

Aus dem Institut für Molekulare Onkologie des
Zentrums für Tumor- und Immunbiologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. T. Stiewe

**Die Interaktion zwischen p53 und p73
als molekulare Zielstruktur in der Tumorthherapie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von
Maximilian Müller
aus Ilmenau
Marburg, 2018

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 06.03.2018

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Thorsten Stiewe

1. Korreferent: Prof. Dr. Thomas Wündisch

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
nicht-kommerziell
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
4.0 International Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.de>

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	8
1.1. Maligne Tumoren im Allgemeinen und ihre Entstehung	8
1.2. Der Tumorsuppressor p53	9
1.2.1. Funktion und Regulation von p53	9
1.2.2. Die Struktur von p53	10
1.3. Das p53-Familienmitglied p73	13
1.3.1. Regulation der p73-Isoformen.....	14
1.4. p73 in malignen Tumoren	15
1.5. Der Tumorsuppressor p53 in malignen Tumorzellen.....	16
1.5.1. Formen der p53 Inaktivierung in malignen Tumorzellen.....	16
1.5.2. Onkogenes Potential von mutierten p53-Proteinen	18
1.5.3. Die Interaktion zwischen p53-Mutanten und TAp73	19
1.5.4. P53- und p73-basierte Tumorthherapie	20
1.6. Fragestellungen	22
2. Material und Methoden	23
2.1. Material	23
2.1.1. Chemikalien.....	23
2.1.2. Organismen	23
2.1.2.1. Zelllinien	23
2.1.2.2. Bakterien	24
2.1.3. Plasmide	25
2.1.4. Oligonukleotide	26
2.1.4.1. Two-Step PCR-Primer.....	26
2.1.4.2. Multi Site-directed Mutagenesis Primer.....	27
2.1.4.3. Site-directed Mutagenesis Primer.....	27
2.1.4.4. Sequenzierungsprimer	27
2.1.5. Käufliche Komplettausstattungen – Kits.....	28
2.1.6. Verbrauchsmaterialien.....	29
2.1.7. Geräte	29
2.2. Methoden.....	30
2.2.1. Kultivierung von Bakterien auf Agarplatten und in Flüssigmedien.....	30
2.2.2. Transformation kompetenter E. coli Bakterien	30
2.2.2.1. chemische Transformation kompetenter E. coli Bakterien.....	30
2.2.2.2. elektrische Transformation kompetenter E. coli Bakterien	30
2.2.3. Plasmidisolierung durch alkalische Lyse	31
2.2.3.1. Mini Präparation.....	31
2.2.3.2. Midi Präparation.....	31

2.2.4.	DNA-Analyse	32
2.2.5.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	32
2.2.6.	Design von PCR-Primern	32
2.2.7.	Gelelektrophorese von DNA	33
2.2.8.	Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA	33
2.2.9.	DNA-Aufreinigung	34
2.2.9.1.	Aufreinigung von DNA in Lösung	34
2.2.9.2.	Aufreinigung nach DNA-Exzision aus Agarosegelen	34
2.2.10.	Konzentrationsbestimmung von DNA	34
2.2.11.	DNA-Sequenzierung	34
2.2.12.	Formen der Mutagenese und Klonierung mittels Gateway System®	35
2.2.13.	Mutagenese	35
2.2.13.1.	PCR Mutagenese (Two-Step PCR)	35
2.2.13.2.	Site-directed Mutagenese und Multi site-directed Mutagenese	37
2.2.14.	TOPO®-Klonierung	38
2.2.15.	Gateway® Klonierung und LR-Reaktion	38
2.2.16.	Analyse von Genpolymorphismen	39
2.2.17.	RFLP-Analyse	39
2.2.18.	SNP Genotyping basierend auf quantitativer Echtzeit-PCR	40
2.2.18.1.	quantitative Echtzeit-PCR (quantitative real time PCR, qRT-PCR)	40
2.2.18.2.	SNP Genotyping Assay	40
2.2.19.	Zellkultur	42
2.2.19.1.	Material	42
2.2.19.2.	Kultivierung vitaler Zellen	42
2.2.19.3.	Passage von Zellen	43
2.2.19.4.	Zellzahlbestimmung	43
2.2.19.5.	Einfrieren und Auftauen von Zellen	43
2.2.20.	Transiente Transfektion humaner Zellen	44
2.2.20.1.	Calcium-Phosphat-Präzipitation & Herstellung von Retroviren	44
2.2.20.2.	Transfektion mittels liposomaler und kationischer Komplexe	44
2.2.21.	Stabile Integration von DNA in humane Zellen durch virale Infektion	45
2.2.22.	Behandlung von Zellen mit zytotoxischen Substanzen	46
2.2.22.1.	Behandlung von Zellen mit RETRA	46
2.2.22.2.	Kombinationsbehandlung von Zellen mit RETRA und Etoposid	46
2.2.23.	Messung von Zytotoxizität durch Zellvitalitätsuntersuchungen (Viability Assay)	47
2.2.24.	Berechnung der mittleren letalen Dosis (LD50)	48
2.2.25.	Analyse von Substanzkombinationseffekten	48
2.2.26.	Luziferase Assay	49
2.2.27.	Proteinanalyse	50
2.2.28.	transiente Transfektion zu analysierender H1299-Zellen mit TP53-Mutanten	51

2.2.29.	Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen.....	51
2.2.30.	Proteinquantifizierung (Bradford).....	51
2.2.31.	Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	51
2.2.32.	Western Blotting.....	52
2.2.33.	Proteindetektion.....	53
2.2.33.1.	Immundetektion.....	53
2.2.33.2.	Fluoreszenzdetektion.....	53
3.	Ergebnisse	54
3.1.	Die Substanz RETRA in der Anwendung auf Zelllinien verschiedener Entität.....	54
3.2.	Retrospektive Analyse der erzielten RETRA-Effekte.....	56
3.2.1.	Einfluss des p53-Status auf die Wirksamkeit von RETRA	56
3.2.2.	Einfluss der Expressionslevel von p73-Isoformen auf die Wirkung von RETRA.....	57
3.2.3.	Einfluss der p53-Mutationart auf das Ansprechen auf RETRA	60
3.2.4.	Der TP53-Polymorphismus der Aminosäureposition 72.....	62
3.3.	Nachweis der Wirksamkeit von RETRA in vitro.....	66
3.3.1.	Klonierung der p53-Mutanten	67
3.3.2.	Auswirkungen der p53-Mutanten auf die Transkriptionsaktivität von WTP53 und TAp73	69
3.3.3.	Auswirkungen von RETRA auf die MUTp53-TAp73-Interaktion in vitro.....	73
3.4.	Analyse der RETRA-vermittelten Zytotoxizität	76
3.4.1.	Auswirkung eines veränderten p53-Mutationsstatus auf die Wirksamkeit von RETRA	76
3.4.2.	RETRA in Kombination mit Etoposid in der Behandlung von Tumorzelllinien mit unterschiedlichem p53-Mutationstatus.....	77
3.4.2.1.	RETRA in Kombination mit Etoposid in der Behandlung von p53-negativen und WTP53-exprimierenden Tumorzelllinien.....	78
3.4.2.2.	RETRA in Kombination mit Etoposid in der Behandlung von MUTp53-exprimierenden Zelllinien	80
4.	Diskussion	85
4.1.	RETRA vermittelt in vitro Zytotoxizität in Tumorzelllinien unabhängig des p53-Mutationsstatus.....	85
4.2.	Strukturbiologische Eigenschaften von mutierten p53-Proteinen haben keinen Einfluss auf die Zytotoxizität von RETRA	86
4.3.	Das endogene Transaktivierungspotential von mutierten p53-Proteinen.....	88
4.4.	Mutierte p53-Proteine beeinträchtigen das Transkriptionspotential von WTP53 und TAp73 in vitro	91
4.5.	RETRA stellt das durch MUTp53 gehemmte Transkriptionspotential von TAp73 in vitro wieder her.....	96
4.6.	Die zytotoxischen Effekte von RETRA korrelieren nicht mit der Expression der p73-Isoformen in vitro.....	99

4.7. RETRA besitzt in der Kombinationsbehandlung mit Etoposid additive und synergistische, zytotoxische Effekte auf Tumorzelllinien	100
5. Zusammenfassung.....	104
6. Summary	105
7. Quellenverzeichnis.....	106
8. Anhang	118

1. Einleitung

1.1. Maligne Tumoren im Allgemeinen und ihre Entstehung

Die Internationale Agentur für Krebsforschung (*IARC/WHO*) dokumentierte im Jahr 2012 weltweit 14,1 Millionen neue Krebserkrankungen und 8,2 Millionen krebsbedingte Todesfälle. Dies entsprach zu diesem Zeitpunkt einem Anteil an der globalen Mortalität von ca. 15%. Eine Prognose der WHO geht von einem Anstieg der Inzidenz maligner Erkrankungen von mind. 60% innerhalb der nächsten 20 Jahre aus (Ferlay et al. 2013). Diese Entwicklung ist auf Faktoren, wie demographische Veränderungen der wachsenden Weltbevölkerung und ihre Exposition gegenüber vermeidbarer Risikofaktoren zurückzuführen (z.B. Lebensstil, Impfratendefizite). Sie unterstreicht zudem die Notwendigkeit, das Wissen um die Biologie maligner Tumoren zu erweitern, um ihre Diagnostik, Therapie und Prävention zu verbessern.

Kernhaltige Zellen des menschlichen Körpers enthalten mindestens eine Kopie des kompletten Genoms. Der davon durch Gentranskription genutzte Anteil entspricht dem Genexpressionsprofil. Es ist gewebespezifisch und bestimmt sämtliche zelluläre Funktionsaspekte. Der potentiell mögliche Zugriff von Zellen auf alle Bereiche des Genoms ist die Voraussetzung für die Varianz und Evolution zellulärer Lebensformen. Er bietet jedoch auch die Grundlage für Zellentartung.

Bösartige Tumoren entstehen in der Regel in einem mehrstufigen Prozess aus einer gesunden Einzelzelle (monoklonale Einzelzellproliferation). Ihre maligne Transformation ist durch hereditäre und/oder erworbene Veränderungen auf genetischer und epigenetischer Ebene gekennzeichnet, die ein Ungleichgewicht aus wachstumshemmenden und -fördernden Vorgängen nach sich ziehen: sog. Proto-Onkogene vermitteln zelluläre Wachstumssignale. Sie sind in Tumoren häufig überaktiv. Tumorsuppressoren dienen hingegen der Einleitung von Zellwachstumsstopp, Reparaturmechanismen und programmiertem Zelltod (Apoptose). Sie sind in (prä-)malignen Zellen funktionell oft eingeschränkt oder funktionslos (Lee & Muller, 2010).

Die genannten Veränderungen führen in Tumorzellen zur Unabhängigkeit von endogenen und exogenen Signalen, die Zellteilung und -wachstum bzw. Wachstumshemmung und Zelltod vermitteln. Folge ist die unbegrenzte, monoklonale Vermehrung und Immortalisierung der Zellen. Der Mangel an DNA-Reparaturpotential und die hohe Zellvermehrungsrate bedingen zusätzlich hohe genomische Instabilität. Durch die Anhäufung von genetischen Aberrationen kommt es wiederum zur Entdifferenzierung der Zellen von ihrem Ursprungsgewebe, sowie zu Gewebeinvasion und Metastasierung. Der Erhaltung von malignen Zellen im Ursprungsgewebe dienen ein fehlregulierter Zellmetabolismus, tumoreigene Gefäßneubildung, Mechanismen der Immunevasion und die Erzeugung eines wachstumsförderlichen Mikromilieus (Hanahan & Weinberg 2011).

1.2. Der Tumorsuppressor p53

1.2.1. Funktion und Regulation von p53

Unter Tumorsuppressoren nimmt der Transkriptionsfaktor p53 aufgrund eines weitreichenden Funktionsspektrums eine zentrale Rolle ein. In humanen Zellen wird er durch das auf Chromosom 17 lokalisierte Gen *TP53* kodiert (17p13.1) (*NCBI GeneBank ID 7157*). P53 dient als sog. „Wächter des Genoms“ der Erhaltung genomischer Integrität und Zellhomöostase. Das Funktionsspektrum umfasst u.a. die Regulation von Zellwachstum, transienten und permanenten Zellzyklusarrest sowie des programmierten Zelltods (Apoptose). Zusätzlich ist p53 in zahlreiche zellprotektive Prozesse involviert, zu denen unter anderem die Reparatur von reversiblen DNA-Schäden, die Regulation von Autophagie und Zellmetabolismus und die Erhaltung des oxidativen Status gehören (Lane & Levine 2010).

Das Wildtypprotein p53 (Wtp53) vermittelt den größten Teil seiner tumorsuppressiven Funktionen als nukleärer Transkriptionsfaktor (el-Deiry et al. 1992; Menendez et al. 2009). Er unterliegt unter anderem auf RNA- und Proteinebene einer komplexen Regulationsstruktur (Kruse & Gu 2009). Infolge genotoxischer Stimuli, wie z.B. ionisierender Strahlung, Hypoxie, Ribonukleotidmangel, Telomerschäden oder zelleigene und –fremde Onkogene wird p53 über zahlreiche Signalkaskaden aktiviert. Dies umfasst die Stabilisierung und Akkumulation des p53- Proteins im Zellkern. Hier bindet p53 in Form eines Tetramers sequenzspezifisch an DNA-Zielsequenzen (Farmer et al. 1992). In Interaktion mit zahlreichen Ko-Faktoren transaktiviert p53 Gene, deren Proteinprodukte zelluläre Effekte vermitteln (Zilfou & Lowe 2009).

Die Proteinstabilität und -aktivität von p53 wird kurzfristig vor allem durch posttranslationale Modifikationen bestimmt (z.B. Ubiquitinierung, Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Sumoylierung, ADP-Ribosylierung, und weitere) (Meek & Anderson 2009). Eine zentrale Regulationsachse stellt dabei die Interaktion zwischen p53 und den Onkoproteinen Mdm2 und MdmX dar. Sie blockieren unter Ruhebedingungen konstitutiv die p53-Funktion durch direkte Proteininteraktion oder in ihrer Funktion als E3-Ligase durch Ubiquitinierung. Letztere führt zum Export von p53 in das Zytoplasma und seiner dortigen proteasomalen Degradation (Momand et al. 1992; Wade et al. 2010). Zusätzlich steht p53 im Zytoplasma und Zellkern unter dem Einfluss zahlreicher Proteininteraktionen (Lu 2010). Weitere aktivitätsbestimmende Mechanismen bestehen auf Ebene der p53-Transkription und –Translation sowie durch Netzwerke nicht-kodierender RNA (Mosner et al. 1995; Cairns & White 1998; Huarte et al. 2010; Feng et al. 2011).

Die Bindung und Transaktivierung von Zielgenen durch p53 setzt die Erkennung einer spezifischen Konsensussequenz innerhalb der Promotorregion von Zielgenen voraus („*Response Element*“) (el-

Deiry et al. 1992; Wang et al. 2009). Die Architektur des Response Elements bestimmt unmittelbar über die Affinität von p53 für Zielgene (Riley et al. 2008). Dabei sind Gene, deren Genprodukte reversible Folgen für die Zelle haben (z.B. Wachstumsarrest) in der Regel hochaffin für p53. Proapoptotische Gene sind hingegen niederaffin (Inga et al. 2002; Weinberg et al. 2005). Die genannten Regulationsebenen ermöglichen eine differenzierte p53-vermittelte Antwort von Zellen auf genotoxische Stimuli, welche Qualität und Quantität der einwirkenden Noxe, das zelluläre Mikromilieu und Gewebetyp integriert (Murray-Zmijewski et al. 2008) (**Abb. 1.1.**)

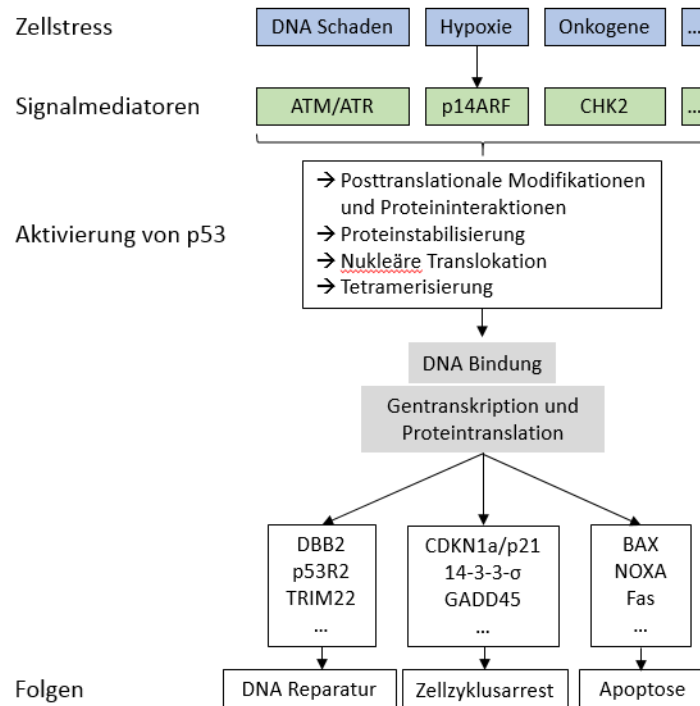


Abb. 1.1. Darstellung der Funktionen und Regulationsebenen von p53

Dargestellt sind Ebenen der p53-Aktivierung durch genotoxischen Stress und dessen Signalweiterleitung über posttranslationale Modifikationen und Proteininteraktionen. Diese führen zur Proteinstabilisierung von p53, Translokation in den Zellkern und dortigen Tetramerisierung der p53-Monomere entlang gebundener Ziel-DNA. Folge ist Transkription von p53-Zielgenen, deren Proteinprodukte reversible (DNA-Reparatur, Zellzyklusarrest) oder irreversible Folgen (Apoptose) für die Zelle vermitteln können.

1.2.2. Die Struktur von p53

Das *TP53*-Gen kodiert für eine Kette von 393 Aminosäuren. Das gefaltete p53-Monomer ist in funktionell eigenständige Proteinmodule aufgeteilt (**Abb. 1.2.**, Cho et al. 1994; Joerger & Fersht 2010): N- und C-terminal finden sich ungefaltete Proteinregionen (N-Terminus: TAD1/TAD2, Aminosäurereste 1-40 bzw. 40-61; C-Terminus: Aminosäurereste 363-393) (Bell et al. 2002). Über posttranslationale Modifikationen oder Proteininteraktionen dieser Regionen kann die transkriptionale Aktivität von p53 beeinflusst werden (Weinberg et al. 2004; Dunker et al. 2005). An die TA-Domäne schließt sich eine prolinreiche Aminosäuresequenz an (Aminosäurereste 61-94) (PRD, „proline-rich domain“). Sie enthält fünf PXXP-Motive (P = Prolin, X = jede andere Aminosäure), die für

verschiedene Proteininteraktionen notwendig sind (Walker & Levine 1996). Die PR-Region dient auch der innermolekularen Stabilisierung des p53-Monomers und -Tetramers. C-terminal befinden sich Aminosäuresequenzen, die in die Regulation des p53-Transports zwischen Zellkompartimenten eingeschaltet sind (NLS, „*nuclear localization signal*“, Aminosäuren 305-321; NES, „*nuclear export signal*“, Aminosäuren 339-350) (Liang 1999; Stommel et al. 1999).

Die Kern- bzw. DNA-Bindungsdomäne (*DBD*) von p53 stellt die Grundlage für die sequenzspezifische Bindung von p53 an Response Elemente dar (el-Deiry et al. 1992). Sie wird durch die Aminosäurereste 94 bis 292 gebildet (Cho et al. 1994). Ihre Tertiärstruktur ist durch ein kompaktes Gerüst aus zwei verwundenen β -Faltblättern („ *β -Sandwich*“) gekennzeichnet, die ihrerseits aus mehreren β -Strängen („ *β -sheets*“) bestehen (Sandwich 1: Sheets S1, S3, S5, S8; Sandwich 2: Sheets S4, S6, S7, S9, S10). Sie schließen einen hydrophoben Proteinkern ein, der über Wechselwirkungen von Aminosäureresten stabilisiert wird.

