus bestätigen. Aufgrund der Detektionsgrenze der 2-DE Technik für Polypeptide mit einem MW kleiner 25kD konnten die bekannten Zielproteine p21, MDM2, Bax und PUMA wegen ihrer geringen Molekulargewichte nicht separiert und detektiert werden.

eIF5A (eukaryotic translation initiation factor 5A)

eIF5A wurde ursprünglich als ein translationsinitiiierender Faktor beschrieben. Studien an Hefezellen haben jedoch erwiesen, dass eine Inaktivierung des Faktors nur zu einer geringen Abnahme der Proteinexpressionsrate führt und dass es nicht für die generelle Proteinsynthese erforderlich ist (99). Weiterhin wurde gemutmaßt, dass eIF5A eine Rolle in der mRNA-Translation zellzyklusregulierender Proteine spielt (144). So konnte eine Zunahme der

Proliferationsrate in eIF5A erhöht exprimierenden Zellen festgestellt werden, wohingegen nach Inaktivierung des Faktors vermehrt ein Stillstand in der G1-Phase des Zellzyklus zu verzeichnen war. Weiterhin interagiert eIF5A mit dem nukleären Exportrezeptor CRM1 und fungiert als ein nukleozytoplasmatisches Shuttle-Protein (152).

In Kenntnis der oben erwähnten Funktionen von eIF5A berichteten Jin et al. (96) paradoxerweise über eine wichtige Bedeutung von eIF5A in der Apoptose von Tumorzellen. In diesem Zusammenhang zeigten Chen et al. (37), dass eIF5A in Tumoren mit einer geringen Differenzierung und einer vermehrten Expression von p53 verstärkt nachgewiesen werden kann. Jedoch blieb die genaue Verbindung dieser beiden Faktoren bislang unklar. Kürzlich vermuteten Jin et al., dass es sich bei eIF5A womöglich um einen positiven Regulator der p53 Expression handeln könne. Sie zeigten, dass sich nach einer Inaktivierung von eIF5A der p53 Proteinspiegel signifikant verminderte. Dieses Ergebnis konnte von Taylor et al. bestätigt werden (186). Darüber hinaus berichteten sie, dass in eIF5A überexprimierenden Kolonkarzinomzelllinien eine verstärkte Apoptoserate verzeichnet werden kann und unterstrichen somit die Bedeutung von eIF5A in der p53 induzierten Apoptose.

In Übereinstimmung mit den oben genannten Ergebnissen konnten wir in unserer Analyse eine starke mit p53 in Verbindung stehende Hochregulation von eIF5A nach 24 h MMC Behandlung sehen. Weiterhin identifizierten wir eine mögliche p53 Bindungsstelle im 1. Intron des eIF5A kodierenden Gens. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich bei eIF5A um ein p53 Target handeln könnte und dass sich die beiden Proteine im Sinne eines positiven Feedbackmechanismus gegenseitig regulieren.

hnRNP K (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K)

hnRNP K wurde ursprünglich als eine Komponente des hnRNP Proteinkomplexes in Zellkernen und Zytoplasma entdeckt (126). Seither wurde es mit zellulären Prozessen wie Chromatinremodeling, mRNA-Splicing, mRNA-Export und Translation in Verbindung gebracht (19). Man nimmt jedoch an, dass seine größte Bedeutung in der Regulation von Transkriptionsvorgängen zu sehen ist, wobei jedoch seine genaue Funktion bislang noch unklar blieb. Es wurde gezeigt, dass hnRNP K an DNA bindet (184). Interessanterweise gelang es Takimoto et al.

darzustellen, dass eine erhöhte Expression von hnRNP K zu einer verstärkten Aktivität des Onkogens c-myc führt.

Einige seiner Funktionen deuten an, dass hnRNP K mit der Entwicklung und Metastasierungsfähigkeit von Tumoren in Zusammenhang gebracht werden kann (34). Kürzlich wurde hnRNP K von Moumen et al. als ein Bestandteil des p53/MDM2 Regelkreises identifiziert (132). Unter normalen Bedingungen führt eine Bindung an MDM2 zur Inaktivierung und nachfolgendem Abbau von hnRNP K. In DNA geschädigten Zellen jedoch dissoziiert das Protein p53 vermittelt von MDM2, resultierend in einer verstärkten Aktivität. Weiterhin postulierten sie, dass hnRNP K wohlmöglich als Co-Faktor an der p53 induzierten Aktivierung von Targetgenen, involviert in den G1-Zellzyklusarrest, beteiligt ist.

In unserer Studie sahen wir eine Induktion der hnRNP K Expression nach 16 h MMC Behandlung und wiesen eine mögliche p53 Bindungsstelle in der Promotorregion von hnRNP K nach. Dies könnte bedeuten, dass hnRNP K einen Co-Aktivator von p53 darstellt, welcher wiederum selbst über einen positiven Feedbackmechanismus durch p53 reguliert werden kann.

Interessanterweise sahen wir eine 10fache Verminderung der hnRNP K Isoform a in der behandelten HCT116 p53 +/+ Zelllinie (Abb. 3H). Dies könnte auf eine verminderte Stabilität dieser Isoform nach p53 Aktivierung hindeuten, ggf. als Resultat p53 induzierter posttranslationaler Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen (44, 158).

Laminin A/C

Laminin A/C wird durch das LMNA Gen kodiert und gehört zu den Typ A Laminen, welche die Hauptkomponente der nukleären Zellwand ausmachen. Im Rahmen von Mitose- und Apoptosevorgängen weichen die Zellkernwände als Folge von proteolytischer Spaltung dieser Lamine auseinander. Mutationen im LMNA Gen werden mit der Hutchinson-Gilford Krankheit in Verbindung gebracht. Einer Erkrankung, die durch eine frühzeitige Alterung von Zellen gekennzeichnet ist (76).

Schon aus früheren Studien ist bekannt, dass auch p53 eine Rolle in der Regulation von Zellalterungsvorgängen spielt. So konnten Tyner et al. in ihren Studien belegen, dass Mäuse, die eine kurze p53 Isoform exprimieren, Anzeichen vorzeitiger Alterung aufweisen (123, 189).

Varela et al. gelang es erstmals, eine Verknüpfung zwischen der Metalloproteinase Zmpts24, involviert in Laminin A/C Reifungsprozesse, Laminin A/C und p53 herzustellen (190). Sie zeigten, dass ein Fehlen der Proteinase Zmpts24 zu einer Ansammlung von Laminin A/C Vorstufen führt und dies mit einer Aktivierung der p53 Signalkaskade in Verbindung steht. Auffällig war, dass die molekularen Ereignisse auf zellulärer Ebene von beschleunigten Alterungsprozessen begleitet waren. Es ist somit zu vermuten, dass Laminin A/C und p53 auf bisher noch unbekannte Weise im Rahmen des Auftretens vorzeitiger Alterungsprozesse miteinander in Beziehung stehen.

In unserer Analyse konnten wir eine signifikante p53 abhängige Laminin A/C Hochregulation feststellen. Interessanterweise weist Laminin A/C ebenfalls eine p53 Bindungsstelle im 1. Intron auf, so dass es sich möglicherweise um ein in der Literatur noch nicht beschriebenes p53 Target handeln könnte.

NM23-H1

Das Proteinprodukt des NM23-H1 Gens fungiert als eine Diphosphatkinase (NDP), welche Nukleosiddiphosphate in die entsprechenden Triphosphate überführt.

Eine Verminderung der NM23-H1 Expression steht in signifikanter Verbindung mit einem aggressiveren Wachstumsverhalten von Melanomen, Brust-, Magen- und Kolonkarzinomen (46, 199). Interessanterweise liegen viele der Tumoren, in denen ein vermindertes NM23-H1 Proteinprodukt verzeichnet werden kann, schon in metastasiertem Zustand vor, so dass für NM23-H1 eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Metastasierungsfähigkeit von Tumoren angenommen wird (111).

In der Literatur wird oftmals beschrieben, dass auch die p53 Aktivität in vielen Tumoren und Tumorzelllinien einen wichtigen Einfluss auf Invasivität und das Metastasierungsverhalten hat (72, 164). So wurde berichtet, dass einige mit der Metastasierungsfähigkeit von Tumoren in Verbindung stehenden Gene, wie MMP-2 (matrix metalloproteinase 2), Cathepsin D, Thrombospondin-1 und E-Cadherin, in einer p53 abhängigen Weise reguliert werden. Da diese Gene entweder die Tumordinvasivität fördern oder hemmen können, wird angenommen, dass es vom Expressionsmuster dieser Gene und von der jeweiligen Tumorart bestimmt wird, zu welchem Ergebnis eine p53 Aktivierung führt (181). Welche genauen Mechanismen bei der p53 abhängigen Regulation des Wachstumsverhaltens von Tumorzellen eine Rolle spielen ist Inhalt laufender Studien. Erst kürzlich

berichteten Chen et al. über eine zelltypabhängige indirekte Regulation von NM23-H1 durch p53 (39).

Wie auch Chen et al. detektierten wir in der 2D-Elektrophorese eine starke p53 abhängige Hochregulation von NM23-H1 und konnten dieses Ergebnis mittels Western-Blot und PCR Analysen verifizieren (Abb. 4+5D). Jedoch gelang es uns, im NM23-H1 Gen eine mögliche p53 Bindungsstelle zu detektieren, so dass wir im Gegensatz zu Chen et al. eher von einer direkten Regulation des NM23-H1 Gens durch p53 ausgehen.

