

# p73 in Differenzierung und Tumorigenese

Dissertation zur Erlangung  
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Heidi Griesmann  
aus Steinbach-Hallenberg

Würzburg, 2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit 01.11.2004 bis 31.12.2007 am Rudolf-Virchow-Zentrum in Würzburg und vom 01.01.2008 bis 31.12.2008 an der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Medizin, Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) unter der Anleitung von Prof. Dr. Thorsten Stiewe angefertigt.

Eingereicht am: 12.12.2008

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. M. Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Stiewe

2. Gutachter: Prof. Dr. R. Benavente.

Tag des Promotionskolloquiums: 25.03.2009

Doktorurkunde ausgehändigt am:

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Diese Arbeit wurde weder in gleicher, noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlichen Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben und zu erwerben gesucht.

Marburg, 12.12.2008

Heidi Griesmann

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1	Vorwort . . . . .	6
1.2	p53 . . . . .	8
1.2.1	Gen und Struktur von p53 . . . . .	8
1.2.2	p53 Regulation . . . . .	9
1.2.3	p53 in der Differenzierung . . . . .	11
1.2.4	p53 in der Tumorentwicklung . . . . .	12
1.3	p63 . . . . .	13
1.3.1	Gen und Struktur von p63 . . . . .	13
1.3.2	p63 in Entwicklung und Differenzierung . . . . .	14
1.3.3	p63 in der Tumorentstehung . . . . .	15
1.4	p73 . . . . .	16
1.4.1	Gen und Struktur von p73 . . . . .	16
1.4.2	p73 Regulation . . . . .	17
1.4.3	p73 in Differenzierung und Entwicklung . . . . .	20
1.4.4	p73 in der Tumorentstehung . . . . .	21
1.5	Zielsetzung . . . . .	25
<b>2</b>	<b>Der p53-Familieninhibitor <math>\Delta</math>Np73 interferiert mit multiplen Entwicklungsprogrammen (Publikation 1)</b>	<b>27</b>
2.1	Einleitung . . . . .	27
2.2	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	28
<b>3</b>	<b>Die Rolle der p53-Familie in der Muskeldifferenzierung und Rhab- domyosarkomentwicklung (Publikation 2)</b>	<b>32</b>
3.1	Einleitung . . . . .	32
3.2	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	32

---

<b>4</b>	<b>p73 fungiert als Barriere der malignen Transformation (Publikation 3)</b>	<b>38</b>
4.1	Einleitung . . . . .	38
4.2	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	39
<b>5</b>	<b>p53 und p73 in der Suppression der Myc-gesteuerten Lymphom-entwicklung (Publikation 4)</b>	<b>44</b>
5.1	Einleitung . . . . .	44
5.2	Ergebnisse und Diskussion . . . . .	45
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung (deutsch und englisch)</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>52</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>73</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>74</b>
	<b>Publikationsliste</b>	<b>75</b>
	<b>Anhang mit Publikationen 1-4</b>	<b>76</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Vorwort

Krebs ist die zweithäufigste Todesursache weltweit. Im Jahr 2007 starben 7,9 Millionen Menschen an den Folgen einer Krebserkrankung und jedes Jahr erkranken weitere 11 Millionen Menschen weltweit. Nach Schätzungen der Experten wird die Zahl der Krebserkrankungen bis zum Jahr 2030 um 50 Prozent zunehmen. Ein Grund dafür ist, dass die Menschen immer älter werden und das Risiko an Krebs zu erkranken mit zunehmendem Alter steigt (Deutsche Krebshilfe; WHO). Krebs wird in der Medizin als maligne Neoplasie bezeichnet, welche in epitheliale (Karzinome) und mesenchymale (Sarkome) Tumore unterteilt werden. Eine weitere Gruppe bilden die hämatologischen Krebsformen des Blutes und der blutbildenden Organe, wobei hier zwischen Leukämien und Lymphomen unterschieden wird. Gegenwärtig sind etwa 100 verschiedene Krebserkrankungen bekannt, die sich hinsichtlich Überlebenswahrscheinlichkeit, Behandlungsmöglichkeiten und Metastasenbildung unterscheiden, welche jedoch folgende charakteristische biologische Eigenschaften gemeinsam haben [Hanahan und Weinberg, 2000]:

- Unabhängigkeit von Wachstumssignalen
- Unempfindlichkeit gegenüber antiproliferativen Signalen
- Verlust der Apoptose
- Verlust der Seneszenz
- Angiogenese
- Fähigkeit zur Invasivität
- Fähigkeit zur Metastasierung.

Im Gegensatz zu normalen Zellen, die nur eine begrenzte Lebensspanne besitzen, sind Krebszellen, bei denen die Balance zwischen Proliferation und Zelltod verschoben ist, immortal. Dies zeichnet sich durch ihre Fähigkeit zur unbegrenzten Zellteilung aus.

Die Transformation von einer normalen Zelle in eine Krebszelle ist ein mehrstufiger Prozess. Die Veränderungen sind das Resultat einer Interaktion zwischen den individuellen genetischen Faktoren und drei Kategorien externer Noxen:

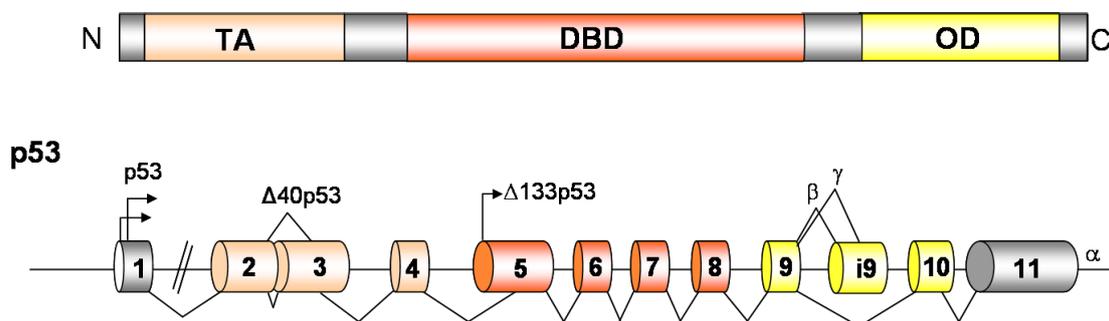
- physikalische Karzinogene: UV- und ionisierende Strahlung
- chemische Karzinogene: Asbest, Tabakrauch, Aflatoxin, Arsen (im Trinkwasser), u.a.
- biologische Karzinogene: Infektionen durch Viren (Hepatitis B/C, HPV, HHV-8, HIV), Bakterien (*Helicobacter pylori*), Parasiten (Schistosomiasis).

Schätzungsweise 90% aller Krebsarten resultieren aus den genannten externen Faktoren. Um einer solchen Transformation vorzubeugen, verfügt der Organismus über Mechanismen, welche ein unkontrolliertes Zellwachstum verhindern. Hierzu zählen unter anderem eine strikte Kontrolle über den Zellzyklus, sowie die Fähigkeit zur Apoptose oder Seneszenz. Falls diese zelleigenen Kontrollmechanismen einmal fehlschlagen sollten, kann das Immunsystem die transformierten Zellen erkennen und eliminieren, und somit ein unkontrolliertes Zellwachstum verhindern [Lowe et al., 2004]. Die Gene, die für diese zelleigenen Kontrollmechanismen kodieren, werden Tumorsuppressorgene“genannt, während Tumorentstehung und Progression aktiv fördernde Gene als Ökogene“bezeichnet werden. Der Verlust dieser Tumorsuppressorgene und ihrer Funktion durch die Inaktivierung beider Allele fördert schließlich die Tumorentstehung [Knudson, 1971]. Der wohl bekannteste und wichtigste Tumorsuppressor ist p53.

## 1.2 p53

### 1.2.1 Gen und Struktur von p53

Im Jahre 1979 wurde p53 das erste Mal durch seine Interaktion mit dem T-Antigen des SV-40 Virus beschrieben [DeLeo et al., 1979; Lane und Crawford, 1979; Melero et al., 1979; Linzer und Levine, 1979]. Es ist das erste identifizierte und bis heute das bestuntersuchte Tumorsuppressorgen. Das 20 kb große p53-Gen kann theoretisch für mindestens neun verschiedene Proteinisoformen kodieren (Abb. 1) [Bourdon et al., 2005]. Das p53-Volllängenprotein besteht aus 393 Aminosäuren und weist drei Domänen auf: Transaktivierungs- (TA), DNA-Bindungs- (DBD) und Oligomerisierungsdomäne (OD). Die im zentralen Bereich gelegene DNA-Bindungsdomäne ist essentiell für die sequenzspezifische DNA-Bindung an p53 responsive Elemente (p53-RE) in den Promotoren der p53-Zielgene [Bourdon et al., 1997; el Deiry et al., 1992; Funk et al., 1992]. Die N-terminal lokalisierte Transaktivierungsdomäne benötigt p53 für die Induktion p53-regulierter Gene [Fields und Jang, 1990; Raycroft et al., 1990]. Mittels der Oligomerisierungsdomäne im C-Terminus bildet p53 einen tetrameren Transkriptionsfaktor. Diese Oligomerisierung ist essentiell für die Promotorbindung und transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen und somit für seine tumorsuppressive Aktivität [Jeffrey et al., 1995].

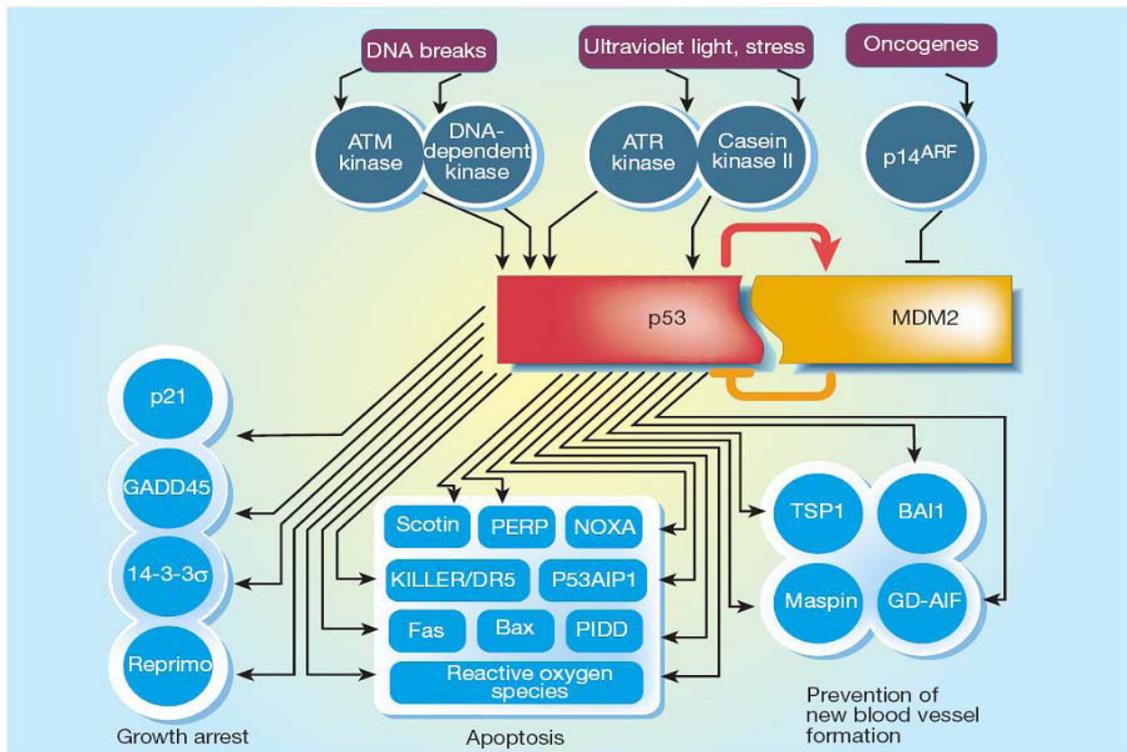


**Abb. 1: Humanes p53.**

Schema der humanen p53 Protein- und Genstruktur. Das p53-Protein besteht aus folgenden Domänen: TA, Transaktivierungsdomäne; DBD, DNA-Bindungsdomäne; OD, oligomerisierungsdomäne. Durch alternatives Spleißen ( $\alpha, \beta, \gamma$ ) und alternative Promotoren kann das p53-Gen diverse Isoformen generieren (verändert nach [Bourdon et al., 2005]).

### 1.2.2 p53 Regulation

In ungestressten Zellen liegt p53 in niedrigen Konzentrationen vor, was auf seine sehr kurze Halbwertszeit und die strenge Regulierung zurückzuführen ist, die wiederum für ein normales Zellwachstum und die Entwicklung notwendig ist. Als wichtiger Bestandteil in einem großen Netzwerk von Signalwegen (Abb. 2) kontrolliert p53 die drei wichtigsten zellulären Prozesse: Zellzyklusarrest, Apoptose und Seneszenz [Vogelstein et al., 2000]. Zu den bedeutendsten p53-Zielgenen zählt sein Antagonist *MDM2* [Oliner et al., 1992; Barak et al., 1993; Wu et al., 1993], Zellzyklusregulatoren wie *p21<sup>CIP1/WAF1</sup>* [el Deiry et al., 1993; Harper et al., 1993], *GADD45* [Hollander et al., 1993] oder *14-3-3 $\sigma$*  [Hermeking et al., 1997], sowie die proapoptischen Gene *Bax*, *PUMA* und *Noxa* [Nakano und Vousden, 2001; Yu et al., 2001; Miyashita und Reed, 1995; Oda et al., 2000; Attardi et al., 2000]. Der Umfang und die Höhe der Transaktivierung eines jeden Zielgens sind abhängig vom Zelltyp und dem jeweiligen Stresssignal. Einer der bedeutendsten Kontrollmechanismen der p53-Funktion ist die Interaktion mit dem Onkoprotein und p53-Antagonisten MDM2. MDM2 besitzt gegenüber p53 eine E3-Ubiquitinligaseaktivität und kann direkt an dessen N-Terminus binden [Brown et al., 1993; Chen et al., 1993; Picksley et al., 1994; Brown et al., 2001]. Diese direkte Interaktion führt zur Ubiquitinierung von p53 und dem anschließenden proteasomalen Abbau [Kubbutat et al., 1997]. Gleichzeitig ist *MDM2* ein Zielgen von p53, dessen Expression sich mit der Induktion der p53-Aktivität erhöht. Dies impliziert, dass p53 und MDM2 sich gegenseitig mittels eines Autoregulationsmechanismus kontrollieren [Oliner et al., 1993; Wu et al., 1993; Ashcroft und Vousden, 1999]. Zusätzlich wird die p53-Aktivität durch onkogene Stimuli, DNA-Schäden und zytotoxischen Stress reguliert. Diese Regulationen von p53 umfassen posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Azetylierung, Methylierung, Ubiquitinierung und Sumoylierung [Gu und Roeder, 1997; Sakaguchi et al., 1998; Buschmann et al., 2000b,a; Oda et al., 2000; Rodriguez et al., 2000; Melchior und Hengst, 2002; Chuikov et al., 2004]. So induzieren zum



**Abb. 2: Das p53-Netzwerk.**

Das Schema zeigt die Aktivierung und Regulierung von und durch p53, was seine zentrale Rolle als Tumorsuppressor widerspiegelt [Vogelstein et al., 2000].

Beispiel Onkogene wie Ras, E1A, E2F und c-Myc p53 durch die Aktivierung von p14<sup>Arf</sup>. p14<sup>Arf</sup> seinerseits hemmt MDM2, was zur Stabilisierung von p53 führt [Zindy et al., 1998; Pomerantz et al., 1998; de Stanchina et al., 1998; Lowe, 1999; Sherr und Weber, 2000; Lowe und Lin, 2000]. Der Verlust von p14<sup>Arf</sup> hingegen erhöht eine durch Myc forcierte Krebsentstehung, da die durch p53-vermittelte apoptotische Antwort unterdrückt ist [Schmitt et al., 2002]. DNA-Schäden induzieren über die Kinasen ATM, ATR, Chk1 und Chk2 eine Phosphorylierung von p53 am N-Terminus und hemmen so die Interaktion mit MDM2 [Giaccia und Kastan, 1998; Meek, 1999; Prives und Hall, 1999]. Allerdings ist der Mechanismus, wie p53 seine Tumorsuppressoraktivität ausführt, bis heute nicht ganz verstanden. Der bekannteste Mechanismus ist der der Genexpressionsmodulation. p53 kann als Transkriptionsfaktor direkt und spezifisch an die DNA-Zielsequenz (p53 responsive Elements (p53RE)) in der Promotorregion seiner Zielgene binden [el Deiry et al., 1992; Funk

et al., 1992; Bourdon et al., 1997] und so deren Genexpression modulieren, was ein wichtiger Bestandteil der Tumorsuppressoraktivität von p53 ist [Chipuk und Green, 2006]. Zusammenfassend verhindert die p53-vermittelte Induktion von Zellzyklusarrest oder Apoptose die Replikation geschädigter DNA sowie die Teilung genetisch veränderter Zellen, die abnormes Zellwachstum hervorrufen können. Aus diesem Grund kommt p53 eine essentielle Rolle in der Erhaltung der Genomintegrität zu und wird auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet [Lane, 1992; Bourdon, 2007]. Dass p53 eine zentrale Rolle beim Schutz der Genomintegrität spielt, wird dadurch deutlich, dass seine Aktivität in mehr als 50% aller humanen Krebsarten, durch Proteininaktivierung oder direkte Genmutation, verloren geht [Iwakuma und Lozano, 2007; Lozano, 2007; Vousden und Lane, 2007; Petitjean et al., 2007a; Bourdon, 2007]. Zu 97% befinden sich alle Mutationen, vorwiegend Punktmutationen (R248, R273, R175, G245, R249, R282), in der DNA-Bindungsdomäne [Olivier et al., 2002; Petitjean et al., 2007a], was zu einer verminderten DNA-Bindung dieser Mutanten führen kann, die darüber hinaus auch als dominant-negative Inhibitoren gegenüber dem Wildtyp-p53 wirken können [de Vries et al., 2002; Ko und Prives, 1996]. Eine Mutation im p53-Gen muss aber nicht unbedingt zu einer Inaktivierung der transkriptionellen Aktivität führen [Kato et al., 2003; Iacopetta et al., 2006; Petitjean et al., 2007b]: 60% der Mutationen, die im p53-Gen auftreten können, zeigen keinen Aktivitätsverlust. Nur 15% aller Mutationen führen zu einer kompletten Inaktivierung seines Transaktivierungsvermögens (loss-of-function). Die verbleibenden 25% der p53-Mutationen zeigen eine vom Wildtyp-Protein abweichende transkriptionelle Aktivität in Bezug auf das Zielgenspektrum (gain-of-function) [Petitjean et al., 2007b].

### 1.2.3 p53 in der Differenzierung

Eine exakte Regulierung der p53-Aktivität ist essentiell für eine optimale Entwicklung und Differenzierung. In Differenzierungsprozessen wie Hämatopoese, Sperma-

togenese [Kastan et al., 1991; Almon et al., 1993] und Myogenese [Soddu et al., 1996; Tamir und Bengal, 1998; Porrello et al., 2000] ist die p53-Expression und/oder Aktivität erhöht. Strukturelle oder funktionelle Veränderungen des Tumorsuppressorgens p53 in Tumoren korrelieren häufig mit einem undifferenzierten Phänotyp [Feinstein et al., 1991; Battista et al., 1995]. So kann die exogene Expression von p53 die Differenzierung in zahlreichen Tumorzellen *in vivo* und *in vitro* induzieren [Almog und Rotter, 1997; Bossi et al., 2000]. Darüber hinaus ist bekannt, dass eine exakte Balance der p53-Proteinspiegel in Embryonalzellen essentiell für deren optimale Entwicklung ist. *In situ* Hybridisierungen konnten zeigen, dass in embryonalen Mauszellen an den Tagen 8.5 bis 10.5 post coitum hohe p53-mRNA-Spiegel existieren. In den späteren Entwicklungsphasen ist die p53-Expression während der Differenzierung bestimmter Gewebe deutlich ausgeprägt, wie zum Beispiel in Gehirn, Leber, Lunge, oder Thymus. In ausdifferenzierten Zellen hingegen ist die p53-mRNA-Expression stark reduziert [Schmid et al., 1991].

Ein komplettes Fehlen von p53 führt in Mäusen zu einer reduzierten Fertilität, sowie in einigen Fällen zu Exenzephalie [Armstrong et al., 1995; Sah et al., 1995]. Allerdings sind p53-null Mäuse lebensfähig. Dies ist ein deutlicher Gegensatz zu *Xenopus laevis* Embryonen, wo eine p53-Depletion Gastrulationsfehler und Defekte in der Mesodermbildung verursacht [Cordenonsi et al., 2003]. Grundsätzlich deuten diese Erkenntnisse auf Funktionen von p53 in Differenzierung und Entwicklung hin. Die Signalwege dieser Prozesse, an denen p53 beteiligt ist, sowie deren Regulatoren und Effektoren, sind bisher noch nicht detailliert bekannt.

#### 1.2.4 p53 in der Tumorentwicklung

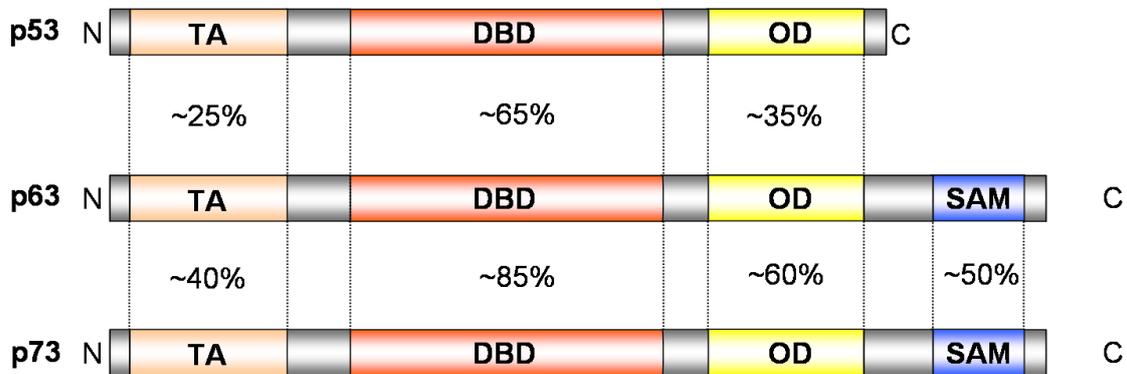
Die meisten humanen Tumore weisen ein defektes p53-Signalnetzwerk auf. In mehr als 50% dieser Tumore ist p53 direkt durch Genmutationen inaktiviert. Aber auch die indirekte Inaktivierung von p53 durch Bindung an virale Onkoproteine oder der Verlust von auf- und absteigenden Signalen rund um p53 kann zu dieser Si-

gnalwegsstörung in Tumoren mit Wildtyp-p53 führen [Nigro et al., 1989; Harris und Hollstein, 1993; Vogelstein et al., 2000; Bourdon, 2007]. Der Verlust der p53-Antwort macht Zellen anfälliger für weitere genetische Schäden und begünstigt somit neoplastische Transformation und Tumorprogression. Dass p53 eine essentielle Rolle als Tumorsuppressor zukommt, zeigt sich auch im transgenen Tiermodell. p53 Knockout-Mäuse weisen eine erhöhte Tumorzinzidenz auf [Donehower et al., 1992; Jacks et al., 1994]. Keimbahnmutationen des p53 führen zu erblichen Formen von Krebs, in Maus und Mensch [Levine et al., 1995]. Menschen mit dem autosomal-dominant vererbten Li-Fraumeni Syndrom, welche meistens Keimbahnmutationen in einem der beiden p53-Allele tragen, entwickeln zu 90% bereits im frühen Alter gehäuft Tumore wie Brustkrebs, Sarkome und Hirntumore [Malkin et al., 1990; Malkin, 1993; Kemp et al., 1993].

Mutiertes p53 ist in der Regel stabiler als Wildtyp-p53 und liegt in höherer Konzentration in Tumorzellen vor. Das mutierte p53-Protein kann außerdem als dominant-negativer Inhibitor von Wildtyp-p53 fungieren und so dessen Funktion blockieren [Ko und Prives, 1996; de Vries et al., 2002]. Viele Tumore, die eine p53-Mutation tragen, zeigen oft auch einen Verlust der Heterozygotie, wobei hier die Funktion des bestehenden Wildtyp-Allels entweder durch Deletion, Mutation oder Promotorhypermethylierung inaktiviert wird [Greenblatt et al., 1994].

Bis zum Jahr 1997, mit der Entdeckung von p63 und p73, galt p53 als einzigartig. Da die drei Proteine eine signifikante Homologie aufweisen, werden sie als p53-Familie bezeichnet. Die Homologie der drei p53-Familienmitglieder (Abb. 3) zeigt sich in den drei funktionellen Proteindomänen: N-terminale Transaktivierungs (TA)-, zentrale DNA-Bindungs- (DBD) und C-terminale Oligomerisierungsdomäne (OD). Aufgrund des hohen Homologiegrades in der DBD können p63 und p73 mit p53-Bindungsstellen in der DNA interagieren und diese transaktivieren [Kaghad et al., 1997; Marin et al., 1998; Yang et al., 1998]. Basierend auf der Homologie zu p53 wurde vermutet, dass p63 und p73 eine analoge Rolle als Tumorsuppressor in humanen Tumoren zukommt [Yang und McKeon, 2000; Melino et al., 2003; Moll

und Slade, 2004].