Die β -Faltblätter tragen die DNA-Bindungsfläche von p53. Hier befindet sich das *Loop-Sheet-Helix*-Motiv (LSH, Schleife/Loop L1, β -Stränge S2, S2', Anteile von S10, Helix H2). Es steht während der DNA-Bindung über einzelne Aminosäuren mit der großen DNA-Furche in Kontakt (K120, R273, C275, A276, C277, R280). Weiterhin trägt das Proteingerüst die Schleifen (*Loops*) L2 und L3, von denen letztere direkt mit der kleinen DNA-Furche interagiert (über Aminosäuren N239, S241, R248). Der L2/L3-Schleifenkomplex wird durch diverse Wechselwirkungen stabilisiert, die von Aminosäuren der Loops L2 und L3 und hierbei insbesondere den Aminosäuren R249 und G245 ausgehen (Gouas et al. 2009). Essentiell für die Erhaltung des L2/L3-Schleifenkomplexes ist insbesondere ein tetravalent gebundenes Zinkion (L2: Aminosäuren C176, H179; L3: Aminosäuren C238, C242). Ein Defekt der Zinkbindung löst die Denaturierung des Schleifenkomplexes aus (Cañadillas et al. 2006).

In vitro besitzt die unmodifizierte p53-Kerndomäne eine geringe kinetische und thermische Stabilität. Dies bedingt bei 37°C eine Halbwertszeit von neun Minuten und die Denaturierung der p53-Kerndomäne bei 42°C. Die hohe Proteinverformbarkeit des p53-Proteins ist für die Interaktion mit DNA- und Proteinstrukturen vonnöten. Die geringe Proteinstabilität begünstigt aber auch die p53-Denaturierung beispielsweise als Folge von Änderungen der Aminosäuresequenz (Friedler et al. 2003; Ang et al. 2006).

P53 bindet und transaktiviert Zielgene in Form eines Homotetramers, das sich aus der Dimerisierung zweier Dimere entwickelt (Kitayner et al. 2006). P53 liegt in vivo in einem Konzentrationsgleichgewicht aus Monomeren, Dimeren und Tetrameren vor. Die Tetramerisierung der p53-Moleküle wird durch die Tetramerisierungs- bzw. Oligomerisierungsdomäne ermöglicht (TET/OD, Aminosäurereste 325–356). Sie besteht innerhalb eines p53-Monomers aus einem β -Strang und einer α -Helix (Lee et al. 1994). Über den β -Strang erfolgt die Bildung eines p53-Dimers während der p53-Proteintranslation (Mateu et al. 1999; Nicholls et al. 2002). Die α -Helices vermitteln die

Dimerisierung zweier p53-Dimere während der DNA-Bindung (Chène & Che 2001). In Gegenwart von p53-Response Elementen verschiebt sich das Oligomerisierungsgleichgewichts in Richtung der Tetramerisierung (Chène et al. 2001; Weinberg et al. 2004). Grundlage für diese DNA-induzierte Bindungskoooperativität sind verschiedene inner- und intermolekulare Wechselwirkungen der DNA-bindenden p53-Dimere (Klein et al. 2001; Ma & Levine 2007). Die Stärke der Wechselwirkungen innerhalb eines Tetramers korreliert mit der Affinität von p53 für Zielgene (Schlereth et al. 2010; Timofeev et al. 2013). Die genannten Mechanismen der TET- und DBD-Domänen ermöglichen die Homotetramerisierung von p53-Oligomeren. Die Heteroaggregation mit den Mitgliedern der p53-Familie p63 und p73 ist jedoch ausgeschlossen (Davison 1999; Kitayner et al. 2006).

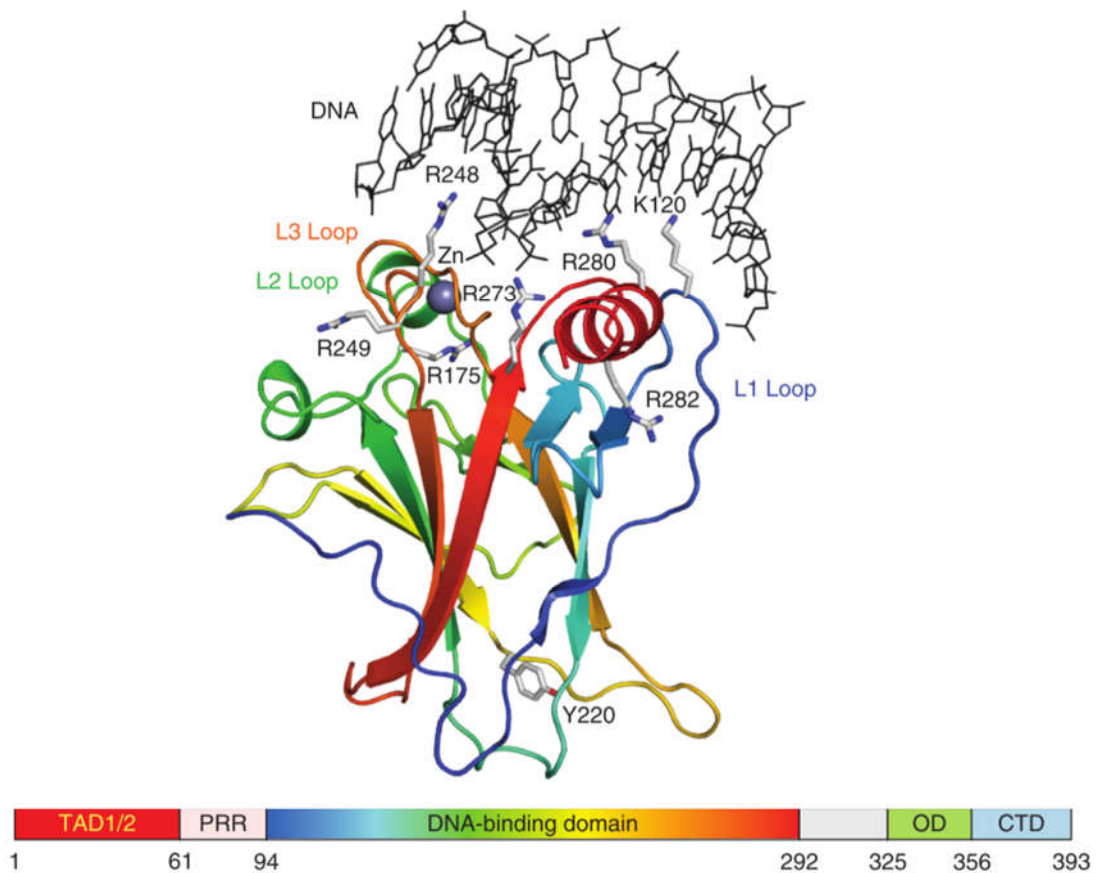


Abb. 1.2. Modularer Aufbau des TP53-Gens und Kristallstruktur des DNA-gebundenen p53-Monomers

TAD1/2 – Transaktivierungsdomänen 1 und 2; PRR – prolinreiche Domäne; „DNA-binding domain“ – DNA-Bindungsdomäne; OD – Oligomerisierungs- bzw. Tetramerisierungsdomäne; CTD – C-Terminus.

Erklärungen zu Loops L1, L2, L3, Zn (tetravalent gebundenes Zinkion) und den abgebildeten Aminosäuren im Fließtext. Die Farbkodierung der Kristallstruktur- und TP53-Gendarstellung stimmen überein.

(nach Joerger & Fersht 2010)

1.3. Das p53-Familienmitglied p73

P73 gehört mit p53 und p63 einer Familie von strukturell und funktionell homologen Transkriptionsfaktoren an (Jost et al. 1997; Kaghad et al. 1997). Die Gensequenzen von *TP53* und *TP73* teilen eine N-terminale Transaktivierungsdomäne, eine DNA-Bindungsdomäne und eine C-terminale Oligomerisierungs- bzw. Tetramerisierungsdomäne, die jeweils Sequenzhomologien von 30%, 63% und 38% aufweisen (Dötsch et al. 2010). Auf dem *TP73*-Gen sind weiterhin Regionen für den subzellulären Transport („*nuclear localization signal*“ und „*nuclear export signal*“), eine SAM-Domäne („*sterile alpha motif*“) zur Vermittlung von Proteininteraktionen (Thanos & Bowie 1999) und eine transkriptionshemmende Domäne (TID) (Serber et al. 2002) kodiert (**Abb. 1.3.**).

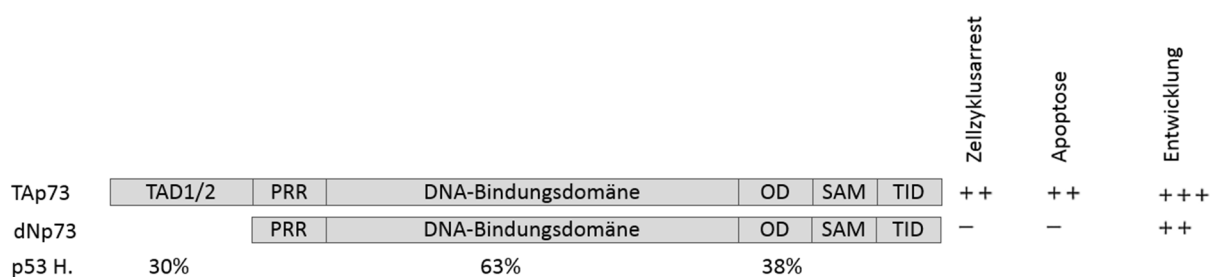


Abb. 1.3. Modularer Aufbau von TAp73 und dNp73

TAD1/2 – Transaktivierungsdomänen 1 und 2; PRR – prolinreiche Domäne; DNA-binding domain – DNA-Bindungsdomäne; OD – Oligomerisierungs- bzw. Tetramerisierungsdomäne; SAM – „sterile alpha motif“, TID – Transkriptionshemmende Domäne; TAp73 ist ein Tumorsuppressor, während dNp73 onkogene Eigenschaften besitzt. P53 H. – Sequenzhomologie des *TP73*-Gens zum *TP53*-Gen. (nach Straub et al. 2010 und Dötsch et al. 2010)

Von der *TP73*-Gensequenz (Chromosom 1p36, *NCBI GeneBank* Identifikationsnummer: 7161) werden durch Transkription von zwei verschiedenen p73-Promotoren (P1, P2) und durch alternatives Spleißen zahlreiche p73-Varianten exprimiert. „TA“-Isoformen besitzen eine intakte Transaktivierungsdomäne, welche bei N-terminal trunkierten „delta-TA“- (dN)-Isoformen fehlt. C-terminale Modifikationen erlauben eine weitere strukturelle Untergliederung (α - η). Nur α -Isoformen besitzen die TID-Domäne (**s. Abb. 1.3.**) (Melino et al. 2002).

P73-Isoformen können durch die genannten Sequenzhomologien der DNA-Bindungsdomäne mit p53 und ein identisches DNA-Bindungsmotiv Teile des p53-Zielgenspektrums binden (Ethayathulla et al. 2012).

TAp73-Isoformen können daher unabhängig von p53 Zellzyklusregulation, Apoptose und Seneszenz vermitteln (Kaghad et al. 1997; Zhu et al. 1998). Die tumorsuppressive Funktion von TAp73 kann im Mausmodell bestätigt werden. Eine komplette *TP73*-Genlokusdeletion führt zu Entwicklungsdefekten des zentralen Nerven- und Immunsystems (Yang et al. 2000; Flores et al. 2005). Demgegenüber zeigen homozygot TAp73-negative Mäuse (-/-) eine deutliche Tumorprädisposition. TAp73-heterozygote Mäuse (+/-) neigen zudem zum Verlust des intakten TAp73-Allels im Sinne eines klassischen

Knudson'schen Tumorsuppressorgens (Verlust der Heterozygotie, „*loss of heterozygosity*“, LOH) (Tomasini et al. 2008).

DNp73-Isoformen binden dieselben DNA-Zielsequenzen wie TAp73 und p53. Sie sind durch das Fehlen einer Transaktivierungsdomäne jedoch transkriptionell inaktiv und blockieren entsprechend die Transaktivierung dieser Gene (Kaghad et al. 1997). Sie hemmen zudem die Funktion von TAp73 über Interaktion der homologen Oligomerisierungsdomänen. DNp73-Isoformen bieten durch diese dominant-negative Funktion onkogenes Potential (Stiewe et al. 2002). Es sind zahlreiche weitere, tumorfördernde Mechanismen bekannt, über die dNp73 in vitro Seneszenz und Apoptose verhindert. In klinischen Studien ist eine dNp73-Überexpression mit einem verminderten Ansprechen auf konventionelle Chemotherapeutika verbunden (Chemoresistenz) (Engelmann et al. 2015). Umgekehrt unterdrückt die Blockade der dNp73-Transkription die Bildung von induzierten Tumoren im Mausmodell. Sie begünstigt p53- und TAp73-abhängige tumorsuppressive Funktionen, die wiederum zur Sensibilisierung auf Chemotherapeutika führen (Zaika et al. 2002; Wilhelm et al. 2010).

Die C-terminal trunkierten p73-Varianten besitzen unterschiedliche transkriptionelle Aktivität und ein gewebespezifisches Expressionsmuster (De Laurenzi et al. 1998). Nur die C-terminal vollständige α -Variante besitzt eine transkriptionshemmende Domäne (TID). Durch Interaktionen mit dem N-Terminus des p73-Proteins verhindert sie die Bindung von p73-Proteinen an DNA-Zielgene (Serber et al. 2002). Ihre transkriptionshemmende Funktion kann durch posttranslationale Modifikationen oder mutationsbedingte Sequenzveränderungen unterbunden werden (Straub et al. 2010).

1.3.1. Regulation der p73-Isoformen

Die p73-Isoformen werden, ähnlich zu p53, unter anderem auf RNA- und Proteinebene reguliert. Auf Transkriptionsebene bestimmen zahlreiche Transkriptionsfaktoren, epigenetische Mechanismen (v.a. Promotormethylierung) und alternatives Splicing über das Aktivitätsniveau der Isoformen. Auf Proteinebene besteht eine dichte Regulationsstruktur u.a. durch Proteininteraktionen innerhalb der p53-Familie und mit diversen Ko-Faktoren, durch posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung, etc.) sowie über die Regulation ihrer subzellulären Lokalisation. Hierdurch sind die TA- und dNp73-Isoformen auch separat steuerbar und befinden sich unter Ruhebedingungen in einem funktionellen Gleichgewicht (Soldevilla et al. 2013).

Als Reaktion auf endogene und exogene Noxen, wie DNA-Schäden oder virale Onkogene verschiebt sich das funktionelle und quantitative Gleichgewicht der p73-Isoformen in Richtung von TAp73. Dies ist Folge von zahlreichen Signalkaskaden auf o.g. Regulationsebenen, die zur Stabilisierung, nukleären Translokation und Akkumulation des TAp73-Proteins im Zellkern führen. Das dNp73-Protein wird unter diesen Umständen in ubiquitin- oder antizymabhängiger Weise degradiert (Dulloo

et al. 2010; Chaudhary et al. 2014). Auch kommt es zur Erhöhung der Transkriptionslevel von TAp73 und einer Repression der dNp73-Transkription (Sayan et al. 2010; Qian et al. 2014).

TAp73 bindet im Zellkern über seine DNA-Bindungsdomäne Response-Elemente von Zielgenen sequenzspezifisch und als Tetramer in kooperativer Weise (Joerger et al. 2009; Luh et al. 2013). Das Transaktivierungspotential von TAp73 setzt unter genotoxischen Bedingungen aktivierende posttranslationale Modifikationen des TAp73-Proteins und Ko-Faktoren der Transkription voraus. Auch die Architektur des gebundenen Response-Elements bestimmt über die Bindungsaffinität der p73-Isoformen. Sie verursacht Unterschiede und Gemeinsamkeiten des Zielgenspektrums von p53 und TAp73 (Ciribilli et al. 2013; Ethayathulla et al. 2013). Durch die beschriebene Regulationsstruktur ist eine von p53 unabhängige TAp73-Funktion möglich.

1.4. p73 in malignen Tumoren

In humanen Malignomen und Tumorzelllinien ist das *TP73*-Gen im Gegensatz zu *TP53* sehr selten durch Mutationen inaktiviert (Levrero et al. 2000). Stattdessen sind zahlreiche Mechanismen auf Transkriptions- und Proteinebene beschrieben, die in malignen Tumoren die Funktion von TAp73 blockieren und die onkogenen Eigenschaften von dNp73 begünstigen (Moll & Slade 2004).

Während in humanen Geweben unter physiologischen Bedingungen die Expression der p73-Isoformen kaum nachweisbar ist, liegt in Malignomen häufig ein verändertes Expressionsmuster der p73-Isoformen vor. Es findet sich meist eine Überexpression von dNp73 bei gleichzeitiger Suppression der TAp73-Expression oder eine Ko-Überexpression beider Isoformen (Conforti et al. 2012). Diese Konstellationen sind, unabhängig des p53-Mutationsstatus, mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium und schlechterer Prognose von Tumorpatienten verbunden. Im Gegensatz dazu ist die Überexpression von TAp73-Isoformen häufig mit einem besseren Therapieansprechen und Gesamtüberleben assoziiert (Müller et al. 2005; Domínguez et al. 2006; Becker et al. 2006; Lucena-Araujo et al. 2015).

Es wird angenommen, dass in vitro und im klinischen Kontext von Tumorpatienten nicht die absoluten Expressionsraten von dNp73 und TAp73, sondern ihr unphysiologisches Verhältnis zueinander entscheidend für den malignen Phänotyp und Therapieansprechen ist (Franco Conforti et al. 2012). Die pathologischen Expressionsmuster der p73-Isoformen in Tumoren sind zum Teil durch Hypermethylierung des P1- und Hypomethylierung des P2-Promotors bedingt. Auch unphysiologisches alternatives Splicing der p73-Transkripte und fehlregulierte Promotorkontrolle durch Transkriptionsfaktoren, wie Nrf-2 und E2F1 sind als Ursachen beschrieben (Stiewe & Pützer 2000; Castillo et al. 2009; Lai et al. 2014).

Auch auf Proteinebene lassen sich in malignen Tumoren Ursachen für eine verminderte Aktivität von TAp73 und Überaktivität von dNp73 feststellen. Neben mutierten p53-Proteinen (s. Abschnitt 1.5.) und dNp73 sind weitere Proteine in der Lage, die tumorsuppressiven Funktionen von TAp73 durch

direkte Proteininteraktion oder posttranslationale Modifikationen blockieren (z.B. MDM2, PLK1, Aurora A, mTOR, iASPP etc.). Die gezielte Hemmung dieser onkogenen Mechanismen kann das tumorsuppressive Potential von TP53 wiederherstellen (Bell et al. 2007; Peirce et al. 2009; Wong et al. 2011).

1.5. Der Tumorsuppressor p53 in malignen Tumorzellen

1.5.1. Formen der p53 Inaktivierung in malignen Tumorzellen

Das tumorsuppressive Potential von p53 macht seine Inaktivierung zu einem essentiellen Schritt in der Entstehung von Tumoren. In fast allen humanen Malignomen lässt sich eine Dysfunktion von p53 oder in seinem regulatorischen Umfeld nachweisen (Junttila et al. 2009). Der hauptsächliche Mechanismus der p53-Inaktivierung besteht in Einzelbasenmutationen innerhalb der *TP53*-Gensequenz. Mindestens 50% aller humanen Tumorentitäten weisen mindestens eine erworbene oder vererbte Punktmutation des *TP53*-Gens auf. *TP53*-Mutationen stellen damit die häufigste Genalteration in humanen Tumoren dar (Stratton 2011; Kandoth et al. 2013). In zahlreichen Tumorentitäten sind sie mit erhöhter Tumoraggressivität, vermindertem Therapieansprechen und erhöhter Mortalität verbunden (Robles & Harris 2010). Das Mutationsspektrum unterscheidet sich in Abhängigkeit von Tumorentität- und stadium, verursachender Noxe (mikrobiologisch, chemisch, physikalisch), sowie unter erworbenen und hereditären Neoplasien (z.B. Li Fraumeni Syndrom) (Soussi & Wiman 2007).

TP53-Mutationen kommen entlang der gesamten *TP53*-Sequenz vor, häufen sich jedoch zu über 90% zwischen Exon 5 und 8 (DNA-Kerndomäne) und betreffen zu 30% sechs Codons (**Abb. 1.4.**, „Hot Spots“, Aminosäuren R175, G245, R248, R249, R273, R282). Im Vergleich zu anderen Tumorsuppressoren ist p53 in Tumoren selten durch Gendeletionen, Nonsense- oder Frameshiftmutationen inaktiviert (je 2, 6, 11% der *TP53*-Mutationen) (Weinberg 1991; Leroy et al. 2014). Nonsense- und Frameshiftmutationen führen zu trunkierten p53-Translationsprodukten, die durch Defekte der DNA-Kerndomäne funktionell inaktiv sind und degradiert werden. Im Mausmodell reicht eine heterozygote *TP53*-Deletion aus, um eine Prädisposition für spontane und induzierte Tumoren zu schaffen (Donehower et al. 1992). Heterozygot *TP53*-negative Tumorzellen neigen entsprechend zum Verlust des intakten *TP53*-Wildtypallels im Sinne der Knudsonhypothese (Knudson 1986) (Verlust der Heterozygotie, „loss of heterozygosity“, LOH).