NPM (Nucleophosmin)

NPM wurde ursprünglich als ein nicht-ribosomales nukleoläres Phosphoprotein, welches sich kontinuierlich zwischen Zellkern und Zytoplasma hin- und herbewegt, beschrieben (21). Zum heutigen Zeitpunkt sind viele unterschiedliche Funktionen von NPM bekannt. So wird angenommen, dass es Funktionen in der Kontrolle von Entwicklung, ribosomalen Vorgängen (297), Zellproliferation und in der Kontrolle über genomische Stabilität hat. Auch wird ihm eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Tumoren zugeschrieben (80, 81).

Beziehungen zwischen NPM und p53 sind schon aus der Literatur bekannt. Kurki et al. konnten zeigen, dass NPM als Antwort auf zellschädigende Faktoren MDM2 bindet und so eine p53/MDM2 Interaktion (105) verhindert. Studien von Colombo et al. ergaben, dass NPM p53 sogar direkt bindet und dadurch zu einer erhöhten Stabilität und Aktivität des Tumorsuppressors p53 (42) führt und Gjerset et al. ermittelten, dass NPM auch über die Bindung von ARF auf die Aktivität von p53 Einfluss nimmt (75).

Wir konnten eine p53 Bindungsstelle im NPM kodierenden Gen analysieren. Dies lässt vermuten, dass NPM ein durch p53 induziertes Protein ist, welches wiederum selbst über einen positiven Feedbackmechanismus auf p53 Einfluss nimmt.

hnRNP C1/C2 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2)

HnRNP Proteine gehören zu einer Gruppe von Proteinen, welche in kennzeichnenden strukturellen Domänen übereinstimmen (45). Extensive Forschung hat ergeben, dass sie zentrale Rollen in der DNA-Reparatur, Telomerbiologie, Zellsignalkaskade und der Genexpression innehaben. Über

diese Schlüsselfunktionen spielen einige der hnRNP's wichtige Rollen in der Entstehung und Weiterentwicklung von Tumoren. Einen Überblick über die Bedeutung von hnRNP's in der Karzinogenese bieten Carpenter et al. (34). HnRNP C1/C2 Proteine binden an RNA Vorstufen und sind so an RNA-Reifungsvorgängen beteiligt. Wir konnten eine p53 abhängige Induktion des hnRNP C1/C2 Proteinlevels feststellen, was vermuten lässt, dass p53 an der Regulation dieser Prozesse beteiligt ist. Im Gegensatz zu den zuvor untersuchten Proteinen waren die hnRNP C1/C2 mRNA Spiegel jedoch deutlich nach der MMC Behandlung reduziert (Abb. 5E). Dies wäre dadurch zu erklären, dass die hnRNP C1/C2 Proteine nicht ein klassisches p53 Target darstellen, sondern eher über posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen durch p53 beeinflusst werden. Phosphorylierungen sind notwendig, um eine Bindung von hnRNP C1/C2 an die RNA-Vorstufen zu ermöglichen, vermehrte Phosphorylierungen jedoch lassen diese Bindung wieder aufheben und anschließende Dephosphorylierungen durch die Proteindephosphatase 2A (PP2A) führen zu einer erneuten Aktivierung der Bindungsfähigkeit der hnRNP Proteine (128). In unserer Analyse sahen wir eine PP2A Expressionshemmung nach p53 Aktivierung. Dies könnte zu einer Ansammlung von hyperphosphorylierten hnRNP C1/C2 Proteinen führen, welche somit nicht mehr in der Lage wären, sich an den mRNA Reifungsprozessen zu beteiligen.

Weiterhin ist zu erwähnen, dass hnRNP C1/C2 Proteine durch Proteasen und Caspase-3 im Rahmen von Apoptosevorgängen gespalten werden (26, 201). Da Caspase-3 durch die MMC Behandlung p53 abhängig induziert wurde, ist es möglich, dass über eine p53 induzierte Apoptose hnRNP C1/C2 Proteine der proteolytischen Spaltung zugeführt werden.

PP2A (Serin/Threonin Phosphatase 2A)

PP2A kontrolliert die Phosphorylierung einer großen Anzahl von Proteinen, involviert in Zellsignalkaskaden, und ist ein wichtiger Regulator des Zellwachstums (94, 192). Man nimmt an, dass PP2A Einfluss auf Apoptosevorgänge nimmt, da es mit einigen in der Apoptose eine wichtige Rolle spielenden Proteinen wie Bcl-2 und Caspase-3 (155) in Verbindung gebracht werden kann. Silverstein et al. zeigten, dass speziell ein Verlust der PP2A R5/B56 Untereinheit zu einer erhöhten

Apoptoserate führt (168). In neueren Studien berichteten Arroyo et al., dass eine Inaktivierung von PP2A durch das SV40small-t Antigen für die maligne Transformation von Zellen ebenfalls bedeutsam ist (4).

Aufgrund seines Einflusses auf den Zellzyklus und das Überleben einer Zelle wurde PP2A von Janssens et al. (94) auch als neuer Tumorsuppressor bezeichnet. Einen Überblick über die weitreichenden Aktivitäten von PP2A bieten Virshup et al. (192).

Da PP2A als eine Phosphatase fungiert, wurde vermutet, dass es seine tumorsuppressive Funktion ausübt, indem es als Antwort auf zellschädigende Ereignisse über Dephosphorylierungsvorgänge als eine Art Signalübermittler fungiert. Tatsächlich konnten Dohoney et al. (48) eine direkte Dephosphorylierung von p53 als Antwort auf μ -Bestrahlung feststellen und Li et al. (113) gelang es, speziell die PP2A Untereinheit B56 hierfür verantwortlich zu machen. Sie beschrieben, dass eine PP2A vermittelte Dephosphorylierung von p53 an Thr55 p53 vor einem MDM-2 vermittelten Abbau bewahrt und so zu einer Stabilisierung des Proteins führt. Im Gegensatz hierzu berichteten Moule et al. interessanterweise, dass PP2A in Komplex mit dem polyoma virus small-t Antigen auch in der Lage ist, ARF induzierte Signale - nötig für eine p53 Aktivierung - zu inhibieren (131).

In unseren Analysen stellten wir eine p53 abhängige Hemmung der PP2A Expression nach 16 h MMC Behandlung fest und detektierten eine mögliche p53 Bindungsstelle im 1. Intron. Es wäre somit möglich, dass p53 über eine Hemmung der ARF/PP2A Interaktion seine eigene Aktivierung fördert. Aufgrund der in der Literatur eher kontrovers dargestellten Sachverhalte sind jedoch weitere Untersuchungen über die Beziehung zwischen PP2A und p53 unerlässlich.

Prx II (Peroxiredoxin II)

Wie auch PP2A wurde Prx II in unseren 2-DE Untersuchungen p53 abhängig herunterreguliert. Erstaunlicherweise ergaben die Western-Blot Analysen jedoch keine signifikante Veränderung nach MMC Behandlung. Dies weist möglicherweise darauf hin, dass p53 nur spezielle Isoformen des Proteins oder nur posttranslational modifizierte Formen anstelle des gesamten Pools herunterreguliert.

Peroxiredoxine gehören zu einer Gruppe antioxidativ wirkender Proteine, die in allen lebenden Organismen gefunden werden können (36). Ihre weite Verbreitung lässt vermuten, dass sie wichtige Funktionen in der antioxidativen Abwehr und der Vermittlung von Redoxsignalen innehaben. Schon mehrmals wurden sie mit Vorgängen wie Signalkaskaden, Proteinphosphorylierungen, Transkription und Apoptose in Verbindung gebracht (98, 211). Mehrere Subtypen der Peroxiredoxine können oftmals gemeinsam in einer Spezies gefunden werden.

Eine p53 Aktivierung führt zu einem erhöhten Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), resultierend in einer oxidativen Zerstörung von mitochondrialen Zellkomponenten gefolgt von Apoptose. Zhou et al. berichteten, dass Prx V in der Lage ist, einer durch p53 induzierten ROS Produktion vorzubeugen und somit die p53 abhängige Apoptose zu behindern (213).

Prx II spielt eine Rolle in zellulären Reifungs- und Alterungsprozessen. Mausfibroblasten, in denen das Prx II Gen inaktiviert ist, zeigen erhöhte Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und zellulären Alterungsvorgängen (85).

Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass die p53 abhängige Hemmung von Prx II ebenfalls eine Rolle in der Bildung von ROS und der p53 abhängigen Apoptose spielt. In der analogen PCR Analyse konnten wir keine Reduktion des mRNA Levels feststellen und auch das kodierende Gen verfügt nicht über eine potentielle Bindungsstelle, dies ggf. wiederum als ein Hinweis, dass Prx II kein direktes p53 Target darstellt.

TrpRS

Aminoacylsynthetasen spielen eine große Rolle in der Proteinsynthese, indem sie die Bindung spezifischer Aminosäuren an die vorgesehene RNA katalysieren. Auch können sie mit anderen Zellprozessen wie RNA Synthese, Apoptose, Angiogenese und Entzündungsvorgängen in Verbindung gebracht werden. In menschlichen Zellen wird die Aminoacylsynthetase TrpRS in einer Hauptform und einer verkürzten mini-TrpRS Form exprimiert.