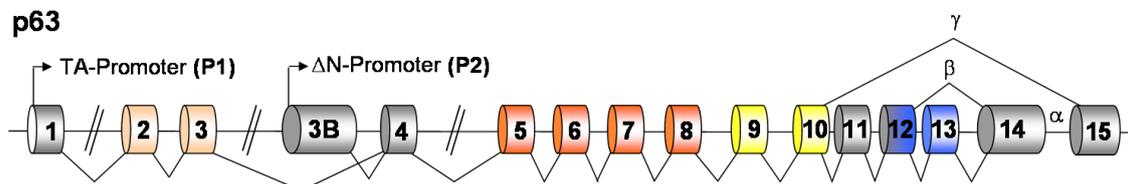
**Abb. 3: Proteinstruktur der p53-Familie.** Strukturvergleich der drei p53-Familienmitglieder. TA, Transaktivierungsdomäne; DBD, DNA-Bindungsdomäne; OD, Oligomerisierungsdomäne; SAM, SAM-Domäne.

## 1.3 p63

### 1.3.1 Gen und Struktur von p63

Das p63-Gen (Abb. 4) wurde 1998 identifiziert [Yang et al., 1998; Osada et al., 1998]. Die transaktivierenden Isoformen (TA) werden von einem Promotor stromaufwärts von Exon 1 generiert. Ein alternativer Promotor in Intron 3 führt zur Expression von N-terminal verkürzten  $\Delta Np63$ -Isoformen [Bourdon, 2007]. p63-Proteine können an p53- und p63-RE in der DNA binden und so die Transkription von Zielgenen regulieren, die an Zellzyklusarrest, Apoptose und Differenzierung beteiligt sind [Murray-Zmijewski et al., 2006; Stiewe, 2007]. Die Expression von p63 ist lokal beschränkt. Die höchste Expression ist in Basalzellen verschiedener Epithelgewebe zu finden, wo  $\Delta Np63\alpha$  die vorwiegende Form ist. Wie die Expression von p63 reguliert ist oder was entscheidet, welche Isoform überwiegt, ist bis heute nicht genau geklärt. Allerdings gibt es Hinweise, dass DNA-Schädigung die Expression von TA-Isoformen hoch- [Kato et al., 2000] und die  $\Delta N$ -Isoformen herunterreguliert [Liefer et al., 2000]. Wie bereits erwähnt besteht die größte Homologie zwischen p53 und p63 in

der DBD [Celli et al., 1999; Yang et al., 1998]. Experimente basierend auf transienter Transfektion zeigen, dass p63 die Transkription eines Reportergens, stromabwärts einer p53 DNA-Bindungsstelle, aktivieren oder reprimieren kann [Yang et al., 1998]. So führt die transiente Transfektion von TAp63 zu Zellzyklusarrest und Apoptose [Yang et al., 1998], wohingegen  $\Delta Np63$  entgegengesetzte Effekte zeigt [Yang et al., 1998; Sasaki et al., 2001].



**Abb. 4: Humanes p63.**

Schema der humanen p63 Genstruktur: alternatives Spleißstellen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) und alternative Promotoren (P1, P2) resultiert in zahlreichen Isoformen (verändert nach [Deyoung und Ellisen, 2007]).

### 1.3.2 p63 in Entwicklung und Differenzierung

p63 wird während der Embryonalentwicklung in einem stark begrenzten Muster exprimiert [Yang et al., 1999; Mills et al., 1999; Pellegrini et al., 2001]. Beachtlich ist, dass p63 essentiell für die Entwicklung der meisten Gewebe ist, in denen es exprimiert wird. So zeigen p63-null Mäuse (Abb. 5), im Gegensatz zu p53-null Mäusen, enorme Entwicklungsdefekte: p63-Knockout Tiere weisen extreme Verkürzungen oder komplette Verluste der Gliedmaßen sowie Schädelmissbildungen auf. Darüber hinaus bilden diese Tiere keine mehrschichtigen Epithelien aus, weshalb die Jungtiere wenige Stunden nach der Geburt an Dehydratation versterben [Yang et al., 1999; Mills et al., 1999]. Diese Defekte verdeutlichen die zentrale Rolle der p63-Expression für die Epidermalmorphogenese (Integument und Zunge), einschließlich der Formation von Adnexen (Zähne, Haare, Brust-, Prostata-, Schweiß- und Tränendrüsen) [Yang et al., 1999; Mills et al., 1999].



**Abb. 5: Phänotyp eines p63-null Neugeborenen.**

Verpaarungen zwischen p63-heterozygoten Mäusen resultieren in normal entwickelten Wildtyp und heterozygoten Nachkommen, sowie p63-Knockout Tieren mit fehlenden Gliedmaßen und Hautdefekten.

### 1.3.3 p63 in der Tumorentstehung

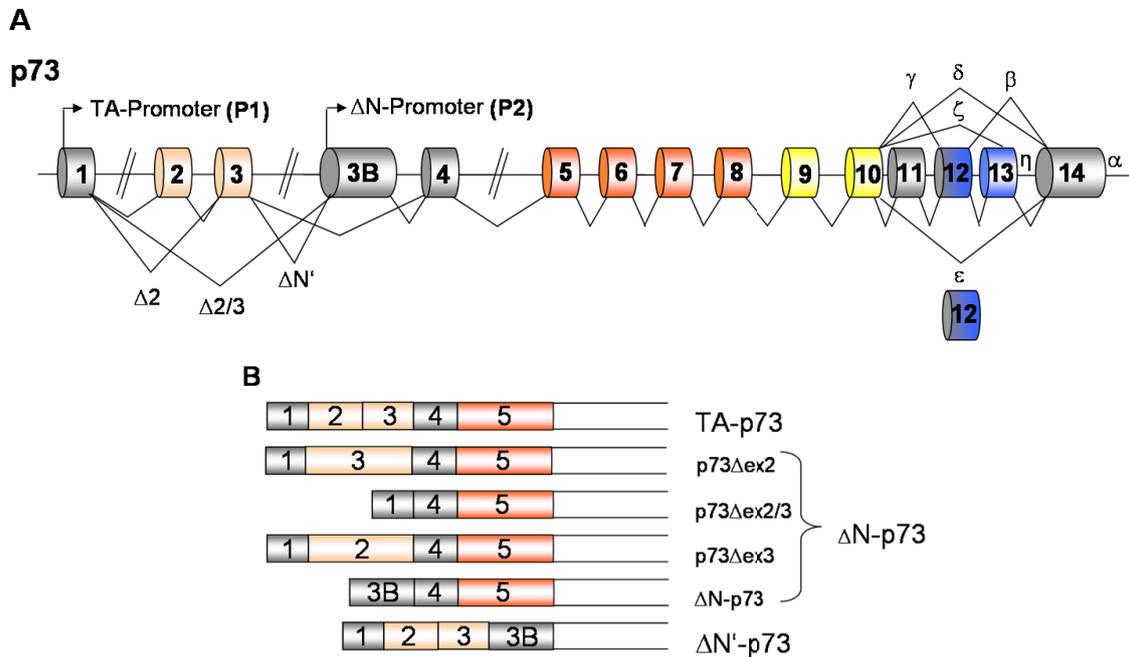
Das p63-Gen befindet sich auf Chromosom 3q27-28, eine Region deren Amplifikation eine Rolle in der Tumorigenese spielt. Studien haben gezeigt, dass p63 in humanen Tumoren wie dem Plattenepithel-, Zervix- und Prostatakarzinom überexprimiert ist [Björkqvist et al., 1998; Hibi et al., 2000; Massion et al., 2003]. Untersuchungen mit Antikörpern und RT-PCR gegen die verschiedenen p63-Isoformen haben gezeigt, dass  $\Delta Np63\alpha$  in Plattenepithelkazinomen, vor allem des Kopf-Hals Bereiches (HNSCC) die prädominante Form ist [Massion et al., 2003; Sniezek et al., 2004]. Im Gegensatz dazu, zeigen andere Studien eine Reduktion oder gar einen Verlust der p63-Expression [Park et al., 2000; Como et al., 2002; Urist et al., 2002; Koga et al., 2003; Rocco et al., 2006]. Über den Tumorphänotyp von p63 Tieren ist wenig bekannt. Während p63-null Mäuse nach der Geburt versterben, entwickeln heterozygote p63-Mäuse Tumore. Dies lässt vermuten, dass p63 eine Rolle in der Tumorsuppression spielt [Flores et al., 2005]. Auch wenn p63 $+/$ - Tiere nicht diesen ausgeprägten Tumorphänotyp wie p53 $+/$ - Mäuse zeigen, geht das p63 Wildtyp-Allel in den sich entwickelnden Tumoren verloren [Flores et al., 2005].

## 1.4 p73

### 1.4.1 Gen und Struktur von p73

Die Entdeckung von p73 im Jahre 1997 war eine große Überraschung in der Krebsforschung, denn bisher galt p53 als einzigartig [Kaghad et al., 1997]. Das p73-Gen befindet sich auf Chromosom 1p36, eine Region, die häufig in einer Vielzahl von Tumoren verloren geht. Dadurch wird p73 eine p53-ähnliche Tumorsuppressoraktivität zugesprochen. Die p73-Genstruktur (Abb.6) ist sehr komplex, was zu einer Vielzahl verschiedener Isoformen führt [Melino et al., 2002; Yang et al., 2002]. Das p73-Gen exprimiert 7 alternativ gespleißte C-terminale Isoformen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ) und 4 alternativ gespleißte N-terminale Isoformen, die verschiedene Regionen der TA-Domäne besitzen. Insgesamt kann das p73-Gen mindestens 35 mRNAs exprimieren, die theoretisch für 29 verschiedene Proteine kodieren [Bourdon, 2007]. Die Expression der p73-Isoformen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  und  $\eta$ , bestehend aus der TA-, DBD- und Oligomerisierungsdomäne, konnte in normalen Zellen nachgewiesen werden [Kaghad et al., 1997; Laurenzi et al., 1998, 1999; Casciano et al., 1999; Fillippovich et al., 2001].

Die Isoformen, welchen die Oligomerisierungsdomäne von Exon 10 fehlt, kommen hingegen ausschließlich in neoplastischen Zellen vor [Scaruffi et al., 2000]. Wie p53 und p63 besitzt auch p73 zwei Promotoren, P1 stromaufwärts von Exon 1 und den alternativen P2 in Intron 3. Diese unterteilen die p73-Isoformen in zwei funktionelle Klassen, die transaktivierenden vom P1-Promotor, auch als TAp73 bezeichnet, sowie die N-terminal verkürzten und transaktivierungsdefizienten vom P2-Promotor, als  $\Delta$ Np73 bekannt [Grob et al., 2001; Stiewe et al., 2002b; Ishimoto et al., 2002; Pozniak et al., 2002; Zaika et al., 2002; Kartasheva et al., 2002; Oswald und Stiewe, 2008]. Der alternative Promotor P2 enthält außerdem p53- und p73-REs, so dass die Expression von  $\Delta$ Np73 durch TAp73 und p53-induziert werden kann. Weitere transaktivierungsdefiziente Proteinformen entstehen durch das alternative Spleißen N-terminal lokalisierter Exone ( $\Delta$ N'p73,  $\Delta$ ex2p73,  $\Delta$ ex2/3p73) [Kaghad et al., 1997;



**Abb. 6: Humanes p73.**

(A) Schema der humanen p73-Genstruktur: alternatives Spleißen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ) und alternative Promotoren sind hier dargestellt. (B) p73-Proteinisoformen: TAp73-Proteine, kodiert vom Promotor P1, enthalten die konservierte N-terminale Transaktivierungsdomäne (TA). Ex2p73 Proteine entstehen durch alternatives Spleißen von Exon 2. Diesen fehlt die konservierte N-terminale Transaktivierungsdomäne (TA). Ex2/3p73 Proteine entstehen durch alternatives Spleißen von Exon 2 und 3, welche von Exon 4 initiiert werden und keine TA besitzen.  $\Delta N'$ p73 mRNAs sind oft in Tumoren überexprimiert und werden durch alternatives Spleißen von Exon 3' im Intron 3 gebildet.  $\Delta N$ p73 Proteine, kodiert vom Promotor P2, sind N-terminal verkürzt und unterscheiden sich von TAp73 in der N-terminalen Domäne [Bourdon, 2007].

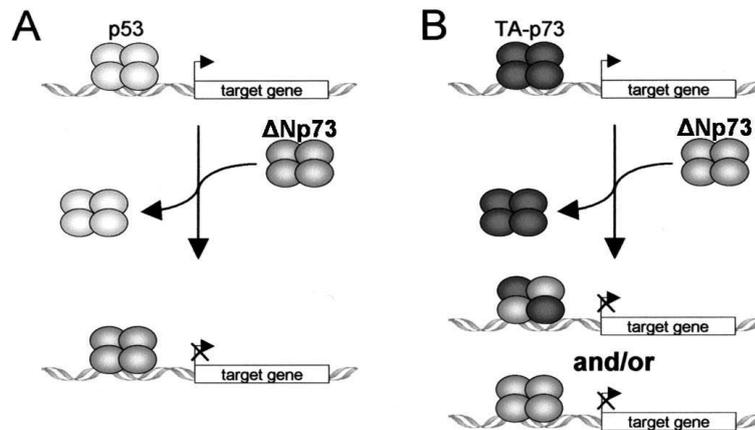
Stiewe et al., 2002a; Stiewe und Pützer, 2002; Ishimoto et al., 2002; Fillippovich et al., 2001; Oswald und Stiewe, 2008].

Während TAp73 als Transaktivator p53-Zielgene, wie *p21*, *Puma*, *Noxa*, *Bax* und *MDM2* induzieren kann, ist es  $\Delta N$ p73 nicht möglich die Gentranskription zu induzieren, da es zwar eine funktionale DBD besitzt, aber keine TA-Domäne [Kaghad et al., 1997; Jost et al., 1997; Laurenzi et al., 1998; Stiewe und Pützer, 2002].

### 1.4.2 p73 Regulation

Da p73 wie p53 durch DNA-Schädigung aktiviert wird, sind auch ähnliche Mechanismen an der Regulation von p73 beteiligt [Zaika et al., 2001]. Wegen seiner Funktion als Transaktivator von p53-Zielgenen, wie *p21* (*CDKN1A*), *Puma*, *Noxa*, *Bax* und *MDM2* [Kaghad et al., 1997; Jost et al., 1997; Laurenzi et al., 1998; Zhu et al., 1998; Fontemaggi et al., 2002; Ramadan et al., 2005], kann p73 unabhängig von p53 Zellzyklusarrest und Apoptose induzieren [Agami et al., 1999; Gong et al., 1999; Yuan et al., 1999; Murray-Zmijewski et al., 2006; Stiewe, 2007]. p73 ist vorwiegend im Kern lokalisiert [Inoue et al., 2002] und unter normalen Bedingungen wird p73 wie p53 durch den Ubiquitin-Proteasomsignalweg im Zytoplasma degradiert, um so die Proteinspiegel zu regulieren [Bálint et al., 1999; Lee und Thangue, 1999; Inoue et al., 2002; Bernassola et al., 2004]. Itch ist eine Ubiquitin-Proteinligase, die p73 bindet und ubiquitiniert [Rossi et al., 2005]. Darüber hinaus nehmen posttranslationale Modifikationen Einfluss auf die Proteinstabilität von p73. Dazu gehört die Phosphorylierung durch c-Abl, p38-MAPK [Agami et al., 1999; Gong et al., 1999; Yuan et al., 1999; Sanchez-Prieto et al., 2002; Gaiddon et al., 2003] und JNK (c-Jun N-terminale Kinase) [Jones et al., 2007], sowie die Azetylierung durch p300/CBP [Costanzo et al., 2002; Mantovani et al., 2004; Bernassola et al., 2004; Oberst et al., 2005; Strano et al., 2005] und die Sumoylierung durch PIAS1 [Minty et al., 2000; Blandino und Dobbstein, 2004]. Aber auch kinaseabhängige Signale, wie Chk1 und Chk2 [Gonzalez et al., 2003; Urist et al., 2004] oder der PI3K/AKT-, PKA- und CDK-Signalweg [Basu et al., 2003; Gaiddon et al., 2003; Hanamoto et al., 2005], tragen zur Regulation von TAp73 bei. Darüber hinaus sind auch Onkogene an der Regulation von p73 beteiligt. Hierbei spielt der Transkriptionsfaktor E2F1 eine entscheidende Rolle, der in gesunden Zellen den Zellzyklus und die Induktion von Apoptose reguliert, aber in vielen humanen Tumoren fehlreguliert ist [Stiewe und Pützer, 2002]. Im Gegensatz zu p53, wird p73 direkt durch die Bindung von E2F1 an den p73-Promotor aktiviert [Irwin et al., 2000; Stiewe und Pützer, 2000], was zur

Induktion von p53-Zielgenen und Apoptose führt. Die Hemmung der p73-Aktivität durch dominant-negativ agierende p73-Mutanten ( $\Delta Np73$ , p73DD) hingegen führt zur Inhibierung der E2F1-vermittelten Apoptose in p53-depletierten Zellen [Irwin et al., 2000; Stiewe und Pützer, 2000; Zaika et al., 2001]. Auch die Onkogene SV40 T-Antigen, c-Myc und E1A induzieren eine erhöhte p73-Expression möglicherweise durch eine Verstärkung der E2F1-Aktivität [Zaika et al., 2001], was zur Induktion von p73-Zielgenen und Apoptose führt [Marin et al., 1998; Steegenga et al., 1999; Zaika et al., 2001; Chen et al., 2004]. Die proapoptotische Wirkung von E1A beruht auf seiner Fähigkeit, in p53-negativen Zellen, p300/CBP und pRB zu binden, die Regulatoren der E2F1-vermittelten Apoptose sind [Stiewe und Pützer, 2000]. Wie c-Myc p73 beeinflusst, ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Zum einen ist bekannt, dass c-Myc den p73-Promotor induzieren und aktivieren kann. Zum anderen wurde gezeigt, dass c-Myc mit p73 interagiert und so dessen transkriptionelle Funktion inhibiert [ichi Watanabe et al., 2002]. Mit Abstand der wichtigste Regulator von p73 ist jedoch p73 selbst. Wie bereits erwähnt können TAp73 und p53 direkt die N-terminal verkürzten  $\Delta Np73$ -Isoformen induzieren, welche dann wiederum in der Lage sind, die transaktivierungsfähigen p53-Familienmitglieder zu reprimieren [Ramadan et al., 2005; Oswald und Stiewe, 2008]. Da  $\Delta Np73$  keine direkte Gentranskription induzieren kann, konkurriert es vielmehr mit TAp63, TAp73 und p53 um die Promotorbindung, wodurch deren Zielgenaktivierung inhibiert wird. Dadurch übernimmt  $\Delta Np73$  eine regulatorische Rolle, indem es als dominant-negativer Inhibitor der transaktivierenden p53-Familienmitglieder agiert und die Apoptoseinduktion verhindert [Grob et al., 2001; Stiewe et al., 2002a; Kartasheva et al., 2002; Melino et al., 2002; Oswald und Stiewe, 2008]. Die inhibitorische Funktion von  $\Delta Np73$  kann auch durch direkte Bindung an die p53-Familienmitglieder erfolgen, was in der Entstehung von transaktivierungsdefizienten heteromeren Komplexen (Abb. 7) resultiert [Stiewe et al., 2002b; Nakagawa et al., 2002; Kartasheva et al., 2002; Slade et al., 2004]. Eine Störung der tumorsuppressiven Regulationsmechanismen, wie es in Krebszellen oder viral infizierten Zellen vorkommt, hat eine massive oder perma-



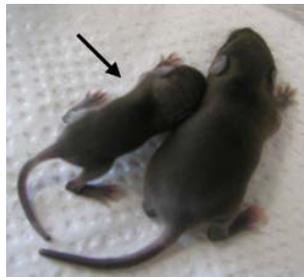
**Abb. 7: Der dominant-negative Effekt von  $\Delta Np73$  auf die p53-Familienmitglieder.**

(A) Konkurrenz von  $\Delta Np73$  mit p53, TAp63 und TAp73 um dieselbe p53-Promoterzielsequenz. (B) Formation von transkriptionell inaktiven TAp73- $\Delta p73$  Heterodimeren.

nente Expression von  $\Delta Np73$  zur Folge. Das wiederum führt zur Inhibition von p53 und TAp73 [Stiewe et al., 2002a; Allart et al., 2002], so dass schließlich die tumorsuppressive Funktion von p53 und TAp73 nicht mehr gewährleistet ist. All dies deutet daraufhin, dass  $\Delta Np73$  ein Onkogen ist. So kann  $\Delta Np73$  NIH3T3-Fibroblasten transformieren und kooperiert mit onkogenem Ras in der Transformation von primären MEFs [Stiewe et al., 2002b; Petrenko et al., 2003; Oswald und Stiewe, 2008]. Darüber hinaus reprimiert  $\Delta Np73$  den RB-E2F Komplex, indem es die inaktivierende Phosphorylierung von pRB induziert und so das Zellwachstum begünstigt [Stiewe et al., 2003]. Außerdem führt die transgene Expression von  $\Delta Np73$  unter dem leberspezifischen Albuminpromotor in Mäusen zu einer erhöhten Hepatozytenproliferation und einem frühen Auftreten von hepatozellulären Adenomen mit einer Progression zum Karzinom [Tannapfel et al., 2008; Oswald und Stiewe, 2008]. Alles in allem entscheidet eine exakte Balance zwischen proapoptotischen (p53, TAp73) und antiapoptotischen ( $\Delta Np73$ ) Proteinen über das tumorigene Potential einer Zelle.

### 1.4.3 p73 in Differenzierung und Entwicklung

p73 Knockout-Mäuse (Abb. 8) sind, im Gegensatz zu p63-null Mäusen, postnatal lebensfähig. Aufgrund multipler Defekte erreichen aber nur wenige Tiere das adulte Stadium. Die Defekte zeichnen sich aus durch einen kongenitalen Hydrozephalus aufgrund einer Atrophie des umliegenden Hirngewebes, eine Fehlbildung des Hippokampus durch das Fehlen der bipolaren und  $\Delta$ Np73-positiven Cajal-Retzius Neuronen und durch eine defekte sensorische Pheromondetektion aufgrund eines fehlerhaften Vomeronasalorgans. Letzteres führt zu einem Desinteresse an Sexualpartnern und somit zu einer Art „Infertilität“ [Yang et al., 2000]. Überraschend ist, dass  $\Delta$ Np73 die überwiegende Isoform im entstehenden Mausgehirn ist. Studien an p73-null Tieren haben gezeigt, dass  $\Delta$ Np73 eine essentielle, antiapoptotische Funktion *in vivo* zukommt. Es wird zur Inhibition der p53-vermittelten Apoptose von Neuronen im sich normal entwickelnden Gehirn benötigt. Damit ließe sich der erhöhte neuronale Zelltod in p73-null Mäusen erklären [Pozniak et al., 2000; Yang et al., 2000]. Neben den neurologischen Mängeln weisen die p73-null Tiere chronische Infektionen und Entzündungen auf, die durch massive Neutrophileninfiltrationen charakterisiert sind. Die Ursache der massiv auftretenden Entzündungen ist noch nicht eindeutig geklärt, da es keine auffälligen Defekte im lymphoiden und granulozytären System gibt [Yang et al., 2000].



**Abb. 8: Phänotyp eines p73-null Neugeborenen.**

Verpaarungen zwischen p73 heterozygoten Mäusen resultieren in normal entwickelten wildtypischen und heterozygoten Nachkommen, sowie p73 Knockout-Tieren ( $\rightarrow$ ) mit einer deutlichen Reduktion von Größe und Gewicht.

In Zellkultur konnte gezeigt werden, dass p73 in zelluläre Differenzierungsprozesse involviert ist. Während der Vitamin A-vermittelten, neuronalen Differenzierung von Neuroblastomzellen akkumuliert p73, während die p53-Spiegel unverändert bleiben. Die exogene Überexpression von p73 in undifferenzierten Neuroblastomen resultiert in der Ausbildung von Neuriten, sowie der Expression von Differenzierungsmarkern [Laurenzi et al., 2000a]. Des Weiteren induziert exogenes TAp73 die Differenzierung von Oligodentroytenvorläuferzellen (OPC), was durch  $\Delta$ Np73 inhibiert wird [Billon et al., 2004]. Weitere Untersuchungen zeigen, dass  $\Delta$ Np73 die „nerve growth factor“ (NGF) vermittelte neuronale Differenzierung durch Transrepression des NGF-Rezeptors TrkA negativ reguliert. Hierfür rekrutiert  $\Delta$ Np73 die Histondeazetylasen HDAC1 und HDAC2 an den TrkA-Promotor [Zhang und Chen, 2007]. Ein weiterer Hinweis dafür, dass  $\Delta$ Np73 ein entscheidender Faktor in Entwicklungsprozessen ist, zeigt die reziproke Expression und Funktion von TAp73 und  $\Delta$ Np73 während der Nephrogenese. So wird  $\Delta$ Np73 bevorzugt in proliferierenden Nephron-Vorläuferzellen exprimiert, während TAp73 vorrangig in der Differenzierungszone des Nierenkortex zu finden ist [Saifudeen et al., 2005]. Bekannt ist auch, dass die p73-Genexpression während der Muskeldifferenzierung hochreguliert ist [Fontemaggi et al., 2001]. p73 ist ein transkriptionelles Zielgen der muskelregulatorischen Faktoren MyoD, Myogenin, Myf5 und Myf6 *in vivo* [Fontemaggi et al., 2005]. Darüber hinaus ist die p73-Expression in der Differenzierung myeloider Progenitorzellen deutlich erhöht. In Leukämiepatienten ist in den leukämischen Blasten hingegen vermehrt  $\Delta$ Np73 exprimiert [Tschan et al., 2000]. Ebenso ist p73, ähnlich wie p63, bei der terminalen Differenzierung humaner Keratinozyten involviert [Laurenzi et al., 2000b].