Ca. 80% der *TP53*-Mutationen bestehen in Missense-Mutationen (Hollstein et al. 1991; Leroy et al. 2014). Hierdurch kommt es zur Transkription und Translation eines mutierten p53-Proteins normaler Länge („MUTp53“). Dieses weist Defekte in der Bindung und Transaktivierung von Zielgenen, sowie in der Interaktion mit Proteinen auf, die für die Vermittlung der tumorsuppressiven Funktionen

bedeutsam sind (Kern et al. 1992; Chang et al. 2005) (*“loss of function”*, LOF). Die in vitro messbare Einschränkung des Transkriptionspotentials durch eine *TP53*-Mutation korreliert mit ihrer Häufigkeit in malignen Tumoren (Kato et al. 2003; Leroy et al. 2014).

Mutierte p53-Proteine akkumulieren in der Regel in malignen Tumorzellen, da sie im Vergleich zur Wildtyp-p53 eine deutlich gesteigerte Proteinstabilität und Halbwertszeit aufweisen (Strano et al. 2007). Der Abbau von p53-Mutanten wird vor allem durch Ubiquitinligasen, wie MDM2 und CHIP gesteuert. In Tumorzellen sind sie jedoch in einem Komplex mit dem Chaperon Hsp90 und dem mutierten p53-Protein inaktiviert (Dun Li et al. 2011).

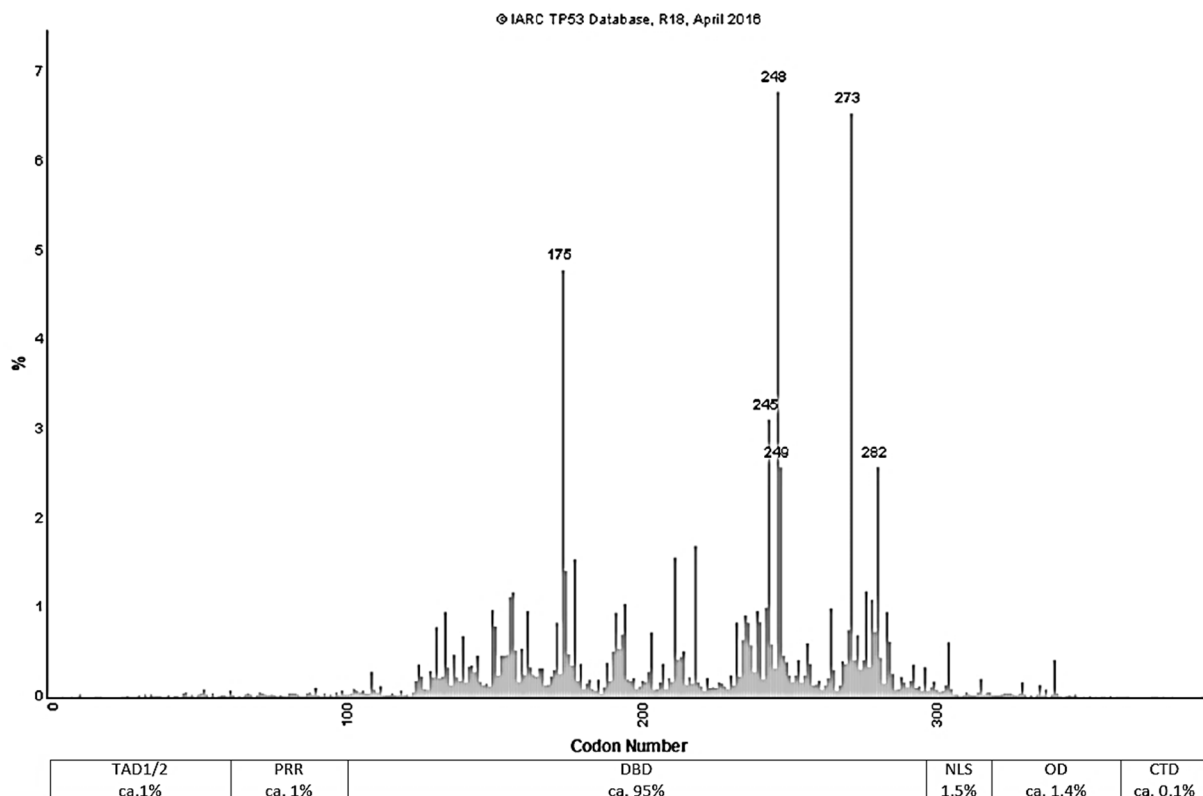


Abb. 1.4. Verteilung somatischer TP-Mutationen entlang *TP53*-Gensequenz

Die Abbildung zeigt die Frequenz von Codonmutationen innerhalb der *TP53*-Gensequenz, wie sie in humanen Tumorproben per Sequenzierung identifiziert wurden. Die Mutationen kommen entlang der DNA-Bindungsdomäne stark gehäuft vor und sind außerhalb davon selten.

TAD1/2 – Transaktivierungsdomänen 1 und 2; PRR – prolinreiche Domäne; NLS – nukleäres Lokalisationssignal; DBD – DNA-Bindungsdomäne; OD – Oligomerisierungs- bzw. Tetramerisierungsdomäne; CTD – C-Terminus.

(IARC TP53 Database, Version R18, Stand April 2016, nach Bouaoun et al. 2016)

TP53-Mutationen können anhand ihrer strukturellen Folgen für das p53-Protein eingeteilt werden. „Kontaktmutationen“ (ca. 25% der Missense-Mutationen) betreffen Aminosäuren, die während der DNA-Bindung direkt mit Basen der DNA im Kontakt stehen (Regionen des LSH- und L3-Motivs). Kontaktmutanten haben daher trotz erhaltener Proteinstruktur ein deutlich reduziertes

Transaktivierungspotential. „Struktur-“ bzw. „Konformationsmutationen“ verursachen hingegen die Destabilisierung des p53-Proteins oder von Proteinregionen, denen die DNA-Bindungsfläche aufsitzt (ca. 85% der Missense-Mutationen, v.a. in Regionen der β -Faltblätter, des L2/L3-Motivs und der Zinkbindungsregion). Die Position der Mutation wirkt sich entscheidend auf die Proteinstabilität von p53 und das damit verbundene Transaktivierungspotential aus. Die destabilisierenden Auswirkungen einer p53-Mutation auf das p53-Protein korrelieren mit ihrer Häufigkeit in Tumoren (Bullock et al. 1997; Bullock et al. 2000). Mutationen in der Zinkbindungsregion führen bereits bei subphysiologischen Temperaturen zur Denaturierung des p53-Proteins. Demgegenüber sind destabilisierende Effekte von Mutationen innerhalb der β -Faltblätter wegen der komplexen Interaktionen mit dem p53-Proteinkern sehr unterschiedlich (Shiraishi et al. 2004; Grochova et al. 2008).

TP53-Mutationen innerhalb der Proteinstruktur motive L2/L3, LSH und der Zinkbindungsregion sind in klinischen Untersuchungen mit einer ungünstigen Prognose von Tumorpatienten assoziiert. Die aktuelle Datenlage zur Beurteilung der prognostischen Wertigkeit einzelner Proteinstrukturen ist uneindeutig: einige Studien demonstrierten das aggressivste Verhalten für Tumoren, die strukturstabile p53-Kontaktmutanten exprimierten (Proteinregion LSH, z.B. R273H, R248W). Andere fanden eine Assoziation mit einer ungünstigen Prognose und der Expression von Strukturmutationen (Olivier et al. 2006; Peltonen et al. 2011; Xu-Monette et al. 2012; Warren et al. 2013).

1.5.2. Onkogenes Potential von mutierten p53-Proteinen

Neben dem Verlust tumorsuppressiver Funktionen (LOF) weisen mutierte p53-Proteine im Vergleich zu Wildtypproteinen (WTP53) zusätzlich onkogene Eigenschaften auf. Dies kann durch die Expression von p53-Mutanten in vitro in WTP53-exprimierenden und p53-negativen Zellsystemen demonstriert werden (Kern et al. 1992; Dittmer et al. 1993). Auch im Mausmodell und anhand von Patienten mit hereditären *TP53*-Mutationen ist das onkogene Potential anhand eines aggressiveren Tumorphänotyps nachvollziehbar (Wachstumsrate, Invasivität, Chemoresistenz) (Lang et al. 2004; Olive et al. 2004; Bougeard et al. 2008) („*gain of function*“, GOF).

Mutierte p53-Proteine beeinflussen in transkriptionsabhängiger und –unabhängiger Weise zahlreiche Aspekte eines malignen Tumorphänotyps (Solomon et al. 2011). Sie besitzen einerseits Bindungs- und Transaktivierungspotential für ein von WTP53 verschiedenes Genspektrum und verursachen ein typisches, malignomassoziiertes Genexpressionsprofil (Strano et al. 2007; Solomon et al. 2012). Andererseits gehen mutierte p53-Proteine unphysiologische Interaktionen mit zytoplasmatischen und mitochondrialen Proteinen ein (Freed-Pastor & Prives 2012). Hierunter sind Interaktionen mit dem WTP53-Protein, das hierdurch transkriptionell gehemmt wird (Kern et al. 1992; Kato et al. 2003).

Dieser dominant-negative Effekt bedingt ein vermindertes tumorsuppressives Potential von WTP53 in vitro und in vivo (Robles & Harris 2010; Monti et al. 2011). Die starke Selektion von Missense-Mutationen entlang der DNA-Bindungsdomäne von *TP53* ist neben dem Funktionsverlust von p53 vor allem auf den Zugewinn onkogener Eigenschaften von p53-Proteinen zurückzuführen (Petitjean et al. 2007; Oren & Rotter 2010).

Ursächlich für die Auswirkung von MUTp53 auf WTP53 ist ihre Heterooligomerisierung über verschiedene Interaktionsmechanismen. Strukturstabile p53-Kontaktmutanten tetramerisieren über ihre Oligomerisierungsdomäne mit mutierten oder nativen p53-Dimeren zu Homo- oder Heterotetrameren (Chène & Bechter 1999; Xu et al. 2011). Die DNA-Bindungsaffinität und das Transaktivierungspotential MUTp53-haltiger Tetramere ist im Vergleich zu WTP53-Tetrameren stark reduziert (Chan et al. 2004; Ang et al. 2006).

Durch strukturelle Instabilität neigen Konformationsmutanten zur Exposition spezifischer Sequenzen der DNA-Bindungsdomäne (Aminosäuren 251-257, Domäne S9). Über diese können denaturierte p53-Proteine zu höhermolekularen Proteinkomplexen aggregieren. Da auch WTP53 eine geringe Thermostabilität und Denaturierungstendenz bei 37°C aufweist, kann es über die Aggregationssequenz in derartige Proteinaggregate eingeschlossen und hierdurch funktionell inaktiviert werden. Dieser dominant negative Mechanismus hängt nicht von der Tetramerisierungsdomäne ab und ist durch Unterdrückung der Aggregationstendenz reversibel (Bensaad et al. 2003; Xu et al. 2011). Während der Bildung der Aggregate wird WTP53 auch domänenunabhängig in sie eingeschlossen und gleichermaßen gehemmt („*Co-Aggregation*“ bzw. „*Trapping*“, Kehrlöesser et al. 2016; Cino et al. 2016).

1.5.3. Die Interaktion zwischen p53-Mutanten und TAp73

Mutierte p53-Proteine können mit den Mitgliedern der p53-Familie TAp63 und TAp73 interagieren (Como et al. 1999; Gaiddon et al. 2001). Diese werden dadurch transkriptionell gehemmt und verlieren tumorsuppressives Potential in vitro und in vivo (Irwin et al. 2003; Li & Prives 2007).

Dieser Effekt auf TAp73 ist in vitro für Kontakt- und Strukturmutanten demonstriert (Monti et al. 2003). Die Proteininteraktion zwischen p53 und TAp73 wird über die o.g. Aggregationssequenzen der DNA-Bindungsdomäne des p53-Proteins vermittelt (Xu et al. 2011). Obwohl TAp73 homologe Aggregationssequenzen in der DNA-Bindungsdomäne besitzt, liegen die aggregationsvermittelnden Sequenzen von TAp73 wahrscheinlich in seiner transkriptioneninhibitorischen Domäne des C-Terminus (Kehrlöesser et al. 2016). Hierüber kommt es, analog zur MUTp53/WTP53-Interaktion, zur Aggregation und Co-Aggregation von MUTp53 und TAp73. Da auch Kontaktmutanten, wie WTP53, geringe Proteininstabilität und daher Denaturierungstendenz aufweisen, wird angenommen, dass die Interaktion mit TAp73 ebenfalls über Aggregation und Co-Aggregation vermittelt wird (Cino et al.

2016). Die Heterotetramerisierung zwischen mutierten p53-Proteinen und TAp73 über die Oligomerisierungsdomäne ist nicht möglich (Davison et al. 1999).

Die Interaktion von mutierten p53-Proteinen und TAp73 wird durch Polymorphismen der *TP53*-Sequenz beeinflusst („*single nucleotide polymorphisms*“, SNP) (Marin et al. 2000). Die Triplettsposition 72 in der prolinreichen Region des *TP53*-Genes kann entweder für Arginin (Arg72) oder Prolin (Pro72) kodieren (SNP rs1042522). In Untersuchungen humaner Malignome, die WTp53 exprimieren, ist eine Selektion des Pro72-Allels dokumentiert. Demgegenüber findet sich in Tumorproben mit mutiertem p53 eine Selektion des Arg72-Allels. Dies ist mit erhöhter Chemosensitivität und einem aggressiveren Tumorverhalten assoziiert (Bergamaschi et al. 2003; Sullivan et al. 2004). Als molekulare Ursache wird die Bindung zwischen MUTp53 und TAp73 angenommen, die im Falle von Arg72 höheraffin, als für Pro72 ausfällt. Dies führt zu einem stabileren MUTp53/TAp73-Komplex und damit stärkerer Hemmung der Funktion von TAp73 (Marin et al. 2000; Bergamaschi et al. 2003).

1.5.4. P53- und p73-basierte Tumorthherapie

Die Erkenntnisse über die Regulation und Dysfunktion von p53 und p73-Isoformen in malignen Tumoren haben zur Entwicklung verschiedener Ansätze für eine p53-basierte Tumorthherapie geführt. Mehrere Substanzen werden bereits in klinischen Studien in Kombination mit konventionellen Chemotherapeutika erprobt (Hoe et al. 2014; Duffy et al. 2014). Hierunter sind Substanzen, die auf die Expression des Wildtypproteins von p53 angewiesen sind (z.B. „*Nutlin*“ und Derivate, Vassilev et al. 2004; „*RITA*“, Issaeva et al. 2004). Andere Moleküle zielen auf die Korrektur spezifischer struktureller Aberrationen durch einzelne *TP53*-Mutationen ab (z.B. „*PRIMA*“ und Derivate, Bykov & Wiman 2014; Alexandrova et al. 2015). Diese und weitere p53-basierte Therapieansätze sind in **Tabelle 4.2.** aufgeführt.

Auch das Wissen über die onkogenen Funktionen von mutierten p53-Proteinen ermöglicht therapeutisch nutzbare Ansätze. Im Gegensatz zu p53 ist TAp73 in Tumoren nur selten durch Mutationen inaktiviert und kann seine tumorsuppressiven Funktionen ersetzen (Irwin et al. 2003; Vayssade et al. 2005). Die Verhinderung der Aggregation von mutierten p53-Proteinen und tumorsuppressiven p73-Isoformen stellt daher einen vielversprechenden Therapieansatz in *TP53*-mutierten Tumoren dar. In vitro konnte mittels verschiedener Substanzen die Komplexbildung verhindert und damit TAp73-abhängige Chemosensibilisierung von Tumorzelllinien erzielt werden (Di Agostino et al. 2008; Bruno et al. 2010; Rökaeus et al. 2010; Saha et al. 2013; Hong et al. 2014). Ein solcher Effekt konnte 2008 auch für Molekül „*RETRA*“ nachgewiesen („*reactivation of transcriptional reporter activity*“, Kravchenko et al. 2008). In einem p53-mutierten Zellsystem (Zelllinie A431) hob RETRA den transkriptionshemmenden Effekt der hier exprimierten p53-Mutante

R273H auf TAp73 auf (Reportersystem: Sequenz für β -Galactosidase unter der Kontrolle eines minimalen CMV-Promotors gekoppelt an fünf p53-spezifische Response Elemente). Dieser Effekt war ausschließlich in MUTp53-exprimierenden, aber nicht in WTP53- oder p53-negativen Zellsystemen nachweisbar (durch Kravchenko verwendete Zelllinien: A549, HeLa, humane embryonale Fibroblasten/HEF (je WTP53); H1299, Saos2 (je p53-negativ)). Mittels selektiver TAp73-Blockade in einem siRNA-Assay wurde die Reporteraktivierung und Transkription verschiedener Gene, wie p21(CDKN1A) und PUMA(BBC3), auf TAp73 zurückgeführt. Unter RETRA-Behandlung konnte im verwendeten MUTp53-exprimierenden Zellsystem zudem eine Abnahme von MUTp53/TAp73-Komplexen und eine Zunahme der freien Fraktion von TAp73-Protein nachgewiesen werden. Dabei war keine Erhöhung der TAp73- oder dNp73-Expression festzustellen. Nachfolgend konnte die funktionelle Reaktivierung von TAp73 als Tumorsuppressor in vitro im Zellvitalitätsassay („XTT“-Assay), Koloniebildungstest („*colony formation*“-Assay) und anhand von Apoptosemessungen („*Caspase 3/7*“-Assay) demonstriert werden. Auch im Mausmodell verlangsamte RETRA das Wachstum subcutan injizierter, MUTp53-exprimierender Tumorzelllinien und reduzierte die Zahl der Tumoren am Injektionsort im Vergleich zu RETRA-unbehandelten Mäusen. Es wurde geschlussfolgert, dass RETRA die Interaktion zwischen TAp73 und p53-Mutanten unterbindet und so die tumorsuppressive Funktion von TAp73 wiederherstellt. Der molekulare Wirkmechanismus der TAp73-Reaktivierung durch RETRA wurde bisher nicht identifiziert.

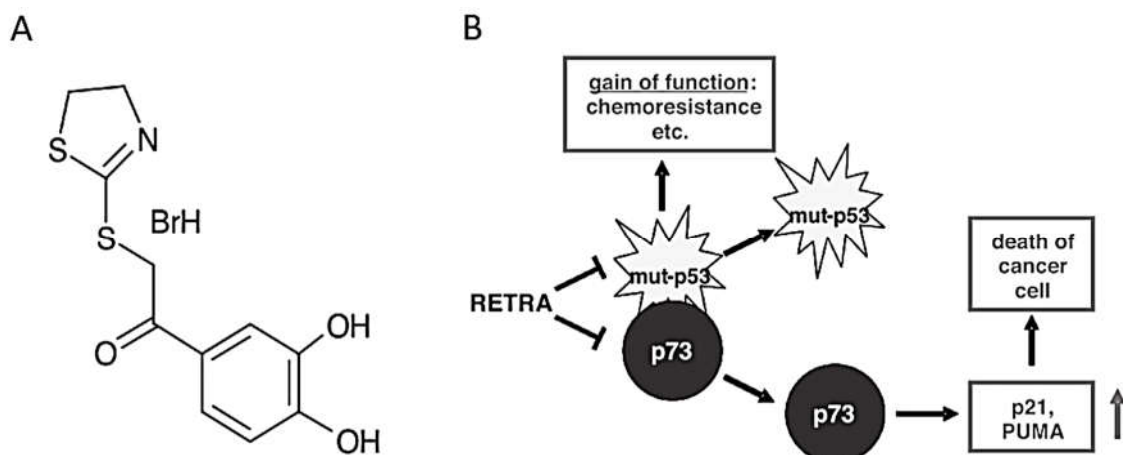


Abb. 1.5. RETRA und propagierter Wirkmechanismus

A – Strukturformel von RETRA (2-(4,5-dihydro-1,3-thiazol-2-ylthio)-1-(3,4-dihydroxyphenyl)-ethanonhydrobromid)

B – Auszug aus der Originalpublikation von Kravchenko mit vorgeschlagenem Wirkmechanismus, nachdem RETRA entweder über das mutierte p53-Protein oder p73 (genauer: TAp73) die Interaktion zwischen diesen Proteinen verhindert und so das transkriptionelle Potential von p73 reaktiviert.