Wir konnten eine Verminderung des TrpRS Siegels in der 2-DE nach 24 h MMC Behandlung feststellen. Dieses Ergebnis wurde durch die Western-Blot Analyse unterstützt, während die PCR auf RNA Niveau keine Veränderungen zeigte. Somit könnte es sich bei der Aminoacylsynthetase TrpRS wiederum um ein indirektes p53 Target handeln.

P53 abhängige Phosphorylierungen

Reversible Phosphorylierungen an Serin-, Threonin- und Thyrosinresten gehören zu den häufigsten, die Funktion von Proteinen beeinflussenden, Modifikationen. Auch p53 wird in seiner Aktivität durch Phosphorylierungsprozesse beeinflusst (6-8). Einige Studien unterstützen die These, dass p53 ebenfalls einige seiner Funktionen über Änderungen des Phosphorylierungstatus spezifischer Zielproteine ausübt. Dies könnte über die transkriptionsabhängige Induktion unterschiedlicher Kinasen erfolgen oder transkriptionsunabhängig Mechanismen wie Protein-Protein Interaktionen (3).

Um p53 abhängige Phosphorylierungen detektieren zu können, wurden die mit MMC behandelten Gele mit einer Pro-QD Färbung gefärbt. Diese Färbung ermöglicht es, nur Proteine mit an Thyrosin, Serin oder Threonin gebundenen Phosphatgruppen darzustellen.

Unter Verwendung dieser Technik sah man, dass eine MMC induzierte p53 Aktivierung nicht nur zu Änderungen des Proteinlevels einer großen Anzahl an Proteinen führte, sondern auch p53 abhängige Veränderungen des Phosphorylierungstatus auftraten (Tabelle 1). Es gelang mittels Massenspektrometrie Proteine zu identifizieren, die auf eine p53 Aktivierung hin ohne Veränderungen des Proteinlevels phosphoryliert oder dephosphoryliert wurden und Proteine, die p53 induzierte Änderungen des Proteinspiegels in Verbindung mit Veränderungen des Phosphorylierungstatus zeigten.

ANXA1(Annexin 1)

ANXA1 gehört zu einer Gruppe calciumabhängiger phospholipidbindender Proteine und hat antiinflammatorische Funktionen (97). Eine erhöhte Expression dieses Proteins fördert in Verbindung mit einer Aktivierung von Caspase-3 die Apoptose von Zellen (205). Kürzlich wurde ANXA1 identifiziert, ebenfalls als ein Signal zur Elimination von apoptotischen Zellen durch Phagozyten zu dienen (5).

Wir konnten eine Erhöhung des Proteinlevels von ANXA1 in Verbindung mit neu auftretenden Phosphorylierungen nach p53 Aktivierung detektieren. Diese p53 abhängige Phosphorylierung könnte eine Rolle in der Regulation der Funktion dieses Proteins spielen. Es wäre z.B. vorstellbar, dass ANXA1 an der Beseitigung apoptotischer Zellen nach p53 induzierter Apoptose beteiligt ist und so Inflamationsprozessen vorbeugt.

NM23-H1

Wie oben beschrieben konnten wir eine p53 abhängige Induktion des Nm23-H1 Proteinproduktes feststellen. Mutationen im NM23-H1 Gen sind assoziiert mit dem Auftreten von Metastasen in einer Vielzahl von Tumoren. Interessanterweise konnten MacDonald et al. zeigen, dass eine direkte Korrelation zwischen dem Phosphorylierungsstatus des NM23-H1 Proteinproduktes und seiner Fähigkeit zur Hemmung von Metastasierungsvorgängen besteht (121).

Unsere Beobachtung der p53 abhängigen Phosphorylierung dieses Proteins lässt spekulieren, ob p53 über posttranslationale Modifikationen des NM23-H1 Proteinproduktes in der Lage ist, Einfluss auf das Metastasierungsverhalten von Tumoren zu nehmen.

DJ-1

DJ-1 wurde ursprünglich als ein Onkogenprodukt identifiziert, das an der Ras vermittelten Signaltransduktionskaskade beteiligt ist (134). Es liegen einige Hinweise vor, dass DJ-1 eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Tumoren spielt. So konnten erhöhte Spiegel dieses Proteins in Brustkrebspatienten (110) und bei Patienten mit kleinzelligen Bronchialkarzinomen (122) festgestellt werden. Die genaue Funktion im Rahmen der Tumorgenese bleibt jedoch bislang unklar. Man nimmt an, dass es eine Funktion in der Antwort auf oxidativen Stress inne hat und Kim et al. ermittelten, dass eine erhöhte Expression von DJ-1 mit einer Hemmung des Tumorsuppressors PTEN korreliert (100, 182). Weiterhin bedingt ein Verlust von DJ-1 neurodegenerative Prozesse und eine Mutation des kodierenden Gens ist assoziiert mit PARK7, einer monogenetischen Form der Parkinson Krankheit (20).

In einem kürzlich veröffentlichten Bericht führte ein Knockout von DJ-1 in einem Zebrafisch-Parkinson-Model zu einer erhöhten Expression von p53 und Bax. Dies lässt vermuten, dass die Abwesenheit von DJ-1 zu einer Aktivierung des Apoptose-Pathway führt.

Wir konnten in unserer Analyse eine p53 vermittelte Phosphorylierung von DJ-1 feststellen. Dies könnte die Möglichkeit mit sich bringen, dass p53 in der Lage ist, das Onkogen DJ-1 über posttranslationale Modifikationen zu hemmen.

6. Zusammenfassung

Seit mehr als 25 Jahren steht p53 im Fokus des wissenschaftlichen Interesses in der molekularen Onkologie. Die Realisierung der basalen Bedeutung von p53 für Tumorentstehung und -progression hat dazu motiviert, das therapeutische Potential von Manipulationen der p53 pathways zu evaluieren. Seither steht p53 im Mittelpunkt vieler Studien, die sich mit dem Versuch solcher Manipulationen innerhalb des p53 Regelkreises befassen. Diese basieren auf genetischen, biochemischen und funktionellen Analysen von wt-p53 und mut-p53.

Derzeit werden Möglichkeiten entwickelt, die Konzentration von aktivem p53 innerhalb der Tumorzelle zu erhöhen, mutiertes p53 mittels Gentherapie zu verändern, p53 Regulatoren zu beeinflussen und p53 Targets zu aktivieren/deaktivieren.

Vorraussetzung, um innerhalb dieser Ansätze erfolgreich sein zu können, ist es, die derzeit noch vielen unbeantworteten Fragen über die molekularen Mechanismen der p53 Regulation und Funktion weiter zu klären.

Da p53 seinen Einfluss auf sehr vielfältige Weise ausübt, ist es wichtig, neben den schon vielfach durchgeführten Microarray-Analysen der von p53 regulierten RNA auch Untersuchungen direkt auf Proteinniveau durchzuführen. Durch unsere Analysen gelang es, Proteine innerhalb des p53 regulierten Proteoms zu identifizieren, deren Existenz bzw. Funktionen im p53 pathway noch unberücksichtigt waren. Es handelt sich hier um so wichtige Funktionen wie mRNA Bearbeitung, Translation, Apoptose, Zellzykluskontrolle und Zellalterung. Auch scheint die Phosphorylierung als bedeutende posttranslationelle Modifikation im p53 Regelkreis Funktionen an- oder ausschalten zu können.

Inwieweit diese „neuen“ Targetproteine bzw. die gezielte Modulation posttranslationaler Veränderungen dieser Polypeptide von therapeutischem Nutzen sein können, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Durch die Identifikation dieser potentiellen Targets sind wir dem Ziel, neue molekularonkologische Angriffspunkte im p53 Regelkreis zu definieren, einen Schritt näher gekommen.

7. Literaturverzeichnis

1. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR: Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260, 812-816 (1993)
2. Albrechtsen N, Dornreiter I, Grosse F, Kim E, Wiesmüller L, Deppert W: Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene* 18, 7706-7717 (1999)
3. Appella E, Anderson CW: Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* 268, 2764-2772 (2001)
4. Arroyo JD, Hahn WC: Involvement of PP2A in viral and cellular transformation. *Oncogene* 24, 7746-7755 (2005)
5. Arur S, Uche UE, Rezaul K, Fong M, Scranton V, Cowan AE, Mohler W, Han DK: Annexin I is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell* 4, 587-598 (2003)
6. Ashcroft M, Kubbutat MH, Vousden KH: Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Mol Cell Biol* 19, 1751-1758 (1999)
7. Ashcroft M, Taya Y, Vousden KH: Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Mol Cell Biol* 20, 3224-3233 (2000)
8. Ashcroft M, Vousden KH: Regulation of p53 stability. *Oncogene* 18, 7637-7643 (1999)
9. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B: Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244, 217-21 (1989)
10. Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B: p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 50, 7717-7722 (1990)
11. Bálint E E, Vousden KH: Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein. *Br J Cancer* 85, 1813-1823 (2001)
12. Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M: Mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J* 12, 461-468 (1993)