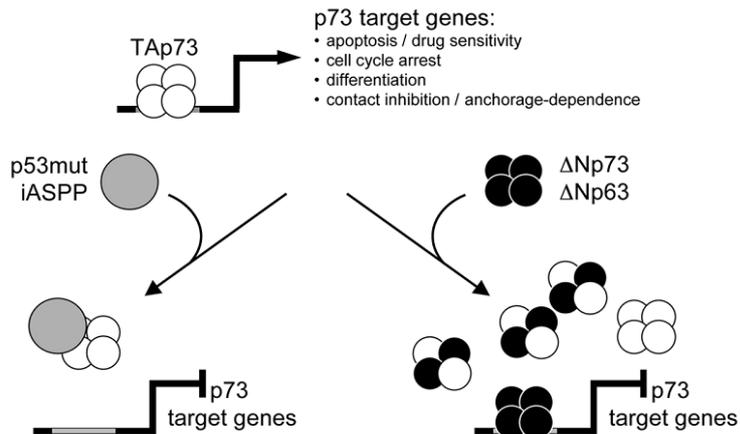
#### 1.4.4 p73 in der Tumorentstehung

Aufgrund der strukturellen Homologie zu p53 wurde vermutet, dass p73 eine analoge Rolle als Tumorsuppressor zukommt. Heterozygote p73-Mäuse entwickeln maligne Tumore, deren Spektrum aber gänzlich von dem der p53-null Mäuse differiert. Im

Vergleich zu Einzelknockout-Tieren, zeigen Tiere mit gleichzeitigen Verlusten in p73 und p53 einen viel aggressiveren, metastasierenden Tumorphänotyp [Flores et al., 2005]. TAp73-defiziente Mäuse hingegen entwickeln einen Phänotyp der zwischen dem von p73- und p53-null Tieren anzusiedeln ist. Die Tiere zeigen ein vermehrtes Auftreten spontaner und karzinogeninduzierter Tumore, Infertilität, Alterung aber auch Fehlbildungen des Hippokampus. Zellen von TAp73-null Mäusen weisen eine genomische Instabilität auf, assoziiert mit erhöhter Aneuploidie, die möglicherweise zu der spontanen Tumorzinzidenz beiträgt [Tomasini et al., 2008]. Anhand der murinen Tumorstudien kommt p73 als Tumorsuppressor in Frage. Jedoch ist p73 nicht mit der „Zwei-Treffer-Hypothese“ von Knudson vereinbar, da intensive Untersuchungen nur selten Mutationen (<1%) in Zelllinien und Primärtumoren offenbarten [Hagiwara et al., 1999; Sunahara et al., 1999; Melino et al., 2002].

Interessanterweise und im Gegensatz zu jeder Vermutung sind p73-mRNA und Proteinspiegel im neoplastischen Gewebe höher als im umliegenden gesunden Gewebe [Kaghad et al., 1997; Kovalev et al., 1998; Mai et al., 1998; Sunahara et al., 1998; Yokomizo et al., 1999; Zaika et al., 1999; Irwin und Kaelin, 2001]. Beispiele hierfür sind Ependymome, Brust-, Lungen-, Prostata-, Ovar-, Kolorektal-, Ösophagus- und Blutkrebs [Kovalev et al., 1998; Mai et al., 1998; Zaika et al., 1999]. Patienten mit einer hohen p73-Proteinexpression haben eine schlechtere Überlebensprognose als Patienten mit fast nicht detektierbaren p73 [Tannapfel et al., 1999; Sun, 2002]. Einen Zusammenhang zwischen p73-Expression und Lymphknoten- bzw. Gefäßinvasion konnte in Brusttumoren nachgewiesen werden [Dominguez et al., 2001; Vikhanskaya et al., 2001a]. Darüber hinaus korreliert die Überexpression mit einer erhöhten Resistenz gegenüber DNA-schädigenden Substanzen [Vikhanskaya et al., 2001b].

Eine  $\Delta$ Np73-Hochregulierung hingegen ist spezifisch für Ovar-, Brust-, Lungen-, Magen- und Schilddrüsenkrebs, sowie Leberkarzinome und Neuroblastome [Casciano et al., 2002; Zaika et al., 2002; Frasca et al., 2003; Concin et al., 2004; Stiewe et al., 2004; Uramoto et al., 2004]. Tatsächlich hat eine  $\Delta$ Np73-Überexpression eine klinische Relevanz. So ist  $\Delta$ Np73 ein unabhängiger prognostischer Marker für eine



**Abb. 9: TAp73-Inaktivierung in Krebszellen.**

TAp73 aktiviert eine Reihe von Genen, die durch Kooperation die Tumorbildung verhindern. In Tumoren ist TAp73 meistens inaktiv durch die Komplexbildung mit onkogenen Proteinen der p53 Familie (mutiertes p53,  $\Delta Np73$ ,  $\Delta Np63$ ) oder anderen Inhibitoren (iASPP) [Oswald und Stiewe, 2008].

reduzierte Überlebensrate und eine erhöhte Progression in Lungenkarzinomen und Neuroblastomen [Casciano et al., 2002; Uramoto et al., 2004]. Viele Arbeiten zum p73-Status in verschiedenen Tumorarten stimmen darin überein, dass p73 seine Tumorsuppressoraktivität trotz Überexpression verloren hat. Dies beruht im Wesentlichen auf einer Komplexbildung von TAp73 mit  $\Delta Np73$ , oder anderen inhibitorische p53-Familienmitgliedern (mutp53,  $\Delta Np63$ ), sowie mit dem Protein iASPP [Oswald und Stiewe, 2008] (Abb. 9). Im Gegensatz zum meist irreversibel mutierten p53, ist TAp73 in Tumorzellen so in einer latenten Wildtypform präsent. Die Zerstörung der inhibitorischen Interaktionen könnte daher ein vielversprechendes Mittel bei der Therapie von Tumoren sein. Erste Hinweise lieferten Studien, die zeigten, dass mit antisense-Oligonukleotiden gegen  $\Delta Np73$  oder mit Peptiden, die die TAp73-iASPP Interaktion zerstören, Apoptose in Tumorzellen induziert werden konnte [Simões-Wüst et al., 2005; Bell und Ryan, 2007; Bell et al., 2007]. Auf ähnliche Weise konnte in HNSCC Zellen eine TAp73-gesteuerte Apoptose durch die RNAi-vermittelte Depletion von  $\Delta Np63$  ausgelöst werden [Rocco und Ellisen, 2006; DeYoung et al., 2006; Rocco et al., 2006]. Die Tatsache, dass die p73-Expression in Tumoren nicht ausgeschaltet, sondern eher in Form von transaktivierungsdefekten Komplexen hoch-

reguliert ist, lässt vermuten, dass transaktivierungsdefekte p73-Komplexe das Tumorstadium besser fördern als ein komplettes Fehlen von p73 [Oswald und Stiewe, 2008]. So kann p73 die Zellproliferation durch die Kooperation mit Protoonkogenen wie c-Jun unterstützen [Vikhanskaya et al., 2007]. Therapeutische Applikationen, die entweder das TAp73/ $\Delta$ Np73-Verhältnis und/oder die inhibitorischen Interaktionen modulieren oder auf eine Destabilisierung von p73 zielen, könnten in der Krebstherapie hilfreich sein [Oswald und Stiewe, 2008].

Zusammenfassend kann man sagen, dass p73 eine sehr komplexe Funktion in der Tumorigenese besitzt: Es hat zum einen tumorsuppressive (TAp73) und zum anderen auch onkogene ( $\Delta$ Np73) Aktivität. Das onkogene Potential von  $\Delta$ Np73 resultiert aus der Aktivierung von E2F und der Inhibition der transaktivierenden Proteine p53, TAp73 und TAp63 [Stiewe et al., 2003].

## 1.5 Zielsetzung

Während p53 in Tumoren primär durch Mutationen inaktiviert wird, ist p73 lediglich bei einigen hämatologischen Neoplasien direkt durch Gendeletionen oder Promotormethylierungen inaktiviert. In soliden Tumoren ist p73 paradoxerweise häufig überexprimiert. Allerdings betrifft die Überexpression dabei nicht nur die tumorsuppressive TAp73-Isoform, sondern ebenfalls die antagonistische, potentiell onkogene  $\Delta$ Np73-Isoform. Es ist bekannt, dass  $\Delta$ Np73 an TAp73 bindet und es in transaktivierungs-defekten Komplexen sequestriert. Es wurde daher vermutet, dass p73 ebenso wie p53 einen Funktionsverlust bei Tumorerkrankungen aufweist – auch wenn sich die Inaktivierungsmechanismen im Detail unterscheiden. In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob und wie ein Funktionsverlust von p73 die Tumorentstehung begünstigen kann. Um einen kompletten Funktionsverlust zu simulieren, wie er bei hämatologischen Neoplasien auftritt, wurden p73-knockout-Mäuse verwendet. Um die Wirkung einer  $\Delta$ Np73-Überexpression zu simulieren, wurden  $\Delta$ Np73-transgene Mäuse generiert und analysiert. Auf diese Weise konnte umfassend *in vitro* und *in vivo* die Bedeutung eines p73-Funktionsverlustes für die Tumorigenese untersucht werden.

Aus diesen Untersuchungen sind die folgenden vier Publikationen hervorgegangen, die im Weiteren detailliert beschrieben werden:

Hüttinger-Kirchhof N, Cam H, Griesmann H, Hofmann L, Beitzinger M, Stiewe T. **The p53 family inhibitor DeltaNp73 interferes with multiple developmental programs.** Cell Death Differ. 2006 Jan;13(1):174-7.

Cam H\*, Griesmann H\*, Beitzinger M, Hofmann L, Beinoraviciute-Kellner R, Sauer M, Hüttinger-Kirchhof N, Oswald C, Friedl P, Gattenlöhner S, Burek C, Rosenwald A, Stiewe T. **p53 family members in myogenic differentiation and rhabdomyosarcoma development.** Cancer Cell. 2006 Oct;10(4):281-93. (\* geteilte Erstautorenschaft)

---

Beitzinger M, Hofmann L, Oswald C, Beinoraviciute-Kellner R, Sauer M, Griesmann H, Bretz AC, Burek C, Rosenwald A, Stiewe T. **p73 poses a barrier to malignant transformation by limiting anchorage-independent growth.** EMBO J. 2008 Mar 5;27(5):792-803. Epub 2008 Jan 31.

Griesmann H<sup>\*</sup>, Schlereth K<sup>\*</sup>, Krause M, Samans B, Stiewe T. **p53 and p73 in suppression of Myc-driven lymphomagenesis.** Int J Cancer. 2008 Sep 2;124(2):502-506. (\* geteilte Erstautorenschaft)

---

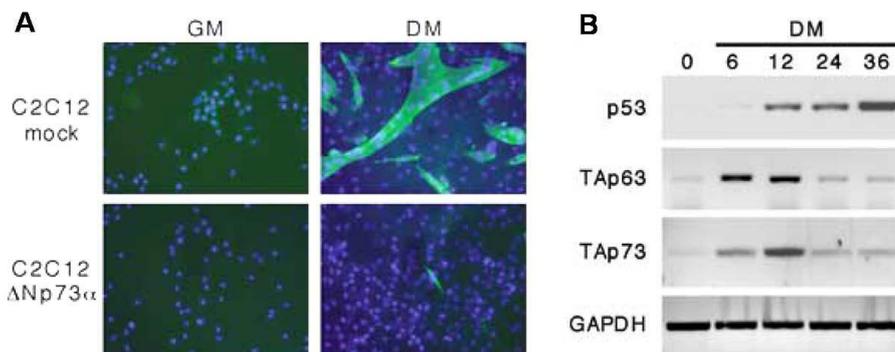
## 2 Der p53-Familieninhibitor $\Delta$ Np73 interferiert mit multiplen Entwicklungsprogrammen (Publikation 1)

### 2.1 Einleitung

Die Aktivität des Tumorsuppressors p53 geht in 50% aller Krebsarten durch Proteininaktivierung oder Genmutation verloren. Daher ist es nicht verwunderlich, dass p53-defiziente Tiere eine erhöhte spontane Tumorzinzidenz zeigten [Donehower et al., 1992]. Während p53-null Mäuse aber lebensfähig sind, kommt es in p53-depletierten *Xenopus laevis* Embryonen aufgrund von Gastrulationsfehlern zur Letalität [Sah et al., 1995; Cordenonsi et al., 2003]. Diese gegensätzlichen Entwicklungsphänotypen könnten vermutlich darauf beruhen, dass in *Xenopus*-Embryonen ausschließlich p53 vorhanden ist, während in Mausembryonen alle drei p53-Familienmitglieder exprimiert werden, wodurch das Fehlen von p53 möglicherweise durch p63 und p73 kompensiert wird. Das heißt, eine mögliche Redundanz der p53-Familienmitglieder könnte den in *Xenopus*-Embryonen beobachteten letalen Phänotyp in Mäusen verhindern. Im Gegensatz zu p53-null Mäusen, zeigen murine Knockouts von p63 und p73 enorme Entwicklungsdefekte, was für eine Relevanz beider Gene in der Entwicklung spricht [Yang et al., 1999; Mills et al., 1999; Yang et al., 2000]. Um eine Entwicklungsfunktion der p53-Familie in der Maus zu untersuchen, wäre das Ausschalten aller p53-Familienmitglieder notwendig. Dies kann idealerweise durch die Generierung von Tripel-Knockouts analysiert werden, was aber aufgrund der reduzierten Fertilität der Knockout-Mäuse sehr schwierig ist. Eine Alternative wäre die Inhibition aller drei p53-Familienmitglieder durch die Überexpression des dominant-negativen Inhibitors  $\Delta$ Np73. In dieser Arbeit wurde die Funktion der p53-Familie in der Entwicklung durch eine Überexpression von  $\Delta$ Np73 zuerst im Zellkulturmodell und anschließend im transgenen Tiermodell untersucht.

## 2.2 Ergebnisse und Diskussion

Zunächst wurde die Rolle der p53-Familie näher in einem Muskeldifferenzierungsmodell in Zellkultur untersucht. Hierzu wurden murine Myoblasten (C2C12) verwendet, welche nach Entzug von Wachstumsfaktoren differenzieren: Die Zellen arretieren und bilden nach Fusion mehrkernige Myotuben, die als typischen Muskelmarker die schwere Kette des Myosins (myosin heavy chain, MHC) exprimieren. Die Induktion der myogenen Differenzierung war mit einer erhöhten Expression der p53-Familienmitglieder assoziiert (Abb. 10). Die dabei beobachteten Veränderungen der TAp73-Expression sind mit der Repression von TAp73 durch den Repressor  $\delta$ EF1/ZEB in proliferierenden Myoblasten und die Aktivierung des TAp73-Promotors durch MyoD, Myogenin, Myf5 und Myf6 während der Differenzierung zu erklären [Fontemaggi et al., 2001].  $\Delta$ Np73 $\alpha$  exprimierende Myoblasten hingegen zeigten keine Differenzierung. Darüber hinaus interferierte  $\Delta$ Np73 $\alpha$  auch mit der „bone morphogenetic protein-2“ (BMP2) vermittelten Transdifferenzierung der Myoblasten in Osteoblasten, was durch eine fehlende Expression der alkalischen

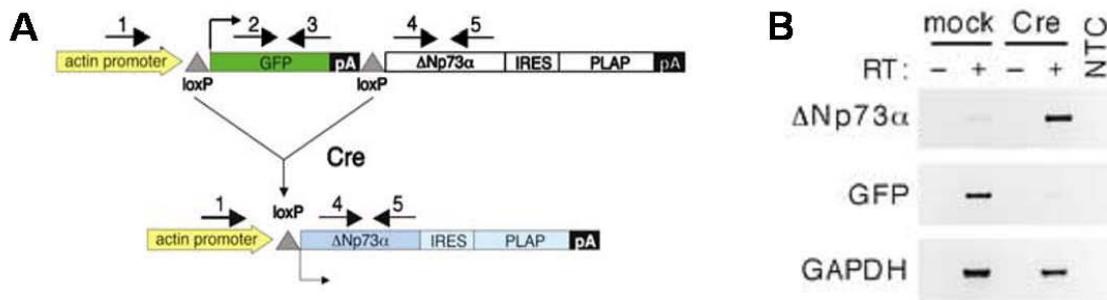


**Abb. 10:  $\Delta$ Np73 $\alpha$  inhibiert die myogene Differenzierung.**

(A) Immunfluoreszenz auf Differenzierung. Retroviral mit einem Leervektor (mock) oder dem pQCXIP- $\Delta$ Np73 $\alpha$  Plasmid transfizierte C2C12-Zellen wurden 5 Tage in Wachstums- (GM) oder Differenzierungsmedium (DM) kultiviert. Die Differenzierung in mehrkernige Myotuben wurde in der Immunfluoreszenz mit dem myosin heavy chain Antikörper (MF 20, Developmental Studies Hybridoma Bank) nachgewiesen (in grün). Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt. (B) Expressionsanalyse der p53-Mitglieder. Aus proliferierenden und differenzierenden C2C12-Zellen wurde zu den angegebenen Zeitpunkten (h) die RNA isoliert und mit semiquantitativer RT-PCR die Expression von p53, TAp63 und TAp73 analysiert. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Phosphatase (ALP) und des Osteocalcins nachgewiesen wurde. Auch die all-trans Retinsäure (ATRA) induzierte Differenzierung von Neuroblastomzellen wurde von  $\Delta\text{Np73}\alpha$  inhibiert, was sich in der fehlenden Expression des Neurofilaments widerspiegelt.  $\Delta\text{Np73}\alpha$  ist somit ein effizienter Repressor der Muskel-, Osteoblasten- und neuronalen Differenzierung in verschiedenen Zellkulturmodellen.

Für die Analyse des Inhibitionseffektes von  $\Delta\text{Np73}\alpha$  auf die p53-Familie *in vivo* wurde eine transgene Mauslinie generiert. Da keine Foundertiere unter dem ubiquitär aktiven HMG-CoA-Reduktasepromotor generiert werden konnten, wurde ein konditionelles  $\Delta\text{Np73}\alpha$ -Transgenkonstrukt kloniert (Abb. 11A). Dazu wurde eine von loxP-Sequenzen flankierte GFP-Stopkassette zwischen den  $\beta$ -Aktin Promotor und die  $\Delta\text{Np73}\alpha$ -cDNA integriert, die die Expression von  $\Delta\text{Np73}\alpha$  verhinderte.

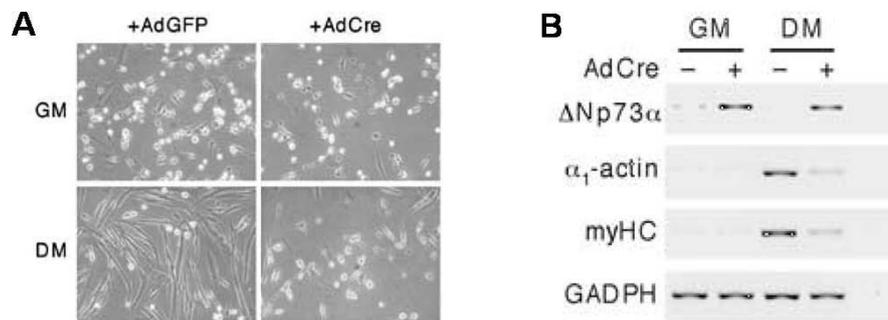


**Abb. 11: Konditionelle Mauslinie  $\Delta\text{Np73}\alpha^{lox}$ .**

(A) Diagramm des Transgenkonstruktes. Der ubiquitär aktive  $\beta$ -Aktin Promotor führt im nicht induzierten Zustand zur Expression der loxP-flankierten GFP-Stopkassette. Rekombination durch Cre entfernt die GFP-Expressions-kassette und platziert die  $\Delta\text{Np73}\alpha$ -cDNA unter die Kontrolle des  $\beta$ -Aktin Promotors. Die Bindungsstellen für die Primer sind gekennzeichnet ( $\rightarrow$ ). PLAP, humane plazenta-ähnliche ALP; IRES, interne ribosomale Eintrittsstelle. (B) Expression von  $\Delta\text{Np73}\alpha$ . In isolierten Hautfibroblasten von  $\Delta\text{Np73}\alpha^{lox}$ -Mäusen wurde die Rekombination mit adenoviralem Cre induziert und die GFP- (Primer 2/3) oder  $\Delta\text{Np73}\alpha$ - (Primer 4/5) Expression mit semiquantitativer RT-PCR auf RNA Ebene nachgewiesen. Kontrollen ohne reverse Transkriptase (-RT) sind dargestellt.

Das Entfernen dieser GFP-Stopkassette durch Cre-Rekombinase führte zu einer effektiven  $\Delta\text{Np73}\alpha$ -Expression und zur Aktivierung seiner transdominant-negativen Funktion auf die p53-Familienmitglieder *in vitro*. Unter Verwendung dieses konditionellen Konstruktes wurde durch Pronukleus-Injektion die transgene Mauslinie

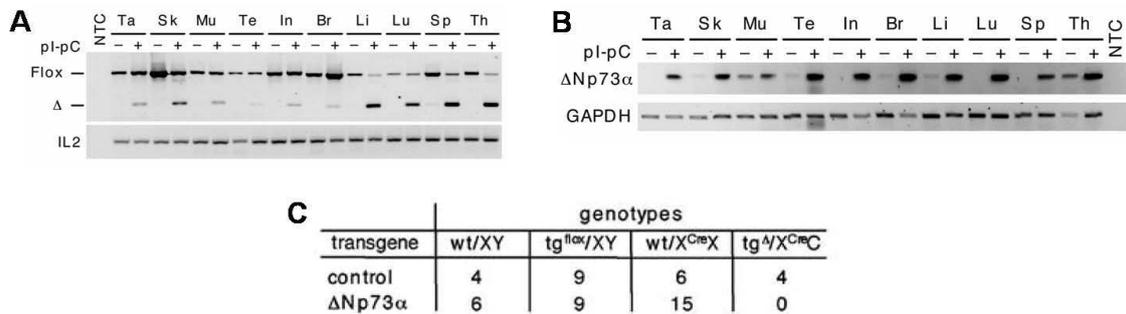
$\Delta\text{Np73}\alpha^{flox}$  generiert. Isolierte Hautfibroblasten aus  $\Delta\text{Np73}\alpha^{flox}$ -Mäusen zeigten nach adenoviraler Cre-Expression einen Verlust der GFP-Expressionskassette, sowie eine Verschiebung der Expression von GFP zu  $\Delta\text{Np73}\alpha$  (Abb. 11B). Isolierte Myoblasten aus diesen transgenen Tieren reflektierten nach  $\Delta\text{Np73}\alpha$ -Induktion durch Cre den bereits beschriebenen Muskeldifferenzierungsdefekt. Zellen mit dem inaktiven Transgenkonstrukt hingegen differenzierten innerhalb von 30 h unter der Expression typischer Muskelmarkergene wie  $\alpha$ 1-Aktin und MHC (Abb. 12).



**Abb. 12: Muskeldifferenzierung in  $\Delta\text{Np73}\alpha^{flox}$ -transgenen Tieren.**

(A) Phasenkontrastaufnahme isolierter Myoblasten aus  $\Delta\text{Np73}\alpha^{flox}$ -Tieren. Die Myoblasten wurden mit adenoviralem Cre oder GFP infiziert und entweder in Wachstums- (GM) oder Differenzierungsmedium (DM) kultiviert. (B) Expressionsanalyse von Myoblasten aus  $\Delta\text{Np73}\alpha^{flox}$ -Tieren. Aus proliferierenden und differenzierenden Myoblasten, mit oder ohne adenoviralem Cre, wurde RNA isoliert und mit semiquantitativer RT-PCR die Expression von  $\Delta\text{Np73}\alpha$ ,  $\alpha$ 1-Aktin und MHC analysiert. GAPDH diente als Kontroll-Gen.