(nach Kravchenko et al. 2008)

1.6. Fragestellungen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst das zytotoxische Potential der Substanz RETRA durch die direkte Anwendung auf verschiedene Tumorzelllinien untersucht werden. Dabei war Folgendes zu beantworten:

sind zytotoxische Effekte von RETRA in behandelten Tumorzellen abhängig von

- a) p53-Mutationsstatus,
- b) p53-Mutationsart (Kontakt- oder Strukturmutation) oder mutierter p53-Proteindomäne,
- c) Ausprägung des Einzelbasenpolymorphismus (SNP) der Codonposition 72 von p53,
- d) mRNA-Expression der p73-Isoformen TAp73 und dNp73 oder dem Methylierungsstatus der p73-Promotoren P1 und P2?

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, mutierte p53-Proteine hinsichtlich ihres endogenen Transkriptionspotentials und ihrer unphysiologischen Interaktion mit dem p53-Wildtypprotein und TAp73 zu charakterisieren. In diesem Kontext sollte auch geklärt werden, ob RETRA die transkriptionshemmenden Effekte von mutierten p53-Proteinen auf TAp73 in vitro verhindern und dadurch TAp73 transkriptionell reaktivieren kann. Um die mutierten p53-Proteine zu generieren, sollte dabei die sog. „Two-Step“-PCR-Mutagenese laborintern etabliert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Im Folgenden findet sich eine tabellarische Auflistung der verwendeten Materialien. Versuchseigene Substanzen und Geräte sind mit ihrem Verwendungszweck unter Methoden (2.2.) aufgeführt.

2.1.1. Chemikalien

Sämtliche Chemikalien wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, von *Sigma*, *AppliChem* und *Roth* bezogen.

2.1.2. Organismen

2.1.2.1. Zelllinien

Die verwendeten Adhäsions- und Suspensionszelllinien stammen aus dem Bestand der AG Stiewe. Für die Arbeit war der Mutationsstatus des *TP53*-Gens von Relevanz. Informationen darüber stammen von der „*International Agency for Research on Cancer*“ der WHO (IARC) und der „*American Type Culture Collection*“ (ATCC). Stand 12/2016.

Adhäsionszelllinie	Gewebe	Tumor	p53-Status
NCI-H2009	Lunge	NSCLC	p.R273L
NCI-H1299	Lunge	NSCLC	Negativ
NCI-H661	Lunge	NSCLC	p.S215I oder p.R158L
NCI-H460	Lunge	NSCLC	Wildtyp
NCI-H322	Lunge	NSCLC	p.R248L
NCI-H157	Lunge	NSCLC	p.E298X oder p.34fs*ins1b
NCI-H125	Lunge	NSCLC	p.N239X (p.239fs* ins1b)
NCI-H23	Lunge	NSCLC	p.M246I
A549	Lunge	NSCLC	Wildtyp
LCLC-103H	Lunge	NSCLC	p.V216L
EPLC 32 M1	Lunge	NSCLC	Unbekannt
AsPC-1	Pankreas	Adenokarzinom	p.R273H oder p.C135fs*
BxPC-3	Pankreas	Adenokarzinom	p.Y220C
Capan-1	Pankreas	Adenokarzinom	p.A159V
Capan-2	Pankreas	Adenokarzinom	p. R273H oder Wildtyp
Hs766T	Pankreas	Adenokarzinom	p.R181H
MiaPaca	Pankreas	Epitheloidkarzinom	p.R248W
PaCa44	Pankreas	Adenokarzinom	p. C176S oder Wildtyp
Panc-1	Pankreas	Epitheloidkarzinom	p.R273H oder p.R273C
Su86.86	Pankreas	Adenokarzinom	p.G245S

DU145	Prostata	Adenokarzinom	p.V274F und p.P223L
Ad293	Niere	mod. HEK293	Wildtyp
A431	Zervix	Plattenepithelkarzinom	p.R273H
IMR5	Gehirn	Neuroblastom	Wildtyp
Saos-2	Knochen	Osteosarkom	Negativ
U2OS	Knochen	Osteosarkom	Wildtyp
MDA-MB231	Brustdrüse	Adenokarzinom	p.R280K
A-204	Skelettmuskel	Rhabdomyosarkom	Wildtyp
Hs-729T	Skelettmuskel	Rhabdomyosarkom	p.H179R
Rh-1	Skelettmuskel	Rhabdomyosarkom	p.Y220C
Rh-30	Skelettmuskel	Rhabdomyosarkom	p.R273C oder p.R280S
RD	Skelettmuskel	Rhabdomyosarkom	p.R248W

Suspensionszelllinie	Gewebe	Tumor	p53-Status
NCI-H2106	Lunge	NSCLC	P.R248W
NCI-H1155	Lunge	NSCLC	p.R273H
NCI-H720	Lunge	NSCLC	p.C176W
NCI-H526	Lunge	SCLC	p.33 (Splice Intron 3)
NCI-H187	Lunge	SCLC	p.S241C
NCI-H146	Lunge	SCLC	p.P318X (p.P318fs*21)
NCI-H82	Lunge	SCLC	Wildtyp oder p.T125T
NCI-H69	Lunge	SCLC	p.E171X (p.E171fs*)
NCI-H60	Lunge	SCLC	Unbekannt
SCLC-86M1	Lunge	SCLC	Unbekannt
SCLC-24H	Lunge	SCLC	Unbekannt

2.1.2.2. Bakterien

Die verwendeten E. coli Stämme stammten aus verschiedenen Herstellerkits (*Invitrogen*) oder dem Bestand der AG Stiewe.

Bakterienlinie	Genotyp
TOP10-F ⁺ (<i>Invitrogen</i>)	F ⁺ [<i>lacIqTn10</i> (TetR)] <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i>
DH10B (<i>Invitrogen</i>)	F ⁺ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 endA1 recA1 deoR</i> Δ(<i>ara,leu</i>)7697 <i>araD139 galU galK nupG rpsL</i> λ ⁻
XL10-Gold (<i>Agilent</i>)	<i>endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 TetR; [F ⁺ [<i>proAB lacI</i> ^q ZΔM15 Tn10(TetR Amy CmR)]]
One Shot [®] Mach1 [™] (<i>Invitrogen</i>)	Δ <i>recA1398 endA1 tonA</i> φ80Δ <i>lacM15</i> Δ <i>lacX74 hsdR</i> (r _K ⁻ m _K ⁺)
XL1-Blue (M. Wanzel)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>supE44 relA1 lac</i> [F ⁺ <i>proAB lacIqZ</i> Δ M15 Tn10 (TetR)]
DH5α (M. Wanzel)	F ⁺ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) λ ⁻

2.1.3. Plasmide

Die angeführten Plasmide wurden entweder mittels geeigneter Kits hergestellt oder dem laboreigenen Bestand der AG Stiewe entnommen. Der zugehörige Verwendungszweck ist angegeben.

Plasmidbezeichnung	Verwendung	Herkunft		
pENTR_p53WTAB1(72P)	Mutagenese	Anne Bretz (AB1)		
pENTR_p53wt_72R	Mutagenese	generiert (Site-directed Mutagenese)		
pENTR_p53_R306X_72R	LR-Reaktion	generiert (Two-Step-PCR)		
pENTR_p53_E285K_72R				
pENTR_p53_R283P_72R				
pENTR_p53_R282W_72R				
pENTR_p53_R280T_72R				
pENTR_p53_P278S_72R				
pENTR_p53_G266E_72R				
pENTR_p53_C277F_72R				
pENTR_p53_R249S_72R				
pENTR_p53_R248Q_72R				
pENTR_p53_G245S_72R				
pENTR_p53_R213X_72R				
pENTR_p53_H179R_72R				
pENTR_p53_C176F_72R				
pENTR_p53_R175H_72R				
pENTR_p53_Y163C_72R				
pENTR_p53_R158H_72R				
pENTR_p53_V157F_72R				
pENTR_p53_C135Y_72R				
pENTR_p53_V143A_72R				
pENTR_p53_R273H_72R			LR-Reaktion	generiert (Site-directed Mutagenesis)
pENTR_p53_V143A_72P				
pENTR_p53_R273H_72P				
pENTR_p53_M237I_72R				
pENTR_p53_R248W_72R				
pENTR_p53_Y234C_72R	Transiente Transfektion (Luziferase Assay)	generiert (LR-Reaktion)		
pENTR_p53_Y220C_72R				
pENTR_p53_R196X_72R				
pCMV_p53_R306X_72R				
pCMV_p53_E285K_72R				
pCMV_p53_R283P_72R				
pCMV_p53_R282W_72R				
pCMV_p53_R280T_72R				
pCMV_p53_P278S_72R				
pCMV_p53_G266E_72R				
pCMV_p53_C277F_72R				
pCMV_p53_R249S_72R				
pCMV_p53_R248Q_72R				
pCMV_p53_R248W_72R				
pCMV_p53_G245S_72R				
pCMV_p53_M237I_72R				
pCMV_p53_Y234C_72R				
pCMV_p53_Y220C_72R				
pCMV_p53_R213X_72R				
pCMV_p53_R196X_72R				
pCMV_p53_H179R_72R				
pCMV_p53_C176F_72R				
pCMV_p53_R175H_72R				
pCMV_p53_Y163C_72R				

pCMV_p53_R158H_72R		
pCMV_p53_V157F_72R		
pCMV_p53_C135Y_72R		
pCMV_att	LR Reaktion	Claudia Oswald
pMSCV_hygro_AttC	(Destination Vektor)	Anne Bretz (AB25)
pCMV_p53_R273H_72R		Thorsten Stiewe Box 3 I7 (TS475)
pCMV_LV		Thorsten Stiewe Box 4 G6 (TS537)
pCMV_p53_wt_72R		Thorsten Stiewe Box 4 C6 (TS501)
pCMV_p53_wt_72R	Transiente Transfektion (Luziferase Assay)	RBK 303
pGL3_p53-Luc		Thorsten Stiewe Box 2 D5 (TS347) bzw. Box 2 E3 (TS354)
pcDNA_HAp73 α		Thorsten Stiewe Box 4 E1 (TS515)
pcDNA_HAp73 β		Thorsten Stiewe Box 4 E2 (TS514)
pMCSV_p53_V143A_72R		
pMCSV_p53_R273H_72R		
pMCSV_p53_V143A_72P		
pMCSV_p53_R273H_72P		
pMSCV_p53_R175H_72R		
pMCSV_hygro	stabile Transfektion	generiert (LR-Reaktion)
pENTRD/TOPO	TOPO Klonierung	Michael Wanzel
		Invitrogen

2.1.4. Oligonukleotide

Die angegebene Primer wurden in verschiedenen Mutageneseverfahren verwendet, welche Methoden erläutert werden. Die Primer wurden anhand der nativen *TP53*-Sequenz und nach Vorgaben von Kato et al. 2003 erstellt. Hervorgehoben ist jeweils die von der *TP53*-Sequenz abweichende Punktmutation.

2.1.4.1. Two-Step PCR-Primer

Primerbezeichnung	Sequenz
17-p53_R306X	GGAGCACTAAG TG AGCACTGCCCAAC
12-p53_E285K	ACCGGCGCACAA AAG GAAGAGAATCTC
96-p53_R283P	GGAGAGACCGG CCC ACAGAGGAAGAG
04-p53_R282W	CTGGGAGAGACT TGG CGCACAGAGGAA
35-p53_R280T	TGTGCGCCGGT TGT CCCAGGACAGG
40-p53_P278S	TTTGTGCCTGT TCT TGGGAGAGACCGG
43-p53_G266E	GTAATCTACTG GAA CGGAACAGCTTT
70-p53_C277F	GTGTTTGTGCCT TTT CCTGGGAGAGAC
06-p53_R249S	GCATGAACCGG AGC CCCATCCTCACC
01-p53_R248Q	GCGGCATGAAC CAG AGGCCCATCCTC
02-p53_R248W	GCGGCATGAAC TGG AGGCCCATCCTC
05-p53_G245S	GCATGAACCGG AGC CCCATCCTCACC
13-p53_M237	ACTACAAC TACT TGTAACAGTTCC
19-p53_Y234C	CCACCATCCACT TGCA ACTACATGTGT

07-p53_Y220C	TGGTGGTGCCCT <u>TGT</u> GAGCCGCCTGAG
08-p53_R213X	GAAACACTTTTT <u>TGAC</u> CATAGTGTGGTG
09-p53_R196X	ATTTCCCTCCACT <u>TCAG</u> ATAAGATGCTG
16-p53_H179R	GAGCAGCGCTC <u>ACGG</u> TGGGGGCAGCG
10-p53_C176F	TCATGGTGGGG <u>GAA</u> GCGCCTCACAAC
100-p53_R175H	TGGTGGGGGCAG <u>TGC</u> CCTCACAACCTC
15-p53_Y163C	TGTGACTGCTT <u>GCAG</u> ATGGCCATGGC
26-p53_R158H	ATGGCCATGGC <u>GTG</u> GACGCGGGTGCC
11-p53_V157F	GCCATGGCGCG <u>GAA</u> GCGGGTGCCGGG
48-p53_C135Y	TTGGCCAGTT <u>GTAAA</u> AACATCTTGTT
p53-Mut_R273H	AGCTTTGAGGT <u>GCA</u> TGTTTGTGCCTG
p53-Mut_V143A	AACCCACAGCTG <u>CGC</u> AGGGCAGGTCT
mod.LS5	<u>CACC</u> ATGGAGGAGCCGCAGTCAGATC
mod.LS6	TCAGTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTCTTG

2.1.4.2. Multi Site-directed Mutagenesis Primer

Primerbezeichnung	Sequenz
p53_wt_P72R	[Phos]CAGAGGCTGCTCCCC <u>CGCG</u> TGGCCCCTGCACC
p53_wt_R72P	[Phos]CCAGAGGCTGCTCCCC <u>CCCG</u> TGGCCCCTGCACC
p53-SDMut-R248W	[Phos]GGCGGCATGAAC <u>TGG</u> AGGCCCATCCT
p53-SDMut-M237I	[Phos]CCATCCACTACAAC <u>TACATCT</u> GTAACAGTTCCTGCA
p53-SDMut-Y234C	[Phos]CTGTACCACCATCCACT <u>TGCA</u> ACTACATGTGTAAC
p53-SDMut-Y220C	[Phos]AGTGTGGTGGTGCCT <u>TGT</u> GAGCCGCCTGAGGT
p53-SDMut-R196X	[Phos]CTCCTCAGCATCTTATCT <u>TGAG</u> TGGAAGGAAATTTGC

2.1.4.3. Site-directed Mutagenesis Primer

Primerbezeichnung	Sequenz
fwd-Primer-p53_P→R	CCAGAGGCTGCTCCCC <u>CGCG</u> TGGCCCCTGCACCAGC
rev-Primer-p53_P→R	GCTGGTGCAGGGGCCAC <u>GCGG</u> GGGAGCAGCCTCTGG

2.1.4.4. Sequenzierungsprimer

Primerbezeichnung	Sequenz
M13-fwd (<i>Invitrogen</i>)	GTAAAACGACGGCCAG
M13-rev (<i>Invitrogen</i>)	CAGGAAACAGCTATGAC
OligoC72-for	TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA
OligoC72-for	TCTGGGAAGGGACAGAAGATGAC
exon6 PCR rev nested	GGGACCACCACACTATGTCG
P53-E6/7F	TGAGGTTGGCTCTGACTGTA

2.1.5. Käufliche Komplettausstattungen – Kits

Die aufgeführten Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet.

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung	Relevante Inhalte
pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit	<i>Invitrogen</i>	Klonierung	pENTR™ TOPO® vector, Salt Solution, Water, M13 Forward / Reverse Sequencing Primer
Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix	<i>Invitrogen</i>	Klonierung	LR Clonase™ II, Enzyme Mix, Proteinase K
QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	<i>Agilent</i>	Mutagenese	QuikChange Multi enzyme blend, QuikChange Multi Reaction Buffer, QuikSolution, XL10-Gold ultracompetent cells
QuikChange II XL Site-directed Mutagenesis Kit	<i>Agilent</i>	Mutagenese	PfuUltra High Fidelity DNA polymerase, QuikSolution Reagent, Reaction Buffer, XL10-Gold ultracompetent cells
PfuUltra Hotstart DNA Polymerase	<i>Agilent</i>	PCR	PfuUltra Hotstart DNA Polymerase, Reaction Buffer
TaqMan® SNP Genotyping Assay	<i>Applied Biosystems</i>	SNP Analyse	sequence-specific forward and reverse primers, TaqMan® MGB Probes (VIC®, FAM™)
TaqMan® Genotyping Master Mix	<i>Applied Biosystems</i>	Genotyping Assay / SNP Analyse	TaqMan® Genotyping Master Mix
Lipofectamine™ LTX	<i>Invitrogen</i>	Transiente Transfektion	Lipofectamin™ LTX
ESCORT™ V Transfection Reagent	<i>Sigma Aldrich</i>	Transiente Transfektion	ESCORT V Transfection Reagent, ESCORT V Transfection Buffer
Luciferase Assay System	<i>Promega</i>	Luziferase Assay	Luciferase Cell Culture Lysis 5X Reagent
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	<i>Promega</i>	Luziferase Assay	Passive Lysis Buffer 5X, Luciferase Assay Buffer II, Luciferase Assay Substrate
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	<i>Promega</i>	Viability Assay	CellTiter-Glo® Buffer, CellTiter-Glo® Substrate
Beetle-Juice®	<i>PJK</i>	Luziferase Assay	Beetle-Juice®, D-Luciferin, ATP
Renilla-Juice®	<i>PJK</i>	Luziferase Assay	Renilla-Juice®, Coelenterazin (CTZ), Reconstruction buffer
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	<i>Promega</i>	DNA-Aufreinigung	Membrane Binding Solution, Membrane Wash Solution, Nuclease-Free Water, Wizard® SV Minicolumns
QIAquick® Gel Extraction Kit	<i>Quiagen</i>	DNA-Aufreinigung	Buffer (QG, PE, EB), QIAquick® columns
QIAquick® PCR Purification Kit	<i>Quiagen</i>	DNA-Aufreinigung	Buffer (PB, PE, EB), pH indicator, QIAquick® columns
MultiScreen® PCR µ96 Plate	<i>Millipore</i>	DNA-Aufreinigung	MultiScreen® PCR µ96 Plates
NucleoFast® 96 PCR Clean-up	<i>Macherey-Nagel</i>	DNA-Aufreinigung	NucleoFast® 96 PCR Plates Elution Plates, Recovery Buffer, RNase-free H ₂ O
NucleoBond® Xtra Midi	<i>Macherey-Nagel</i>	Plasmidisolierung	Buffer (RES, LYS, NEU, EQU, WASH, ELU), NucleoBond® Xtra Midi columns, RNase A

2.1.6. Verbrauchsmaterialien

Materialbezeichnung	Hersteller
Pipetten	<i>Eppendorf, Greiner</i>
Pipettenspitzen	<i>Sarstedt</i>
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2ml)	<i>Sarstedt</i>
Reaktionsgefäße (Falcons) (15 ml, 50 ml)	<i>Sarstedt</i>
Zellkulturschalen (ø5 cm, ø10 cm, ø15 cm)	<i>Sarstedt</i>
Zellkulturflaschen	<i>Sarstedt</i>
Multiwell-Platten (6 well, 96 well, 384 well)	<i>Sarstedt</i>
Nitrocellulose Membran ECL Bond	<i>Amersham</i>
Elektroporationsgerät <i>Micropulser</i> und Gefäße	<i>BioRad</i>
Plastikküvetten	unbekannt
Reagenzgläser	unbekannt
Erlenmeyerkolben	unbekannt
Schottflaschen	unbekannt
Deckgläser, Neubauerzählkammer	unbekannt

2.1.7. Geräte

Gerät	Hersteller	Verwendung
Thermocycler	<i>Eppendorf, Mastercycler gradient Applied Biosystems, GeneAmp PCR System 9700</i>	PCR
RT-qPCR Thermo Cycler	<i>Roche</i>	RT-qPCR
Inkubatoren	<i>Heraeus function line Typ B12/B10</i>	Sterile Zellkultivierung
Spectrophotometer	<i>NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific</i>	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren
Photometer	<i>Eppendorf, BioPhotometer</i>	Konzentrationsbestimmung von Proteinen
Agarosegel UV-Gerät, Photo	<i>Diverse (Roth, Eppendorf)</i>	Nukleinsäurenachweis
Luminometer	<i>Diverse</i>	Lumineszenznachweis
Zentrifugen	<i>Eppendorf, Centrifuge 5810R Eppendorf, Centrifuge 5415R Eppendorf, Minispin</i>	Diverse Nukleinsäure- und Proteinarbeiten
Elektroporator	<i>Biorad, Micropulser</i>	Elektroporation
Vortex	<i>Scientific Industries, Vortex Genie 2</i>	Probenaufbereitung

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung von Bakterien auf Agarplatten und in Flüssigmedien

Verschiedene E.coli Stämme wurden auf antibiotikaversetzten Festagarplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht zur Koloniebildung stimuliert. Über die vorherige Transformation entsprechender Resistenzplasmide wurde ein selektives Wachstum von Bakterienkolonien erzeugt.