13. Beahrs OH, Sanfelippo PM: Factors in prognosis of colon and rectal cancer. *Cancer* 28, 213-128 (1971)
14. Behbehani A, Sakwa M, Ehrlichman R, Maguire P, Friedman S, Steele GD, Jr., Wilson RE: Colorectal carcinoma in patients under age 40. *Ann Surg* 202, 610-614 (1985)
15. Bergamaschi D, Samuels Y, Jin B, Duraisingham S, Crook T, Lu X: ASPP1 and ASPP2: common activators of p53 family members. *Mol Cell Biol* 24, 1341-1350 (2004)
16. Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, Postel W: Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* 6, 317-339 (1982)
17. Bodmer W: Familial adenomatous polyposis (FAP) and its gene, APC. *Cytogenet Cell Genet* 86, 99-104 (1999)
18. Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P, Lucibello FC, Murday VA, Rider SH, Scambler P: Localisation of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 328, 614-616 (1987)
19. Bomsztyk K, Denisenko O, Ostrowski J: hnRNP K: one protein multiple processes. *Bioessays* 26, 629-638 (2004)
20. Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joosse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P: Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299, 256-259 (2003)
21. Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA: Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56, 379-390 (1989)
22. Bos JL: ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49, 4682-4689 (1989)
23. Bouvard V, Zaitchouk T, Vacher M, Duthu A, Canivet M, Choisy-Rossi C, Nieruchalski M, May E: Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice. *Oncogene* 19, 649-660 (2000)
24. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254 (1976)

25. Brattain MG, Fine WD, Khaled FM, Thompson J, Brattain DE: Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res* 41, 1751-1756 (1981)
26. Brockstedt E, Rickers A, Kostka S, Laubersheimer A, Dörken B, Wittmann-Liebold B, Bommert K, Otto A: Identification of apoptosis-associated proteins in a human Burkitt lymphoma cell line. Cleavage of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 by caspase 3. *J Biol Chem* 273, 28057-28064 (1998)
27. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A: Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 368, 258-261 (1994)
28. Brown JM: Tumor microenvironment and the response to anticancer therapy. *Cancer Biol Ther* 1, 453-458 (2002)
29. Brown JM, Giaccia AJ: The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy. *Cancer Res* 58, 1408-1416 (1998)
30. Brugarolas J, Chandrasekaran C, Gordon JI, Beach D, Jacks T, Hannon GJ: Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* 377, 552-557 (1995)
31. Bykov VJ, Issaeva N, Selivanova G, Wiman KG: Mutant p53-dependent growth suppression distinguishes PRIMA-1 from known anticancer drugs: a statistical analysis of information in the National Cancer Institute database. *Carcinogenesis* 23, 2011–2018 (2002)
32. Caelles C, Helmberg A, Karin M: p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 370, 220-223 (1994)
33. Carpenter B, MacKay C, Alnabulsi A, MacKay M, Telfer C, Melvin WT, Murray GI. The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in tumour development and progression. *Biochem Biophys Acta* 1765, 85-100 (2006)
34. Carpenter B, McKay M, Dundas SR, Lawrie LC, Telfer C, Murray GI: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is over expressed, aberrantly localised and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 95, 921-927 (2006)
35. Celis JE, Olsen E: A qualitative and quantitative protein database approach identifies individual and groups of functionally related proteins that are differentially regulated in simian virus 40 (SV40) transformed human

- keratinocytes: an overview of the functional changes associated with the transformed phenotype. *Electrophoresis* 15, 309-44 (1994)
36. Chae HZ, Robison K, Poole LB, Church G, Storz G, Rhee SG. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 7017-7021 (1994)
 37. Chen G, Gharib TG, Thomas DG, Huang CC, Misek DE, Kuick RD, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG: Proteomic analysis of eIF-5A in lung adenocarcinomas. *Proteomics* 3, 496-504 (2003)
 38. Chen X, Ko LJ, Jayaraman L, Prives C: p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes and Dev* 10, 2438-2451 (1996)
 39. Chen SL, Wu YS, Shieh HY, Yen CC, Shen JJ, Lin KH: P53 is a regulator of the metastasis suppressor gene Nm23-H1. *Mol Carcinog* 36, 204-214 (2003)
 40. Chevallet M, Luche S, Rabilloud T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nat Protocol* 1, 1852-1858 (2006)
 41. Cho WC, Cheng CH: Oncoproteomics: current trends and future perspectives. *Expert Rev Proteomics* 4, 401-410 (2007)
 42. Colombo E, Marine JC, Danovi D, Falini B, Pelicci PG: Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol* 4, 529-533 (2002)
 43. Cottrell S, Bicknell D, Kaklamanis L, Bodmer WF: Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas. *Lancet* 340, 626-630 (1992)
 44. De Hoog CL, Foster LJ, Mann M: RNA and RNA binding proteins participate in early stages of cell spreading through spreading initiation centers. *Cell* 117, 649-662 (2004)
 45. Dejgaard K, Leffers H, Rasmussen HH, Madsen P, Kruse TA, Gesser B, Nielsen H, Celis JE: Identification, molecular cloning, expression and chromosome mapping of a family of transformation upregulated hnRNP-K proteins derived by alternative splicing. *J Mol Biol* 236, 33-48 (1994)
 46. de la Rosa A, Williams RL, Steeg PS: Nm23/nucleoside diphosphate kinase: toward a structural and biochemical understanding of its biological functions. *Bioessays* 17, 53-62 (1995)

47. De Vries A, Flores ER, Miranda B, Hsieh HM, van Oostrom CT, Sage J, Jacks T: Targeted point mutations of p53 lead to dominant-negative inhibition of wild-type p53 function. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 2948-2953 (2002)
48. Dohoney KM, Guillemin C, Whiteford C, Elbi C, Lambert PF, Hager GL, Brady JN: Phosphorylation of p53 at serine 37 is important for transcriptional activity and regulation in response to DNA damage. *Oncogene* 23, 49-57 (2004)
49. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A: Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-221 (1992)
50. Doyle VC: Nutrition and colorectal cancer risk: a literature review. *Gastroenterol Nurs* 30, 178-182 (2007)
51. Dukes CE: The classification of cancer of the rectum. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 35, 323-332 (1932)
52. El-Deiry WS: The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. *Oncogene* 22, 7486-7495 (2003)
53. El-Deiry WS: Regulation of p53 downstream genes. *Semin. Cancer Biol* 8, 345-357 (1998)
54. Evan G, Littlewood T: A matter of life and cell death. *Nature* 382, 1317-1322 (1998)
55. Evan GI, Vousden KH: Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342-348 (2001)
56. Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, Tighe RV, Steen RG, Small CG, Stoeckli ET, Keino-Masu K, Masu M, Rayburn H, Simons J, Bronson RT, Gordon JI, Tessier-Lavigne M, Weinberg RA: Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* 386, 796-804 (1997)
57. Fearnhead NS, Wilding JL, Bodmer WF: Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *Br Med Bull* 64, 27-43 (2002)
58. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW: Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247, 49-56 (1990)
59. Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-67 (1990)

60. Fernandez E, gallus S, La Vecchia C, talamini R, Negri E, Franceschi S: Family history and environmental risk factors for colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13, 658-661 (2004)
61. Ferreira CG, Tolis C, Giaccone G: p53 and chemosensitivity. *Ann Oncol* 10, 1011-1021 (1999)
62. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R: The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75, 1027-1038 (1993)
63. Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, van Es JH, Breukel C, Wiegant J, Giles RH, Clevers H: Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* 3, 433-438 (2001)
64. Foster BA, Coffey HA, Morin MJ, Rastinejad F: Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science* 286, 2507–2510 (1999)
65. Friedler A, Hansson LO, Veprintsev DB, et al: A peptide that binds and stabilizes p53 core domain: chaperone strategy for rescue of oncogenic mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 937–942 (2002)
66. Friedman DB, Hill S, Keller JW, Merchant NB, Levy SE, Coffey RJ, Caprioli RM: Proteome analysis of human colon cancer by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 4, 793-811 (2004)
67. Fukuda M, Ishii A, Yasutomo Y, Shimada N, Ishikawa N, Hanai N, Nagata N, Irimura T, Nicolson GL, Kimura N: Decreased expression of nucleoside diphosphate kinase alpha isoform, an nm23-H2 gene homolog, is associated with metastatic potential of rat mammary-adenocarcinoma cells. *Int J Cancer* 65, 531-537 (1996)
68. Gabrilovich DI: INGN 201 (Advexin): adenoviral p53 gene therapy for cancer. *Expert Opin Biol Ther* 6, 823–832 (2006)
69. Gaiddon C, Lokshin M, Ahn J, Zhang T, Prives C: A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol Cell Biol* 21, 1874-1887 (2001)
70. Garrels JI: The QUEST system for quantitative analysis of two-dimensional gels. *J Biol Chem* 264, 5269-5282 (1989)
71. Gatenby RA, Vincent TL: An evolutionary model of carcinogenesis. *Cancer Res* 63, 6212-6220 (2003)