Um das Transgen *in vivo* zu aktivieren, wurden  $\Delta\text{Np73}\alpha^{flox}$ -Mäuse mit Mx1-Cre Tieren verpaart, die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des interferonabhängigen Mx1-Promotors exprimieren [Kühn et al., 1995]. Die transiente Aktivierung des Mx1-Promotors erfolgte durch die intraperitoneale Injektion von pI-pC (polyinosinic-polycytidylic acid) in  $\Delta\text{Np73}\alpha^{flox}$ /Mx1-Cre doppelt-transgene Mäuse. Die anschließende Induktion von Cre führte in den meisten Geweben zum Verlust der GFP-Stopkassette, mit einer Rekombinationseffizienz von bis zu 80% in der Leber (Abb. 13 A) und einer effizienten Induktion der  $\Delta\text{Np73}\alpha$ -Expression (Abb. 13B). Für die Induktion von  $\Delta\text{Np73}\alpha$  während der Embryonalentwicklung wurden die  $\Delta\text{Np73}\alpha^{flox}$ -



**Abb. 13: Aktivierung des  $\Delta\text{Np73}\alpha^{\text{flox}}$ -Transgens *in vivo*.**

(A, B) Induktion der Cre-Expression in doppelt-transgenen  $\Delta\text{Np73}\alpha^{\text{flox}}$ /Mx1-Cre Jungtieren durch intraperitoneale Injektion von pI-pC. Die Rekombinationseffizienz (A) wurde auf DNA-Ebene (Primer 1/5), die  $\Delta\text{Np73}\alpha$ -Expression (B) auf RNA-Ebene (Primer 4/5) in verschiedenen Organen nachgewiesen. Ta, Schwanz; Sk, Haut; Mu, Muskel; Te, Testis; In, Intestinum; Br, Gehirn; Li, Leber; Lu, Lunge; Sp, Milz; Th, Thymus; NTC, PCR-Kontrolle. (C) Letalität von  $\Delta\text{Np73}\alpha$ -exprimierenden Embryonen. Verpaarung weiblicher  $\Delta\text{Np73}\alpha^{\text{flox}}$ -Mäuse mit männlichen CMV-Cre Tieren. Die DNA der Jungtiere wurde auf das  $\Delta\text{Np73}\alpha$ -Transgen (Primer 4/5), das Y-Chromosom (YMT) und IL2 als Kontrolle analysiert. Die Tabelle zeigt die Genotypen von 30 Jungtieren und eine Kontrollverpaarung von CMV-Cre mit einer gleichwertigen konditionalen Linie.

Mäuse mit CreDeleter-Tieren verpaart, die eine CMV-Promotor gesteuerte Cre-Expressionskassette auf dem X-Chromosom tragen und bei denen die Cre-Expression bereits vor der Implantation stattfindet [Schwenk et al., 1995]. Aufgrund der X-Chromosomalen Lokalisation ist die Cre-Transmission durch Männchen auf weibliche Nachkommen beschränkt. Die Verpaarung von weiblichen  $\Delta\text{Np73}\alpha^{\text{flox}}$ -Mäusen mit männlichen CreDeleter-Tieren resultierte in der Geburt von männlichen  $\Delta\text{Np73}\alpha^{\text{flox}}$ -transgenen Jungtieren im erwarteten Mendel'schen Verhältnis (Abb. 13C). Da diese Jungtiere kein Cre-Allel besaßen, enthielt das  $\Delta\text{Np73}\alpha$ -Transgen die flankierte GFP-Stopkassette. Im Gegensatz dazu konnten aus dieser Verpaarung keine weiblichen  $\Delta\text{Np73}\alpha$ /Cre doppelt-transgenen Jungtiere generiert werden, die  $\Delta\text{Np73}\alpha$  exprimierten (Abb. 13C). Eine konstitutive Überexpression des p53-Familieninhibitors  $\Delta\text{Np73}\alpha$  ist somit nicht mit einer normalen Embryogenese vereinbar. Im Gegensatz zu den homozygoten Knockouts der einzelnen p53-Familienmitglieder ist der Entwicklungsphänotyp der  $\Delta\text{Np73}\alpha$ -transgenen Tiere viel gravierender und lässt eine Kooperation innerhalb der p53-Familie in der Koordination der Embryonalentwicklung vermuten. Da  $\Delta\text{Np73}\alpha$  als Inhibitor der gesamten p53-Familie wirkt, gibt der

---

Phänotyp der  $\Delta Np73\alpha$ -transgenen Mäuse einen Hinweis auf den möglichen Phänotyp von Tripel-Knockout Mäusen der p53-Familiemitglieder.

### 3 Die Rolle der p53-Familie in der Muskeldifferenzierung und Rhabdomyosarkomentwicklung (Publikation 2)

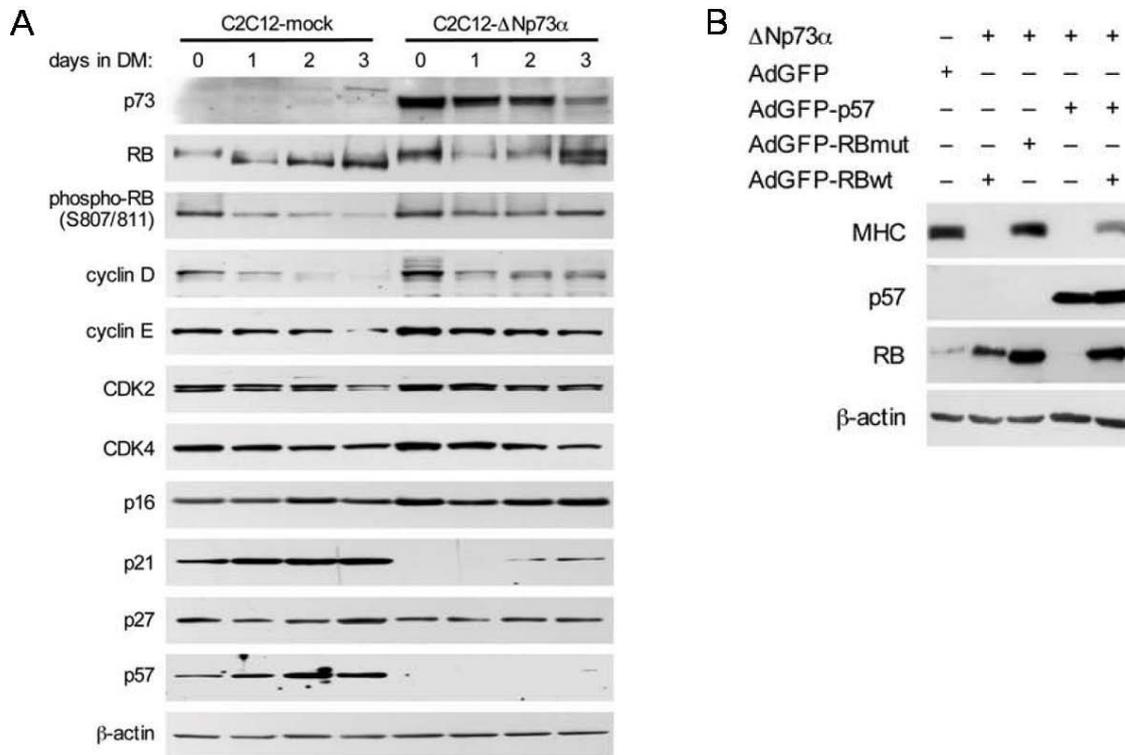
#### 3.1 Einleitung

Dass p53 neben seiner Tumorsuppressorfunktion auch eine mögliche Rolle in der Differenzierung und Entwicklung zukommen könnte, wird durch mehrere *in vitro* und *in vivo* Experimente unterstützt, die gezeigt haben, dass in undifferenzierten Zellen die Überexpression von Wildtyp-p53 eine Differenzierung induziert [Almog und Rotter, 1997]. Die Defekte der p63 und p73 Knockout-Mäuse zeigen, dass beide eine essentielle Rolle in der Entwicklung spielen. Die gleichzeitige Inhibition der p53-Familienmitglieder durch die deregulierte Expression von  $\Delta Np73$ , ein transdominanter Inhibitor aller p53-Mitglieder, induziert embryonale Letalität indem es mit multiplen Entwicklungsprogrammen interferiert [Hüttinger-Kirchhof et al., 2006; Erster et al., 2006]. Dieser Phänotyp, der viel schwerwiegender ist als der von homozygoten Knockouts der einzelnen p53-Familienmitglieder, lässt eine überlappende Funktion der p53-Mitglieder vermuten. Um die mechanistische Grundlage der Inhibition durch  $\Delta Np73$  zu verstehen, wurde dessen Wirkung auf die myogene Differenzierung in der folgenden Publikation detaillierter untersucht.

#### 3.2 Ergebnisse und Diskussion

Um die mechanistischen Grundlagen des inhibitorischen Effektes von  $\Delta Np73\alpha$  in der Myoblastendifferenzierung zu untersuchen, dienten C2C12-Zellen als Modell für die skeletale Muskeldifferenzierung *in vitro* sind [Blau et al., 1985]. Wie bereits in Hüttinger-Kirchhof *et.al* gezeigt, führt der Entzug von Mitogenen in Kontrollzellen zu den bekannten Differenzierungsmerkmalen.  $\Delta Np73\alpha$ -exprimierende Myoblasten hingegen reagierten zwar mit einer reduzierten Proliferationsrate, zeigten aber kei-

nen permanenten Zellzyklusarrest und setzen sich über Differenzierungssignale aus der extrazellulären Matrix hinweg. Das myogene Differenzierungsprogramm wird durch ein begrenztes Set von Transkriptionsfaktoren initiiert, das progressiv ein komplexes Genexpressionsprogramm entfaltet [Bergstrom et al., 2002; Delgado et al., 2003]. Da  $\Delta Np73\alpha$  ein Protein mit sequenzspezifischen DNA-Bindungseigenschaften ist, lag es nahe, dass es mit der Expression einzelner Gene während der Differenzierung interferieren könnte [Grob et al., 2001; Kartasheva et al., 2002; Stiewe et al., 2002a]. Die Analyse von genomweiten Genexpressionsprofilen während des Differenzierungsprozesses zeigte, dass zahlreiche Zellproliferationsgene (z.B. *Rfc3*, *Ccna2*, *Pole*, *Pold1*, *Mcm2*) in Anwesenheit von  $\Delta Np73\alpha$  nicht in physiologischer Weise differenzierungsabhängig reprimiert wurden. In den Kontrollzellen hingegen wurden Zellproliferationsgene reprimiert und muskelspezifische Gene induziert. Der Differenzierungsblock erfolgte in  $\Delta Np73\alpha$ -Myoblasten nach der Myogeninexpression, gekennzeichnet durch die fehlende Expression von Myogenin-Zielgenen (z.B. *MEF2C*, *MHC*, *CKM*). Da auch in RB-/- Fibroblasten die Myogenin-Aktivität gestört ist [Novitch et al., 1996] und das Differenzierungsprogramm ebenfalls nach der Myogeninexpression stoppt, wurde vermutet, dass  $\Delta Np73\alpha$  die pRB-Funktion beeinträchtigt, was der Grund für den Differenzierungsblock sein könnte. Im Zuge der Differenzierung von Wildtyp-Myoblasten war eine Erhöhung der pRB-Protein- und mRNA-Expression sowie eine Dephosphorylierung vom inaktiven (hyperphosphorylierten) zum aktiven (hypophosphorylierten) pRB zu erkennen. In  $\Delta Np73\alpha$ -Myoblasten hingegen waren über den gesamten Versuchszeitraum konstant hohe Spiegel von hyperphosphorylierten und somit inaktiven pRB zu beobachten. Der Phosphorylierungszustand von pRB wird durch zyklinabhängige Kinasen (CDKs) reguliert, die wiederum durch Zykline und CDK-Inhibitoren aktiviert bzw. reprimiert werden. Während in differenzierenden Kontrollmyoblasten die CDK-Kinaseaktivität durch die Repression von Zyklinen und Induktion von CDK-Inhibitoren reduziert wurde, zeigten  $\Delta Np73\alpha$ -Zellen eine kontinuierlich hohe CDK-Aktivität aufgrund einer fehlenden Induktion der CDK-Inhibitoren p57 und p21 (Abb. 14A).



**Abb. 14:  $\Delta$ Np73 $\alpha$  interferiert mit der pRB-Aktivierung in Myoblasten.**

(A) Western Blot von Kontroll (mock) und  $\Delta$ Np73 $\alpha$ -Myoblasten. Die Zellen wurden nach Zugabe von Differenzierungsmedium (DM) zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. (B) Rekonstitution der pRB-Aktivität. Western Blot von C2C12- $\Delta$ Np73 $\alpha$  Zellen nach der Infektion mit den aufgeführten Adenoviren und Kultivierung in DM für 2 Tage. Die Expression von MHC diente als Marker für Differenzierung.

Dies erklärt, dass  $\Delta$ Np73 $\alpha$ -Myoblasten den Zellzyklusarrest und die damit verbundene muskelspezifische Genexpression durch das Fehlen von aktivem pRB nicht induzieren können. Durch die Expression einer konstitutiv-aktiven pRB-Mutante oder der Kombination von Wildtyp-pRB mit p57 konnte jedoch die  $\Delta$ Np73 $\alpha$ -vermittelte Differenzierungsblockade aufgehoben werden, was den pRB-Aktivierungsdefekt als Ursache für den Differenzierungsblock in  $\Delta$ Np73 $\alpha$ -Myoblasten belegt (Abb. 14B). Zusammenfassend übernehmen die einzelnen p53-Familienmitglieder eine wichtige Rolle in der Muskeldifferenzierung: p53 transaktiviert RB, während p63/p73 die Expression von p57 kontrollieren, das für die Aufrechterhaltung von aktivem (dephosphoryliertem) pRB in der Zelle wichtig ist (Abb. 15).

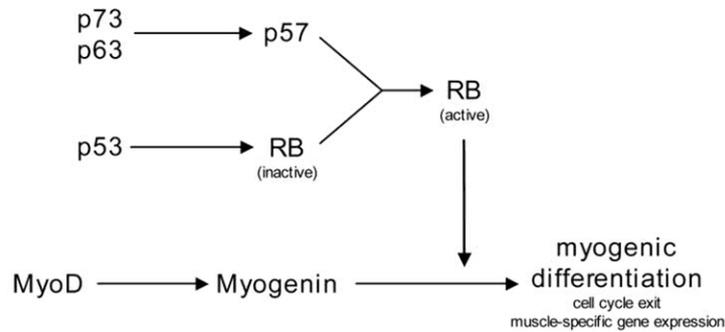


Abb. 15: Die Rolle der p53-Familienmitglieder während der Muskeldifferenzierung.

Ein muskulärer Differenzierungsdefekt ist ein charakteristisches Merkmal von Rhabdomyosarkomen (RMS), den häufigsten Weichteilsarkome bei Kindern. Für p53 wurde bereits eine Rolle in RMS vermutet, denn ein Jahr alte p53<sup>+/-</sup> Mäuse entwickeln zu 19% RMS [Choi und Donehower, 1999]. Auch Patienten mit dem Li-Fraumeni Syndrom entwickeln RMS [Li und Fraumeni, 1969]. Die Analyse der p73-Expression in humanen RMS-Proben (Abb. 16A) ergab in den meisten (>85%) Tumورproben erhöhte TAp73-Expressionsspiegel, die mit einer Überexpression von  $\Delta$ Np73 assozi-

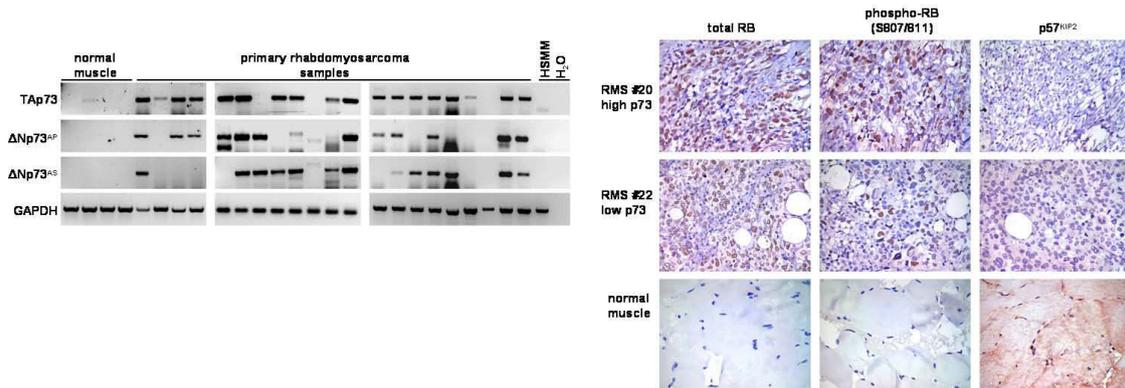
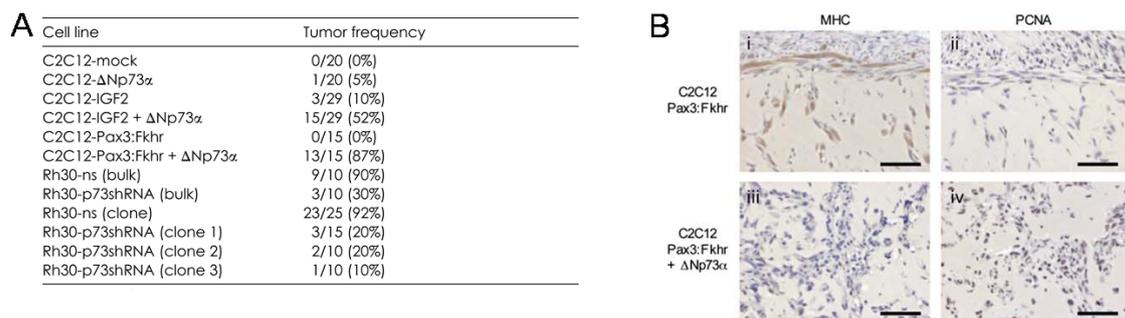


Abb. 16:  $\Delta$ Np73 $\alpha$  in der Rhabdomyosarkomentwicklung.

(A) Expressionsanalyse von TAp73- und  $\Delta$ Np73-Isoformen. Mittels semiquantitativer RT-PCR wurde die Expression von TAp73- und  $\Delta$ Np73-Isoformen, generiert durch alternatives Spleißen von Exon 2 ( $\Delta$ N<sup>AS</sup>) oder den alternativen Promotor ( $\Delta$ N<sup>AP</sup>), in normalem Muskel und RMS-Gewebe untersucht. Humane skeletale Muskelmyoblasten (HSM) dienten zur Kontrolle. (B) Immunhistochemie humaner RMS. Die RMS-Proben 20 und 22 aus (A) und normales Muskelgewebe wurden auf Gesamt-pRB, phosphoryliertes pRB (Serin 807/811) und p57 analysiert. Maßstab, 50  $\mu$ m.

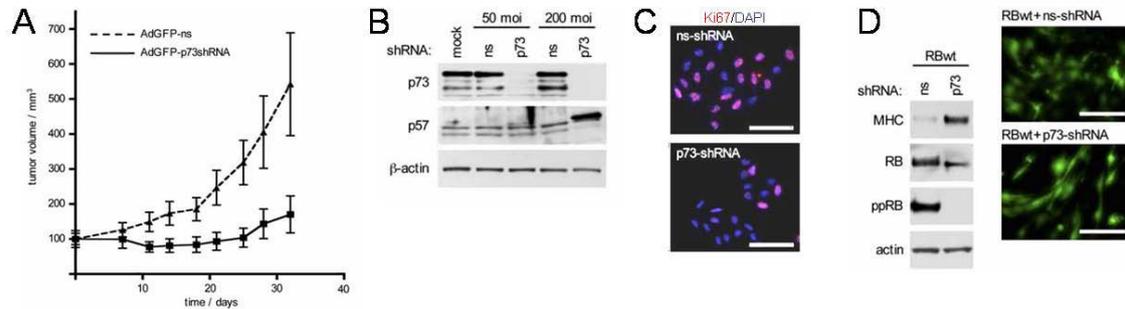
iert waren. Es ist daher davon auszugehen, dass in RMS-Tumoren große Mengen von transkriptionell-inaktivem p73 vorliegen, die die Funktion der gesamten p53-Familie blockieren. Eine zusätzliche Immunhistologie zeigte, im Gegensatz zum normalen Muskel, eine Korrelation von kaum detektierbarem p57 mit hohen Spiegeln von hyperphosphoryliertem/inaktivem pRB in RMS-Tumoren mit hoher p73-Expression (Abb. 16B). Darüber hinaus war bekannt, dass die Onkogene IGF2 und Pax3-Fkhr in RMS exprimiert sind [Merlino und Helman, 1999] und dass konditionale Pax3-Fkhr Knockin-Mäuse häufig RMS auf einem p53-heterozygoten oder p53-defizienten Hintergrund entwickeln, aber nur selten in p53-Wildtyp-Mäusen [Keller et al., 2004]. Folglich wurde die Kooperation von  $\Delta Np73\alpha$  mit diesen RMS-Onkogenen untersucht. Während Myoblasten mit einzelnen Onkogenen keine Tumore in Nacktmäusen induzierten, waren Zellen mit den Kombinationen Pax3-Fkhr+ $\Delta Np73\alpha$  und IGF2+ $\Delta Np73\alpha$  tumorigen (Abb. 17A). Um zu untersuchen, warum die Onkogene nur in Kombination mit  $\Delta Np73\alpha$  Tumore bilden, wurden die Zellen mit Matrigel-Matrix gemischt und subkutan in Mäuse injiziert, wo das Matrigel polymerisiert und ein festes Gel bildet. Die Analyse des Gels mit Pax3-Fkhr-



**Abb. 17:  $\Delta Np73\alpha$  kooperiert mit Pax3-Fkhr und IGF2 in der malignen Transformation von Myoblasten.**

(A) p73 moduliert die Tumorigenität myogener Zelllinien. Zellen mit den aufgeführten Genotypen wurden subkutan in Nacktmäuse injiziert und die Tumorentstehung über 3 Monate beobachtet. Gezeigt ist die Zahl der Mäuse mit Tumor, die Zahl der injizierten Mäuse und der prozentuale Anteil der Tiere mit einem Tumor. (B) Immunhistologie von Matrigelplugs auf Differenzierung und Proliferation. Pax3-Fkhr (Bi und Bii) und Pax3-Fkhr+ $\Delta Np73\alpha$  (Biii und Biv) Myoblasten, gemischt mit Matrigel Matrix HC, wurden subkutan in Nacktmäuse injiziert. Nach einer Woche wurde der Matrigelplug isoliert und auf MHC und PCNA immunhistologisch analysiert. Maßstab, 100 $\mu$ m.

exprimierenden Myoblasten zeigte fusionierte, mehrkernige Myotuben, die positiv für den Differenzierungsmarker MHC waren. Das Gel mit Pax3-Fkhr- und  $\Delta$ Np73 $\alpha$ -exprimierenden Myoblasten hingegen wies Regionen mit aktiver Proliferation auf, aber keine fusionierten und MHC-positiven Zellen (Abb. 17B). Die injizierten Myoblasten arretierten und differenzierten unabhängig von Pax3-Fkhr.  $\Delta$ Np73 $\alpha$  dagegen interferierte mit dem Zellzyklusarrest und der Differenzierung, was die onkogene Aktivität von Pax3-Fkhr förderte und das Tumorwachstum ermöglichte. Ob die hohe p73-Expression in humanen RMS-Proben zum Differenzierungsdefekt und Tumorphänotyp beiträgt, wurde in Rh30-Zellen mit p73-gerichteten shRNAs untersucht. Die Depletion von p73 reduzierte die Tumorigenität von injizierten Rh30-Zellen in Nacktmäusen. Auch in bereits existierenden RMS-Tumoren (Rh30-Xenotransplantate) führte die intratumorale Injektion eines rekombinanten p73sh-RNA-Adenoviruses zu einer deutlichen Reduktion des Tumorwachstums (Abb. 18A). Der Effekt dieser Wachstumsinhibition nach Depletion von p73 korrelierte mit der Aktivierung von p57 und einem damit verbundenen Zellzyklusarrest (Abb. 18B, C). Während die Aktivierung von p57 aber nicht ausreichend war, um Differenzierung zu induzieren, konnte die Koexpression von p57 und pRB in Rh30-Zellen hohe Spiegel von aktivem pRB wiederherstellen und schließlich die Differenzierung einleiten. Auch die Expression von Wildtyp-pRB in p73-depletierten Rh30-Zellen führte zu morphologischen und biochemischen Zeichen der Differenzierung (Abb. 18D). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die p53-Familienmitglieder in die Regulation der Muskeldifferenzierung involviert sind. Während die frühen Schritte der Differenzierung ohne die p53-Familie ablaufen können, benötigen die späten Schritte aktives pRB, um einen permanenten Zellzyklusarrest und die muskelspezifische Gentranskription zu aktivieren. Die Aktivierung von pRB ist dabei von der p53-Familie abhängig. Die Funktionen der einzelnen p53-Familienmitglieder hierbei sind verschieden, aber komplementär. Während p53 notwendig ist, um die Transkription des *Rb*-Gens zu induzieren, kontrollieren p63 und p73 die Expression von p57, das pRB in einem aktiven, hypophosphorylierten Zustand hält. Der Verlust der



**Abb. 18: p73 fungiert als Onkogen in Rhabdomyosarkomen.**

(A) p73-Depletion in bestehenden RMS. Rh30-Zellen wurden subkutan in Nacktmäuse injiziert. Nach 4 Wochen wurden  $5 \times 10^7$  PFU eines rekombinanten Adenovirus mit einer Kontroll-shRNA (AdGFP-ns) oder mit einer p73-shRNA (AdGFP-p73shRNA) in  $100 \text{ mm}^3$  große Tumore injiziert. Dargestellt sind die Tumolvolumina und die Standardabweichung (zweifaktorielle Varianzanalyse ANOVA,  $p < 0.002$ ). (B, C) p73-Depletion induziert p57 und Zellzyklusarrest. Rh30-Zellen wurden für 2 Tage mit einer geringen (50 moi) oder hohen (200 moi) Dosis von AdGFP-ns oder AdGFP-p73shRNA infiziert. (B) zeigt den Immunoblot auf p73, p57 und  $\beta$ -Aktin. (C) veranschaulicht die Immunfluoreszenz auf den Proliferationsmarker Ki67. Maßstab,  $100 \mu\text{m}$ . (D) Rekonstitution der Differenzierung. Rh30-Zellen wurden mit einer Kombination von AdGFP-RBwt und AdGFP-ns oder AdGFP-p73shRNA jeweils infiziert. Die Differenzierung wurde nach 3 Tagen in Differenzierungsmedium mittels Immunfluoreszenz und Western-Blot auf MHC, pRB und phospho-pRB (Serin 807/811) analysiert. Maßstab,  $100 \mu\text{m}$ .

p53-Familie durch die Überexpression von  $\Delta\text{Np73}$  oder mutiertes p53 blockiert die myogene Differenzierung und ermöglicht kooperierenden Onkogenen Myoblasten zur Tumorigenität zu transformieren. Die Induktion der zellulären Differenzierung trägt deshalb zur Tumorsuppressoraktivität der p53-Familie bei und bietet eine Erklärung für die p53-Signalwegalterationen in RMS.