Die weitere Kultivierung einer bakteriellen Monokultur in Flüssigmedien erfolgte durch die sterile Übertragung isolierter Bakterienkolonien in Reagenzgläser bzw. Erlenmeyerkolben, die vorher mit 3 bzw. 100 ml LB Medium und entsprechendem Antibiotikum (Verdünnung 1:1000) befüllt wurden. Nach 12-16 Stunden im Bakterienschüttler bei 37°C und 200 rpm wurde die Kultur der Plasmidisolierung (Mini- bzw. Midipräparation) zugeführt.

Material:

LB Medium	5 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, pH 7,5
S.O.C. Medium (<i>Invitrogen</i>)	2% Trypton, 0,5% Hefextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose
LB Agar	1% Agar-Agar in LB Medium 1 ‰ Antibiotikum (Ampicillin [100 mg/dl], Kanamycin [50 mg/dl])
Antibiotika	Ampicillin, Kanamycin

2.2.2. Transformation kompetenter E. coli Bakterien

Zur Einbringung von DNA in Bakterien (Transformation) wurden Methoden verwendet, die auf der temporären Permeabilitätssteigerung der bakteriellen Zellwand beruhen. Hierzu zählen die plötzliche Temperaturerhöhung (Hitzeschock) und die Abgabe eines elektrischen Impulses (Elektroporation).

2.2.2.1. chemische Transformation kompetenter E. coli Bakterien

50 µl chemokompetente E.coli Bakterien wurden nach allmählichem Auftauen auf Eis mit 2 µl des zu transformierenden Plasmids versetzt. Nach 30-minütiger eisgelagerter Inkubation wurde der Ansatz einem Hitzeschock bei 42°C für 60 sec unterzogen, folgend sofort zurück auf Eis transferiert und dort für weitere 2 min belassen. Anschließend wurden die Bakterien in 300 µl LB Medium für 60 min bei 37°C und 500-600 rpm auf dem Heizblock inkubiert. Schließlich konnte der Transformationsansatz auf einer antibiotikaversetzten Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert werden.

2.2.2.2. elektrische Transformation kompetenter E. coli Bakterien

50 µl elektrokompetente E. coli Bakterien wurden nach allmählichem Auftauen auf Eis mit 2 µl des zu transformierenden Plasmids versetzt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Durch einen elektrischen Impuls eines Elektroporator (*Micropulse, Biorad*) wurden die Bakterien transformiert und sofort in ein frisches Reaktionsgefäß mit 300 µl LB Medium überführt. Nach 60-minütiger Inkubation

im Bakterienschüttler bei 37°C und 200 rpm konnte der Transformationsansatz auf einer antibiotikaversetzten Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert werden.

Material: s. 3.1.1. Kultivierung von Bakterien

2.2.3. Plasmidisolierung durch alkalische Lyse

Transformierte Plasmid-DNA kann durch die sog. alkalische Lyse aus Bakterien extrahiert, aufgereinigt und folgend analysiert werden (Birnboim & Doly, 1979).

2.2.3.1. Mini Präparation

Eine monoklonale Bakteriensuspension wurde nach nächtlicher Kultivierung in 2 ml Eppendorfgefäße überführt und für 2 min bei 15.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das entstandene Bakterienpellet wurde vom Überstand befreit und in 300µl P1-Puffer resuspendiert. Unter Invertierung erfolgte die Zelllyse in 300 µl P2-Puffer und deren Reaktionsstopp für 5 Minuten auf Eis durch weitere 300 µl P3-Puffer. Nach Zentrifugation (5 min, 15.000 x g, 4°C) wurde der klare, plasmidhaltige Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und in diesem die DNA durch Zugabe von 700 µl Isopropanol präzipitiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 15.000 x g, 4°C) wurde Isopropanol entfernt und das gebildete DNA Pellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (5 min, 15.000 x g, 4°C) und dann bei 37°C luftgetrocknet. Schließlich konnte die DNA in 50 µl ddH₂O resuspendiert und für 30 min bei 37°C gelöst werden.

Material:

P1-Puffer (Resuspensionspuffer)	50 mM Tris·Cl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A
P2-Puffer (Lysepuffer)	200 mM NaOH, 1% (w/v), SDS
P3-Puffer (Neutralisierungspuffer)	2.6 M Kaliumacetat, pH 7.2

2.2.3.2. Midi Präparation

Aus einer monoklonalen Bakteriensuspension wurde nach nächtlicher Kultivierung mithilfe des *NucleoBond Xtra Midi Kits* entsprechend der Protokollanweisungen des Herstellers (*Macherey-Nagel*) Plasmid isoliert. Durchgeführte Schritte umfassten mithilfe von Filtersäulen Lyse-, Neutralisierungs-, Wasch und Elutionsschritte, welche auf dem Prinzip der Ionenaustauschchromatographie beruhen. Das entstandene DNA Pellet wurde in 100 µl ddH₂O resuspendiert und für 30 min bei 37°C gelöst.

2.2.4. DNA-Analyse

Substanz	Zusammensetzung bzw. Hersteller
10x TBE Puffer	0,89 M Tris, 0,89 M Borat, 20 mM EDTA
TE Puffer	10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8,0)
Ethidiumbromid (10 mg/dl)	<i>Roth</i>
Restriktionsendonukleasen und Puffer	<i>Fermentas</i>
Probenpuffer (6x) (<i>Loading Dye</i>)	10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0.03% Bromophenol Blau, 0.03% Xylen Zyanol FF, 60% Glycerol, 60 mM EDTA
DNA-Längenstandard (DNA-Ladder)	<i>Fermentas (GeneRuler DNA Ladder Mix)</i>
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP)	<i>Sigma, Stratagene, Quiagen</i>

2.2.5. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die „polymerase chain reaction“ (PCR) ist eine Methode zur exponentiellen in-vitro-Amplifizierung von DNA-Segmenten. Die Zielsequenz eines Genabschnitts (Template) wird dabei durch zwei spezifische Oligonukleotide (Primer) eingegrenzt, welche als Startsequenz für eine DNA-Polymerase fungieren. Deren Reaktiossubstrate, die Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP), werden exogen zugeführt.

Im ersten Schritt der PCR wird das Template bei Temperaturen um 94°C denaturiert und der DNA-Doppelstrang entzweit. Im zweiten Schritt wird die Temperatur zügig auf 55-65°C, in jedem Fall aber 2°C unter die Schmelztemperatur der Primer gesenkt. Folgend hybridisieren diese mit den komplementären DNA-Einzelstrangabschnitten des verwendeten Templates. Da die Primer im starken Überschuss dem Reaktionsansatz zugesetzt sind, hybridisieren sie dem abgetrennten Einzelstrang gegenüber bevorzugt mit dem komplementären DNA-Strang. Im Elongationsschritt wird die Temperatur auf das Aktivitätsoptimum der genutzten DNA-Polymerase von etwa 70-72°C gesteigert. Diese verlängert die angelagerten Primer mittels zugesetzter dNTP in 5'-3' Richtung. Der üblicherweise etwa 30-fach wiederholte Zyklenverlauf lässt die Menge der amplifizierten DNA-Fragmente exponentiell auf nachweisbare Mengen anwachsen.

In dieser Arbeit wurde die PCR verwendet, um Polymorphismusanalysen (RFLP-Analysen) und Klonierungsexperimente des *TP53*-Gen vorzunehmen. Angaben zu Reaktionsansatz und Temperaturschema sind unter dem jeweiligen Experiment entsprechend aufgeführt.

Zur PCR-Optimierung während eines Experimentes wurden verschiedene Parameter modifiziert (Temperaturschemata [u.a. „Touch Down PCR“], 5-10%ige Zusätze von DMSO, verschiedener Konzentrationen von Primer und Templates)

2.2.6. Design von PCR-Primern

Die Primersequenzen wurden in silico durch Modifikation der cDNA-Sequenz des Templates konzipiert. Bei der rechnerischen ($T_m = (4 \cdot [G+C]) + (2 \cdot [A+T])$ °C) und computerisierten Primerüberprüfung wurde auf eine Schmelztemperatur (T_m) von über 50°C und eine geringe Tendenz,

Sekundärstrukturen oder Primerdimere auszubilden, geachtet. Andernfalls wurden die Sequenzen cDNA-analog verlängert oder verkürzt. Wurden die Primer im Rahmen der Anwendung von Kits verwendet, erfolgten Modifikationen entsprechend der Herstellerprotokolle. Primer wurden bei *Sigma Life Science* erworben.

2.2.7. Gelelektrophorese von DNA

Die Gelelektrophorese dient der größenanalogen Auftrennung und Visualisierung von DNA. Dabei wird diese in einem elektrischen Feld zur Durchwanderung einer Polymermatrix angeregt.

Die DNA-Proben wurden Abhängigkeit der erwarteten DNA-Fragmentlängen unter Verwendung von 1x TAE-Laufpuffer in 1-2%-igen Agarosegelen bei 90-110V aufgetrennt. Im Voraus wurden sie mit einer entsprechenden Menge 6x Probenpuffer (*Fermentas*) versetzt. Zur Visualisierung der Nukleinsäuren wurde Ethidiumbromid (*Roth*) genutzt (0,2 mg/ml). Dieses reagiert nach Interkalierung in die DNA auf Anregung durch UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$) mit sichtbarer Fluoreszenzemission. Der optische Vergleich der entstandenen Banden mit dem DNA-Längenstandard (*Fermentas*) eines bekannten Bandenmusters ermöglichte die Bestimmung der DNA-Länge.

Material:

TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-Acetat, 50 mM EDTA, pH 8.0
Agarosegel (1%)	0,1 g Agarose/ml in TAE Puffer (1x)

2.2.8. Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA

Zum Nachweis der korrekten Transformation und bakteriellen Vermehrung eines Plasmids kann im Anschluss an eine Plasmidisolation eine Restriktionsanalyse durchgeführt werden. Hierbei werden bakterielle Enzyme (Restriktionsendonukleasen) verwendet, welche DNA an bekannten, spezifischen Nukleotidsequenzen hydrolytisch spalten können. Die Restriktionsendonukleasen wurden unter vom Hersteller (*Fermentas*) empfohlenen Bedingungen (Reaktionspuffer, -temperatur und -dauer) mit 1-2 μg Plasmid-DNA zur Reaktion gebracht. Ein Reaktionsansatz stellte sich zusammen aus:

Restriktionsanalyseschema			
Plasmid-DNA	10x Reaktionspuffer	Restriktionsenzym	Wasser
5-10% oder 1-2 μl	10% oder 1 μl	0,5% oder 0,1 μl	ad 100% oder ad 20 μl

In Kenntnis der Plasmidsequenz und der verwendeten Restriktionsendonuklease konnte das Bandenmuster der sich anschließenden Auftrennung vorausgesagt und als Kontrolle verwendet werden.

Material:

Reaktionspuffer (10x) (<i>Fermentas</i>)	verschiedene Zusammensetzungen aus: Tris-HCl (pH 7,5), MgCl ₂ , NaCl, KCl, BSA
---	--

2.2.9. DNA-Aufreinigung

DNA-Proben sind nach Experimenten, die auf die Verwendung von Enzymen und kurzen DNA-Fragmenten angewiesen sind (Polymerasen, Oligonukleotide etc.), als verunreinigt anzusehen und vor weiterer Nutzung einer Aufreinigung zu unterziehen. Die Funktionsweise dazu verwendeter Kits beruht auf dem Prinzip, dass DNA in Gegenwart chaotroper (Wasserstoffbrückenbindungen auflösend) Salze an Silicamembranen bindet, von denen sie in nachfolgenden Schritten mit Wasser wieder abgelöst werden kann.

2.2.9.1. Aufreinigung von DNA in Lösung

DNA-Lösungen wurden abhängig vom Versuchsmaßstab unter Verwendung geeigneter Kits und gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Für einzelne Reaktionsgefäße wurde das zentrifugenbasierte *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)* verwendet. 96- well Platten wurden mit den vakuumbasierten *NucleoFast 96 well Plat-Kit (Macherey-Nagel)* und dem *MultiScreen PCR μ 96 Plate-Kit (Millipore)* aufgereinigt. Die DNA wurde in 30-50 μ l ddH₂O eluiert.

2.2.9.2. Aufreinigung nach DNA-Exzision aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen erfolgte nach Exzision mithilfe des *QIAquick[®] Gel Extraction-Kits (Quiagen)* oder des *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up Systems* entsprechend der Herstellerangaben. Die DNA wurde in 40 μ l ddH₂O eluiert.

2.2.10. Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der Konzentrationen einer DNA-Probenlösung wurde das Spektrophotometer *NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific)* verwendet. Der Messung wurden dem Herstellerprotokoll folgend 1 – 1,5 μ l DNA-Lösung unterzogen. In das Messergebnis gingen die Absorbanz bei 260 nm, 280 nm und deren Koeffizient als Reinheitsmaß ($A_{260}/A_{280} \sim 1,8$) ein.

2.2.11. DNA-Sequenzierung

Um die exakte Nukleotidsequenz von DNA festzustellen, wurden DNA-Proben in Kombination mit entsprechenden Sequenzierprimern an *LGC Genomics GmbH* in Berlin versandt. Zum Zeitpunkt der Einsendung wurde dort die Kettenabbruchmethode nach Sanger mithilfe von Sequenziergeräten hoher Genauigkeit praktiziert (ABI 3730 XL und ABI 3731 XL). Das Sequenzierungsergebnis konnte anschließend computerisiert auf Richtigkeit überprüft werden.

2.2.12. Formen der Mutagenese und Klonierung mittels Gateway System®

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungsexperimente war folgendes Arbeitsschema Grundlage:

1. Mutagenese
2. TOPO® Klonierung in einen pENTR-Vektor
3. LR Rekombinationsreaktion in einen pCMV/pMSCV Vektor
4. anschließende Experimente (Transfektion, Luziferase Assay)

2.2.13. Mutagenese

Mutagenese bezeichnet die stabile Veränderung der genetischen Information auf Gensequenz- oder Genomebene. Im Rahmen dieser Arbeit wurden *TP53*-Punktmutanten (Missense- und Nonsense-Mutationen) erzeugt, welche sich um ein einziges Basenpaar von der *TP53*-Wildtypsequenz unterschieden.

2.2.13.1. PCR Mutagenese (Two-Step PCR)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Konzept der PCR-Mutagenese erprobt und erfolgreich etabliert (nach Kato et al. 2003). Die PCR-Mutagenese ermöglicht in zwei aufeinander abgestimmten PCR-Schritten die Punktmutagenese einer Gensequenz. Jede zu erzeugende Punktmutation, so auch die hier angestrebten *TP53*-Mutagenese, erfordert ein Primerpaar bestehend aus Mutageneseprimer und N- bzw. C-terminalem Primer:

	Mutageneseprimer (1-196 bp)	Mutageneseprimer (197-393 bp)	N-terminaler Primer mod. LS5	C-terminaler Primer mod. LS6
Länge	26 bp	26 bp	26 bp	28 bp
Sequenz	Revers-komplementär	Nativ	Nativ (+CACC)	Revers-komplementär
Annealing am	Plusstrang	Minusstrang	Minusstrang	Plusstrang

Jeder Mutageneseprimer bestand aus 26 Nukleotiden und trug ausgehend von seinem 5'-Ende die Punktmutation an Position 14. Die Länge des kalkulierten DNA-Zwischenproduktes sollte minimiert werden, um im Folgeschritt optimal genutzt zu werden. Punktmutationen der vorderen Matrizenhälfte von *TP53* (Aminosäuren 1-196) wurden deshalb durch revers-komplementäre Rückwärtsprimer eingefügt. Umgekehrt konnten die Codonpositionen der hinteren Matrizenhälfte (Aminosäuren 197-393) durch Vorwärtsprimer generiert werden. Als flankierende Primerpartner wurden zwei universell einsetzbare Oligonukleotide eingesetzt, die in entsprechend entgegengesetzter Laufrichtung zum Mutageneseprimer an den C- oder N-Terminus der Matrize banden („mod. LS5“ und „mod. LS6“). Das 5'-Ende des N-terminalen Vorwärtsprimers wurde mit der Sequenz „CACC“-Sequenz versehen, um in anschließenden Klonierungsexperimenten die gerichtete Integration des Endproduktes in einen linearen pENTR-Vektor zu gewährleisten (TOPO®-Klonierung).

Im ersten PCR-Schritt wurden der Mutageneseprimer und der korrespondierende C- oder N-terminale Primerpartner inkubiert (eingeschlossen Reaktionspuffer, Desoxyonukleotide und DNA-Polymerase, **Abb. 2.1., PCR-Schritt 1**). Als PCR-Temperaturschema kam ein laborinternes Standardprotokoll zum Einsatz. Das amplifizierte Zwischenprodukt, ein bereits punktmutiertes Matrizenfragment, wurde elektrophoretisch detektiert und seine Länge mit der theoretisch zu erwartenden Nukleotidzahl abgeglichen (s. Ergebnisteil, **Abb. 3.13., A**). Die Reaktionsedukte und insbesondere die verwendeten Primer wurden durch eine Säulenaufreinigung aus der Probe entfernt (*Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega*).

Im folgenden PCR-Schritt diente das mutierte Zwischenprodukt durch seine hohe Oligonukleotidanzahl von 400-600 bp als Megaprimer. Es konnte unter PCR-Standardbedingungen gemeinsam mit dem korrespondierenden C- oder N-terminalen Standardprimer zur Generierung der kompletten, punktmutierten Sequenz eingesetzt werden (**Abb. 2.1., PCR-Schritt 2**). Das punktmutierte Endprodukt wurde ebenfalls elektrophoretisch auf seine korrekte Länge von 1179 Basenpaaren geprüft (s. Ergebnisteil, **Abb. 3.13., B**) Die als *TP53*-Sequenz identifizierte DNA-Bande (393 Aminosäuren, 1179 Basenpaare) wurde aus dem Elektrophoresegel isoliert und erneut aufgereinigt (*Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega*). Auf diese Weise wurden neben den Reaktionsedukten auch zahlreiche intermediäre Reaktionsprodukte aus der Probe entfernt. Durch eine DNA-Sequenzierung konnte jede eingefügte Punktmutation von C- und N-terminal bestätigt werden. Im Anschluss an die Mutagenese wurden alle generierten Punktmutanten gerichtet in Zielvektoren kloniert und bakteriell repliziert (**2.2.14. und 2.2.15.**).

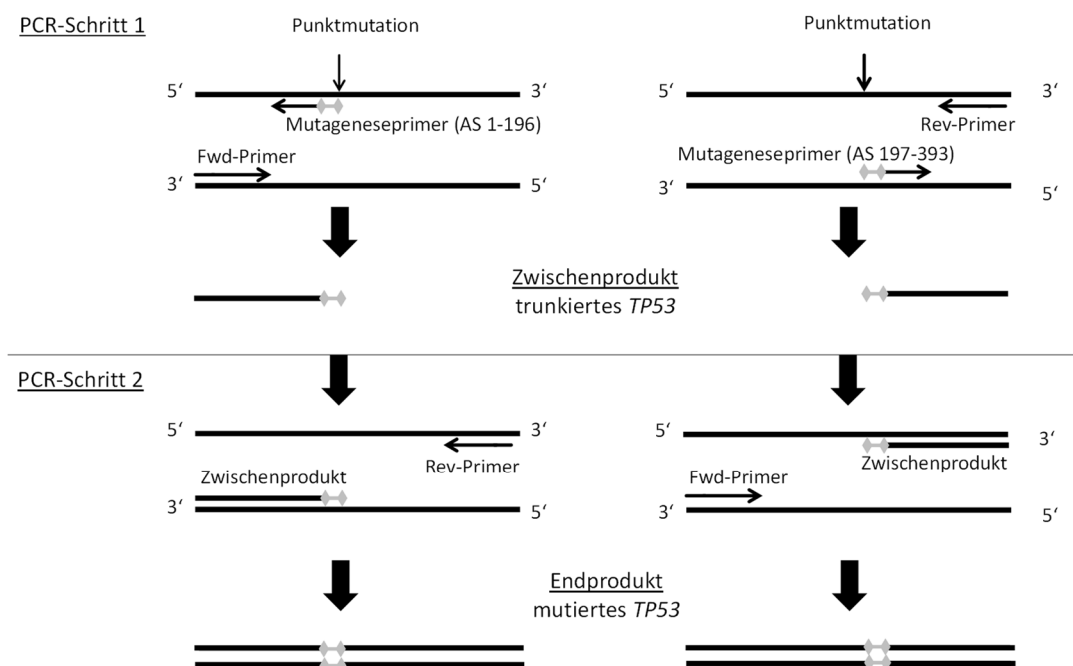


Abb. 2.1. Prinzip der PCR-Mutagenese (modifiziert nach Kato et al. 2003)

Rev-Primer = Rückwärtsprimer, Fwd-Primer = Vorwärtsprimer.