72. Gautam A, Densmore CL, Waldrep JC: Inhibition of experimental lung metastasis by aerosol delivery of PEI-p53 complexes. *Mol Ther* 2, 318-323 (2000)
73. Gavin AC, Bösch M, Krause R, Grandi P, Marzioch M, Bauer A et al.: Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141-147 (2002)
74. Giovannucci E, Willett WC: Dietary factors and risk of colon cancer. *Ann Med* 26, 443-452 (1994)
75. Gjerset RA: DNA damage, p14ARF, nucleophosmin (NPM/B23), and cancer. *J Mol Histol* 37, 239-251 (2006)
76. Goldman RD, Shumaker DK, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Gordon LB, Gruenbaum Y, Khuon S, Mendez M, Varga R, Collins FS: Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 8963-8968 (2004)
77. Görg A, Postel W, Günther S: The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 9, 531-546 (1988)
78. Görg A, Weiss W, Dunn MJ: Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4, 3665-3685 (2004)
79. Goss KH, Groden J: Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol* 18, 1967-1979 (2000)
80. Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, Cheng K, Khandker L, Manova K, Pandolfi PP: Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature* 437, 147-153 (2005)
81. Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP: Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 493-505 (2006)
82. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, et al.: Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66, 589-600 (1991)
83. Hainaut P, Hernandez T, Robinson A, Rodriguez-Tome P, Flores T, Hollstein M, Harris CC, Montesano R : IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic Acids Res* 26, 205-213 (1998)

84. Hainaut P, Hollstein M: p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 77, 81-137 (2000)
85. Han YH, Kim HS, Kim JM, Kim SK, Yu DY, Moon EY: Inhibitory role of peroxiredoxin II (Prx II) on cellular senescence. *FEBS Lett* 579, 4897-4902 (2005)
86. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70 (2000)
87. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M: Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387, 296-299 (1997).
88. Hawkins DS, Demers GW, Galloway DA: Inactivation of p53 enhances sensitivity to multiple chemotherapeutic agents. *Cancer Res* 56, 892-898 (1996)
89. Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C: Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 5011-5015 (1993)
90. Hermsen M, Postma C, Baak J, Weiss M, Rapallo A, Sciutto A, Roemen G, Arends JW, Williams R, Giaretti W, De Goeij A, Meijer G: Colorectal adenoma to carcinoma progression follows multiple pathways of chromosomal instability. *Gastroenterology* 123, 1109-1119 (2002)
91. Hoh J, Jin S, Parrado T, Edington J, Levine AJ, Ott J. :The p53MH algorithm and its application in detecting p53-responsive genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 8467-8472 (2002)
92. Itahana K, Bhat KP, Jin A, Itahana Y, Hawke D, Kobayashi R, Zhang Y: Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol Cell* 12, 1151-1164 (2003)
93. Janssens V, Goris J, Van Hoof C: PP2A: the expected tumor suppressor. *Curr Opin Genet Dev* 15, 34-41 (2005)
94. Janssens V, Goris J: Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* 353, 417-439 (2001)
95. Jimenez GS, Nister M, Stommel JM, Beeche M, Barcarse EA, Zhang XQ, O'Gorman S, Wahl GM: A transactivation-deficient mouse model provides insights into Trp53 regulation and function. *Nat Genet* 26, 37-43 (2000)

96. Jin BF, He K, Wang HX, Wang J, Zhou T, Lan Y, Hu MR, Wei KH, Yang SC, Shen BF, Zhang XM: Proteomic analysis of ubiquitin-proteasome effects: insight into the function of eukaryotic initiation factor 5A. *Oncogene* 22, 4819-4830 (2003)
97. Kamal AM, Flower RJ, Perretti M: An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100, 39-47 (2005)
98. Kang SW, Chae HZ, Seo MS, Kim K, Baines IC, Rhee SG: Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem* 273, 6297-6302 (1998)
99. Kang HA, Hershey JW: Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269, 3934-3940 (1994)
100. Kim RH, Peters M, Jang Y, Shi W, Pintilie M, Fletcher GC, DeLuca C, Liepa J, Zhou L, Snow B, Binari RC, Manoukian AS, Bray MR, Liu FF, Tsao MS, Mak TW: DJ-1, a novel regulator of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Res* 7, 263-273 (2005)
101. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D: Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 253, 661-665 (1991)
102. Klose J: Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangentik* 26, 231-243 (1975)
103. Knudson AG: Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 157-162 (2001)
104. Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH: Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299-303 (1997)
105. Kurki S, Peltonen K, Latonen L, Kiviharju TM, Ojala PM, Meek D, Laiho M: Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell* 5, 465-475 (2004)
106. Lane DP: Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15-16 (1992)
107. Lane DP, Crawford LV: T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261-263 (1979)

108. Laptenko O, Prives C: Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ* 13, 951-961 (2006)
109. Lavin MF, Gueven N: The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* 13, 941-950 (2006)
110. Le Naour F, Misek DE, Krause MC, Deneux L, Giordano TJ, Scholl S, Hanash SM: Proteomics-based identification of RS/DJ-1 as a novel circulating tumor antigen in breast cancer. *Clin Cancer Res* 7, 3328-3335 (2001)
111. Leone A, Flatow U, King CR, Sandeen MA, Margulies IM, Liotta LA, Steeg PS: Reduced tumor incidence, metastatic potential, and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells. *Cell* 65, 25-35 (1991)
112. Levine AJ: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331 (1997)
113. Li HH, Cai X, Shouse GP, Piluso LG, Liu X: A specific PP2A regulatory subunit, B56gamma, mediates DNA damage-induced dephosphorylation of p53 at Thr55. *EMBO J* 26, 402-411 (2007)
114. Liotta LA, Espina V, Mehta AI, Calvert V, Rosenblatt K, Geho D, Munson PJ, Young L, Wulfkuhle J, Petricoin EF 3rd: Protein microarrays: meeting analytical challenges for clinical applications. *Cancer Cell* 3, 317-325 (2003)
115. Lohrum MA, Vousden KH: Regulation and activation of p53 and its family members. *Cell Growth Differ* 6, 1162-1168 (1999)
116. Lowe SW: Activation of p53 by oncogenes. *Endocr Relat Cancer* 6, 45-48 (1999)
117. Lowe SW: Cancer therapy and p53. *Curr Opin Oncol* 7, 547-553 (1995)
118. Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, Housman DE, Jacks T: p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 266, 807-810 (1994)
119. Ludwig RL, Bates S, Vousden KH: Differential activation of target cellular promoters by p53 mutants with impaired apoptotic function. *Mol Cell Biol* 16, 4952-4960 (1996)
120. Lynch HT, Krush AJ: Cancer family "G" revisited. *Cancer* 27, 1505-1511 (1971)
121. MacDonald NJ, De la Rosa A, Benedict MA, Freije JM, Krutsch H, Steeg PS: A serine phosphorylation of Nm23, and not its nucleoside diphosphate

- kinase activity, correlates with suppression of tumor metastatic potential. *J Biol Chem* 268, 25780-25789 (1993)
122. MacKeigan JP, Clements CM, Lich JD, Pope RM, Hod Y, Ting JP: Proteomic profiling drug-induced apoptosis in non-small cell lung carcinoma: identification of RS/DJ-1 and RhoGDIalpha. *Cancer Res* 63, 6928-6934 (2003)
 123. Maier B, Gluba W, Bernier B, Turner T, Mohammad K, Guise T, Sutherland A, Thorner M, Scrable H: Modulation of mammalian life span by the short isoform of p53. *Genes Dev* 18, 306-319 (2004)
 124. Mareel M, Vleminckx K, Vermeulen S, Bracke M, Van Roy F: E-cadherin expression: a counterbalance for cancer cell invasion. *Bull Cancer* 79, 347-355 (1992)
 125. Martin K, Steinberg TH, Cooley LA, Gee KR, Beechem JM, Patton WF: Quantitative analysis of protein phosphorylation status and protein kinase activity on microarrays using a novel fluorescent phosphorylation sensor dye. *Proteomics* 3, 1244-1255 (2003)
 126. Matunis MJ, Michael WM, Dreyfuss G: Characterization and primary structure of the poly(C)-binding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex K protein. *Mol Cell Biol* 12(1):164-171 (1992)
 127. Mayo LD, Donner DB: A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 11598-11603 (2001)
 128. Mayrand SH, Dwen P, Pederson T. Serine/threonine phosphorylation regulates binding of C hnRNP proteins to pre-mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 7764-7768 (1993)
 129. McLellan EA, Owen RA, Stepniowska KA, Sheffield JP, Lemoine NR: High frequency of K-ras mutations in sporadic colorectal adenomas. *Gut* 34, 392-396 (1993)
 130. Mirza A, Wu Q, Wang L, McClanahan T, Bishop WR, Gheyas F, Ding W, Hutchins B, Hockenberry T, Kirschmeier P, Greene JR, Liu S: Global transcriptional program of p53 target genes during the process of apoptosis and cell cycle progression. *Oncogene* 22, 3645-2654 (2003)
 131. Moule MG, Collins CH, McCormick F, Fried M: Role for PP2A in ARF signaling to p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 14063-14066 (2004)

132. Moumen A, Masterson P, O'Connor MJ, Jackson SP: hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage. *Cell* 123, 1065-1078 (2005)
133. Munro AJ, Lain S, Lane DP: P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. *Br J Cancer* 92, 434-444 (2005)
134. Nagakubo D, Taira T, Kitaura H, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Ariga SM, Ariga H: DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochem Biophys Res Commun* 231, 509-513 (1997)
135. Nicolaides NC, Carter KC, Shell BK, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW: Genomic organization of the human PMS2 gene family. *Genomics* 30, 195-206 (1995)
136. Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM: Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 371, 75-80 (1994)
137. Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y: p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 102, 849-862 (2000)
138. O'Farrell PH: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250, 4007-4021 (1975)
139. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B: Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 358, 80-83 (1992)
140. Oller AR, Rastogi P, Morgenthaler S, Thilly WG: A statistical model to estimate variance in long term-low dose mutation assays: testing of the model in a human lymphoblastoid mutation assay. *Mutat Res* 216, 149-161 (1989)
141. Oppermann M, Cols N, Nyman T, Helin J, Saarinen J, Byman I, Toran N, Alaiya AA, Bergman T, Kalkkinen N, González-Duarte R, Jörnvall H: Identification of foetal brain proteins by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry comparison of samples from individuals with or without chromosome 21 trisomy. *Eur J Biochem* 267, 4713-4719 (2000). *Oncogene* 23, 4975-4983 (2004)

142. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Liu B, Parsons R, Lengauer C, Palombo F, D'Arrigo A, Markowitz S, Willson JK, Kinzler KW: Mutations of GTBP in genetically unstable cells. *Science* 268, 1915-1917 (1995)
143. Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ: Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol* 3, 327-332 (1993)
144. Park MH, Wolff EC, Folk JE: Hypusine: its post-translational formation in eukaryotic initiation factor 5A and its potential role in cellular regulation. *Biofactors* 4, 95-104 (1993)
145. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B: A model for p53-induced apoptosis. *Nature* 389, 300-305 (1997)
146. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW: APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359, 235-237 (1992)
147. Prives C, Hall PA: The p53 pathway. *J Pathol* 187, 112-126 (1999)
148. Rabilloud T, Adessi C, Giraudel A, Lunardi J: Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 18, 307-316 (1997)
149. Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B, Lengauer C: The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 695-701 (2003)
150. Ramos YF, Stad R, Attema J, Peltenburg LT, van der Eb AJ, Jochemsen AG: Aberrant expression of HDMX proteins in tumor cells correlates with wild-type p53. *Cancer Res* 61, 1839-1842 (2001)
151. Rippin TM, Bykov VJ, Freund SM, et al: Characterization of the p53-rescue drug CP-31398 in vitro and in living cells. *Oncogene* 21, 2119–2129 (2002)
152. Rosorius O, Reichart B, Krätzer F, Heger P, Dabauvalle MC, Hauber J: Nuclear pore localization and nucleocytoplasmic transport of eIF-5A: evidence for direct interaction with the export receptor CRM1. *J Cell Sci* 112, 2369-2380 (1999)
153. Sabbatini P, McCormick F: Phosphoinositide 3-OH kinase (PI3K) and PKB/Akt delay the onset of p53-mediated, transcriptionally dependent apoptosis. *J Biol Chem* 274, 24263-242639 (1999)

154. Samuels-Lev Y, O'Connor DJ, Bergamaschi D, Trigiante G, Hsieh JK, Zhong S, Campargue I, Naumovski L, Crook T, Lu X: ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell* 8, 781-794 (2001)
155. Santoro MF, Annand RR, Robertson MM, Peng YW, Brady MJ, Mankovich JA, Hackett MC, Ghayur T, Walter G, Wong WW, Giegel DA: Regulation of protein phosphatase 2A activity by caspase-3 during apoptosis. *J Biol Chem* 273, 13119-13128 (1998)
156. Schmitt CA, Lowe SW: Apoptosis and therapy. *J Pathol* 187, 127-137 (1999)
157. Schuler M, Green DR. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans* 29, 684-688 (2001)
158. Schullery DS, Ostrowski J, Denisenko ON, Stempka L, Shnyreva M, Suzuki H, Gschwendt M, Bomsztyk K: Regulated interaction of protein kinase Cdelta with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein. *J Biol Chem* 274, 15101-1509 (1999)
159. Schulmann K, Reiser M, Schmiegel W: Colonic cancer and polyps. *Best Pract Res Gastroenterol* 16, 91-114 (2002)
160. Selivanova G, Iotsova V, Okan I, et al: Restoration of the growth suppression function of mutant p53 by a synthetic peptide derived from the p53 C-terminal domain. *Nat Med* 3, 632-638 (1997)
161. Selivanova G, Kawasaki T, Ryabchenko L, Wiman KG: Reactivation of mutant p53: a new strategy for cancer therapy. *Semin Cancer Biol* 8, 369-378 (1998)
162. Seow C, Neale K, Landgrebe JC, Bussey HJ, Thomson JP: A review of physical abnormalities in familial adenomatous polyposis. *Singapore Med J* 32, 139-142 (1991)
163. Sherr CJ, Weber JD: The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* 10, 94-99 (2000)
164. Shiao YH, Palli D, Caporaso NE, Alvord WG, Amorosi A, Nesi G, Saieva C, Masala G, Fraumeni JF Jr, Rice JM: Genetic and immunohistochemical analyses of p53 independently predict regional metastasis of gastric cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9, 631-633 (2000)

165. Shih IM, Zhou W, Goodman SN, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 61, 818-822 (2001)
166. Shikama N, Lee CW, France S, Delavaine L, Lyon J, Krstic-Demonacos M, La Thangue NB: A novel cofactor for p300 that regulates the p53 response. *Mol Cell* 4, 365-376 (1999)
167. Sigal A, Rotter V: Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* 60, 6788-6793 (2000)
168. Silverstein AM, Barrow CA, Davis AJ, Mumby MC: Actions of PP2A on the MAP kinase pathway and apoptosis are mediated by distinct regulatory subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 4221-4226 (2002)
169. Sionov RV, Haupt Y: The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 18, 6145-6157 (1999)
170. Soengas MS, Alarcón RM, Yoshida H, Giaccia AJ, Hakem R, Mak TW, Lowe SW: Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science* 284, 156-159 (1999)
171. Solito E, de Coupade C, Canaider S, Goulding NJ, Perretti M: Transfection of annexin 1 in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation. *Br J Pharmacol* 133, 217-228 (2001)
172. Soong R, Powell B, Elsaleh H, Gnanasampanthan G, Smith DR, Goh HS, Joseph D, Iacopetta B: Prognostic significance of TP53 gene mutation in 995 cases of colorectal carcinoma. Influence of tumour site, stage, adjuvant chemotherapy and type of mutation. *Eur J Cancer* 36, 2053-2060 (2000)
173. Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory K, Schlichtholz B. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. *Int J Cancer* 57, 1-9 (1994)
174. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW: Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 58, 1130-1134 (1998)
175. Srinivas PR, Srivastava S, Hanash S, Wright GL Jr: Proteomics in early detection of cancer. *Clin Chem* 47, 1901-1911 (2001)
176. Stulík J, Hernychová L, Porkertová S, Knízek J, Macela A, Bures J, Jandík P, Langridge JI, Jungblut PR: Proteome study of colorectal carcinogenesis. *Electrophoresis* 22, 3019-3025 (2001)

177. Stulík J, Osterreicher J, Koupilová K, Knízek , Macela A, Bures J, Jandík P, Langr F, Dedic K, Jungblut PR: The analysis of S100A9 and S100A8 expression in matched sets of macroscopically normal colon mucosa and colorectal carcinoma: the S100A9 and S100A8 positive cells underlie and invade tumor mass. *Electrophoresis* 20, 1047-1054 (1999)
178. Su F, Overholtzer M, Besser D, Levine AJ: WISP-1 attenuates p53-mediated apoptosis in response to DNA damage through activation of the Akt kinase. *Genes Dev* 16, 46-57 (2002)
179. Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW: Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 262, 1734-1737 (1993)
180. Sun XF, Carstensen JM, Zhang H, Stål O, Wingren S, Hatschek T, Nordenskjöld B: Prognostic significance of cytoplasmic p53 oncoprotein in colorectal adenocarcinoma. *Lancet* 340, 1369-1373 (1992)
181. Sun Y, Wicha M, Leopold WR: Regulation of metastasis-related gene expression by p53: a potential clinical implication. *Mol Carcinog* 24, 25-28 (1999)
182. Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Ariga SM, Takahashi K, Ariga H: DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep* 5, 213-518 (2004)
183. Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Sato Y, Niitsu Y: Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol* 41, 185-192 (2006)
184. Takimoto M, Tomonaga T, Matunis M, Avigan M, Krutzsch H, Dreyfuss G, Levens D: Specific binding of heterogeneous ribonucleoprotein particle protein K to the human c-myc promoter, in vitro. *J Biol Chem* 268, 18249-18258 (1993)
185. Takimoto R, Wang W, Dicker DT, et al: The mutant p53-conformation modifying drug, CP-31398, can induce apoptosis of human cancer cells and can stabilize wild-type p53 protein. *Cancer Biol Ther* 1, 47–55 (2002)
186. Taylor CA, Sun Z, Cliche DO, Ming H, Eshaque B, Jin S, Hopkins MT, Thai B, Thompson JE. Eukaryotic translation initiation factor 5A induces apoptosis in colon cancer cells and associates with the nucleus in response to tumour necrosis factor alpha signalling. *Exp Cell Res* 313, 437-449 (2007)
187. Tejpar S, Van Cutsem E: Molecular and genetic defects in colorectal tumorigenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 16, 171-185 (2002)
188. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260, 751-752 (1993)

189. Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, Lu X, Soron G, Cooper B, Brayton C, Hee Park S, Thompson T, Karsenty G, Bradley A, Donehower LA: p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 415, 45-53 (2002)
190. Varela I, Cadiñanos J, Pendás AM, Gutiérrez-Fernández A, Folgueras AR, Sánchez LM, Zhou Z, Rodríguez FJ, Stewart CL, Vega JA, Tryggvason K, Freije JM, López-Otín C: Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature* 437, 564-568 (2005)
191. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, et al: In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 303, 844–848 (2004)
192. Virshup DM: Protein phosphatase 2A: a panoply of enzymes. *Curr Op Cell Biol* 12, 180-185 (2000)
193. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319, 525-532 (1988)
194. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ: Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310 (2000)
195. Vousden KH, Lu X: Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2, 594-604 (2002)
196. Vousden KH: p53: death star. *Cell* 103, 691-694 (2000)
197. Wallace-Brodeur RR, Lowe SW: Clinical implications of p53 mutations. *Cell Mol Life Sci* 55, 64-75 (1999)
198. Wang W, El-Deiry WS: Restoration of p53 to limit tumor growth. *Curr Opin Oncol* 20, 90-96 (2008)
199. Wang L, Patel U, Ghosh L, Chen HC, Banerjee S: Mutation in the nm23 gene is associated with metastasis in colorectal cancer. *Cancer Res* 53, 3652 (1993)
200. Wang L, Wu Q, Qiu P, Mirza A, McGuirk M, Kirschmeier P, Greene JR, Wang Y, Pickett CB, Liu S: Analyses of p53 target genes in the human genome by bioinformatic and microarray approaches. *J Biol Chem* 276, 43604-43610 (2001)
201. Waterhouse N, Kumar S, Song Q, Strike P, Sparrow L, Dreyfuss G, Alnemri ES, Litwack G, Lavin M, Watters D: Heteronuclear ribonucleoproteins C1 and C2, components of the spliceosome, are specific targets of interleukin 1beta-

- converting enzyme-like proteases in apoptosis. *J Biol Chem* 271, 29335-29341 (1996)
202. Wei CL, Wu Q, Vega VB, Chiu KP, Ng P, Zhang T, Shahab A, Yong HC, Fu Y, Weng Z, Liu J, Zhao XD, Chew JL, Lee YL, Kuznetsov VA, Sung WK, Miller LD, Lim B, Liu ET, Yu Q, Ng HH, Ruan Y: A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell* 124, 207-219 (2006)
 203. Weller M: Predicting response to cancer chemotherapy: the role of p53. *Cell Tissue Res* 292, 435-445 (1998)
 204. Wildgruber R, Harder A, Obermaier C, Boguth G, Weiss W, Fey SJ, Larsen PM, Görg A: Towards higher resolution: two-dimensional electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21, 2610-2616 (2000)
 205. Wilkins MR, Hochstrasser DF, Sanchez JC, Bairoch A, Appel RD: Integrating two-dimensional gel databases using the Melanie II software. *Trends Biochem Sci* 21, 496-497 (1996)
 206. Woods DB, Vousden KH: Regulation of p53 function. *Exp Cell Res* 264, 56-66 (2001)
 207. Wu X, Chen VW, Martin J, Roffers S, Groves FD, Correa CN, Hamilton-Byrd E, Jemal A: Comparative Analysis of Incidence Rates Subcommittee, Data Evaluation and Publication Committee, North American Association of Central Cancer Registries. Subsite-specific colorectal cancer incidence rates and stage distributions among Asians and Pacific Islanders in the United States, 1995 to 1999. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13, 1215-1222 (2004)
 208. Wu W, Hu W, Kavanagh JJ: Proteomics in cancer research. *Int J Gynecol Cancer* 12, 409-423 (2002)
 209. Wulfschle JD, Liotta LA, Petricoin EF: Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 267-275 (2003)
 210. Yates JR 3rd, Speicher S, Griffin PR, Hunkapiller T: Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification. *Anal Biochem* 214, 397-408 (1993)
 211. Zhang P, Liu B, Kang SW, Seo MS, Rhee SG, Obeid LM: Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *J Biol Chem* 272, 30615-30618 (1997)

212. Zhao R, Gish K, Murphy M, Yin Y, Notterman D, Hoffman WH, Tom E, Mack DH, Levine AJ: Analysis of p53-regulated gene expression patterns using oligonucleotide arrays. *Genes Dev* 14, 981-993 (2000)
213. Zhou Y, Kok KH, Chun AC, Wong CM, Wu HW, Lin MC, Fung PC, Kung H, Jin DY: Mouse peroxiredoxin V is a thioredoxin peroxidase that inhibits p53-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 268, 921-927 (2000)

8. Anhang

Tabelle 3: Identifizierte Proteine mit p53 abhängiger Regulation

Protein	Symbol	Accession	Expression (fold change)						Score	Putative binding site*	Putative P53 binding sequence*
			p53+/+			p53-/-					
			8h	16h	24h	8h	16h	24h			
Upregulated, containing p53 biniding site											
Lamin A/C	LMNA	P02545	3.69	67.2	133.7	3.7	11.1	18.0	86.45	+9363	AGCCATGCCT GCTGTGGGT GCACATGCCC
similar to ubiquitin UBF-1	UBF-1	19343979	1.23	2.56	3.29	unch	unch	unch	88.96	-3254	ATACATGTCC CTTTGTGA AGACAAGCTA
Metastasis inhibition factor nm23	NME1	P15531	1.49	2.19	1.39	unch	unch	unch	83.54	-4856	AGGCATGTGC. CACCATGCCC
Ras-related protein Rab-15	RAB15	P59190	1.4	2.14	2.3	1.3	1.3	1.29	91.38	-1597	CAGCTTGCCT GCCTGCC AGCCAAGCTC
Elongation factor 1-delta isoform 2	EEF1D	NP_001951	1.93	2.10	2.39	unch	unch	unch	86.51	+3455	AGGCTTGAC GTGCCTGTGCTCT GCGCAAGCTT
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRPK	Q07244	unch	1.78	3.81	unch	1.15	1.14	83.79	+67	CGTCTTGCT GTGTC CCACCTTGTC
Hypermethylated in cancer 2 protein	HIC2	Q96JB3	1.98	3.74	4.98	unch	unch	unch	87.2	+19752	CTACATGCTC TTGTGACCCT GGGCAAGTTG
Eucaryotic translation factor 5A	eIF-5A	Q9AXQ7	1.94	11.27	13.01	unch	1.25	1.42	82.61	+2043	TGGCTTGTG CAA GTGCATGTTG
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRPH	AAA91346	2.23	3.21	4.76	unch	unch	unch	84.64	-3074	CACCATGTTG GC CAACATGTCT
MHC class II transactivator	MHC2TA	NP_000237	1.11	2.7	5.56	unch	unch	unch	90.12	+1904	CTACTTGTC AAGGTCACA CAGCAAGTCT
TAT-binding protein 1/Proteasome subunit P50	PSMC3 / TBP1	AAA36666.1	1.15	1.48	13.43	unch	unch	unch	84.71	-3549	AATCTTGTTT ACCCCAAAAGCCC CACCAAGCTC
HSP 27	HSPB1	AAAG2175.1	1.45	2.66	17.71	1.5	2.28	3.08	83.86	-614	AGGCATGCAC. CACCATGCCC
EH-domain containing protein 2	EHD2	NP_055416.2	2.34	2.81	8.77	unch	unch	unch	83.58	+2788	AGGCATGCAC. CACCATGCCC
Annexin 1	ANXA1	NP_000691.1	1.82	4.73	4.81	unch	unch	unch	90.67	-1050	GGTCTAGTTC CTTGTTTGGTGT CAACATAGTCT
v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog like	CRKL	NP_0055198.1	2.49	4.93	4.73	unch	unch	unch	86.89	+1965	ATCCTAGTTC AATTTC AGACATGCTT
Tumor protein	TPT1	NP_003286	2.65	2.86	3.26	unch	unch	unch	90.77	-1297	GAACAAGCTT TCAGACTTCATAC TGGCATGTAT
Cytoskeleton associated protein 1	CKAP1	Q99426	1.73	2.54	8.52	unch	unch	unch	86.71	-2973	CAACATGTTG A AACCTTGTCT
Thioredoxin like protein p19	TXNDC12	NP_056997	unch	1.6	2.3	unch	unch	unch	87.21	+3240	TCACTAGCTG AGTAGCCTT GGGCAAGTTT
Breast carcinoma amplified	BCAS2	NP_005863	1.3	2.14	2.36	unch	unch	unch	90.88	-3180	AGACTAGCCT GGGGACA TAGCAAGATC
FGFR 1 oncogene partner 2	FGFR1OP2	NP_056448	1.29	2.85	3.74	unch	unch	unch	93.56	+8941	TGGCTAGTTA TGT GAGCATGTTT
Nucleophosmin	NPM1	AAH09623	1.49	1.66	unch	unch	unch	unch	86.07	-2454	GAACATGTTA AATGA CAACATGACT
Caspase 3	CASP3	CAC88866	3.18	3.74	5.29	3.14	3.24	3.99	93.63	-2062	GGACTAGTTC AACC ACACTAGTCC
14-3-3 sigma	1433S_HUMAN	P31947	1.1	2.06	6.07	unch	unch	unch	83.72	-2549	AGGCATGTGC. CACCATGCCC
Upregulated, lacking p53 biniding site											
Hematopoietic progenitor cell antigen CD34 precursor	Cd34	Q64314	1.33	2.17	3.51	unch	unch	unch			
Microtubule-associated protein RP/EB family member 1	MAPRE1	Q15691	1.16	1.77	2.03	unch	unch	unch			
Laminin B2	LMNB	Q03252	1.45	1.99	4.23	unch	unch	unch			
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	HNRPC	AAH03394.1	2.18	2.58	3.49	unch	unch	unch			
Serine proteinase inhibitor	SERPINC1	NP_000479	1.44	2.52	3.69	unch	unch	unch			
Keratin, type I cytoskeletal 19	KRT19	P08727	1.24	1.76	2.79	unch	unch	unch			
HSPC223	AASDHPTT	AAF36143.1	1.78	3.19	1.44	unch	unch	unch			
Protein phosphatase 1, beta isoform	PPP1CB	AAA85093.1	2.79	5.87	3.01	1.78	1.46	1.45			
Galactokinase 1	GALK1	AAH01166.1	2.29	3.25	unch	unch	unch	unch			
ETHE 1 protein	ETHE1	AAH08250.1	5.71	2.06	unch	unch	unch	unch			
Mitogen-activated protein kinase B isoform 4	MAPK8	NP_620635	2.16	2.98	4.83	unch	unch	unch			
Laminin receptor 1	RPSA	CAA43469	1.34	2.76	3.16	unch	unch	unch			
ACTB protein	ACTB	AAH12854	1.84	4.28	4.67	unch	unch	unch			
Thioredoxin	THIO_HUMAN	P10599	1.37	7.33	10.76	1.3	1.7	1.77			
Ferritin, light polypeptide	FTL	AAH21670.1	3.62	6.62	7.77	1.6	1.91	3.04			
HBV-x associated protein	XAP2	AAB39923	2.33	1.68	unch	unch	unch	unch			
Purine nucleoside phosphorylase	PNP	NP_000261	2.11	2.76	4.39	unch	unch	unch			
Triosephosphate Isomerase	TPI1	NP_000356	1.35	1.48	2.15	unch	unch	unch			