Eine Korrektur der RMS-assoziierten Alterationen in den p53-regulierten Signalwegen der Differenzierung, könnte folglich eine mögliche Strategie für die Tumorthherapie sein. Da die Inhibition von  $\Delta\text{Np73}$  das Tumorstadium reduziert, könnte  $\Delta\text{Np73}$  hier ein attraktives Zielprotein darstellen.

---

## 4 p73 fungiert als Barriere der malignen Transformation (Publikation 3)

### 4.1 Einleitung

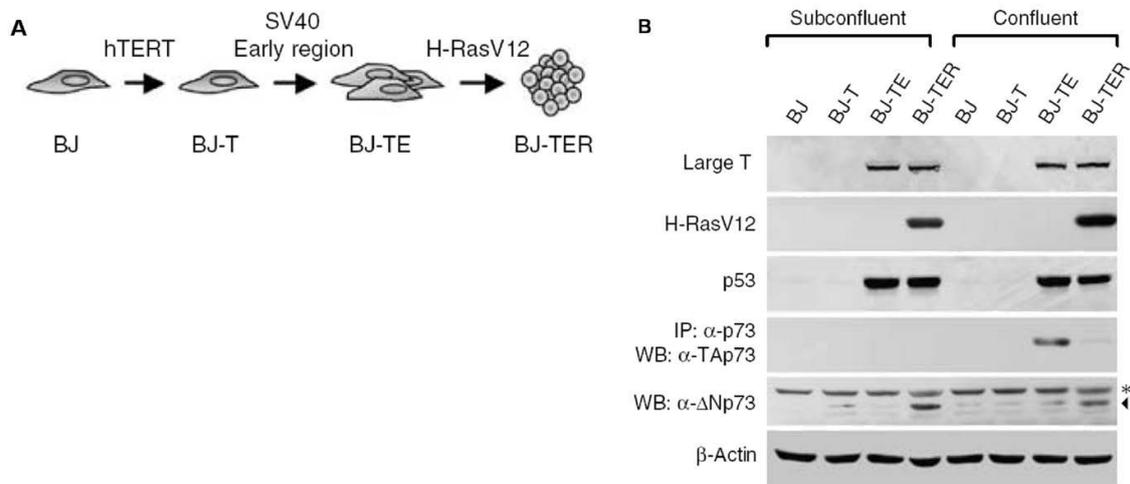
Im Gegensatz zu klassischen Tumorsuppressoren wie p53 wird p73 nicht durch transformierende virale Onkoproteine, wie zum Beispiel den Simian Virus 40 (SV40) large T (LT), HPV16 E6 oder den E1B-55K Adenovirus, gebunden und inaktiviert, so dass lange Zeit davon ausgegangen wurde, dass p73 keine tumorsuppressive Wirkung besitzt [Marin et al., 1998; Roth et al., 1998]. Studien der letzten Jahre haben aber Hinweise für eine mögliche Tumorsuppressoraktivität von p73 ergeben. So haben p73<sup>+/-</sup> Mäuse eine reduzierte Lebenserwartung gegenüber Wildtyp-Tieren und zeigen ein Tumorspektrum, das Lungenadenokarzinome, mediastinale Lymphome und Hämangiosarkome umfasst [Flores et al., 2005]. Kombinierte Verluste von p53 und p73 (p53<sup>+/-</sup>; p73<sup>+/-</sup>) resultieren in einer vermehrten Tumorentstehung und einer Verschiebung zum metastasierenden Tumorphänotyp hin. Dies lässt vermuten, dass p73-Signalwege kontrolliert, die Aggressivität und Metastasierung eines Tumors begrenzen [Flores et al., 2005]. Allerdings ist in Krebspatienten die p73-Funktion nicht durch direkte Genmutationen beeinträchtigt, sondern durch eine erhöhte Expression seines Inhibitors  $\Delta$ Np73 [Casciano et al., 2002; Zaika et al., 2002; Stiewe et al., 2002a, 2004; Concin et al., 2005; Müller et al., 2005; Cam et al., 2006; Domínguez et al., 2006]. Diese hohen  $\Delta$ Np73-Expressionsspiegel korrelieren mit einem aggressiven Tumorphänotyp, gekennzeichnet durch Lymphknotenmetastasierung, Gefäßinvasion, Chemotherapieresistenz und eine schlechte Überlebensprognose für Patienten [Casciano et al., 2002; Concin et al., 2005; Müller et al., 2005; Domínguez et al., 2006]. Darüber hinaus ist die  $\Delta$ Np73-Expression entscheidend für den Erhalt des onkogenen Phänotyps in Rhabdomyosarkomen und Neuroblastomen [Simões-Wüst et al., 2005; Cam et al., 2006]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass  $\Delta$ Np73 immortalisierte NIH3T3-Fibroblasten transformieren kann und mit onkogenem H-RasV12 in der malignen Transformation von primären Mausfibroblasten kooperiert [Stiewe et al.,

2002a; Petrenko et al., 2003]. Somit beeinträchtigt eine Expressions-Verschiebung vom tumorsuppressiven TAp73 zum onkogenen  $\Delta$ Np73 die Tumorsuppressoraktivität des *TPp73*-Gens und ist möglicherweise ein wichtiger Schritt in der Tumorigenese. Der molekulare Mechanismus dieser Verschiebung sollte genauer untersucht werden und die Ergebnisse sind in dieser Publikation zusammengefasst.

## 4.2 Ergebnisse und Diskussion

Mit Hilfe eines schrittweisen Transformationsmodells [Hahn et al., 1999] wurde die Rolle von p73 in der humanen Zelltransformation untersucht. Hierzu wurden humane BJ-Fibroblasten zuerst mit der katalytischen Telomeraseuntereinheit hTERT immortalisiert. In einem weiteren Schritt wurde die Simian Virus 40 (SV40) early region eingebracht, die das large T (LT) und small T (ST) Antigen exprimiert und durch Inaktivierung von pRB und p53 die Zellen (BJ-TE) prämaligne macht. Die Expression von onkogenem H-RasV12 führt letztendlich zu volltransformierten Zellen (BJ-TER), die substratunabhängig wachsen können (anchorage-independent growth) und in Nacktmäusen tumorigen sind [Hahn et al., 1999] (Abb. 19A). Während in primären und hTERT immortalisierten BJ-Zellen keine p73-Expression zu sehen war, stieg diese in den prämaligen BJ-TE Zellen an und wurde in volltransformierten BJ-TER Zellen wieder herunterreguliert, begleitet durch einen gleichzeitigen Anstieg von  $\Delta$ Np73 (Abb. 19B).

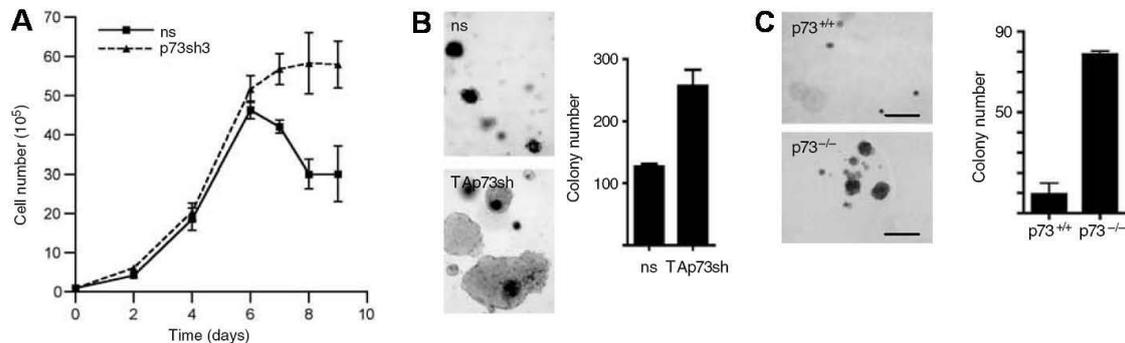
Die hohe TAp73-Expression in prämaligen BJ-TE Zellen wurde durch E2F ausgelöst und resultierte aus der Blockierung der Pocketproteine pRB, p107 und p130 durch das Onkoprotein LT. Das adenovirale Onkoprotein E1A, das ebenfalls die Pocketproteine inaktiviert und auf diese Weise E2F aktiviert, induzierte einen ähnlichen Anstieg der TAp73-Expression. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der TAp73-Promotor in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten ([Irwin et al., 2000; Stiewe und Pützer, 2000; Zaika et al., 2001; Pediconi et al., 2003; Urist et al., 2004]) durch die



**Abb. 19: Veränderungen der p73-Expression während der humanen Zelltransformation.** (A) Graphische Darstellung des Transformationsmodells. Die BJ-Fibroblasten wurden mit retroviralen Vektoren transduziert, die hTERT, SV40 early region und das Onkogen H-RasV12 exprimierten. Die einzelnen Transformationsschritte werden mit BJ, BJ-T, BJ-TE und BJ-TER gekennzeichnet. (B) Western Blot Analyse von BJ-Zellen auf die ektopische Expression des SV40 LT-Antigen und H-RasV12, sowie auf die endogenen Spiegel von p53, TAp73 und  $\Delta$ Np73 unter subkonfluenten und konfluenten Bedingungen. Um die TAp73-Detektion zu verstärken, wurde gesamt-p73 immunopräzipitiert und anschließend TAp73 im Western Blot detektiert. Im Falle von  $\Delta$ Np73 gibt es eine spezifische (Pfeil) und unspezifische (\*) Bande. Als Kontrolle dient die  $\beta$ -Aktin Expression.

E2F-RB Achse reguliert wird und dass Alterationen im pRB-Signalweg unabhängig von p53 eine mögliche Ursache für die TAp73-Induktion in frühen Stadien der Transformation sein könnten. Allerdings war TAp73 nur in konfluenten und kontaktinhibierten Zellen induziert. Dies steht im Gegensatz zu p53, das nur in proliferierenden nicht aber in kontaktinhibierten Zellen aktiv ist [Deffie et al., 1995]. Die hohe Zelldichte könnte also ein Aktivierungssignal für E2F sein, das dessen Bindung an den TAp73-Promotor stimuliert und TAp73 in prämaligen Zellen induziert.

Bei der Untersuchung der funktionellen Relevanz der zelldichte-abhängigen TAp73-Induktion wurde beobachtet, dass prämalige BJ-TE Zellen nach Depletion von TAp73 mit zunehmender Zelldichte eine verbesserte Proliferation zeigten - im Gegensatz zu Kontrollzellen, welche bereits bei einer geringeren Zelldichte abstarben (Abb. 20A). Weiterführende Versuche zeigten, dass die TAp73-Depletion den Zellen einen Langzeit-Wachstumsvorteil verleiht und ein substratunabhängiges Wachstum



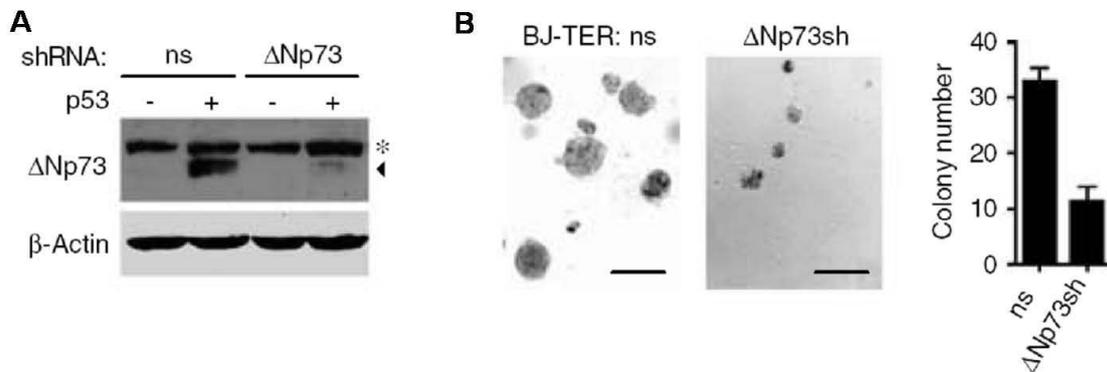
**Abb. 20: Der p73-Knockdown aktiviert das substratunabhängige Wachstum.** (A) Wachstumskurven von BJ-TE Zellen die stabil eine p73shRNA oder eine KontrollshRNA (ns) exprimieren. Die Zellen wurden mit einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro 60 mm Schale ausgesät und in Triplikaten zu den angegebenen Zeitpunkten gezählt. Dargestellt ist die mittlere Zellzahl  $\pm$  SD. (B, C) Soft Agar Assay. (B) BJ-TE Zellen wurden mit H-RasV12 oder einer TAp73shRNA stabil transduziert und auf die Koloniebildung untersucht. (C) Auch primäre Mausfibroblasten aus p73<sup>+/+</sup> und p73<sup>-/-</sup> Embryonen, immortalisiert mit dem LT-Antigen wurden auf substratunabhängiges Wachstum getestet. Dargestellt ist die Kolonieformation im Soft Agar Medium und die durchschnittliche Koloniezahl  $\pm$  SD. Maßstabbalken beträgt  $200 \mu\text{m}$ .

im Soft Agar ermöglicht (Abb. 20B). Da shRNAs aber so genannte „off-target“ Effekte zeigen können, wurden zusätzlich Fibroblasten (MEFs) aus genetischen definierten p73 Knockout-Embryonen präpariert und untersucht. Auch die p73<sup>-/-</sup> Fibroblasten zeichneten sich nach Expression von SV40 LT durch substratunabhängige Wachstumseigenschaften aus, die in p73-Wildtyp-MEFs nicht erkennbar waren (Abb. 20C). Folglich verleiht die TAp73-Depletion prämaligen Zellen einen Langzeit-Wachstumsvorteil und ermöglicht substratunabhängiges Wachstum als Merkmal maligner Tumorzellen. Somit begrenzt die erhöhte TAp73-Expression das Zellwachstum und Überleben von konfluenten, prämaligen Zellen und fungiert als Barriere auf dem Weg zur malignen Transformation. Um hierfür relevante p73-regulierte Signalwege zu identifizieren, wurde das transkriptionelle Programm in prämaligen, konfluenten Fibroblasten mit Hilfe von Genexpressionsprofilen analysiert. Dadurch konnte eine Reihe von Genen identifiziert werden, die TAp73- und Zelldichte-abhängig exprimiert wurden. Der Knockdown zwei dieser TAp73-Zielgene, *KCNK1*, ein Mitglied der Kaliumkanalfamilie [Lesage et al., 1996] oder *FAM38B*, ein Mehrkanalmembranprotein, imitierte den Effekt eines p73-Verlustes in BJ-TE Zellen

und ermöglichte ebenfalls das substratunabhängige Wachstum. Viele Kaliumkanäle werden mit Proliferation und Zellzyklusprogression in Säugerzellen in Verbindung gebracht und einige sind in humanen Tumoren herunterreguliert [Abdul und Hoosein, 2006; Yanglin et al., 2007; Higashimori und Sontheimer, 2007]. Von KCNK1 ist bekannt, dass es in Melanomen, Gliomen und Ovarialkarzinomen eine reduzierte Expression aufweist, für die auch eine beeinträchtigte TAp73-Aktivität durch eine  $\Delta$ Np73-Überexpression dokumentiert ist [Tuve et al., 2004; Concin et al., 2004; Wager et al., 2006]. Auch die FAM38B-Expression war in Gliomen reduziert, was auf eine mögliche pathogenetische Relevanz beider Membranproteine bei der malignen Transformation hindeutet. Wie allerdings KCNK1 und FAM38B das substratunabhängige Wachstum beeinflussen, ist bisher unklar.

Überwunden wurde die tumorsuppressive Aktivität von p73 im Transformationsmodell durch das Einbringen der onkogenen H-RasV12-Mutante in prä-maligne Zellen. Dadurch wurde die dichteabhängige Induktion von TAp73 verhindert, begleitet von einer gleichzeitig erhöhten  $\Delta$ Np73-Expression. Allerdings konnten die substratunabhängigen Wachstumseigenschaften von Ras-transformierten Fibroblasten durch eine  $\Delta$ Np73-Depletion verhindert werden (Abb. 21).

Die TAp73-Suppression und  $\Delta$ Np73-Expression, d.h. eine Verschiebung des TAp73/ $\Delta$ Np73-Verhältnisses in Richtung  $\Delta$ Np73, tragen daher zur Transformationsaktivität von H-RasV12 bei. Die H-RasV12-induzierte Verschiebung der p73-Expression zu  $\Delta$ Np73 benötigt Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-vermittelte Signale. Durch den PI3K-Inhibitor LY294002 konnte das TAp73/ $\Delta$ Np73-Verhältnis wieder in Richtung TAp73 verschoben und das substratunabhängige Wachstum von BJ-TER Zellen reduziert werden. Das heißt, die Ras-induzierten PI3K-Signale können die dichteabhängige E2F1-vermittelte Hochregulation von TAp73 inhibieren, was mit der Suppression der E2F1-induzierten Apoptose in der normalen Zellproliferation durch den Ras-PI3K-AKT-Signalweg übereinstimmt [Hallstrom und Nevins, 2003]. Während in BJ-Zellen Ras essentiell für die Regulation von  $\Delta$ Np73 ist, wurde es aber in der Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 nicht zur Aufrechterhaltung der  $\Delta$ Np73-



**Abb. 21: Knockdown von  $\Delta$ Np73 inhibiert das Wachstum von BJ-TER Zellen im Soft Agar.** (A) Western Blot der  $\Delta$ Np73-Depletion.  $\Delta$ Np73 wurde unter basalen und p53 stimulierten Bedingungen nach der Expression einer Kontroll- (ns) oder  $\Delta$ Np73-shRNA, detektiert. Hierzu wurde ein polyklonales Antiserums gegen das  $\Delta$ Np73-spezifische Epitop, kodiert durch das alternative Exon 3', genutzt.  $\Delta$ Np73-spezifische (Pfeil) und nicht spezifische (\*) Banden sind gekennzeichnet. (B)  $\Delta$ Np73-depletierte BJ-TER Zellen im Soft Agar. Die Zellen wurden lentiviral mit den angegebenen Konstrukten transduziert und auf ihr Wachstum analysiert. Die Bilder zeigen die Kolonien im Soft Agar und die mittlere Koloniezahl  $\pm$  SD. Maßstab, 200 $\mu$ m.

Spiegel benötigt, was auf andere  $\Delta$ Np73-induzierende Faktoren schließen lässt, die bis jetzt nicht bekannt sind. Allerdings war der inhibitorische Effekt der Ras-induzierten PI3K-Signale auf TAp73 sowohl in BJ-Zellen, als auch in HCT116-Zellen zu sehen. Die Kontrolle von p73 durch Ras ist demzufolge komplex und gewebespezifisch. Diese Daten zeigen, dass TAp73 Tumorsuppressorfunktionen besitzt, die spezifisch durch aktives Ras unterbunden werden können. In den volltransformierten BJ-TER Zellen wurde die TAp73-Expression herunterreguliert und gleichzeitig stiegen die  $\Delta$ Np73-Spiegel an, was zu einer Verschiebung des TAp73/ $\Delta$ Np73-Verhältnisses in Richtung  $\Delta$ Np73 führte. Demzufolge kontrolliert Ras die Expression von TAp73 und somit das TAp73/ $\Delta$ Np73-Verhältnis durch PI3K-Signalwege, wie sowohl in einem humanen Transformationsmodell, als auch in Tumorzellen eines Krebspatienten gezeigt werden konnte. Das hier untersuchte humane Transformationsmodell bietet somit eine Erklärung, wie TAp73 in entstehenden humanen Tumoren tumorsuppressiv wirkt und wie dessen tumorsuppressive Aktivität in etablierten Tumoren z.B. durch onkogenes Ras ausgeschaltet werden kann.

---

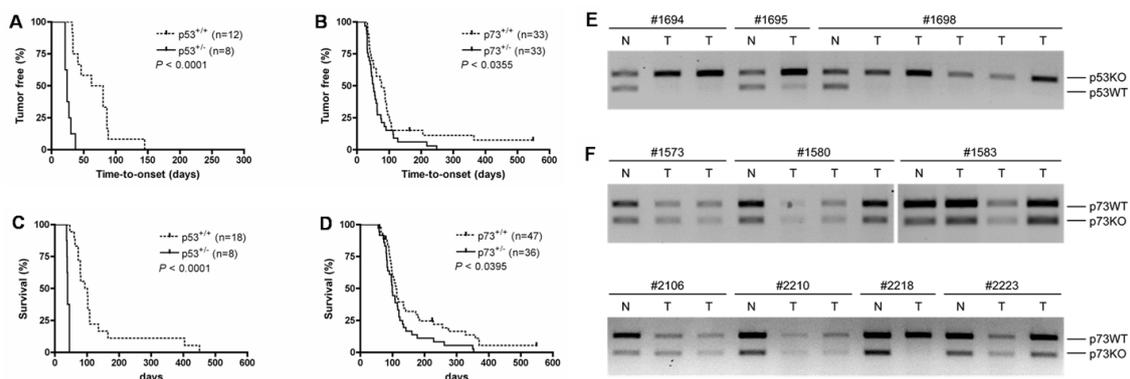
## 5 p53 und p73 in der Suppression der Myc-gesteuerten Lymphomentwicklung (Publikation 4)

### 5.1 Einleitung

Der Tumorsuppressor p53 wird außer durch DNA-Schäden und UV-Licht auch durch Onkogene aktiviert. Der Arf/p53-Signalweg ist dabei eine bedeutende Barriere in der Myc-induzierten Lymphomentwicklung, dessen Verlust zur Myc-gesteuerten Tumorentstehung beiträgt [Eischen et al., 1999; Schmitt et al., 1999, 2002]. Auch der TAp73-Promotor wird durch Onkogene wie E1A, SV40 large T oder Myc aktiviert und kann so zur proapoptotischen Antwort beitragen [Stiewe und Pützer, 2000; Zaika et al., 2001; Beitzinger et al., 2008]. Das TAp73 durch das Abtöten von onkogen-tragenden Zellen einen Schutz vor der Tumorentstehung bieten könnte [Soengas und Lowe, 2000], verdeutlicht die bereits beschriebene Funktion von TAp73 als Barriere zur malignen Transformation [Beitzinger et al., 2008; Oswald und Stiewe, 2008]. Erkenntnisse zur Tumorsuppressorfunktion *in vivo* waren bis dato jedoch rar und widersprüchlich. In Anbetracht der Tatsache, dass p73 durch Onkogene wie c-Myc aktiviert werden kann, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob p73, wie p53, vor der Myc-induzierten Lymphomentwicklung *in vivo* schützt. Im transgenen *E $\mu$ -Myc*-Mausmodell wird c-Myc unter der Kontrolle des *E $\mu$* -Enhancers des IgH-Lokus überexprimiert [Adams et al., 1985]. *E $\mu$ -Myc* Mäuse entwickeln klonale prä-B und B-Zell-Lymphome, die den humanen non-Hodgkin-Lymphomen ähnlich sind. Von humanen non-Hodgkin Lymphomen ist bekannt, dass p73 häufig durch abnormale Promotormethylierung oder Gendeletion inaktiviert ist. Dies lässt eine tumorsuppressive Funktion von p73 in diesen Tumoren vermuten [Corn et al., 1999; Martinez-Delgado et al., 2002].