Beide PCR-Schritte wurden im Maßstab von 20 µl durchgeführt. Template stellte jeweils die *TP53*-cDNA dar, welche zuvor durch eine sequenzierungsüberprüfte *site-directed Mutagenesis* mit einem Polymorphismus versehen wurde (rs1042522, P72R).

Schritt 1 - PCR-Reaktionsschema							
<i>TP53</i> cDNA Template	dNTP (10 mM)	Forward Primer	Reverse Primer	PfuUltra Hotstart DNA Polymerase (2,5 U/µl)	Reaction Buffer (10x)	ddH ₂ O	
1 ng	87,5 µM	10 µM	10 µM	0,4 U/µl	1x	ad 20µl	
PCR-Temperaturschema							
94°C	94°C (Denaturierung)	60°C (Primeranlage- rung)		72°C (Elongation)		72°C	
2 Min	30 sec	30 sec		90 sec		7 min	
	30x						

Schritt 2 - PCR-Reaktionsschema							
<i>TP53</i> cDNA Template	dNTP (10 mM)	Forward Primer	Reverse Primer	PfuUltra Hotstart DNA Polymerase (2,5 U/µl)	Reaction Buffer (10x)	ddH ₂ O	
1 ng	87,5 µM	10 µM bzw. 12 µl	10 µM bzw. 12 µl	0,4 U/µl	1x	ad 20µl	
PCR-Temperaturschema							
94°C	94°C	72°C	94°C Denaturierung	60°C Hybridisie- rung	72°C Elongation	72°C	
2 min	1 min	2 min	30 sec	30 sec	90 sec	7 min	
	5x		30x				

2.2.13.2. Site-directed Mutagenese und Multi site-directed Mutagenese

Um Punktmutationen in doppelsträngige Plasmid-DNA einzufügen, wurde außerdem die „*site-directed mutagenesis*“ verwendet. Zur Anwendung kamen das *site-directed Mutagenesis*-Kit und *Multi site-directed Mutagenesis*-Kit (jeweils *Agilent*), um gemäß Herstellerprotokoll Punktmutationen in die originäre *TP53*-Sequenz einzufügen. Der Versuchsaufbau des *site-directed Mutagenesis*-Kits machte die Generierung eines mutagenen Primerpaares pro einzufügender Punktmutation erforderlich. Das *Multi site-directed Mutagenese*-Kit verwendete hingegen einen einzelnen, am 5'-Ende phosphorylierten Mutageneseprimer. Das Mutageneseprodukt wurde anschließend in elektrokompetente DH10B-Bakterien transformiert und auf selektiven Kanamycin-Agarplatten ausgestrichen. Einzelne Bakterienkolonien wurden Mini-Präparationen zugeführt und der Mutageneseerfolg anhand von Restriktionsanalyse und Sequenzierung (Primer: M13-reverse, M13-forward, *Invitrogen*) bestätigt.

2.2.14. *TOPO*[®]-Klonierung

Um lineare PCR-Produkte durch Bakterien replizierbar zu machen, können sie neben konventionellen Ligationsexperimenten mithilfe der *TOPO*[®]-Klonierung in einen geeigneten Vektor integriert werden. Dieses Klonierungssystem beruht auf der Nutzung einer Topoisomerase I, welche unter geeigneten Bedingungen Doppelstrang-DNA in einen Vektor ligiert. Im Rahmen der Arbeit wurden mithilfe des *pENTRTM Directional TOPO[®] Cloning-Kits (Promega) TP53*-Punktmutanten in einen *pENTR*-Vektor (*pENTRTM/D-TOPO[®]*) überführt. Die Mutanten wurden in Mutageneseexperimenten zum Zweck der gerichteten Integration in den Zielvektor an ihrem 5' Ende mit einer CACC-Sequenz versehen. Nach Gelaufreinigung wurden sie den Herstellerangaben folgend *TOPO*[®]-kloniert, in chemokompetente Bakterien (*One Shot[®] Mach1TM, Invitrogen*) transformiert und auf selektiven, kanamyzinhalten Agarplatten ausgestrichen. Das Reaktionsprodukt wurde durch Mini-Präparationen amplifiziert und mittels Restriktionsanalyse (*NcoI, Fermentas*) überprüft. Sequenzierungen mithilfe kiteigener Primer (*M13 forward, M13 reverse, Invitrogen*) sicherten die korrekt orientierte Integration der Mutanten.

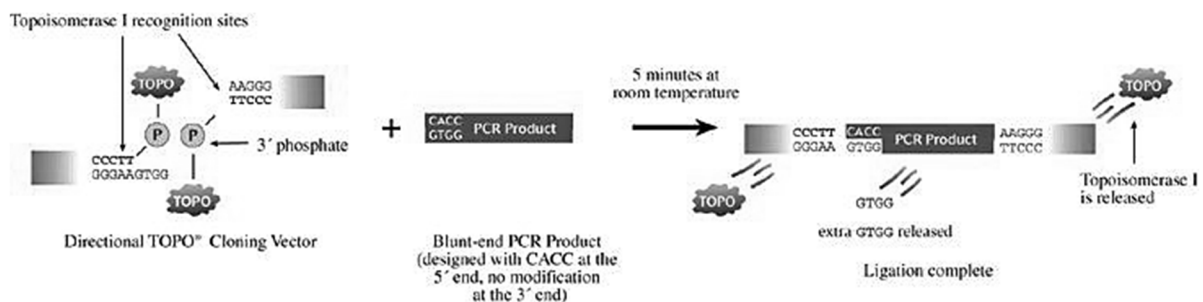


Abb. 2.2. Prinzip der direktionalen *TOPO*[®]-Klonierung (*Invitrogen*)

2.2.15. Gateway[®] Klonierung und LR-Reaktion

Die LR-Reaktion bezeichnet einen von λ -Bakteriophagen (bzw. phagenkodierten Enzymen) katalysierten Vorgang, vektorintegrierte Gensequenzen mit einem anderen Vektor zu rekombinieren. Diese Rekombination ist sequenzspezifisch, setzt also das Vorhandensein von Rekombinationsstellen („*attachment sites*“, *attL/R*) am Ausgangs- und Zielvektor („*entry clone*“ und „*destination vector*“) voraus. Als Ausgangsvektor fungierte hier der zuvor *TOPO*[®]-klonierte *pENTR*-Vektor mit integrierter *TP53*-Mutante. Diese war durch die entsprechend konzipierte *TOPO*[®]-Klonierungsstrategie von *attL1*- und *attL2*-sites flankiert. Den Zielvektor stellte ein *pCMV*- oder *pMSCV*-Vektor dar, der durch „blunt end“-Klonierungen mit einer *attR1/2*-flankierten *ccdB*-Kassette versehen wurde. Wenn transformiert, induziert diese die negative Selektion des Vektorträgers (Kodierung eines Gyrasehemmers) und sichert somit die Eliminierung eines obligaten Nebenprodukts der Rekombination.

Nach erfolgter LR-Reaktion gemäß Herstellerprotokoll (*Gateway[®] LR ClonaseTM II Enzyme Mix, Invitrogen*) wurde der Reaktionsansatz in DH10B-Bakterien elektrotransformiert. Unter der neu

erworbenen pCMV/pMSCV-vermittelten Ampizillinresistenz gelang die positive Selektion des korrekten Vektors auf entsprechendem LB-Selektionsagar. Das Reaktionsprodukt wurde durch DNA-Gewinnung in kleinem Maßstab vermehrt und einer Restriktionsanalyse unterzogen. Nach Aufreinigung konnten die *TP53*-Punktmutanten für transiente (pCMV) und stabile Transfektionen (pMSCV) genutzt werden.

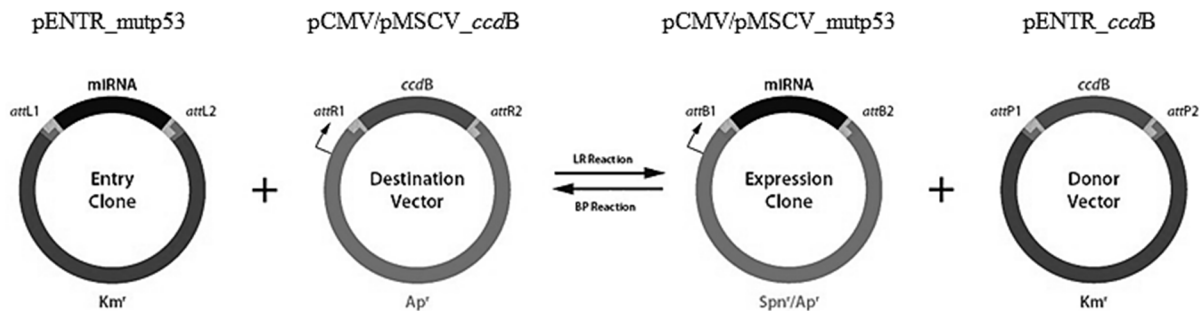


Abb. 2.3. Prinzip der LR-Reaktion (BP Reaktion = Umkehrreaktion) (*Invitrogen*)

2.2.16. Analyse von Genpolymorphismen

Genpolymorphismen („*single nucleotide polymorphism*“, SNP) sind Gensequenzvarianten innerhalb eines Genpools auf Ebene einzelner Nukleotide, die keine oder nur geringfügigen Folgen für den Phänotyp des SNP-Trägers haben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein proteinstruktureller SNP des 72. Codons des *TP53*-Gens analysiert (rs1042522), welcher für Arginin (CCC) oder Prolin (CGC) kodieren kann. Dazu wurde zuvor isolierte genomische DNA (gDNA) 87 verschiedener Zelllinien durch Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-(RFLP)-Analyse und SNP Genotyping hinsichtlich des *TP53*-Gens charakterisiert.

2.2.17. RFLP-Analyse

Um eine RFLP-Analyse von *TP53* durchzuführen, wurde es per PCR mithilfe sequenzspezifischer Primer amplifiziert, wobei die zelllinieninhärente gDNA das Template repräsentierte. Das Produkt war eine 199 bp lange, also trunkierte Sequenz, deren 111. Basenpaar den zu analysieren SNP aufwies.

PCR-Reaktionsschema						
Template	dNTP (10 mM)	Forward Primer (p53-C72_for)	Reverse Primer (p53-C72_rev)	Taq-Polymerase (X Units)	Reaction Buffer (5x)	ddH ₂ O
200 ng	0,4 µl	10 µM bzw. 12 µl	10 µM bzw. 12 µl	0,2 U/µl	1x	ad 20µl
PCR-Temperaturschema						
95°C	95°C (Denaturierung)	60°C (Primeranlagerung)	72°C (Elongation)	72°C		
3 min	15 sec	15 sec	30 sec	1 min		
	35x					

Das PCR-Produkt wurde folgend einer Restriktionsanalyse durch das Restriktionsenzym Bsh1236I (*Fermentas*) unterzogen. Dessen Zielsequenz lautet 5'-CG[^]CG-3' und restringiert damit spezifisch Prolin (CGC), nicht aber Arginin (CCC).

Restriktionsanalyseschema			
PCR-Amplifikat	10x Reaktionspuffer (Red)	BsH1236	Wasser
80% oder 8 µl	10% oder 1 µl	1% oder 0,1 µl	ad 100% oder ad 10 µl

In der anschließenden Gelelektrophorese ergaben sich drei zu erwartende Möglichkeiten von Bandenmustern, welche meist eindeutig auf den gegebenen SNP schließen ließen. Als Positivkontrolle wurden gDNA-Proben von Lymphozyten verwendet, die in der AG Stiewe bereits zuverlässig charakterisiert worden waren.

Genotyp	Codonsequenz	Bsh1236I-restringierbar?	erwartete DNA-Fragmente
<i>TP53_72R</i> (Arginin) homozygot	CCC	nein	199 bp
<i>TP53_72P</i> (Prolin) homozygot	CGC	ja	111 AS, 88 AS
<i>TP53_72R/P</i> (Arginin/Prolin) heterozygot	CCC/CGC	nein/ja	199 AS, 111 AS, 88 AS

2.2.18. SNP Genotyping basierend auf quantitativer Echtzeit-PCR

Der SNP „Rs1042522“ wurde neben der RFLP-Analyse mithilfe des *TaqMan*[®] *SNP Genotyping Assays* (*Applied Biosystems*) dem Herstellerprotokoll folgend bestimmt. Das Assay beruht auf verschiedenen molekularbiologischen Methoden, welche im Folgenden kurz erläutert werden.

2.2.18.1. quantitative Echtzeit-PCR (quantitative real time PCR, qRT-PCR)

Während der PCR-basierten DNA-Amplifikation kann die Nukleinsäuremenge quantitativ und unter gegebenen Bedingungen auch qualitativ charakterisiert werden. Beides geschieht während der PCR-Reaktionszyklen entweder durch Substanzen, die sich unspezifisch in DNA-Doppelstränge einlagern oder durch Oligonukleotid-Sonden, welche sequenzspezifisch an Doppel- oder Einzelstrangamplifikate binden. Durch jeweils verschiedene Mechanismen emittieren die gewählten Agenzien unter Photonenanregung ein messbares Fluoreszenzsignal, welches linear mit der DNA-Menge korreliert. Die Geschwindigkeit des Erreichens eines Schwellenwertes lässt Rückschlüsse auf die ursprünglichen, relativen Mengenverhältnisse der zu analysierenden Proben zu.

2.2.18.2. SNP Genotyping Assay

Das *TaqMan*[®] *SNP Genotyping Assay* (*Applied Biosystems*) ist eine Form der Polymorphismuscharakterisierung, welche sogenannte *TaqMan*[®]-Oligonukleotidsonden nutzt. Diese Oligonukleotide tragen eine der möglichen Sequenzen eines zu untersuchenden SNP, mit dem sie sequenzspezifisch hybridisieren können. An ihrem 5'-Ende tragen sie je einen Fluorophor (*VIC*[®] oder

FAMTM) und sind am 3'-Ende an einen fluoreszenzblockierenden Quencher gekoppelt („Förster resonance energy transfer“). Im Verlauf der qRT-PCR lagert sich die jeweilige *TaqMan*[®]-Sonde an ihre komplementäre Sequenz des codogenen Einzelstrangs an. Die Elongation erfolgt durch eine DNA-Polymerase mit 5'-3'-Exonuklease-Aktivität, wodurch die gebundene Sonde degradiert wird. Somit wird der Fluorophor vom Quencher getrennt und seine Fluoreszenzemission spezifischer Wellenlänge ermöglicht.

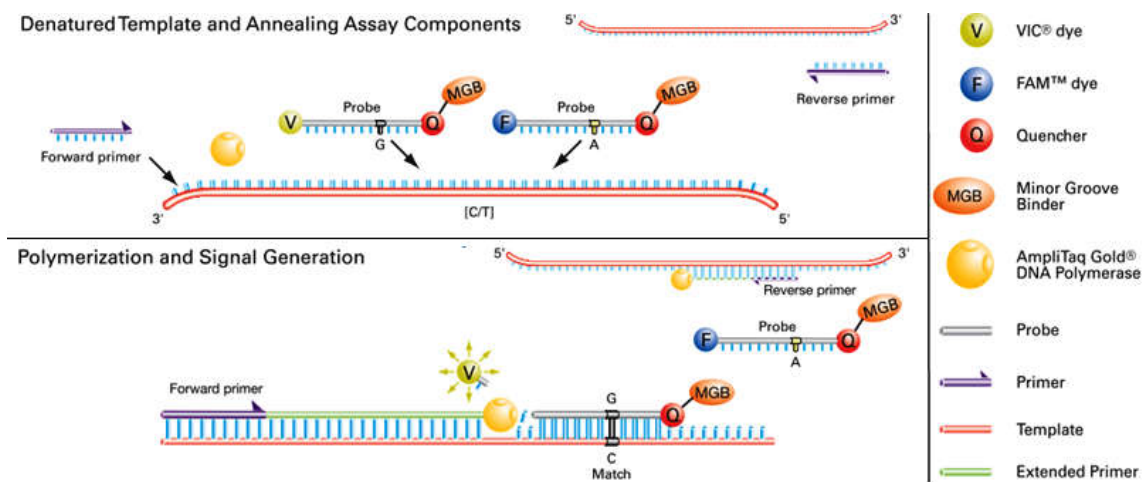


Abb. 2.4. Prinzip des SNP Genotyping Assays (*Taq Man*[®])

In den hier durchgeführten Versuchen wurde auf diese Weise ein *TP53*-SNP charakterisiert. Die qRT-PCR wurde gemäß Herstellerprotokoll im 384-well-Maßstab mit einem Probenvolumen von 5 µl pipettiert. Das Primerpaar (unbekannter Sequenz) zur Amplifizierung der relevanten *TP53*-Fragmente („region of interest“, ROI) war Bestandteil der *SNP Assay*-Reagenz (*Applied Biosystems*). Als Mastermix wurde der *TaqMan*[®] *Genotyping Master Mix* verwendet:

qRT-PCR-Schema		
gDNA	<i>TaqMan</i> [®] <i>Genotyping Master Mix</i> (2x)	<i>SNP Assay</i> -Reagenz (20x)
10 ng oder 2,25 µl	2,5 µl	0,25 µl
qRT-PCR-Temperaturschema		
95°C	95°C (Denaturierung)	60°C (Primeranlagerung und Elongation)
10 min	15 sec	60 sec
	40x	

Das emittierte Fluoreszenzspektrum wurde während der qRT-PCR mithilfe eines Thermal-Cyclers (*LightCycler*[®], *Roche*) gemessen und dem zugehörigen Genotyp zugeordnet. Als Positivkontrollen wurden gDNA-Proben von Lymphozyten verwendet, die in der AG Stiewe bereits zuverlässig hinsichtlich des SNP charakterisiert worden waren.

Genotyp	Codonsequenz	Fluorophorbindung	Fluoreszenzmaximum
TP53_72R (Arginin) homozygot	CCC	<i>FAMTM</i>	465-510 nm
TP53_72P (Prolin) homozygot	CGC	<i>VIC[®]</i>	533-580 nm
TP53_72R/P (Arginin/Prolin) heterozygot	CCC/CGC	<i>FAMTM/VIC[®]</i>	465-510 nm/ 533-580 nm

2.2.19. Zellkultur

2.2.19.1. Material

Alle angegebenen Materialien wurden steril gelagert und verwendet, vor dem Kontakt mit Zellen auf Raumtemperatur gebracht, sowie optisch auf mikrobielle Kontamination untersucht. Die Zellkulturmedien (DMEM, RPMI) kamen nach Zusätzen von 10% FCS (v/v), 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin und 0,4% Amphotericin B (v/v) zum Einsatz.

Medien und Seren	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	<i>Sigma</i>
Roswell Park Memorial Institute (RPMI)	<i>Sigma</i>
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	<i>Sigma</i>
Fötales Kälberserum (FCS)	<i>Sigma</i>
Trypsin-EDTA (10x)	<i>Sigma</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Merck</i>
Polybrene (4 mg/dl)	<i>Sigma</i>
RETRA	<i>Sigma</i>
Antibiotika: Penizillin-Steptomycin (50 mg/ml) Hygromyzin B (100 mg/dl) Puromyzin (20 mg/dl) Amphotericin B (250 mg/dl)	<i>Sigma</i>

2.2.19.2. Kultivierung vitaler Zellen

Die Kultivierung von Zellen geschah unter kontrollierten Umgebungsbedingungen, um darauf aufbauende Experimente vor exogenen Störfaktoren zu schützen:

Alle Tumorzelllinien wurden in sterilen Inkubatoren bei konstanten 37°C und unter atmosphärischen Bedingungen von 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Adhärente Zelllinien erhielten optimale Wachstumsbedingungen in beschichteten Zellkulturschalen in geeigneten Wachstumsmedien (DMEM oder RPMI inklusive Zusätze). Gleiche Bedingungen galten für Suspensionszellen, wobei die Kultivierung in gaspermeablen Zellkulturflaschen unter RPMI geschah. Alle Zellkulturexperimente außerhalb des Inkubators fanden unter sterilen Bedingungen einer regelmäßig chemisch und physikalisch (UV-Licht) desinfizierten Sterilbank statt.