Tabelle 4: Identifizierte Proteine mit p53 abhängiger Regulation

Name	Symbol	Accession	Expression (fold change)						Score	Putative	Putative P53 binding sequence*
			p53+/+			p53-/-			p53 MH algorithm*	binding site*	
			8h	16h	24h	8h	16h	24h			
Downregulated, containing p53-binding sites											
Ras-related protein Rab-11A / Human	RAB11A	P24410	1.21	-2.5	-3.33	unch	unch	unch	86.16	+1730	AATCTTGTTA TAC TAACTAGTCT
Tryptophanyl-tRNA synthetase	WARS	CAA42545.1	-1.3	-1.9	-2.71	unch	unch	unch	91.31	+5619	CACCATGCCC AGCCAT GGGCAAGTTT
Serine/threonine protein phosphatase 2A, 56 kDa regulatory subunit, alpha isoform	PPP2R5A	Q15172	-1.5	-2.3	unch	unch	unch	unch	91.57	+28646	GTACTAGCCC. CAGCTAGTCT
Heterogenous nuclear ribonucleoprotein K, isoform a	HNRPK	NP_112553.1	1.54	-3.75	10.43	unch	unch	unch	83.79	-2086	CGTCTTGCTT GTGTC CCACCTTGTC
60S acidic ribosomal protein P0	RPLP0	P05388	-1.3	-1.9	-3.21	unch	unch	unch	87.26	-2627	GCACATGCCA CCAGGCC GGGCTAGTTT
MRP14, Migration inhibitory factor-related protein 14 (calgranulin)	SI00A9	P06702	1.56	-8.5	-7.4	1.57	1.64	1.52	84.64	-3674	CTGCTTGTTT GT TTACTTGCTT
Keratin, type II cytoskeletal 8	KRT8	AAA35763	1.55	-2.62	-2.47	1.36	1.28	1.15	86.24	-280	AGGCAAGTCT GCTTGTTACAG GCACATGTGCG
EGF receptor binding protein GRB2	GRB2	AAA58448	2.18	-3.11	-3.65	unch	unch	unch	88.97	+9711	AGGCTTGTTG. GCACATGCGCT
HSP 60	HSPD1	AAA36022	unch	-2.83	-4.22	unch	unch	unch	92.51	+1337	TTGCTTGCTC GTTGGCACAGT GGGCATGTTT
Downregulated, lacking p53-binding sites											
Peroxisredoxin 2 / Human	PRDX2	P32119	-1.1	-1.56	-2.85	unch	unch	unch			
cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	PRKAR1A	AAB50921.1	1.34	-3.66	-6.99	unch	unch	unch			
Keratin 19	KRT19	NP_002267	unch	-1.53	-1.68	2.55	3.0	1.69			
Cellular retinoic acid BP Type II	CRABP-II	P29373	1.52	-2.58	-2.83	1.62	1.49	1.49			
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 SSP 6505	HNRPC	AAH03394.1	1.25	-1.67	-4.97	1.13	1.32	2.1			

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kaja Zimmermann
Geburtsdatum: 16.09.1980
Geburtsort: Bremen
Familienstand: ledig
Eltern: Heinz Zimmermann
Berlinde Zimmermann

Schulbildung

8/1997-6/2000 Grundschole und Gymnasium in Schwanewede,
Niedersachsen

6/2000 Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/2000-6/2007 Medizinstudium an der Universität Lübeck

Examina

9/2002 Physikum
8/2003 1. Staatsexamen
3/2006 2. Staatsexamen
5/2007 3. Staatsexamen

Praktisches Jahr

4/2006-6/2006 Innere Medizin, Kardiologie
Bristol Royal Infirmary, Bristol, England

6/2006-7/2006	Innere Medizin, Pneumologie Medizinische Klinik Borstel, Borstel
8/2006-10/2006	Chirurgie - Upper GI Surgery and Vascular Surgery Concord Hospital, Sydney, Australien
10/2006-12/2006	Chirurgie – General Surgery Palmerston North Hospital, Palmerston North, Neuseeland
12/2006-3/2007	Anästhesie und Intensivmedizin Sana Krankenhaus Süd, Lübeck

Dissertation

2004-2009	Dissertation an der Klinik für Chirurgie des UKSH
7/2004	Promotions-Stipendium 2004 „Experimentelle Medizin“

Weiterbildung

seit 9/2007	Ärztin - Klinik für Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin Charite – Campus Benjamin Franklin Berlin
-------------	---

Veröffentlichungen

FG Bader, JK Habermann, **K Zimmermann**, T Gemoll, C Franke, HP Bruch, G Auer, UJ Roblick: Tumor Proteomics – Neue Wege in der Diagnostik kolorektaler Karzinome. Visceralchirurgie 42, 125-133 (2007)

Habermann JK, Bader FG, **Zimmermann K**, Gemoll T, Fritzsche B, Ried T, Auer G, Bruch HP, Roblick UJ: From the genome to the proteome – biomarkers in colorectal cancer. *Langenbecks Arch Surg.*, 93-104 (2008)

Roblick UJ, Bader FG, Lenander C, Hellman U, **Zimmermann K**, Becker S, Ost A, Alaiya A, Bruch HP, Keller R, Mirow L, Franzen B, Ried T, Auer G, Habermann JK: Undifferentiated pelvic adenocarcinomas: diagnostic potential of protein profiling and multivariate analysis. *Int J Colorectal Dis.* 483-491 (2008)

Roblick UJ, Bader FG, Hammarstedt L, Habermann JK, Hellman U, Becker S, Sundmacker A, Gemoll T, **Zimmermann K**, Auer G, Munck-Wikland E.: Proteomic analysis of protein expression in human tonsillar cancer - differentially expressed proteins characterize human tonsillar cancer. *Acta Oncol.* 1-9 (2008)

Kaja Zimmermann, Alexander Schmittl, Ursula Steiner, Anne Marie Asemissen, Maren Knödler, Eckhard Thiel, Kurt Miller, Ulrich Keilholz: Sunitinib treatment for patients with advanced clear-cell renal-cell carcinoma after progression on sorafenib. *Oncology*, 350-354 (2009)

Abstracts

Anne Letsch, Anne Marie Asemissen, **Kaja Zimmermann**, Sandra Bauer, Marcel Völker-Call, David Stather, Eckhard Thiel, Carmen Scheibenbogen, Ulrich Keilholz: Difference in T cell response to WT1 Peptide Vaccination between Patients with AML/MDS and Solid Tumors.

Posterbeiträge

Unger A, **Zimmermann K**, Bruch HP, Jörnvall H, Auer G, Möslin G, Roblick UJ (2004) Vergleich der Proteinexpression der familiären Adenomatosis Polyposis (FAP) zum sporadischen Kolonkarzinom – eine Multiproteomanalyse. CAMO Mannheim (2004)

Habermann JK, Bader FG, **Zimmermann K**, Gemoll T, Fritzsche B, Ried T, Auer G, Bruch HP, Roblick UJ: From the genome to the proteome – biomarkers in colorectal cancer. HUPO München (2004)

Kaja Zimmermann, Alexander Schmittl, Ursula Steiner, Anne Marie Asemissen, Maren Knödler, Eckhard Thiel, Kurt Miller, Ulrich Keilholz: Sunitinib treatment for patients with advanced clear-cell renal-cell carcinoma after progression on sorafenib. DGHO Wien (2008)

Vorträge

Kaja Zimmermann: Chemotherapie induzierte Proteinexpression von p53 Zielgenen – eine Multiproteomanalyse. Sylter Gespräche 2004. Leitung von Prof. Dr. Jelkmann, Institut für Physiologie, UKSH, Campus Lübeck