## 5.2 Ergebnisse und Diskussion

Um in der Myc-induzierten Lymphomentwicklung die Tumorsuppressoraktivitäten von p53 und p73 zu vergleichen, wurden durch die Verpaarung von  $E\mu$ -Myc-transgenen Mäusen mit p53+/- oder p73+/- Tieren B-Zell-Lymphome mit genetischen Alterationen in p53 und p73 generiert [Donehower et al., 1992; Yang et al., 2000]. Wie bereits aus der Literatur bekannt, entstanden in  $E\mu$ -Myc; p53+/- Mäusen die Lymphome deutlich schneller als in  $E\mu$ -Myc; p53+/+ Kontrolltieren, was auch mit einer stark reduzierten Überlebensrate dieser Mäuse korreliert (Abb. 22A, C). Im Gegensatz dazu war in  $E\mu$ -Myc; p73+/- Mäusen die Lymphomentstehung im Vergleich zur Kontrollgruppe nur schwach beschleunigt und die durchschnittliche Überlebensrate auch nur geringfügig reduziert. Jedoch war zu einem späteren Alter (>100 Tage) ein deutlicher protektiver Effekt von p73 sichtbar, was in ein signifikanten Unterschied im Gesamtüberleben resultierte (Abb. 22B, D). Die ebenfalls erhaltenen  $E\mu$ -Myc; p73-/- Mäuse verstarben früh aufgrund der bekannten Entwicklungsdefekte des p73-Knockouts, so dass eine detaillierte Analyse der Lymphomentstehung nicht möglich war. Die zwei überlebenden und adulten  $E\mu$ -Myc; p73-/- Tiere hingegen entwickel-



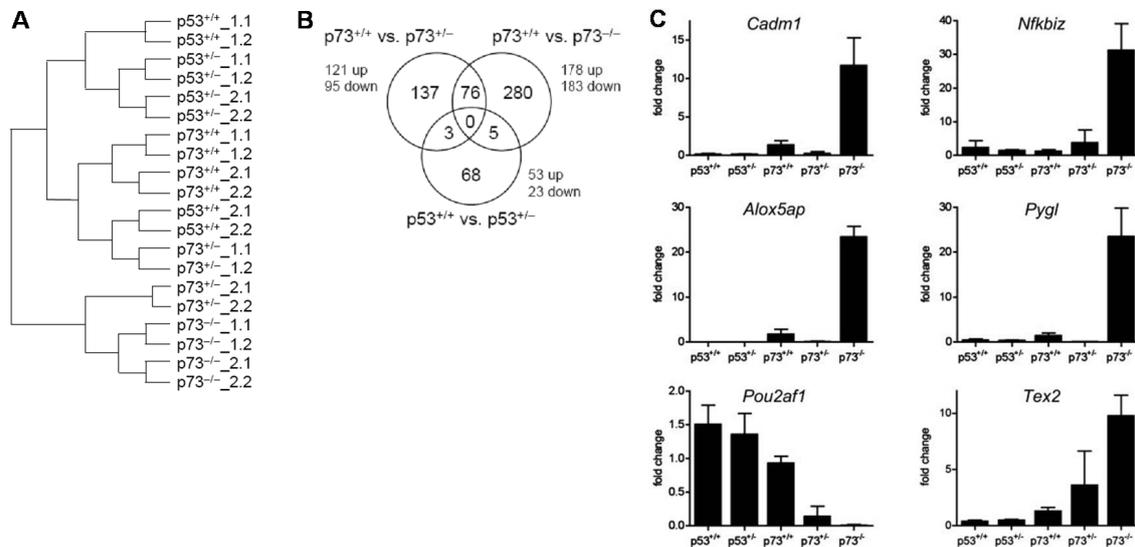
**Abb. 22: Der Einfluss von p53 und p73 auf die Tumorentstehung in  $E\mu$ -Myc-Mäusen.**

Kaplan-Meier Diagramme der Lymphominzidenz (A, B) und des Gesamtüberlebens (C, D). Sowohl p53, als auch p73-heterozygote Tiere zeigten einen signifikanten Unterschied in der Inzidenz und dem Überleben im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrolltieren ( $p < 0.05$ ). Der Verlust der Heterozygotie (LOH) im p53 (E) und p73 (F) Locus wurde durch mehrmalige PCR-Analysen von normalem Gewebe (Schwanzspitze, N) oder Tumorgeewebe (Lymphom, T) untersucht.  $E\mu$ -Myc; p53+/- Mäuse: 1694, 1695, 1698.  $E\mu$ -Myc; p73+/- Mäuse: 1573, 1580, 1583, 2106, 2210, 2218, 2223.

ten Tumore mit einer ähnlichen Latenz wie  $E\mu$ -Myc; p73+/- oder p73+/+ Mäuse und waren noch am leben, als bereits alle  $E\mu$ -Myc; p53+/- Mäuse aufgrund von Lymphomen verstorben waren. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich sagen, dass die gezielte Inaktivierung von p73 die Myc-induzierte Lymphomentwicklung im Gegensatz zu einem Verlust von p53 nur gering verstärkt. Während in den  $E\mu$ -Myc; p53+/- Lymphomen das bestehende p53-Wildtyp-Allel und somit der schützende Effekt verloren geht [Hsu et al., 1995; Eischen et al., 1999; Schmitt et al., 1999], konnte in den  $E\mu$ -Myc; p73+/- Lymphomen kein Verlust der Heterozygotie (LOH) detektiert werden (Abb. 22). Allerdings schließt das Fehlen eines LOHs nicht den Verlust der p73-Aktivität aus, was auch durch reduzierte Expressionsspiegel, ein verändertes Expressionsverhältnis der TAp73- und  $\Delta Np73$ -Isoformen oder eine Inaktivierung durch Expression von Inhibitoren erfolgen kann. Um einen möglichen p73-Funktionsverlust zu untersuchen, wurden von jedem genetischen Hintergrund zwei Lymphome mit Hilfe eines Genexpressionsprofils analysiert. Die beiden p53+/- Tumore zeigten, im Gegensatz zu p73+/-, einen LOH.

Das Clustern der Genexpressionsprofile (Abb. 23A) verdeutlichte, dass sich die p73-null Lymphome von den p53- und p73-Wildtyp-Lymphomen separieren. Die Gruppierung der p53+/+ und p73+/+ Lymphome mit denen der p53+/- Tiere lässt eine p53-Inaktivierung in allen Lymphomproben vermuten. Mit Blick auf die unterschiedlich exprimierten Gene waren 361 Gene in den p73-null Lymphomen im Vergleich zu den p73+/+ signifikant dereguliert.

Einige der unterschiedlich exprimierten Gene wurden mit quantitativer RT-PCR validiert (Abb. 23C). So waren in p73-null Lymphomen der NF- $\kappa$ B Regulator *Nfkbiz*, die Glykogenphosphorylase *Pygl*, das Zelladhäsionsmolekül *CadM1* und das Arachidonat-5-Lipoxygenase aktivierende Protein *Alox5ap* stark hochreguliert, was eine direkte oder indirekte Repression dieser Gene durch p73 vermuten lässt. In den p73+/- Lymphomen war die Expression dieser Gene nicht verändert, was bestätigt, dass die Aktivität des vorhandenen p73-Allels nicht verloren gegangen ist. Aber die Expression des transkriptionellen Koaktivators Pou2af1 und des Membranproteins



**Abb. 23: Microarray Analyse von Lymphomgewebe.**

(A) Hierarchisches Clustern der Lymphomproben mit dem Euclidean distance metric Algorithmus. (B) Das Venn-Diagramm verdeutlicht das Überschneiden der unterschiedlich exprimierten Gene. (C) Validierung der Microarray Ergebnisse mittels quantitativer RT-PCR. Die Genexpressionsdaten wurden auf die GAPDH Expression normalisiert. Dargestellt ist die mittlere Expression  $\pm$  SD im Vergleich zu den p73<sup>+/+</sup> Proben.

Tex2 waren, im Vergleich zu p73<sup>+/+</sup> und p73<sup>-/-</sup> Lymphomen, in den p73<sup>+/-</sup> Proben intermediär. Dies lässt vermuten, dass p73 ein haploinsuffizienter, transkriptioneller Regulator von Genen wie *Pou2af1* und *Tex2* ist. Das heißt, das Genexpressionsprofil war im Wesentlichen durch den p73<sup>-</sup> und nicht den p53-Genotyp der Tiere charakterisiert. Dies ist damit zu erklären, dass p53 in allen E $\mu$ -Myc-Lymphomen inaktiviert wird. Der p53-Genotyp bestimmt die Latenz der Tumorentstehung durch die p53-Inaktivierung. Nach der p53-Inaktivierung ist das Genexpressionsprofil des Tumors somit unabhängig vom ursprünglichen p53-Genotyp. Im Gegensatz dazu waren p73-null Tumore eindeutig von Wildtyp-Tumoren zu unterscheiden, was auf den Erhalt des p73-Genotyps im Tumor hinweist. Der haploinsuffiziente Phänotyp von p73<sup>+/-</sup> Lymphomen ist eine möglicher Erklärung für das schwache, aber signifikant verkürzte Überleben der E $\mu$ -Myc; p73<sup>+/-</sup> im Vergleich zu den E $\mu$ -Myc; p73<sup>+/+</sup> Tieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in der Myc-induzierten Lymphomentwicklung p53 der dominante Suppressor ist, während p73 nur einen kleinen aber signifi-

fikanten Schutz beiträgt. Da p73 ein Mediator der Myc-induzierten Apoptose ist, ist der geringe Einfluss auf die Myc-gesteuerte Lymphomentwicklung überraschend. Obwohl p73 nach ektopter Expression von c-Myc essentiell für die Apoptose in Saos-2 Zellen ist [Zaika et al., 2001], zeigen c-Myc exprimierende p73 Knockout-MEFs nach Etoposidbehandlung ähnliche Apoptosespiegel wie Wildtyp-MEFs [Petrenko et al., 2003]. Die p73-Induktion durch Myc könnte daher möglicherweise nicht ubiquitär, sondern an bestimmte Gewebe und Stresssituationen gebunden sein. Da c-Myc auch physisch mit p73 assoziiert und so dessen transkriptionelle Aktivität am Bax- und p21-Promotor beeinträchtigt [Watanabe et al., 2002], könnte eine p73-Inaktivierung überflüssig sein, wenn Myc effizient die Transaktivierungsfunktion von p73 durch Protein-Protein-Interaktion kontrolliert.

Unsere Daten über eine Rolle von p73 in der Lymphomentwicklung sind auf den ersten Blick konträr zu Ergebnissen von Perez-Losada *et al.*, wo der Vergleich zwischen p73+/- Mäusen und Wildtyp-Tieren nach Gamma-Bestrahlung keine Unterschiede in der Latenz, dem Spektrum oder der Häufigkeit der Lymphome zeigte [Perez-Losada et al., 2005]. Während allerdings strahlungsinduzierte Lymphome und auch die in p53-defizienten Mäusen entstehenden Lymphome typische T-Zell-Lymphome sind, entwickeln E $\mu$ -Myc-Mäuse B-Zell-Lymphome [Adams et al., 1985]. Das reduzierte Überleben von p73+/- Tieren in unserer Studie würde demzufolge für eine spezifische Schutzfunktion von p73 in B-Zellen nicht aber in T-Zellen sprechen. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese, zeigten Senoo *et al.*, dass p73 nicht essentiell für die p53-abhängige Apoptose von T-Lymphozyten ist [Senoo et al., 2004]. Offensichtlich verursacht die geringe Tumorsuppressoraktivität von p73 in der Lymphomgenese keine komplette p73-Inaktivierung durch einen LOH. Bereits eine monoallelische p73-Inaktivierung inhibierte die Regulation unterschiedlicher Gengruppen, die potentiell vor der Lymphomentstehung schützen. Daraus ergibt sich kein weiterer Vorteil der Inaktivierung des bestehenden Wildtyp-Allels. Vergangene Studien lassen vermuten, dass eine komplette p73-Inaktivierung die Zellproliferation stört [Vikhanskaya et al., 2007; Talos et al., 2007]. Die monoallelische Inaktivierung von

---

p73 könnte somit ein Kompromiss zwischen einem Verlust der Tumorsuppressorfunktion und einer gestörten Zellproliferation sein, was das schlechte Überleben der E $\mu$ -Myc; p73<sup>+/-</sup> Tiere und die Inaktivierung einzelner p73-Allele durch Deletion oder Methylierung in 30% aller humanen Lymphome erklären könnte [Martinez-Delgado et al., 2002].

---

## 6 Zusammenfassung (deutsch und englisch)

Um der ungehinderten Vermehrung maligne entarteter Zellen vorzubeugen, besitzt der Organismus Tumorsuppressorgene. Die Blockade von tumorsuppressiven Signalwegen ist Voraussetzung für die neoplastische Transformation von Zellen. Während die tumorsuppressive Funktion von p53 bestens untersucht ist, war die Bedeutung des p53-Familienmitglieds p73 als Tumorsuppressor umstritten. Komplizierend war hierbei, dass das p73-Gen sowohl ein p53-ähnliches, putativ tumorsuppressives Protein (TAp73) als auch ein funktionell antagonistisches, potentiell onkogenes Protein ( $\Delta$ Np73) exprimiert.

Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen zeigen, dass TAp73 tatsächlich tumorsuppressiv agiert: zum einen verhindert es zusammen mit p53 und TAp63 durch Induktion von myogener Differenzierung die Entstehung von Rhabdomyosarkomen - zum anderen unterdrückt es substratunabhängiges Wachstum als Charakteristikum von Tumorzellen und bildet so eine Barriere auf dem Weg der malignen Transformation.

Eine Inaktivierung der tumorsuppressiven Aktivitäten von TAp73 erfolgt bei Tumorpatienten – anders als bei p53 – entweder durch eine Reduktion der p73-Expression aufgrund von Gendeletion bzw. Promotormethylierung oder durch eine verstärkte Expression von Inhibitoren wie  $\Delta$ Np73. Eine reduzierte p73-Expression wird z.B. bei einigen hämatologischen Neoplasien beobachtet. Entsprechend beobachteten wir in einem Myc-induzierten Lymphommodell der Maus eine geringfügig aber signifikant beschleunigte Lymphomentstehung nach Deletion eines p73-Allels. Eine verstärkte Expression von  $\Delta$ Np73 ist dagegen die charakteristische Expressionsveränderung von p73 in soliden Tumoren. Entsprechend beobachteten wir in >85% aller Rhabdomyosarkome stark erhöhte  $\Delta$ Np73-Spiegel, die sich als essentiell für Tumorentstehung und Tumorprogression erwiesen.

Diese Ergebnisse in unterschiedlichen *in vitro* und *in vivo* Modellen belegen mechanistisch, dass TAp73 als Tumorsuppressor wirkt, dessen Funktion in Tumoren

häufig inaktiviert ist. Proof-of-principle Experimente in dieser Arbeit unterstreichen ferner, dass eine Reaktivierung der Tumorsuppressorfunktion von TAp73, z.B. durch Blockade von  $\Delta Np73$ , eine Möglichkeit darstellt, um Tumore auf molekularer Ebene zu therapieren.

## Summary

The organism possesses tumour suppressor genes to prevent an unchecked expansion of malignant cells. For neoplastic cell transformation inhibition of these tumour suppressive pathways is required. Whereas the tumour suppressor function of p53 is well elucidated, the role of the p53 family member p73 as a tumour suppressor was controversially discussed. This was complicated because the p73 gene generates both a p53-like putative tumour suppressive protein (TAp73) and a functionally antagonistic and potentially oncogenic protein ( $\Delta$ Np73). The work described in this thesis shows, that TAp73 indeed acts tumour suppressive. On the one hand, together with p53 and TAp63, TAp73 prevented the development of rhabdomyosarcomas by inducing myogenic differentiation. On the other hand, TAp73 posed a barrier to malignant transformation by impairing anchorage-independent growth as a hallmark of tumour cells. Unlike p53, inactivation of the tumour suppressive activities of TAp73 in patients occurs either by reduced expression of p73 due to gene deletion or promoter methylation or by enhanced expression of inhibitors like  $\Delta$ Np73. A reduced p73 expression is commonly observed in some hematopoietic neoplasias. Accordingly, we observed a small but significant acceleration of lymphoma development after inactivation of a single p73 allele in a Myc-driven lymphoma mouse model. In contrast, an increased  $\Delta$ Np73 expression is characteristic for solid tumours. Consistently, we observed in >85% of all rhabdomyosarcomas highly increased  $\Delta$ Np73 levels which proved to be essential for tumour development and progression. These findings in different in vitro and in vivo models support mechanistically that TAp73 acts as a tumour suppressor the function of which is often inactivated in tumours. Proof of principal experiments in this work further underline that reactivation of TAp73's tumour suppressor function, for example by blocking  $\Delta$ Np73, presents a novel possibility for a molecular targeted cancer therapy.

---

## 7 Literatur

### Literatur

- Abdul, M. und Hoosein, N. (2006). Reduced kv1.3 potassium channel expression in human prostate cancer. *J Membr Biol*, 214(2):99–102.
- Adams, J. M., Harris, A. W., Pinkert, C. A., Corcoran, L. M., Alexander, W. S., Cory, S., Palmiter, R. D., und Brinster, R. L. (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature*, 318(6046):533–538.
- Agami, R., Blandino, G., Oren, M., und Shaul, Y. (1999). Interaction of c-abl and p73alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature*, 399(6738):809–813.
- Allart, S., Martin, H., Detraves, C., Terrasson, J., Caput, D., und Davrinche, C. (2002). Human cytomegalovirus induces drug resistance and alteration of programmed cell death by accumulation of deltan-p73alpha. *J Biol Chem*, 277(32):29063–29068.
- Almog, N. und Rotter, V. (1997). Involvement of p53 in cell differentiation and development. *Biochim Biophys Acta*, 1333(1):F1–27.
- Almon, E., Goldfinger, N., Kapon, A., Schwartz, D., Levine, A. J., und Rotter, V. (1993). Testicular tissue-specific expression of the p53 suppressor gene. *Dev Biol*, 156(1):107–116.
- Armstrong, J. F., Kaufman, M. H., Harrison, D. J., und Clarke, A. R. (1995). High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice. *Curr Biol*, 5(8):931–936.
- Ashcroft, M. und Vousden, K. H. (1999). Regulation of p53 stability. *Oncogene*, 18(53):7637–7643.
- Attardi, L. D., Reczek, E. E., Cosmas, C., Demicco, E. G., McCurrach, M. E., Lowe, S. W., und Jacks, T. (2000). Perp, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the pmp-22/gas3 family. *Genes Dev*, 14(6):704–718.
- Barak, Y., Juven, T., Haffner, R., und Oren, M. (1993). mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J*, 12(2):461–468.
- Basu, S., Totty, N. F., Irwin, M. S., Sudol, M., und Downward, J. (2003). Akt phosphorylates the yes-associated protein, yap, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. *Mol Cell*, 11(1):11–23.

- Battista, S., Martelli, M. L., Fedele, M., Chiappetta, G., Trapasso, F., Vita, G. D., Battaglia, C., Santoro, M., Viglietto, G., und Fagin, J. A. (1995). A mutated p53 gene alters thyroid cell differentiation. *Oncogene*, 11(10):2029–2037.
- Beitzinger, M., Hofmann, L., Oswald, C., Beinoraviciute-Kellner, R., Sauer, M., Griesmann, H., Bretz, A. C., Burek, C., Rosenwald, A., und Stiewe, T. (2008). p73 poses a barrier to malignant transformation by limiting anchorage-independent growth. *EMBO J*, 27(5):792–803.
- Bell, H. S., Dufes, C., O’Prey, J., Crighton, D., Bergamaschi, D., Lu, X., Schätzlein, A. G., Vousden, K. H., und Ryan, K. M. (2007). A p53-derived apoptotic peptide derepresses p73 to cause tumor regression in vivo. *J Clin Invest*, 117(4):1008–1018.
- Bell, H. S. und Ryan, K. M. (2007). Targeting the p53 family for cancer therapy: ‘big brother’ joins the fight. *Cell Cycle*, 6(16):1995–2000.
- Bergstrom, D. A., Penn, B. H., Strand, A., Perry, R. L. S., Rudnicki, M. A., und Tapscott, S. J. (2002). Promoter-specific regulation of myoD binding and signal transduction cooperate to pattern gene expression. *Mol Cell*, 9(3):587–600.
- Bernassola, F., Salomoni, P., Oberst, A., Como, C. J. D., Pagano, M., Melino, G., und Pandolfi, P. P. (2004). Ubiquitin-dependent degradation of p73 is inhibited by pml. *J Exp Med*, 199(11):1545–1557.
- Billon, N., Terrinoni, A., Jolicoeur, C., McCarthy, A., Richardson, W. D., Melino, G., und Raff, M. (2004). Roles for p53 and p73 during oligodendrocyte development. *Development*, 131(6):1211–1220.
- Björkqvist, A. M., Husgafvel-Pursiainen, K., Anttila, S., Karjalainen, A., Tammi-lehto, L., Mattson, K., Vainio, H., und Knuutila, S. (1998). Dna gains in 3q occur frequently in squamous cell carcinoma of the lung, but not in adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 22(1):79–82.
- Blandino, G. und Dobbstein, M. (2004). p73 and p63: why do we still need them? *Cell Cycle*, 3(7):886–894.
- Blau, H. M., Pavlath, G. K., Hardeman, E. C., Chiu, C. P., Silberstein, L., Webster, S. G., Miller, S. C., und Webster, C. (1985). Plasticity of the differentiated state. *Science*, 230(4727):758–766.
- Bálint, E., Bates, S., und Vousden, K. H. (1999). Mdm2 binds p73 alpha without targeting degradation. *Oncogene*, 18(27):3923–3929.
- Bossi, G., Scardigli, R., Musiani, P., Martinelli, R., Gentileschi, M. P., Soddu, S., und Sacchi, A. (2000). Development of a murine orthotopic model of leukemia: evaluation of tp53 gene therapy efficacy. *Cancer Gene Ther*, 7(1):135–143.

- Bourdon, J.-C. (2007). p53 and its isoforms in cancer. *Br J Cancer*, 97(3):277–282.
- Bourdon, J. C., Deguin-Chambon, V., Lelong, J. C., Dessen, P., May, P., Debuire, B., und May, E. (1997). Further characterisation of the p53 responsive element—identification of new candidate genes for trans-activation by p53. *Oncogene*, 14(1):85–94.
- Bourdon, J.-C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D. P., Saville, M. K., und Lane, D. P. (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev*, 19(18):2122–2137.
- Brown, D. R., Deb, D., Frum, R., Hickes, L., Munoz, R., Deb, S., und Deb, S. P. (2001). The human oncoprotein mdm2 uses distinct strategies to inhibit transcriptional activation mediated by the wild-type p53 and its tumor-derived mutants. *Int J Oncol*, 18(3):449–459.
- Brown, D. R., Deb, S., Muñoz, R. M., Subler, M. A., und Deb, S. P. (1993). The tumor suppressor p53 and the oncoprotein simian virus 40 t antigen bind to overlapping domains on the mdm2 protein. *Mol Cell Biol*, 13(11):6849–6857.
- Buschmann, T., Adler, V., Matusevich, E., Fuchs, S. Y., und Ronai, Z. (2000a). p53 phosphorylation and association with murine double minute 2, c-jun nh2-terminal kinase, p14arf, and p300/cbp during the cell cycle and after exposure to ultraviolet irradiation. *Cancer Res*, 60(4):896–900.
- Buschmann, T., Fuchs, S. Y., Lee, C. G., Pan, Z. Q., und Ronai, Z. (2000b). Sumo-1 modification of mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell*, 101(7):753–762.
- Cam, H., Griesmann, H., Beitzinger, M., Hofmann, L., Beinoraviciute-Kellner, R., Sauer, M., Hüttinger-Kirchhof, N., Oswald, C., Friedl, P., Gattenlöhner, S., Burek, C., Rosenwald, A., und Stiewe, T. (2006). p53 family members in myogenic differentiation and rhabdomyosarcoma development. *Cancer Cell*, 10(4):281–293.
- Casciano, I., Mazzocco, K., Boni, L., Pagnan, G., Banelli, B., Allemanni, G., Ponzoni, M., Tonini, G. P., und Romani, M. (2002). Expression of deltanp73 is a molecular marker for adverse outcome in neuroblastoma patients. *Cell Death Differ*, 9(3):246–251.
- Casciano, I., Ponzoni, M., Cunsolo, C. L., Tonini, G. P., und Romani, M. (1999). Different p73 splicing variants are expressed in distinct tumour areas of a multifocal neuroblastoma. *Cell Death Differ*, 6(5):391–393.
- Celli, J., Duijf, P., Hamel, B. C., Bamshad, M., Kramer, B., Smits, A. P., Newbury-Ecob, R., Hennekam, R. C., Buggenhout, G. V., van Haeringen, A., Woods, C. G., van Essen, A. J., de Waal, R., Vriend, G., Haber, D. A., Yang, A., McKeon, F.,

- Brunner, H. G., und van Bokhoven, H. (1999). Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of eec syndrome. *Cell*, 99(2):143–153.
- Chen, J., Marechal, V., und Levine, A. J. (1993). Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol*, 13(7):4107–4114.
- Chen, Q., Liang, D., Yang, T., Leone, G., und Overbeek, P. A. (2004). Distinct capacities of individual e2fs to induce cell cycle re-entry in postmitotic lens fiber cells of transgenic mice. *Dev Neurosci*, 26(5-6):435–445.
- Chipuk, J. E. und Green, D. R. (2006). Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ*, 13(6):994–1002.
- Choi, J. und Donehower, L. A. (1999). p53 in embryonic development: maintaining a fine balance. *Cell Mol Life Sci*, 55(1):38–47.
- Chuikov, S., Kurash, J. K., Wilson, J. R., Xiao, B., Justin, N., Ivanov, G. S., McKinney, K., Tempst, P., Prives, C., Gambelin, S. J., Barlev, N. A., und Reinberg, D. (2004). Regulation of p53 activity through lysine methylation. *Nature*, 432(7015):353–360.
- Como, C. J. D., Urist, M. J., Babayan, I., Drobnjak, M., Hedvat, C. V., Teruya-Feldstein, J., Pohar, K., Hoos, A., und Cordon-Cardo, C. (2002). p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. *Clin Cancer Res*, 8(2):494–501.
- Concin, N., Becker, K., Slade, N., Erster, S., Mueller-Holzner, E., Ulmer, H., Daxenbichler, G., Zeimet, A., Zeillinger, R., Marth, C., und Moll, U. M. (2004). Transdominant deltatap73 isoforms are frequently up-regulated in ovarian cancer. evidence for their role as epigenetic p53 inhibitors in vivo. *Cancer Res*, 64(7):2449–2460.
- Concin, N., Hofstetter, G., Berger, A., Gehmacher, A., Reimer, D., Watrowski, R., Tong, D., Schuster, E., Hefler, L., Heim, K., Mueller-Holzner, E., Marth, C., Moll, U. M., Zeimet, A. G., und Zeillinger, R. (2005). Clinical relevance of dominant-negative p73 isoforms for responsiveness to chemotherapy and survival in ovarian cancer: evidence for a crucial p53-p73 cross-talk in vivo. *Clin Cancer Res*, 11(23):8372–8383.
- Cordenonsi, M., Dupont, S., Maretto, S., Insinga, A., Imbriano, C., und Piccolo, S. (2003). Links between tumor suppressors: p53 is required for tgf-beta gene responses by cooperating with smads. *Cell*, 113(3):301–314.
- Corn, P. G., Kuerbitz, S. J., van Noesel, M. M., Esteller, M., Compitello, N., Baylin, S. B., und Herman, J. G. (1999). Transcriptional silencing of the p73 gene in acute lymphoblastic leukemia and burkitt's lymphoma is associated with 5' cpg island methylation. *Cancer Res*, 59(14):3352–3356.