2.2.19.3. Passage von Zellen

Kultivierte Zellen wurden vor Erreichen 90-100%-iger Konfluenz passagiert. Von Adhäsionszellen wurde hierzu das Medium entfernt, die Zellen einmalig mit PBS gewaschen, durch Trypsin (2x) von der Schale gelöst und im gewünschten Verhältnis (meist 1ml Zellsuspension/10 ml Frischmedium) in Frischmedium resuspendiert. Suspensionszellen wurden nach ihrer Sedimentierung in der Zellkulturflasche von Medium befreit. Wegen möglicher Zellagglomeration wurden sie durch auf- und abpipettieren vereinzelt bzw. homogenisiert und ebenfalls im gewünschten Zellsuspension-Frischmedium-Verhältnis resuspendiert.

2.2.19.4. Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zelldichte einer Zellsuspension wurden Adhäsionszellen von Medium befreit, mit PBS gewaschen und in Medium homogen resuspendiert. Suspensionszellen wurden vor ihrer Zählung durch wiederum vereinzelt. 10 µl der homogenen Zellsuspension wurden unter ein korrekt sitzendes (Newton'sche Ringe aufweisendes) Deckglas einer Neubauerzählkammer (*Neubauer improved*) pipettiert. Die Zellen wurden in mindestens drei Zählgittern ausgezählt und deren Mittelwert zur Berechnung der Zelldichte herangezogen.

2.2.19.5. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zelllinien einer subkonfluenten 15cm-Schale wurden von Medium befreit, mit PBS gewaschen, durch 2x Trypsin abgelöst und in einem 15 ml-Gefäß in 10 ml Medium resuspendiert. Nach Zentrifugation (10min, 200 x g) wurde das entstandene Zellpellett von Medium gereinigt und in Einfriermedium resuspendiert. Daraufhin wurde die Suspension gleichmäßig à 1,5 ml auf Einfriergefäße verteilt und in eine mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox überführt. In dieser wurde die Zellsuspensionen im Eisschrank auf -80°C heruntergekühlt und nach 24 Stunden in einen Stickstofftank (-196°C) verbracht. Um Zellen aus diesem Zustand wieder ohne Vitalitätsverlust aufzutauen, wurden sie aus dem Stickstofftank auf Eis verbracht und in einem 37°C warmen Wasserbad getaut. Bei ersten Verflüssigungsanzeichen wurde die Zellsuspension in vorgewärmtem Medium in eine Zellkulturschale überführt und für maximal 24 Stunden kultiviert. Danach wurde das Medium erneuert, um Rückstände von zytotoxischem DMSO des Einfriermediums zu entfernen. Erste Experimente wurden nach einer Akklimatisierungszeit von fünf bis sieben Tagen durchgeführt.

Material:

Einfriermedium	65% Medium, 25% FCS, 10% DMSO
----------------	-------------------------------

2.2.20. Transiente Transfektion humaner Zellen

Transfektion bezeichnet einen Vorgang der Einbringung von Nukleinsäuren meist in Form eines replizierbaren Plasmidvektors in eukaryotische Zellen. Da dieser extrachromosomal vorliegt, wird er früh degradiert werden, hat also nur vorübergehenden bzw. transienten, biologischen Einfluss auf den Träger.

2.2.20.1. Calcium-Phosphat-Präzipitation & Herstellung von Retroviren

Durch die Calcium-Phosphat-Präzipitation können Zellen mit Nukleinsäuren versetzt, welche in einer Lösung aus Natriumphosphat und Calciumchlorid an ausfallendes Calcium-Phosphat binden. Die entstehenden DNA-Präzipitate werden durch zellvermittelte Endozytose in die Zellen aufgenommen. Das Vorgehen wurde gewählt, um plasmidverpackte *TP53*-Punktmutanten in Phoenixzellen (Verpackungszelllinie) einzuschleusen, welche diese in Form von ecotropen Retroviren vermehren können. Dies geschah zum Zweck der anschließenden stabilen Integration der Plasmide in *TP53*-negative Zielzellen, welche einen entsprechenden *eco*-Rezeptor exprimierten.

Zunächst wurden 2×10^6 Phoenixzellen in DMEM auf einer 6 ml-Kulturschale ausplattiert. Bei Erreichen 70-80%-iger Konfluenz nach etwa 20-24 Stunden wurde das Medium 3-4 Stunden vor Versuchsbeginn erneuert. Folgend wurden 40 µg des zu transfizierenden Plasmids in 50 µl CaCl_2 (2,5 M) und Wasser (ad 500 µl) gelöst und unter leichtem Vortexieren langsam 500 µl einer HBS-Lösung (2x, pH 7,05) zugetropft. Nach 10 Minuten bei 37°C hatte sich die Lösung getrübt und wurde mikroskopisch auf das Vorhandensein feiner Präzipitate geprüft. 1 ml der Präzipitatlösung wurde zu den Phoenixzellen pipettiert. Nach 24 Stunden der Inkubation bei 37°C wurde das Medium mit 7 ml Frischmedium gewechselt. Zugleich wurden die Zielzellen eines späteren Infektionsexperimentes ausplattiert.

Material:

HBS	20 mM HEPES, 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5,5 mM Glucose, pH 7,05, sterilfiltriert
CaCl_2	2,5 M, sterilfiltriert, UV-sterilisiert

2.2.20.2. Transfektion mittels liposomaler und kationischer Komplexe

Plasmid-DNA kann unter geeigneten Versuchsbedingungen als Teil von Lipid- oder Kationenkomplexen in eukaryotische Zellen transfiziert werden.

Lipofectamine™ LTX (Invitrogen) führt zur Ausbildung liposomaler Komplexe von (polyanionischer) Plasmid-DNA in Gegenwart kationischer Liposomen, welche dann mit der Zielzelle fusionieren

können. Das *EscortV*TM-Kit (*Sigma Aldrich*) basiert auf dem Polyamin Polyethyleneimin, welches die Plasmid-DNA in einem kationischen Komplex kondensiert und per Endozytose in die Zelle penetriert. Beide Kits wurden unter folgenden Versuchsspezifitäten protokollgemäß verwendet:

*Lipofectamine*TM *LTX* kam zur transienten Transfektion von *TP53*-Mutanten in H1299-Zellen im Rahmen von Luziferase Assays zur Anwendung. Es wurde gemäß Herstellerprotokoll der Modus der reversen Transfektion gewählt:

Es wurden 15 µl des gewählten Plasmids (insgesamt 200 ng Plasmid-DNA pro Ansatz, genaue Angaben s. Luziferase Assay) mit 15 µl Transfektionsansatz (14,5 µl und 0,5 µl *Lipofectamine*TM *LTX*) versetzt. Das verwendete Medium war stets serum- und antimikrobiotikafrei. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurde das Gesamtvolumen von 30 µl in 96 well-Platten überführt und schließlich mit je 100 µl (1×10^3 Zellen/well) einer vorbereiteten Zielzellsuspension (10×10^4 Zellen/ml) zur Reaktion gebracht.

*EscortV*TM wurde verwendet, um ebenfalls *TP53*-Mutanten in H1299-Zellen zu transfizieren, deren Expression im Anschluss im Western Blot nachgewiesen wurde(Referenz):

Am Vortag wurden 5×10^4 Zellen/well im 6 well-Format ausplattiert. Zwei Stunden vor Transfektion wurde das Medium erneuert. Im Anschluss wurde 2,5 µg der zu transfizierenden Plasmid-DNA und *EscortV*TM (Verhältnis von 1 µg:3 µl) *jeweils* in einem Reaktionsgefäß mit je 250 µl kateigenen Transfektionspuffers vermischt. Beide Lösungen wurden daraufhin miteinander kombiniert, für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich direkt zu den Zellen gegeben. Ein Mediumwechsel fand nach 6 Stunden Inkubation statt.

2.2.21. Stabile Integration von DNA in humane Zellen durch virale Infektion

Die stabile Integration von DNA bezeichnet deren Einschluss in das Genom der Zielzelle durch virale Infektion. Folglich wird die DNA an Tochtergenerationen weitergegeben und kann wegen der ausbleibenden Inaktivierung langfristig molekularbiologische Effekte ausüben. Durchgeführt wurde dies, um *TP53*-Mutanten in *TP53*-negative, eco-rezeptorexprimierende H1299 Zellen stabil zu integrieren:

Phoenixzellen wurden mit dem Zielplasmid transient transfiziert und produzierten dieses in Form von ecotropen Viren. Am Vortag des Versuchs wurden 3×10^5 Zielzellen auf einer 10 cm-Kulturschale ausplattiert. Zu deren Infektion wurde der virushaltige Mediumüberstand (7 ml) der Phoenixzellen in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, um Zellreste zu eliminieren. 3 ml des klaren Überstands und weitere 3 ml Frischmedium wurden zu den Zielzellen gegeben und unter dem Zusatz von 20-30 µg Polybrene über Nacht inkubiert. Schließlich wurde das Infektionsmedium durch 10 ml Frischmedium ersetzt.

Zur Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen mit dem (Hygromycinresistenz-vermittelnden) Plasmid schloss sich eine siebentägige Selektionsphase unter 200 µg Hygromycin B/ml Medium an.

Material:

Polybrene	4 mg / ml
Hygromycin B	100 mg / ml

2.2.22. Behandlung von Zellen mit zytotoxischen Substanzen

Im Rahmen der Arbeit wurden Wirkprofile von Etoposid und RETRA durch die Behandlung von Tumorzelllinien erstellt. In Folgeexperimenten wurde RETRA in der Behandlung von Tumorzellen mit dem Chemotherapeutikum Etoposid kombiniert verwendet.

2.2.22.1. Behandlung von Zellen mit RETRA

Adhäsionszellen wurden von Medium befreit, mit PBS gewaschen, von der Zellkulturplatte gelöst, ausgezählt und in einem geeigneten Reaktionsgefäß auf eine Zellkonzentration von 6×10^4 Zellen/ml eingestellt. Daraufhin wurden sie in 96 well-Reaktionsplatten triplikatenweise zu je 50 µl (3000 Zellen/well) ausplattiert. Weitere 50 µl/well wurden in Form einer RETRA-Medium-Lösung hinzupipettiert, wobei die RETRA-Konzentration im Gesamtansatz entweder 0, 5, 10 oder 15 µM oder in einem weiteren Versuchsaufbau zwischen 0 und 40 betragen:

RETRA (µM)	0	0,156	0,3125	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40
------------	---	-------	--------	-------	------	-----	---	----	----	----

Zur Behandlung von Suspensionszellen wurde nach ihrer Sedimentierung in Zellkulturflaschen das überstehende Medium entfernt, mit PBS gewaschen und anschließend mithilfe von Trypsin eine Zellvereinzelung erreicht. Es folgte die Zellauszählung und Konzentrationseinstellung auf 1×10^5 Zellen in 5 ml Suspensionsvolumen in einer Zellkulturflasche. Es wurden RETRA-Mengen zum Erreichen der angestrebten Zielkonzentration hinzugefügt. Da die anschließende Zellvitalitätsmessung die Entnahme von 100 µl Zellsuspension aus der Kulturflasche enthielt, wurde darauf geachtet, das exakte Suspensionsvolumen von 5 ml einzuhalten, um Verdünnungs- oder Aufkonzentrierungseffekte zu minimieren. Die Messung der Zellvitalität schloss sich für Adhäsionszellen nach drei, für Suspensionszellen nach zwei Tagen an.

2.2.22.2. Kombinationsbehandlung von Zellen mit RETRA und Etoposid

Die Zielzellen (nur adherent) wurden von Medium gereinigt, mit PBS gewaschen und durch Trypsin von der Zellkulturschale gelöst. Nach Auszählung der Zellen erfolgte die Einstellung der Zellkonzentration in geeignetem Medium auf $2,5 - 4 \times 10^4$ /ml abhängig von der jeweiligen Zellwachstumsgeschwindigkeit. Anschließend wurden die Zellen in 96 well-Platten á 100 µl/well

ausgesät. 24 Stunden später erfolgte die Behandlung mit in entsprechendem Medium gelöstem RETRA und Etoposid. Die Einstellung der Zielkonzentration pro Ansatz erfolgte wie folgt:

RETRA (µM)	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Etoposid (µM)	0	0	0,039	0,078	0,156	0,3125	0,625	1,25	2,5	5	10	20	40

Material:

RETRA	Ausgangskonzentration der Stocklösung je nach Hersteller
Etoposid	Ausgangskonzentration der Stocklösung je nach Hersteller

2.2.23. Messung von Zytotoxizität durch Zellvitalitätsuntersuchungen (Viability Assay)

Zur Messung von Zytotoxizität kann als Surrogatparameter für Zellvitalität bzw. metabolische Aktivität das Vorhandensein biochemischer Energie in Form von ATP gemessen werden ("Viability Assay"). Im vorliegenden Fall schloss sich an die Behandlung von Tumorzellen mit RETRA und/oder Etoposid die Messung der Zellvitalität mithilfe des *CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega)* an. Eine darin enthaltene rekombinante Luziferase setzt dabei mittels des ATP der Untersuchungszellen das zugeführte (kiteigene) Substrat „Beetle Luciferin“ (D-Luciferin der *Photinus pyralis*) sauerstoffabhängig zu Oxyluciferin um. Dadurch erzeugte Fluoreszenz ist direkt proportional zum ATP-Gehalt des Versuchsansatzes, welcher wiederum auf die Zellvitalität schließen lässt.

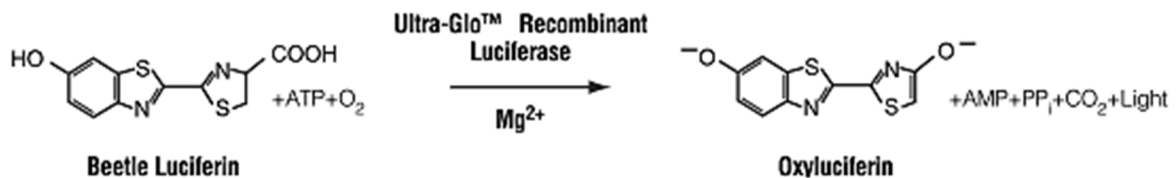


Abb. 2.5. Schema der Luziferasereaktion (*Promega*)

Zur protokollgemäßen Verwendung des Kits wurde das *CellTiter-Glo[®] Substrate* in *CellTiter-Glo[®] Buffer* gelöst. Suspensionszellen wurden nach Homogenisierung des Kulturmediums durch Auf- und Abpipettieren zu je 100 µl in 96 well-Platten übertragen. Adhäsionszellen wurden bereits in 96 well-Platten kultiviert. Alle zu untersuchenden Zellen in 96 well-Platten und die Luziferasereagenz wurden bei Raumtemperatur 30 min temperaturäquilibriert. Anschließend wurde das Reagenz im Volumenverhältnis von 1:1 (Reagenz/Zielvolumen, meist 100 µl) in die Wells pipettiert und unter Lichtabschluss für 10 min auf einem Temperaturcycler geschüttelt. Nach weiteren 10 min Inkubation in Ruhe wurde die Fluoreszenz mit einem Luminometer (*Orion II Microplate Luminometer, Berthold Detection Systems*) gemessen.

2.2.24. Berechnung der mittleren letalen Dosis (LD50)

Die Analyse zytotoxischer Effekte von Etoposid und RETRA auf Tumorzelllinien umfasste die Bestimmung der mittleren letalen Dosis (LD50) anhand von interpolierten Dosis-Wirkungskurven. Der LD50-Wert definiert jene Dosis einer Substanz, die zur Reduktion des Zellüberlebens um 50% im Vergleich zu einer unbehandelten Referenz führt.

Die LD50-Werte und zugehörigen Konfidenzintervalle (hier: 95%) wurden mithilfe der Software GraphPad Prism berechnet (Version 6.00 für Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA). Hierzu wurden die Konzentration von RETRA oder Etoposid in Form des dekadischen Logarithmus mit dem gemessenen Zellüberleben in Bezug gesetzt.

2.2.25. Analyse von Substanzkombinationseffekten

Die Analyse von Zytotoxizität zweier oder mehrerer Substanzen kann die Substanzkombinationseffekte Additivität, Synergismus und Antagonismus aufdecken. Additivität besteht darin, dass zwei oder mehrere Substanzen ein Ausmaß an Zytotoxizität hervorrufen, das genau der Summe ihrer Einzelwirkungen entspricht. Synergismus und Antagonismus sind hingegen durch Über- oder Unterschreiten der Summe der zytotoxischen Einzelwirkungen gekennzeichnet (Chou 2010). Zur Berechnung dieser Effekte kann der Kombinationsindex bestimmt werden, was jedoch in dieser Arbeit aufgrund des experimentellen Aufbaus nicht möglich war (Grabovsky & Tallarida 2004). Stattdessen wurde eine Kurvenanalyse durchgeführt („*curve shift analysis*“), welche als Surrogatparameter für Substanzkombinationseffekte verwendet werden kann (Foucquier & Guedj 2015). Dabei werden die Dosis-Wirkungskurve der Kombinationsbehandlung mit der zu erwartenden Additivität verglichen (Abb. 2.6., A). Ein Unter- oder Überschreiten der angenommenen Additivität kann als Synergismus oder Antagonismus der eingesetzten Substanzen interpretiert und, wie in Abb. 2.6., B, visualisiert werden.

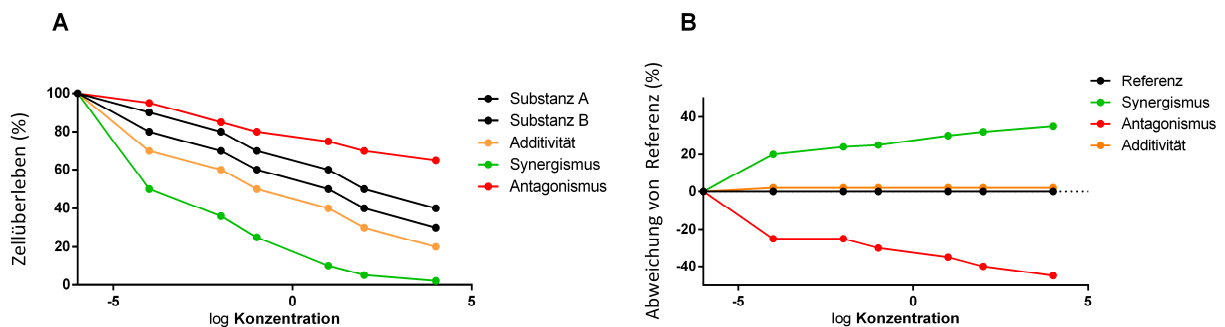


Abb. 2.6. Substanzkombinationseffekte anhand von Beispielgraphen

2.2.26. Luziferase Assay

Das Luziferase Assay ermöglicht die Messung von Gentranskription innerhalb eines Zellverbundes unter in vitro Bedingungen. Der Versuchsaufbau erfordert ein Reporterplasmid, das in seinem Promotorbereich Zielsequenzen (*“Response Element”*) für einen zu untersuchenden Transkriptionsfaktor aufweist. Bei dessen Bindung an die Zielsequenz kommt es zur Transkription eines Gens, welches verschiedene Arten einer Luziferase kodieren kann (z.B. Firefly- oder Renilla Luziferase). Diese katalysiert nach der zellvermittelten Translation in ein funktionsfähiges Protein eine Luziferasereaktion, die bei der Umsetzung ihres Substrats (z.B. Beetle Luciferin oder Coelenterazin) luminometrisch messbare Fluoreszenz erzeugt.

In dieser Arbeit wurde ein Firefly-basiertes Luziferase Assay genutzt, um transient transfizierte *TP53*-Punktmutanten auf ihre Beeinflussung der Transkriptionsfähigkeit von co-transfiziertem p53-Wildtyp oder einer p73-Isoform (TAp73 α) zu untersuchen. Auch RETRA kam in diesem Kontext zur Anwendung. Das Reporterplasmid (laborintern, AG Stiewe) enthielt eine sequenziell fünfmalig vorkommende Konsensussequenz für Wildtyp p53 und TAp73.