- Costanzo, A., Merlo, P., Pediconi, N., Fulco, M., Sartorelli, V., Cole, P. A., Fontemaggi, G., Fanciulli, M., Schiltz, L., Blandino, G., Balsano, C., und Levrero, M. (2002). Dna damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes. *Mol Cell*, 9(1):175–186.
- de Stanchina, E., McCurrach, M. E., Zindy, F., Shieh, S. Y., Ferbeyre, G., Samuelson, A. V., Prives, C., Roussel, M. F., Sherr, C. J., und Lowe, S. W. (1998). E1a signaling to p53 involves the p19(arf) tumor suppressor. *Genes Dev*, 12(15):2434–2442.
- de Vries, A., Flores, E. R., Miranda, B., Hsieh, H.-M., van Oostrom, C. T. M., Sage, J., und Jacks, T. (2002). Targeted point mutations of p53 lead to dominant-negative inhibition of wild-type p53 function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(5):2948–2953.
- Deffie, A., Hao, M., de Oca Luna, R. M., Hulboy, D. L., und Lozano, G. (1995). Cyclin e restores p53 activity in contact-inhibited cells. *Mol Cell Biol*, 15(7):3926–3933.
- DeLeo, A. B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G. C., Law, L. W., und Old, L. J. (1979). Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(5):2420–2424.
- Delgado, I., Huang, X., Jones, S., Zhang, L., Hatcher, R., Gao, B., und Zhang, P. (2003). Dynamic gene expression during the onset of myoblast differentiation in vitro. *Genomics*, 82(2):109–121.
- Deyoung, M. P. und Ellisen, L. W. (2007). p63 and p73 in human cancer: defining the network. *Oncogene*, 26(36):5169–5183.
- DeYoung, M. P., Johannessen, C. M., Leong, C.-O., Faquin, W., Rocco, J. W., und Ellisen, L. W. (2006). Tumor-specific p73 up-regulation mediates p63 dependence in squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 66(19):9362–9368.
- Dominguez, G., Silva, J. M., Silva, J., Garcia, J. M., Sanchez, A., Navarro, A., Gallego, I., Provencio, M., España, P., und Bonilla, F. (2001). Wild type p73 overexpression and high-grade malignancy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 66(3):183–190.
- Domínguez, G., García, J. M., Peña, C., Silva, J., García, V., Martínez, L., Maximiano, C., Gómez, M. E., Rivera, J. A., García-Andrade, C., und Bonilla, F. (2006). Deltatap73 upregulation correlates with poor prognosis in human tumors: putative in vivo network involving p73 isoforms, p53, and e2f-1. *J Clin Oncol*, 24(5):805–815.

- Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Butel, J. S., und Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 356(6366):215–221.
- Eischen, C. M., Weber, J. D., Roussel, M. F., Sherr, C. J., und Cleveland, J. L. (1999). Disruption of the arf-mdm2-p53 tumor suppressor pathway in myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev*, 13(20):2658–2669.
- el Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W., und Vogelstein, B. (1992). Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet*, 1(1):45–49.
- el Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., und Vogelstein, B. (1993). Waf1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75(4):817–825.
- Erster, S., Palacios, G., Rosenquist, T., Chang, C., und Moll, U. M. (2006). Deregulated expression of deltanp73alpha causes early embryonic lethality. *Cell Death Differ*, 13(1):170–173.
- Feinstein, E., Cimino, G., Gale, R. P., Alimena, G., Berthier, R., Kishi, K., Goldman, J., Zaccaria, A., Berrebi, A., und Canaani, E. (1991). p53 in chronic myelogenous leukemia in acute phase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(14):6293–6297.
- Fields, S. und Jang, S. K. (1990). Presence of a potent transcription activating sequence in the p53 protein. *Science*, 249(4972):1046–1049.
- Fillippovich, I., Sorokina, N., Gatei, M., Haupt, Y., Hobson, K., Moallem, E., Spring, K., Mould, M., McGuckin, M. A., Lavin, M. F., und Khanna, K. K. (2001). Transactivation-deficient p73alpha (p73deltaexon2) inhibits apoptosis and competes with p53. *Oncogene*, 20(4):514–522.
- Flores, E. R., Sengupta, S., Miller, J. B., Newman, J. J., Bronson, R., Crowley, D., Yang, A., McKeon, F., und Jacks, T. (2005). Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer Cell*, 7(4):363–373.
- Fontemaggi, G., Gurtner, A., Damalas, A., Costanzo, A., Higashi, Y., Sacchi, A., Strano, S., Piaggio, G., und Blandino, G. (2005). deltaef1 repressor controls selectively p53 family members during differentiation. *Oncogene*, 24(49):7273–7280.
- Fontemaggi, G., Gurtner, A., Strano, S., Higashi, Y., Sacchi, A., Piaggio, G., und Blandino, G. (2001). The transcriptional repressor zeb regulates p73 expression at the crossroad between proliferation and differentiation. *Mol Cell Biol*, 21(24):8461–8470.

- Fontemaggi, G., Kela, I., Amariglio, N., Rechavi, G., Krishnamurthy, J., Strano, S., Sacchi, A., Givol, D., und Blandino, G. (2002). Identification of direct p73 target genes combining dna microarray and chromatin immunoprecipitation analyses. *J Biol Chem*, 277(45):43359–43368.
- Frasca, F., Vella, V., Aloisi, A., Mandarino, A., Mazzon, E., Vigneri, R., und Vigneri, P. (2003). p73 tumor-suppressor activity is impaired in human thyroid cancer. *Cancer Res*, 63(18):5829–5837.
- Funk, W. D., Pak, D. T., Karas, R. H., Wright, W. E., und Shay, J. W. (1992). A transcriptionally active dna-binding site for human p53 protein complexes. *Mol Cell Biol*, 12(6):2866–2871.
- Gaiddon, C., Lokshin, M., Gross, I., Levasseur, D., Taya, Y., Loeffler, J.-P., und Prives, C. (2003). Cyclin-dependent kinases phosphorylate p73 at threonine 86 in a cell cycle-dependent manner and negatively regulate p73. *J Biol Chem*, 278(30):27421–27431.
- Giaccia, A. J. und Kastan, M. B. (1998). The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev*, 12(19):2973–2983.
- Gong, J. G., Costanzo, A., Yang, H. Q., Melino, G., Kaelin, W. G., Levrero, M., und Wang, J. Y. (1999). The tyrosine kinase c-abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced dna damage. *Nature*, 399(6738):806–809.
- Gonzalez, S., Prives, C., und Cordon-Cardo, C. (2003). p73alpha regulation by chk1 in response to dna damage. *Mol Cell Biol*, 23(22):8161–8171.
- Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M., und Harris, C. C. (1994). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 54(18):4855–4878.
- Grob, T. J., Novak, U., Maise, C., Barcaroli, D., Lüthi, A. U., Pirnia, F., Hügli, B., Graber, H. U., Laurenzi, V. D., Fey, M. F., Melino, G., und Tobler, A. (2001). Human delta np73 regulates a dominant negative feedback loop for tap73 and p53. *Cell Death Differ*, 8(12):1213–1223.
- Gu, W. und Roeder, R. G. (1997). Activation of p53 sequence-specific dna binding by acetylation of the p53 c-terminal domain. *Cell*, 90(4):595–606.
- Hagiwara, K., McMenamin, M. G., Miura, K., und Harris, C. C. (1999). Mutational analysis of the p63/p73/p51/p40/cusp/ket gene in human cancer cell lines using intronic primers. *Cancer Res*, 59(17):4165–4169.
- Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W., und Weinberg, R. A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, 400(6743):464–468.

- Hallstrom, T. C. und Nevins, J. R. (2003). Specificity in the activation and control of transcription factor e2f-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(19):10848–10853.
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57–70.
- Hanamoto, T., Ozaki, T., Furuya, K., Hosoda, M., Hayashi, S., Nakanishi, M., Yamamoto, H., Kikuchi, H., Todo, S., und Nakagawara, A. (2005). Identification of protein kinase a catalytic subunit beta as a novel binding partner of p73 and regulation of p73 function. *J Biol Chem*, 280(17):16665–16675.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K., und Elledge, S. J. (1993). The p21 cdk-interacting protein cip1 is a potent inhibitor of g1 cyclin-dependent kinases. *Cell*, 75(4):805–816.
- Harris, C. C. und Hollstein, M. (1993). Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med*, 329(18):1318–1327.
- Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T. C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W., und Vogelstein, B. (1997). 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of g2/m progression. *Mol Cell*, 1(1):3–11.
- Hibi, K., Trink, B., Patturajan, M., Westra, W. H., Caballero, O. L., Hill, D. E., Ratovitski, E. A., Jen, J., und Sidransky, D. (2000). Ais is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(10):5462–5467.
- Higashimori, H. und Sontheimer, H. (2007). Role of kir4.1 channels in growth control of glia. *Glia*, 55(16):1668–1679.
- Hollander, M. C., Alamo, I., Jackman, J., Wang, M. G., McBride, O. W., und Fornace, A. J. (1993). Analysis of the mammalian gadd45 gene and its response to dna damage. *J Biol Chem*, 268(32):24385–24393.
- Hsu, B., Marin, M. C., el Naggar, A. K., Stephens, L. C., Brisbay, S., und McDonnell, T. J. (1995). Evidence that c-myc mediated apoptosis does not require wild-type p53 during lymphomagenesis. *Oncogene*, 11(1):175–179.
- Hüttinger-Kirchhof, N., Cam, H., Griesmann, H., Hofmann, L., Beitzinger, M., und Stiewe, T. (2006). The p53 family inhibitor deltanp73 interferes with multiple developmental programs. *Cell Death Differ*, 13(1):174–177.
- Iacopetta, B., Russo, A., Bazan, V., Dardanoni, G., Gebbia, N., Soussi, T., Kerr, D., Elsaleh, H., Soong, R., Kandioler, D., Janschek, E., Kappel, S., Lung, M., Leung, C.-S. S., Ko, J. M., Yuen, S., Ho, J., Leung, S. Y., Crapez, E., Duffour, J., Ychou, M., Leahy, D. T., O'Donoghue, D. P., Agnese, V., Cascio, S., Fede, G. D., Chiecobianchi, L., Bertorelle, R., Belluco, C., Giaretti, W., Castagnola, P., Ricevuto,

- E., Ficorella, C., Bosari, S., Arizzi, C. D., Miyaki, M., Onda, M., Kampman, E., Diergaarde, B., Royds, J., Lothe, R. A., Diep, C. B., Meling, G. I., Ostrowski, J., Trzeciak, L., Guzinska-Ustymowicz, K., Zalewski, B., Capellá, G. M., Moreno, V., Peinado, M. A., Lönnroth, C., Lundholm, K., Sun, X. F., Jansson, A., Bouzourene, H., Hsieh, L.-L., Tang, R., Smith, D. R., Allen-Mersh, T. G., Khan, Z. A. J., Shorthouse, A. J., Silverman, M. L., Kato, S., Ishioka, C., und Group, T. P.-C. R. C. C. (2006). Functional categories of tp53 mutation in colorectal cancer: results of an international collaborative study. *Ann Oncol*, 17(5):842–847.
- ichi Watanabe, K., Ozaki, T., Nakagawa, T., Miyazaki, K., Takahashi, M., Hosoda, M., Hayashi, S., Todo, S., und Nakagawara, A. (2002). Physical interaction of p73 with c-myc and mm1, a c-myc-binding protein, and modulation of the p73 function. *J Biol Chem*, 277(17):15113–15123.
- Inoue, T., Stuart, J., Leno, R., und Maki, C. G. (2002). Nuclear import and export signals in control of the p53-related protein p73. *J Biol Chem*, 277(17):15053–15060.
- Irwin, M., Marin, M. C., Phillips, A. C., Seelan, R. S., Smith, D. I., Liu, W., Flores, E. R., Tsai, K. Y., Jacks, T., Vousden, K. H., und Kaelin, W. G. (2000). Role for the p53 homologue p73 in e2f-1-induced apoptosis. *Nature*, 407(6804):645–648.
- Irwin, M. S. und Kaelin, W. G. (2001). Role of the newer p53 family proteins in malignancy. *Apoptosis*, 6(1-2):17–29.
- Ishimoto, O., Kawahara, C., Enjo, K., Obinata, M., Nukiwa, T., und Ikawa, S. (2002). Possible oncogenic potential of deltanp73: a newly identified isoform of human p73. *Cancer Res*, 62(3):636–641.
- Iwakuma, T. und Lozano, G. (2007). Crippling p53 activities via knock-in mutations in mouse models. *Oncogene*, 26(15):2177–2184.
- Jacks, T., Remington, L., Williams, B. O., Schmitt, E. M., Halachmi, S., Bronson, R. T., und Weinberg, R. A. (1994). Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr Biol*, 4(1):1–7.
- Jeffrey, P. D., Gorina, S., und Pavletich, N. P. (1995). Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science*, 267(5203):1498–1502.
- Jones, E. V., Dickman, M. J., und Whitmarsh, A. J. (2007). Regulation of p73-mediated apoptosis by c-jun n-terminal kinase. *Biochem J*, 405(3):617–623.
- Jost, C. A., Marin, M. C., und Kaelin, W. G. (1997). p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature*, 389(6647):191–194.

- Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J. C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J. M., Dumont, X., Ferrara, P., McKeon, F., und Caput, D. (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*, 90(4):809–819.
- Kartasheva, N. N., Contente, A., Lenz-Stöppler, C., Roth, J., und Dobbelstein, M. (2002). p53 induces the expression of its antagonist p73 delta n, establishing an autoregulatory feedback loop. *Oncogene*, 21(31):4715–4727.
- Kastan, M. B., Radin, A. I., Kuerbitz, S. J., Onyekwere, O., Wolkow, C. A., Civin, C. I., Stone, K. D., Woo, T., Ravindranath, Y., und Craig, R. W. (1991). Levels of p53 protein increase with maturation in human hematopoietic cells. *Cancer Res*, 51(16):4279–4286.
- Kato, S., Han, S.-Y., Liu, W., Otsuka, K., Shibata, H., Kanamaru, R., und Ishioka, C. (2003). Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(14):8424–8429.
- Katoh, I., Aisaki, K. I., Kurata, S. I., Ikawa, S., und Ikawa, Y. (2000). p51a (tap63gamma), a p53 homolog, accumulates in response to dna damage for cell regulation. *Oncogene*, 19(27):3126–3130.
- Keller, C., Arenkiel, B. R., Coffin, C. M., El-Bardeesy, N., DePinho, R. A., und Capocchi, M. R. (2004). Alveolar rhabdomyosarcomas in conditional pax3:fkhr mice: cooperativity of ink4a/arf and trp53 loss of function. *Genes Dev*, 18(21):2614–2626.
- Kemp, C. J., Donehower, L. A., Bradley, A., und Balmain, A. (1993). Reduction of p53 gene dosage does not increase initiation or promotion but enhances malignant progression of chemically induced skin tumors. *Cell*, 74(5):813–822.
- Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M., und Rajewsky, K. (1995). Inducible gene targeting in mice. *Science*, 269(5229):1427–1429.
- Knudson, A. G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68(4):820–823.
- Ko, L. J. und Prives, C. (1996). p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*, 10(9):1054–1072.
- Koga, F., Kawakami, S., Kumagai, J., Takizawa, T., Ando, N., Arai, G., Kageyama, Y., und Kihara, K. (2003). Impaired delta np63 expression associates with reduced beta-catenin and aggressive phenotypes of urothelial neoplasms. *Br J Cancer*, 88(5):740–747.

- Kovalev, S., Marchenko, N., Swendeman, S., LaQuaglia, M., und Moll, U. M. (1998). Expression level, allelic origin, and mutation analysis of the p73 gene in neuroblastoma tumors and cell lines. *Cell Growth Differ*, 9(11):897–903.
- Kubbutat, M. H., Jones, S. N., und Vousden, K. H. (1997). Regulation of p53 stability by mdm2. *Nature*, 387(6630):299–303.
- Lane, D. P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358(6381):15–16.
- Lane, D. P. und Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in sv40-transformed cells. *Nature*, 278(5701):261–263.
- Laurenzi, V. D., Costanzo, A., Barcaroli, D., Terrinoni, A., Falco, M., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Levrero, M., und Melino, G. (1998). Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. *J Exp Med*, 188(9):1763–1768.
- Laurenzi, V. D., Raschellá, G., Barcaroli, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Ranalli, M., Catani, M. V., Tanno, B., Costanzo, A., Levrero, M., und Melino, G. (2000a). Induction of neuronal differentiation by p73 in a neuroblastoma cell line. *J Biol Chem*, 275(20):15226–15231.
- Laurenzi, V. D., Rossi, A., Terrinoni, A., Barcaroli, D., Levrero, M., Costanzo, A., Knight, R. A., Guerrieri, P., und Melino, G. (2000b). p63 and p73 transactivate differentiation gene promoters in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 273(1):342–346.
- Laurenzi, V. D. D., Catani, M. V., Terrinoni, A., Corazzari, M., Melino, G., Costanzo, A., Levrero, M., und Knight, R. A. (1999). Additional complexity in p73: induction by mitogens in lymphoid cells and identification of two new splicing variants epsilon and zeta. *Cell Death Differ*, 6(5):389–390.
- Lee, C. W. und Thangue, N. B. L. (1999). Promoter specificity and stability control of the p53-related protein p73. *Oncogene*, 18(29):4171–4181.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., und Barhanin, J. (1996). Twik-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying k<sup>+</sup> channel with a novel structure. *EMBO J*, 15(5):1004–1011.
- Levine, A. J., Wu, M. C., Chang, A., Silver, A., Attiyeh, E. F., Lin, J., und Epstein, C. B. (1995). The spectrum of mutations at the p53 locus. evidence for tissue-specific mutagenesis, selection of mutant alleles, and a “gain of function” phenotype. *Ann N Y Acad Sci*, 768:111–128.
- Li, F. P. und Fraumeni, J. F. (1969). Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. *J Natl Cancer Inst*, 43(6):1365–1373.

- Liefer, K. M., Koster, M. I., Wang, X. J., Yang, A., McKeon, F., und Roop, D. R. (2000). Down-regulation of p63 is required for epidermal uv-b-induced apoptosis. *Cancer Res*, 60(15):4016–4020.
- Linzer, D. I. und Levine, A. J. (1979). Characterization of a 54k dalton cellular sv40 tumor antigen present in sv40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, 17(1):43–52.
- Lowe, S. W. (1999). Activation of p53 by oncogenes. *Endocr Relat Cancer*, 6(1):45–48.
- Lowe, S. W., Cepero, E., und Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 432(7015):307–315.
- Lowe, S. W. und Lin, A. W. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3):485–495.
- Lozano, G. (2007). The oncogenic roles of p53 mutants in mouse models. *Curr Opin Genet Dev*, 17(1):66–70.
- Mai, M., Yokomizo, A., Qian, C., Yang, P., Tindall, D. J., Smith, D. I., und Liu, W. (1998). Activation of p73 silent allele in lung cancer. *Cancer Res*, 58(11):2347–2349.
- Malkin, D. (1993). p53 and the li-fraumeni syndrome. *Cancer Genet Cytogenet*, 66(2):83–92.
- Malkin, D., Li, F. P., Strong, L. C., Fraumeni, J. F., Nelson, C. E., Kim, D. H., Kassel, J., Gryka, M. A., Bischoff, F. Z., und Tainsky, M. A. (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*, 250(4985):1233–1238.
- Mantovani, F., Piazza, S., Gostissa, M., Strano, S., Zacchi, P., Mantovani, R., Blandino, G., und Sal, G. D. (2004). Pin1 links the activities of c-abl and p300 in regulating p73 function. *Mol Cell*, 14(5):625–636.
- Marin, M. C., Jost, C. A., Irwin, M. S., DeCaprio, J. A., Caput, D., und Kaelin, W. G. (1998). Viral oncoproteins discriminate between p53 and the p53 homolog p73. *Mol Cell Biol*, 18(11):6316–6324.
- Martinez-Delgado, B., Melendez, B., Cuadros, M., Garcia, M. J., Nomdedeu, J., Rivas, C., Fernandez-Piqueras, J., und Benítez, J. (2002). Frequent inactivation of the p73 gene by abnormal methylation or loh in non-hodgkin's lymphomas. *Int J Cancer*, 102(1):15–19.

- Massion, P. P., Taflan, P. M., Rahman, S. M. J., Yildiz, P., Shyr, Y., Edgerton, M. E., Westfall, M. D., Roberts, J. R., Pietenpol, J. A., Carbone, D. P., und Gonzalez, A. L. (2003). Significance of p63 amplification and overexpression in lung cancer development and prognosis. *Cancer Res*, 63(21):7113–7121.
- Meek, D. W. (1999). Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene*, 18(53):7666–7675.
- Melchior, F. und Hengst, L. (2002). Sumo-1 and p53. *Cell Cycle*, 1(4):245–249.
- Melero, J. A., Stitt, D. T., Mangel, W. F., und Carroll, R. B. (1979). Identification of new polypeptide species (48-55k) immunoprecipitable by antiserum to purified large t antigen and present in sv40-infected and -transformed cells. *Virology*, 93(2):466–480.
- Melino, G., Laurenzi, V. D., und Vousden, K. H. (2002). p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 2(8):605–615.
- Melino, G., Lu, X., Gasco, M., Crook, T., und Knight, R. A. (2003). Functional regulation of p73 and p63: development and cancer. *Trends Biochem Sci*, 28(12):663–670.
- Merlino, G. und Helman, L. J. (1999). Rhabdomyosarcoma—working out the pathways. *Oncogene*, 18(38):5340–5348.
- Mills, A. A., Zheng, B., Wang, X. J., Vogel, H., Roop, D. R., und Bradley, A. (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature*, 398(6729):708–713.
- Minty, A., Dumont, X., Kaghad, M., und Caput, D. (2000). Covalent modification of p73alpha by sumo-1. two-hybrid screening with p73 identifies novel sumo-1-interacting proteins and a sumo-1 interaction motif. *J Biol Chem*, 275(46):36316–36323.
- Miyashita, T. und Reed, J. C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80(2):293–299.
- Müller, M., Schilling, T., Sayan, A. E., Kairat, A., Lorenz, K., Schulze-Bergkamen, H., Oren, M., Koch, A., Tannapfel, A., Stremmel, W., Melino, G., und Krammer, P. H. (2005). Tap73/delta np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell Death Differ*, 12(12):1564–1577.
- Moll, U. M. und Slade, N. (2004). p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res*, 2(7):371–386.
- Murray-Zmijewski, F., Lane, D. P., und Bourdon, J.-C. (2006). p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ*, 13(6):962–972.

- Nakagawa, T., Takahashi, M., Ozaki, T., Ichi Watanabe Ki, K., Todo, S., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., und Nakagawara, A. (2002). Autoinhibitory regulation of p73 by delta np73 to modulate cell survival and death through a p73-specific target element within the delta np73 promoter. *Mol Cell Biol*, 22(8):2575–2585.
- Nakano, K. und Vousden, K. H. (2001). Puma, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*, 7(3):683–694.
- Nigro, J. M., Baker, S. J., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S. H., Davidson, N., Baylin, S., und Devilee, P. (1989). Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, 342(6250):705–708.
- Novitch, B. G., Mulligan, G. J., Jacks, T., und Lassar, A. B. (1996). Skeletal muscle cells lacking the retinoblastoma protein display defects in muscle gene expression and accumulate in S and G2 phases of the cell cycle. *J Cell Biol*, 135(2):441–456.
- Oberst, A., Rossi, M., Salomoni, P., Pandolfi, P. P., Oren, M., Melino, G., und Bernassola, F. (2005). Regulation of the p73 protein stability and degradation. *Biochem Biophys Res Commun*, 331(3):707–712.
- Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., und Tanaka, N. (2000). Noxa, a bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science*, 288(5468):1053–1058.
- Oliner, J. D., Kinzler, K. W., Meltzer, P. S., George, D. L., und Vogelstein, B. (1992). Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*, 358(6381):80–83.
- Oliner, J. D., Pietenpol, J. A., Thiagalingam, S., Gyuris, J., Kinzler, K. W., und Vogelstein, B. (1993). Oncoprotein mdm2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature*, 362(6423):857–860.
- Olivier, M., Eeles, R., Hollstein, M., Khan, M. A., Harris, C. C., und Hainaut, P. (2002). The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat*, 19(6):607–614.
- Osada, M., Ohba, M., Kawahara, C., Ishioka, C., Kanamaru, R., Katoh, I., Ikawa, Y., Nimura, Y., Nakagawara, A., Obinata, M., und Ikawa, S. (1998). Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat Med*, 4(7):839–843.
- Oswald, C. und Stiewe, T. (2008). In good times and bad: p73 in cancer. *Cell Cycle*, 7(12):1726–1731.

- Park, B. J., Lee, S. J., Kim, J. I., Lee, S. J., Lee, C. H., Chang, S. G., Park, J. H., und Chi, S. G. (2000). Frequent alteration of p63 expression in human primary bladder carcinomas. *Cancer Res*, 60(13):3370–3374.
- Pediconi, N., Ianari, A., Costanzo, A., Belloni, L., Gallo, R., Cimino, L., Porcellini, A., Screpanti, I., Balsano, C., Alesse, E., Gulino, A., und Levrero, M. (2003). Differential regulation of e2f1 apoptotic target genes in response to dna damage. *Nat Cell Biol*, 5(6):552–558.
- Pellegrini, G., Dellambra, E., Golisano, O., Martinelli, E., Fantozzi, I., Bondanza, S., Ponzin, D., McKeon, F., und Luca, M. D. (2001). p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(6):3156–3161.
- Perez-Losada, J., Wu, D., DelRosario, R., Balmain, A., und Mao, J.-H. (2005). p63 and p73 do not contribute to p53-mediated lymphoma suppressor activity in vivo. *Oncogene*, 24(35):5521–5524.
- Petitjean, A., Achatz, M. I. W., Borresen-Dale, A. L., Hainaut, P., und Olivier, M. (2007a). Tp53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene*, 26(15):2157–2165.
- Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S. V., Hainaut, P., und Olivier, M. (2007b). Impact of mutant p53 functional properties on tp53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the iarc tp53 database. *Hum Mutat*, 28(6):622–629.
- Petrenko, O., Zaika, A., und Moll, U. M. (2003). deltanp73 facilitates cell immortalization and cooperates with oncogenic ras in cellular transformation in vivo. *Mol Cell Biol*, 23(16):5540–5555.
- Picksley, S. M., Vojtesek, B., Sparks, A., und Lane, D. P. (1994). Immunochemical analysis of the interaction of p53 with mdm2;—fine mapping of the mdm2 binding site on p53 using synthetic peptides. *Oncogene*, 9(9):2523–2529.
- Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liégeois, N. J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H. W., Cordon-Cardo, C., und DePinho, R. A. (1998). The ink4a tumor suppressor gene product, p19arf, interacts with mdm2 and neutralizes mdm2's inhibition of p53. *Cell*, 92(6):713–723.
- Porrello, A., Cerone, M. A., Coen, S., Gurtner, A., Fontemaggi, G., Cimino, L., Piaggio, G., Sacchi, A., und Soddu, S. (2000). p53 regulates myogenesis by triggering the differentiation activity of prb. *J Cell Biol*, 151(6):1295–1304.
- Pozniak, C. D., Barnabé-Heider, F., Rymar, V. V., Lee, A. F., Sadikot, A. F., und Miller, F. D. (2002). p73 is required for survival and maintenance of cns neurons. *J Neurosci*, 22(22):9800–9809.

- Pozniak, C. D., Radinovic, S., Yang, A., McKeon, F., Kaplan, D. R., und Miller, F. D. (2000). An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science*, 289(5477):304–306.
- Prives, C. und Hall, P. A. (1999). The p53 pathway. *J Pathol*, 187(1):112–126.
- Ramadan, S., Terrinoni, A., Catani, M. V., Sayan, A. E., Knight, R. A., Mueller, M., Krammer, P. H., Melino, G., und Candi, E. (2005). p73 induces apoptosis by different mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun*, 331(3):713–717.
- Raycroft, L., Wu, H. Y., und Lozano, G. (1990). Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science*, 249(4972):1049–1051.
- Rocco, J. W. und Ellisen, L. W. (2006). p63 and p73: life and death in squamous cell carcinoma. *Cell Cycle*, 5(9):936–940.
- Rocco, J. W., Leong, C.-O., Kuperwasser, N., DeYoung, M. P., und Ellisen, L. W. (2006). p63 mediates survival in squamous cell carcinoma by suppression of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell*, 9(1):45–56.
- Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Lane, D. P., und Hay, R. T. (2000). Multiple c-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol*, 20(22):8458–8467.
- Rossi, M., Laurenzi, V. D., Munarriz, E., Green, D. R., Liu, Y.-C., Vousden, K. H., Cesareni, G., und Melino, G. (2005). The ubiquitin-protein ligase itch regulates p73 stability. *EMBO J*, 24(4):836–848.
- Roth, J., König, C., Wienzek, S., Weigel, S., Ristea, S., und Dobbelstein, M. (1998). Inactivation of p53 but not p73 by adenovirus type 5 e1b 55-kilodalton and e4 34-kilodalton oncoproteins. *J Virol*, 72(11):8510–8516.
- Sah, V. P., Attardi, L. D., Mulligan, G. J., Williams, B. O., Bronson, R. T., und Jacks, T. (1995). A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly. *Nat Genet*, 10(2):175–180.
- Saifudeen, Z., Diavolitsis, V., Stefkova, J., Dipp, S., Fan, H., und El-Dahr, S. S. (2005). Spatiotemporal switch from delta $\alpha$ p73 to  $\alpha$ p73 isoforms during nephrogenesis: impact on differentiation gene expression. *J Biol Chem*, 280(24):23094–23102.
- Sakaguchi, K., Herrera, J. E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C. W., und Appella, E. (1998). Dna damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev*, 12(18):2831–2841.

- Sanchez-Prieto, R., Sanchez-Arevalo, V. J., Servitja, J.-M., und Gutkind, J. S. (2002). Regulation of p73 by c-abl through the p38 map kinase pathway. *Oncogene*, 21(6):974–979.
- Sasaki, Y., Morimoto, I., Ishida, S., Yamashita, T., Imai, K., und Tokino, T. (2001). Adenovirus-mediated transfer of the p53 family genes, p73 and p51/p63 induces cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cell lines: potential application to gene therapy of colorectal cancer. *Gene Ther*, 8(18):1401–1408.
- Scaruffi, P., Casciano, I., Masiero, L., Basso, G., Romani, M., und Tonini, G. P. (2000). Lack of p73 expression in mature b-all and identification of three new splicing variants restricted to pre b and c-all indicate a role of p73 in b cell all differentiation. *Leukemia*, 14(3):518–519.
- Schmid, P., Lorenz, A., Hameister, H., und Montenarh, M. (1991). Expression of p53 during mouse embryogenesis. *Development*, 113(3):857–865.
- Schmitt, C. A., Fridman, J. S., Yang, M., Baranov, E., Hoffman, R. M., und Lowe, S. W. (2002). Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. *Cancer Cell*, 1(3):289–298.
- Schmitt, C. A., McCurrach, M. E., de Stanchina, E., Wallace-Brodeur, R. R., und Lowe, S. W. (1999). Ink4a/arf mutations accelerate lymphomagenesis and promote chemoresistance by disabling p53. *Genes Dev*, 13(20):2670–2677.
- Schwenk, F., Baron, U., und Rajewsky, K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxp-flanked gene segments including deletion in germ cells. *Nucleic Acids Res*, 23(24):5080–5081.
- Senoo, M., Manis, J. P., Alt, F. W., und McKeon, F. (2004). p63 and p73 are not required for the development and p53-dependent apoptosis of t cells. *Cancer Cell*, 6(1):85–89.
- Sherr, C. J. und Weber, J. D. (2000). The arf/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev*, 10(1):94–99.
- Simões-Wüst, A. P., Sigrist, B., Belyanskaya, L., Donaldson, S. H., Stahel, R. A., und Zangemeister-Wittke, U. (2005). Deltap73 antisense activates puma and induces apoptosis in neuroblastoma cells. *J Neurooncol*, 72(1):29–34.
- Slade, N., Zaika, A. I., Erster, S., und Moll, U. M. (2004). Deltap73 stabilises tap73 proteins but compromises their function due to inhibitory hetero-oligomer formation. *Cell Death Differ*, 11(3):357–360.
- Sniezek, J. C., Matheny, K. E., Westfall, M. D., und Pietenpol, J. A. (2004). Dominant negative p63 isoform expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*, 114(12):2063–2072.

- Soddu, S., Blandino, G., Scardigli, R., Coen, S., Marchetti, A., Rizzo, M. G., Bossi, G., Cimino, L., Crescenzi, M., und Sacchi, A. (1996). Interference with p53 protein inhibits hematopoietic and muscle differentiation. *J Cell Biol*, 134(1):193–204.
- Soengas, M. S. und Lowe, S. W. (2000). p53 and p73: seeing double? *Nat Genet*, 26(4):391–392.
- Steegenga, W. T., Shvarts, A., Riteco, N., Bos, J. L., und Jochemsen, A. G. (1999). Distinct regulation of p53 and p73 activity by adenovirus e1a, e1b, and e4orf6 proteins. *Mol Cell Biol*, 19(5):3885–3894.
- Stiewe, T. (2007). The p53 family in differentiation and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*, 7(3):165–168.
- Stiewe, T. und Pützer, B. M. (2000). Role of the p53-homologue p73 in e2f1-induced apoptosis. *Nat Genet*, 26(4):464–469.
- Stiewe, T. und Pützer, B. M. (2002). Role of p73 in malignancy: tumor suppressor or oncogene? *Cell Death Differ*, 9(3):237–245.
- Stiewe, T., Stanelle, J., Theseling, C. C., Pollmeier, B., Beitzinger, M., und Pützer, B. M. (2003). Inactivation of retinoblastoma (rb) tumor suppressor by oncogenic isoforms of the p53 family member p73. *J Biol Chem*, 278(16):14230–14236.
- Stiewe, T., Theseling, C. C., und Pützer, B. M. (2002a). Transactivation-deficient delta ta-p73 inhibits p53 by direct competition for dna binding: implications for tumorigenesis. *J Biol Chem*, 277(16):14177–14185.
- Stiewe, T., Tuve, S., Peter, M., Tannapfel, A., Elmaagacli, A. H., und Pützer, B. M. (2004). Quantitative tp73 transcript analysis in hepatocellular carcinomas. *Clin Cancer Res*, 10(2):626–633.
- Stiewe, T., Zimmermann, S., Frilling, A., Esche, H., und Pützer, B. M. (2002b). Transactivation-deficient deltata-p73 acts as an oncogene. *Cancer Res*, 62(13):3598–3602.
- Strano, S., Monti, O., Pediconi, N., Baccarini, A., Fontemaggi, G., Lapi, E., Mantovani, F., Damalas, A., Citro, G., Sacchi, A., Sal, G. D., Levrero, M., und Blandino, G. (2005). The transcriptional coactivator yes-associated protein drives p73 gene-target specificity in response to dna damage. *Mol Cell*, 18(4):447–459.
- Sun, X.-F. (2002). p73 overexpression is a prognostic factor in patients with colorectal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*, 8(1):165–170.
- Sunahara, M., Ichimiya, S., Nimura, Y., Takada, N., Sakiyama, S., Sato, Y., Todo, S., Adachi, W., Amano, J., und Nakagawara, A. (1998). Mutational analysis of the p73 gene localized at chromosome 1p36.3 in colorectal carcinomas. *Int J Oncol*, 13(2):319–323.

- Sunahara, M., Shishikura, T., Takahashi, M., Todo, S., Yamamoto, N., Kimura, H., Kato, S., Ishioka, C., Ikawa, S., Ikawa, Y., und Nakagawara, A. (1999). Mutational analysis of p51a/tap63gamma, a p53 homolog, in non-small cell lung cancer and breast cancer. *Oncogene*, 18(25):3761–3765.
- Talos, F., Nemaajerova, A., Flores, E. R., Petrenko, O., und Moll, U. M. (2007). p73 suppresses polyploidy and aneuploidy in the absence of functional p53. *Mol Cell*, 27(4):647–659.
- Tamir, Y. und Bengal, E. (1998). p53 protein is activated during muscle differentiation and participates with myod in the transcription of muscle creatine kinase gene. *Oncogene*, 17(3):347–356.
- Tannapfel, A., John, K., Mise, N., Schmidt, A., Buhlmann, S., Ibrahim, S. M., und Pützer, B. M. (2008). Autonomous growth and hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing the p53 family inhibitor dnp73. *Carcinogenesis*, 29(1):211–218.
- Tannapfel, A., Wasner, M., Krause, K., Geissler, F., Katalinic, A., Hauss, J., Mössner, J., Engeland, K., und Wittekind, C. (1999). Expression of p73 and its relation to histopathology and prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 91(13):1154–1158.
- Tomasini, R., Tsuchihara, K., Wilhelm, M., Fujitani, M., Rufini, A., Cheung, C. C., Khan, F., Itie-Youten, A., Wakeham, A., Tsao, M.-S., Iovanna, J. L., Squire, J., Jurisica, I., Kaplan, D., Melino, G., Jurisicova, A., und Mak, T. W. (2008). Tap73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes Dev*, 22(19):2677–2691.
- Tschan, M. P., Grob, T. J., Peters, U. R., Laurenzi, V. D., Huegli, B., Kreuzer, K. A., Schmidt, C. A., Melino, G., Fey, M. F., Tobler, A., und Cajot, J. F. (2000). Enhanced p73 expression during differentiation and complex p73 isoforms in myeloid leukemia. *Biochem Biophys Res Commun*, 277(1):62–65.
- Tuve, S., Wagner, S. N., Schitteck, B., und Pützer, B. M. (2004). Alterations of deltata-p 73 splice transcripts during melanoma development and progression. *Int J Cancer*, 108(1):162–166.
- Uramoto, H., Sugio, K., Oyama, T., Nakata, S., Ono, K., Morita, M., Funa, K., und Yasumoto, K. (2004). Expression of deltanp73 predicts poor prognosis in lung cancer. *Clin Cancer Res*, 10(20):6905–6911.
- Urist, M., Tanaka, T., Poyurovsky, M. V., und Prives, C. (2004). p73 induction after dna damage is regulated by checkpoint kinases chk1 and chk2. *Genes Dev*, 18(24):3041–3054.

- Urist, M. J., Como, C. J. D., Lu, M.-L., Charytonowicz, E., Verbel, D., Crum, C. P., Ince, T. A., McKeon, F. D., und Cordon-Cardo, C. (2002). Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer. *Am J Pathol*, 161(4):1199–1206.
- Vikhanskaya, F., Bani, M. R., Borsotti, P., Ghilardi, C., Ceruti, R., Ghisleni, G., Marabese, M., Giavazzi, R., Broggin, M., und Taraboletti, G. (2001a). p73 overexpression increases vegf and reduces thrombospondin-1 production: implications for tumor angiogenesis. *Oncogene*, 20(50):7293–7300.
- Vikhanskaya, F., Marchini, S., Marabese, M., Galliera, E., und Broggin, M. (2001b). P73a overexpression is associated with resistance to treatment with dna-damaging agents in a human ovarian cancer cell line. *Cancer Res*, 61(3):935–938.
- Vikhanskaya, F., Toh, W. H., Dulloo, I., Wu, Q., Boominathan, L., Ng, H. H., Vousden, K. H., und Sabapathy, K. (2007). p73 supports cellular growth through c-jun-dependent ap-1 transactivation. *Nat Cell Biol*, 9(6):698–705.
- Vogelstein, B., Lane, D., und Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, 408(6810):307–310.
- Vousden, K. H. und Lane, D. P. (2007). p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(4):275–283.
- Wager, M., Guilhot, J., Blanc, J.-L., Ferrand, S., Milin, S., Bataille, B., Lapierre, F., Denis, S., Chantereau, T., Larsen, C.-J., und Karayan-Tapon, L. (2006). Prognostic value of increase in transcript levels of tp73 deltaex2-3 isoforms in low-grade glioma patients. *Br J Cancer*, 95(8):1062–1069.
- Watanabe, T., Huang, H., Nakamura, M., Wischhusen, J., Weller, M., Kleihues, P., und Ohgaki, H. (2002). Methylation of the p73 gene in gliomas. *Acta Neuropathol*, 104(4):357–362.
- Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D., und Levine, A. J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev*, 7(7A):1126–1132.
- Yang, A., Kaghad, M., Caput, D., und McKeon, F. (2002). On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet*, 18(2):90–95.
- Yang, A., Kaghad, M., Wang, Y., Gillett, E., Fleming, M. D., Dötsch, V., Andrews, N. C., Caput, D., und McKeon, F. (1998). p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*, 2(3):305–316.
- Yang, A. und McKeon, F. (2000). P63 and p73: P53 mimics, menaces and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1(3):199–207.

- Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R. T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C., und McKeon, F. (1999). p3 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*, 398(6729):714–718.
- Yang, A., Walker, N., Bronson, R., Kaghad, M., Oosterwegel, M., Bonnin, J., Vagner, C., Bonnet, H., Dikkes, P., Sharpe, A., McKeon, F., und Caput, D. (2000). p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature*, 404(6773):99–103.
- Yanglin, P., Lina, Z., Zhiguo, L., Na, L., Haifeng, J., Guoyun, Z., Jie, L., Jun, W., Tao, L., Li, S., Taidong, Q., Jianhong, W., und Daiming, F. (2007). Kcne2, a down-regulated gene identified by in silico analysis, suppressed proliferation of gastric cancer cells. *Cancer Lett*, 246(1-2):129–138.
- Yokomizo, A., Mai, M., Bostwick, D. G., Tindall, D. J., Qian, J., Cheng, L., Jenkins, R. B., Smith, D. I., und Liu, W. (1999). Mutation and expression analysis of the p73 gene in prostate cancer. *Prostate*, 39(2):94–100.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W., und Vogelstein, B. (2001). Puma induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell*, 7(3):673–682.
- Yuan, Z. M., Shioya, H., Ishiko, T., Sun, X., Gu, J., Huang, Y. Y., Lu, H., Kharbanda, S., Weichselbaum, R., und Kufe, D. (1999). p73 is regulated by tyrosine kinase c-abl in the apoptotic response to dna damage. *Nature*, 399(6738):814–817.
- Zaika, A., Irwin, M., Sansome, C., und Moll, U. M. (2001). Oncogenes induce and activate endogenous p73 protein. *J Biol Chem*, 276(14):11310–11316.
- Zaika, A. I., Kovalev, S., Marchenko, N. D., und Moll, U. M. (1999). Overexpression of the wild type p73 gene in breast cancer tissues and cell lines. *Cancer Res*, 59(13):3257–3263.
- Zaika, A. I., Slade, N., Erster, S. H., Sansome, C., Joseph, T. W., Pearl, M., Chalas, E., und Moll, U. M. (2002). Deltanp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and tap73, is up-regulated in human tumors. *J Exp Med*, 196(6):765–780.
- Zhang, J. und Chen, X. (2007). Deltanp73 modulates nerve growth factor-mediated neuronal differentiation through repression of trka. *Mol Cell Biol*, 27(10):3868–3880.
- Zhu, J., Jiang, J., Zhou, W., und Chen, X. (1998). The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res*, 58(22):5061–5065.
- Zindy, F., Eischen, C. M., Randle, D. H., Kamijo, T., Cleveland, J. L., Sherr, C. J., und Roussel, M. F. (1998). Myc signaling via the arf tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev*, 12(15):2424–2433.

## Danksagung

Als erstes danke ich Prof. Thorsten Stiewe für seine kontinuierliche Unterstützung und seine richtungsweisenden Tipps, durch die ich viel gelernt habe und profitiere. Des Weiteren danke ich Dr. Nicole Hüttinger, die mich fachkundig in die Welt der Mäuse eingearbeitet hat und der ich mein ganzes Wissen und Können im Tierversuchsbereich verdanke.

Darüber hinaus bedanke ich mich auch bei allen Autoren und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Stiewe, ohne deren Bemühungen und Arbeitseinsatz die Publikationen nicht entstanden wären.

Ein großer Dank geht an die Mädels im Labor: Claudia – „Ich versteh es nicht, das kann doch nicht sein“ – Koch (ehemals Oswald), Katha – „Die Welt könnte aus Milchschaum und Schokolade bestehen“ - Schlereth und Anne - „Ich muß noch Zellkultur machen“ – Bretz (Danke für das Korrekturlesen und die Mausi-Betreuung :o)). Gemeinsame Koch-, Grill- und Schokofondueabende mit euch haben den Laboralltag und manch gescheiterten Versuch vergessen lassen. Kurz gesagt, ein Spitzenteam, das alle Probleme in jeder Lage gemeinsam gemeistert hat! Es war klasse mit euch zusammenzuarbeiten!

Auch meiner gesamten Familie (auch die, die es nicht mehr erleben können) und meinen Freunden (Maren-Stefan mit klein Finn, Alex, Dana-Jürgen) außerhalb des Labors kommt ein großer Dank für ihre Unterstützung und Vertrauen zu. Ich entschuldige mich hiermit für die unzähligen Vernachlässigungen.

Meinen Großeltern, Gisela und Fredi, danke ich ganz besonders für ihre Unterstützung. Ihr habt mir das Studium und alles andere erst ermöglicht. Vielen, vielen Dank!!!

Und nicht zuletzt geht ein riesengroßes Dankeschön an Mario. Du hast mich durch die Jahre der Promotion begleitet und gemeinsam haben wir Höhen und Tiefen erlebt. Vielen Dank für dein Verständnis, wenn ich manches Wochenende nicht daheim war und deine unglaubliche Unterstützung.

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

---

Name: Heidi Griesmann  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Geburtsdatum: 22.09.1979  
Geburtsort: Schmalkalden

## Schulbildung

---

1990-1998 allg. Hochschulreife  
Philipp-Melanchthon-Gymnasium-Schmalkalden

## Hochschulstudium

---

10/1999 – 10/2004 Studium der Biologie  
an der J. W. Goethe Universität Frankfurt/Main  
Hauptfach: Zell- und Entwicklungsbiologie  
Nebenfächer: Neurobiologie, Toxikologie  
  
Diplomarbeit: „Generierung von  $\beta$ -Catenin Deletionsmutan-  
ten für Interaktionsanalysen mit Shrew1 TCD10 mit Hilfe  
der Bimolekularen Fluoreszenz-Komplementation“  
Institut für Humangenetik, Prof.Dr. Anna Starzinski-Powitz  
  
Abschluß: Diplom-Biologin

## Studententätigkeit

---

11/2002 – 02/2003 Mitarbeiterpraktikum in der Pharmazeutischen Biologie  
an der J. W. Goethe Universität, Prof.Dr. Theo Dingermann  
06/2003 – 08/2003 Studentische Hilfskraft, Arbeitsgruppe Starzinski-Powitz  
am Institut für Humangenetik der J. W. Goethe Universität

## Promotion

---

11/2004 – 12/2007 Promotion am DFG-Forschungsinstitut  
Rudolf-Virchow-Zentrum, Würzburg  
Abteilung für Molekulare Tumorbologie,  
Prof.Dr. Thorsten Stiewe  
  
Thema: „p73 in Differenzierung und Tumorigenese“  
  
seit 01/2008 Fortführung der Promotion  
Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie am  
Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT),  
Universität Marburg, Prof.Dr. Thorsten Stiewe

## Publikationsliste

Hüttinger-Kirchhof N, Cam H, Griesmann H, Hofmann L, Beitzinger M, Stiewe T. **The p53 family inhibitor  $\Delta Np73$  interferes with multiple developmental programs.** Cell Death Differ. 2006 Jan;13(1):174-7.

Cam H\*, Griesmann H\*, Beitzinger M, Hofmann L, Beinoraviciute-Kellner R, Sauer M, Hüttinger-Kirchhof N, Oswald C, Friedl P, Gattenlöhner S, Burek C, Rosenwald A, Stiewe T. **p53 family members in myogenic differentiation and rhabdomyosarcoma development.** Cancer Cell. 2006 Oct;10(4):281-93. (\*geteilte Erstautorenschaft)

Beitzinger M, Hofmann L, Oswald C, Beinoraviciute-Kellner R, Sauer M, Griesmann H, Bretz AC, Burek C, Rosenwald A, Stiewe T. **p73 poses a barrier to malignant transformation by limiting anchorage-independent growth.** EMBO J. 2008 Mar 5;27(5):792-803. Epub 2008 Jan 31.

Griesmann H\*, Schlereth K\*, Krause M, Samans B, Stiewe T. **p53 and p73 in suppression of Myc-driven lymphomagenesis.** Int J Cancer. 2008 Sep 2;124(2):502-506. (\*geteilte Erstautorenschaft)

## Anhang mit Publikationen 1-4