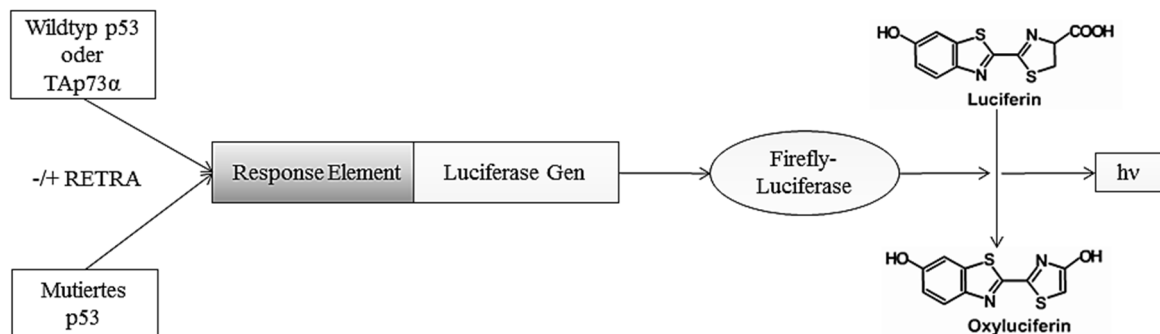


Abb. 2.7. Schema des verwendeten Luziferase Assays

Die Versuchsdurchführung begann mit einer reversen, transienten Transfektion in *TP53*-negative H1299-Zellen im 96 well-Format, wobei pro Well 1000 Zellen transfiziert wurden (beschrieben unter 3.5.6.2.). Die relevanten Plasmide von insgesamt 200 ng/well wurden in einem Gesamtvolumen 15 μ l pipettiert. Ein Leervektor diente der Äquilibrierung der transfizierten Plasmidgesamtmengen. Zur Messung des Hintergrundsignals der Luziferasereaktion wurden Kontrollproben mit Leervektor bzw. Leervektor und Reporterplasmid transfiziert. Den Referenzwert (als 100% gesetzte Transaktivierung des Reporterplasmids) stellte die alleinige Transaktivierung durch Wildtyp p53 bzw. TAp73 unter ansonsten gleichbleibenden Versuchsbedingungen dar.

Luziferase Assay Pipettierschema					
Plasmid	Leervektor (ng)	Reporterplasmid (ng)	Mut- <i>TP53</i> (ng)	Wildtyp p53 / TAp73 (ng)	Mit Mut- <i>TP53</i> co-transfiziert
Menge	ad 200	50	2,5; 50; 100	2,5	Wildtyp p53
			2,5; 75; 100	2,5	TAp73
			2,5; 75; 100	2,5 +/- 5/10 μ M RETRA	TAp73 +/- RETRA

Nach 24-stündiger Inkubation der revers transfizierten H1299-Zellen bei 37°C erfolgte die Luziferasemessung. Im Falle des Einsatzes von RETRA wurde dieses 12 Stunden nach reverser Transfektion im Rahmen eines Mediumwechsels (100 μ l/well) in Konzentrationen von 5 μ M oder 10 μ M zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von 12 oder 24 Stunden schloss sich die Messung der Luziferaseaktivität an.

Um die Luziferasereaktion auszuwerten, wird die resultierende Luziferaseaktivität als Parameter der Zielgenaktivierung luminometrisch aufgezeichnet. Zunächst wurden das Medium von den Zielzellen abgesaugt und eine Zelllyse mit 20 μ l/well Lysepuffer (*Cell Culture Lysis Reagent 5x, Promega*) unter Schütteln auf einem Temperaturcyclus für 20 min durchgeführt. Anschließend wurden 100 μ l temperaturgleichen „*Beetle Juices*“ (*PJK*; Buffer, D-Luciferin, ATP) in jedes zellhaltige Well pipettiert. Die Messung mit ausschließlich *Beetle Juice*-befüllter Wells ergab das einzurechnende Hintergrundsignal. Die folgende Fluoreszenzmessung geschah umgehend an einem Luminometer, wobei für die Messung eines Wells 2 Sekunden eingestellt wurden.

2.2.27. Proteinanalyse

Substanz	Zusammensetzung bzw. Hersteller
NP-40 Lysepuffer	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA (pH 8,0), 2% NP40
RIPA Lysepuffer	50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Natriumdesoxycholat, 1% Triton X-100
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris, 0,2 M Glycin, 0,1% SDS
TBS (20x)	1 M Tris-HCl (pH 7,5), 3 M NaCl
TBS-T	1x TBS, 0,1% (v/v) Tween-20
TEMED	<i>GibcoBRL</i>
Bradford Reagenz	<i>Bio-Rad</i>
ECL-Lösung Substrat	<i>Thermo Scientific</i>
Proteinlängenstandard (Proteinladder)	<i>Fermentas (PageRuler Prestained Protein Ladder)</i>

Der Nachweis zellulärer Proteine erlaubt Analysen über die Quantität und Qualität biologisch relevanter Translationsprodukte innerhalb einer Zelle.

Die folgende Darstellung demonstriert chronologisch die Abfolge von Experimenten, die zum Nachweis der erfolgreichen transienten Transfektion und Proteinexpression von *TP53*-Punktmutanten in H1299-Zellen durchgeführt wurden.

2.2.28. transiente Transfektion zu analysierender H1299-Zellen mit *TP53*-Mutanten

Im 6 well-Format wurden 5×10^4 H1299-Zellen/well mittels *EscortV*TM-Kit (*Sigma Aldrich*) mit je 2,5 µg Plasmid-DNA der betreffenden *TP53*-Punktmutante transfiziert (s. 3.5.6.2). Einem Mediumwechsel nach 24 Stunden folgte weitere 24 Stunden später die Herstellung der Proteinlysate.

2.2.29. Herstellung von Proteinlysaten aus Zellen

Die entsprechenden Zellen im 6 well-Format wurden auf Eis überführt, auf diesem von Medium befreit und mit PBS gewaschen. In je 50 µl/well einer eisgekühlten NP-40-Lysepuffer-Proteaseinhibitor-Lösung konnten die Zellen mit einem sterilen Zellschaber von der Wachstumsfläche gelöst und in ein vorgekühltes, beschriftetes 1 ml-Reaktionsgefäß überführt werden. Nach anschließender Zentrifugation (5 min, 15.000 x g) wurde der proteinhaltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Das fertige Lysat konnte bei -80°C zwischengelagert werden oder direkt der Proteinquantifizierung zugeführt werden.

Material:

NP-40 Lysepuffer	-
Proteaseinhibitor (10x)	Roche

2.2.30. Proteinquantifizierung (Bradford)

Um die Proteinkonzentration einer Lysatprobe zu bestimmen, kam das Verfahren nach Bradford zur Anwendung. Es beruht auf der Komplexbildung von Proteinseitenketten mit Coomassie-Brilliant-Blau G250 (5x CBBG, *BioRad*), wodurch dessen Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm verschoben und bei dieser Wellenlänge photometrisch gemessen wird. 5 µl Proteinlysate und eine proteinleere Referenzlösung wurden in Küvetten jeweils mit 1 ml Bradfordreagenz (1x) und 2 µl eines Proteinstandards versetzt. Unterschiede der ermittelten Extinktionen (Photometer) ließen direkt auf den Proteingehalt der Lysatprobe schließen.

Material:

Bradfordreagenz (5x)	CBBG (BioRad: Bradford Reagent?)
Proteinstandard	-

2.2.31. Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die größenanaloge Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese („*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*“). Dabei werden durch SDS ladungshomogenisierte, denaturierte Proteine in einem elektrischen Feld zur Durchwanderung eines diskontinuierlichen Puffergelsystems gebracht. Dieses setzte sich aus Sammel- und Trenngel

zusammen, wobei letzteres in seiner Zusammensetzung entsprechend des Molekulargewichts des zu analysierenden Proteins gewählt wurde (Sambrook 1989). Entsprechend des Molekulargewichts von p53 bzw. dessen Mutanten wurde das Trenngel 12%-ig hergestellt:

Gelzusammensetzung						
	Wasser	Tris-HCl		Acrylamid (40%)	Ammoniumpersulfat (30%, APS)	Tetramethylethyldiamin (TEMED)
		1,5 M pH 8,8	0,5 M pH 6,8			
Trenngel (12%)	4,3 ml	2,5 ml	-	3 ml	17 µl	5 µl
Sammelgel	3,2 ml	-	1,25 ml	0,5 ml	12,25 µl	8 µl

Das Gel wurde nach seiner Aushärtung zwischen zwei abgedichteten Keramiklamellen in eine geeignete SDS-PAGE-Kammer eingespannt und mit SDS-Laufpuffer (1x) umspült.

Vor der Elektrophorese wurden in Kenntnis der Proteinmengen der Lysatproben 30 µg Protein erst in 20 µl NP-40 Lysepuffer und 5 µl Probenpuffer (5x *Roti-Load*, *Hersteller?*) gelöst und daraufhin für 7 min bei 95°C auf einem Heizblock denaturiert. Nach der Ladung des Ansatzes in die gespülten Geltaschen des Polyacrylamidgels wurde die Elektrophorese in einer Sammelgelphase (ca. 25 min, 80 V) begonnen. Die anschließende Trenngelphase (100-120 V) wurde bei genügender Auftrennung des aufgetragenen, gefärbten Proteingrößenstandards (*Protein Prestige Ladder*, *Fermentas*) gestoppt.

Material:

SDS Laufpuffer (1x)	-
Acrylamid	-
Ammoniumpersulfat	-
Tetramethylethyldiamin	-
Roti Load (5x) (<i>Fermentas</i>)	Nach Herstellerinformationen
Protein Ladder (<i>Fermentas</i>)	Nach Herstellerinformationen

2.2.32. Western Blotting

Zur weiteren Analyse wurden die aufgetrennten Proteine durch ein Tank-Blot-Verfahren aus dem Polyacrylamidgel auf eine ECL-Nitrozellulosemembran (*HybondTM*, *Amersham*) transferiert.

Das Gel wurde auf der Nitrozellulosemembran nach üblichen Vorgaben zwischen blotpuffergetränktem (1x TBS-T, methanolhaltig) Whatmanpapier und Schwämmen innerhalb einer Plastikkassette angeordnet und so in eine blotpuffergefüllte Blotkammer eingespannt. Entsprechend des Molekulargewichts von p53 (53 kDa) dauerte das Blotten bei 4°C bei einer Stromstärke von 1,25 mA/cm² etwa eine Stunde.

2.2.33. Proteindetektion

Nach der Transferierung der Zielproteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde diese eine Stunde mit in 0,1%-igem TBS-T gelöstem Magermilchpulver (10%) geblockt, um unspezifische Epitope zu neutralisieren. Zur Detektion der mutierten p53-Proteine wurden die entsprechenden Primärantikörper in Blocklösung (5% Magermilchpulver in TBS-T 0,1%) gelöst und über Nacht bei 4°C mit der Nitrozellulosemembran inkubiert. Dem dreimaligen Abwaschen verbleibender Primärantikörper in TBS-T (0,1%) folgte die einstündige Inkubation der Sekundärantikörper bei Raumtemperatur, welche ebenfalls in 5%-iger TBS-T-basierter Magermilch gelöst waren. Als Ladekontrolle wurde in jeder untersuchten Probe zusätzlich β -Aktin nachgewiesen, welches konstitutiv in allen Zellen exprimiert wird.

Antikörper	Hersteller	Herkunftsorganismus	Verwendung	verwendete Konzentration
anti-p53 (DO-1)	<i>Santa Cruz</i>	mouse	Primärantikörper	1:1000
anti- β -Actin (AC-15)	<i>Abcam</i>	mouse	Primärantikörper	1:10000
anti-mouse IgG (HRP-konjugiert)	<i>Amersham</i>	mouse	Sekundärantikörper	1:1000
anti-mouse IgG (Alexa Fluor 680-konjugiert)	<i>Molecular Probes</i>	goat	Sekundärantikörper	1:1000

2.2.33.1. Immundetektion

Zum Nachweis HRP (horseradish-peroxidase)-gekoppelter Sekundärantikörper wurde das *SuperSignal West Dura Extended Substrat (Therma Scientific)* gemäß Herstellerempfehlungen verwendet. Das darin enthaltene HRP-Substrat Luminol wird hierbei durch die Peroxidase unter Erzeugung von Chemolumineszenz oxidiert. Diese wurde in einer Dunkelkammer auf einem lichtsensitiven Röntgenfilm (*Scientific Imaging Film X-OMAT AR, Kodak*) aufgefangen und entwickelt.

2.2.33.2. Fluoreszenzdetektion

War der verwendete Sekundärantikörper fluoreszenzmarkiert, wurde er nach Bindung an den Primärantikörper mithilfe eines Fluoreszenzscanners (*Odyssey, LiCor*) nachgewiesen.

3. Ergebnisse

3.1. Die Substanz RETRA in der Anwendung auf Zelllinien verschiedener Entität

In über 50% aller humanen Tumoren findet sich eine *TP53*-Genmutation. Das exprimierte Genprodukt (MUTp53) ist transkriptionell inaktiv und besitzt zusätzlich onkogene Eigenschaften. MUTp53 kann über unphysiologische Proteininteraktionen den Tumorsuppressor TAp73 inaktivieren. Es wird vermutet, dass RETRA diese Interaktion blockieren und hierdurch die tumorsuppressive Funktion von TAp73 wiederherstellen kann. Der molekulare Wirkmechanismus von RETRA ist bisher nicht bekannt.

Um das antiproliferative Potential von RETRA zu untersuchen, wurde die Substanz auf 43 Tumorzelllinien unterschiedlicher Gewebeherkunft angewendet. Es erfolgte die Aussaat verschiedener humaner, adhäsiv und in Suspension wachsender Malignomzelllinien in Mikrotiterplatten oder 5ml-Zellkulturflaschen. Das Wachstumsmedium wurde mit RETRA-Konzentrationen von 5, 10 und 15 μM versetzt und eine unbehandelte Negativkontrollreihe als Referenz mitgeführt. Das Überleben unter RETRA wurde für Adhäsionszelllinien nach drei, für Suspensionszellen nach zwei Tagen mittels lumineszenzbasierter Zellvitalitätsanalyse quantifiziert.

Unter der Behandlung mit RETRA wurde bei allen Zelllinien eine dosisabhängige Abnahme des Zellüberlebens beobachtet. Der zytotoxische Effekt von RETRA fiel unabhängig der Tumorentität sehr variabel aus. Besonders sensibel waren die Zelllinien Rh1, SCLC-86M1 und NCI-H526. Ihr Überleben wurde bereits durch 5 μM RETRA um über 50% reduziert. Im Gegensatz dazu zeigten einige Zelllinien unter 15 μM RETRA ein Zellüberleben von über 70% (z.B. Panc1, Rh30, NCI-H1299). Auch die von *Kravchenko* untersuchten und dabei RETRA-resistenten Zelllinien A549 (p53-Wildtyp) und NCI-H1299 (p53-negativ) boten unter RETRA ein deutlich vermindertes Zellüberleben (**Abb. 3.1**).

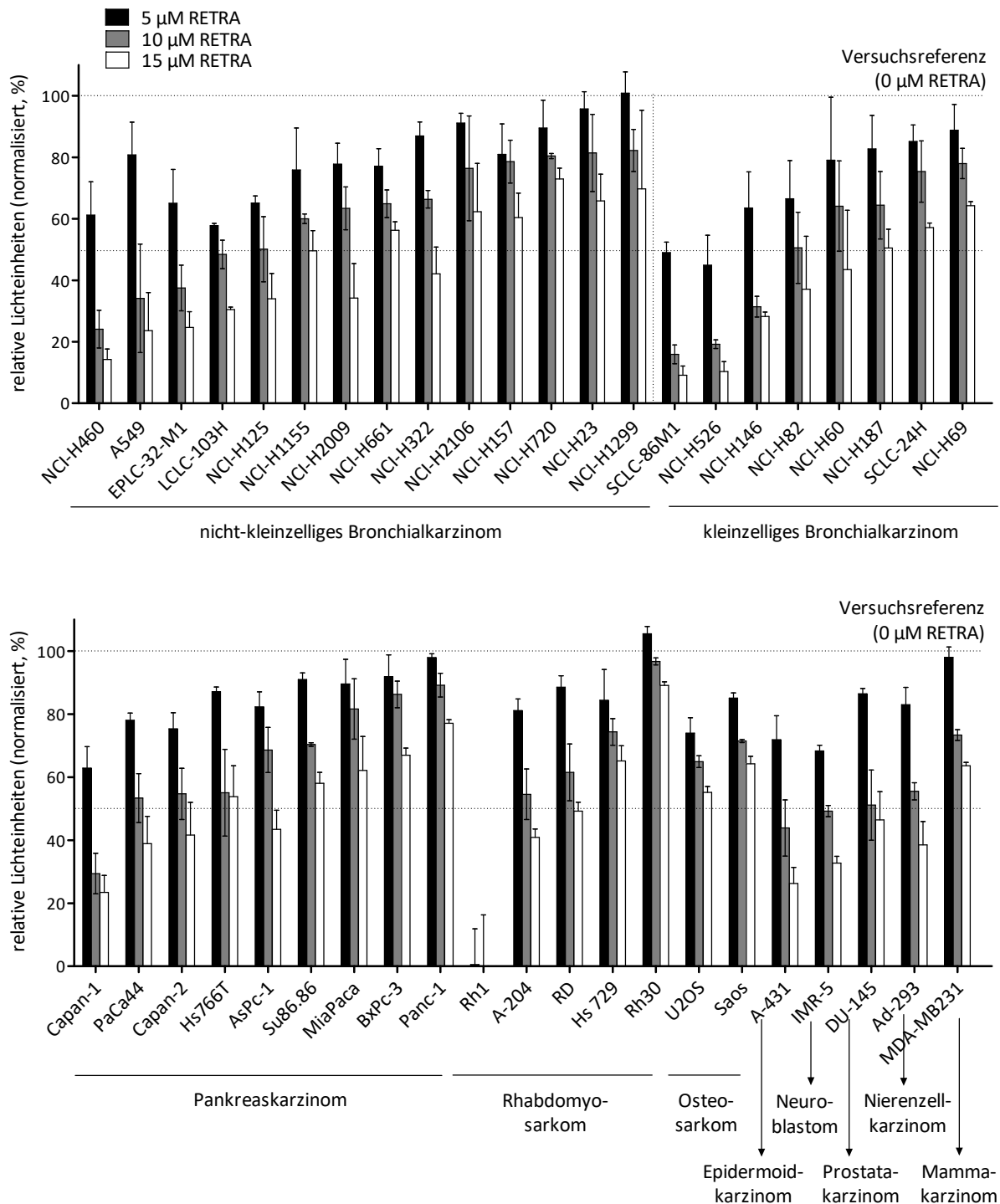


Abb. 3.1. Darstellung des Zellüberlebens von Lungentumoren und anderen Tumorentitäten nach RETRA-Behandlung.

Es wird das gemessene Zellüberleben unter RETRA-Behandlung abgebildet, das im verwendeten Lumineszenzassay als relative Lichteinheit direkt mit dem ATP-Gehalt der Probe korreliert. Dieses wurde jeweils auf das Überleben unbehandelter Kontrollproben normalisiert (100% Zellüberleben bei 0 μM RETRA, Versuchsreferenz).

Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert dreier äquivalenter Messproben eines Versuchsansatzes mit entsprechender Standardabweichung. Das Zellüberleben von Adhäsionszellen wurde nach drei, das von Suspensionszellen nach zwei Tagen gemessen.

3.2. Retrospektive Analyse der erzielten RETRA-Effekte

Zum genaueren Verständnis der zytotoxischen Effekte von RETRA im Rahmen der o.g. Zellkultorexperimente wurden die Ergebnisse mit Parametern korreliert, die für den bisher angenommenen Wirkmechanismus von RETRA von Bedeutung sein sollen.

3.2.1. Einfluss des p53-Status auf die Wirksamkeit von RETRA

Es wird vermutet, dass RETRA die Proteininteraktion zwischen mutierten p53-Proteinen und der tumorsuppressiven p73-Isoform TAp73 verhindern kann. Die aktuelle Datenlage zur Frage, ob die antiproliferative Wirkung von RETRA auf *TP53*-mutierte Zelllinien beschränkt ist, ist widersprüchlich. Es wurde daher analysiert, ob die untersuchten Tumorzelllinien abhängig von ihrem p53-Mutationsstatus unterschiedliches Ansprechen auf RETRA zeigen.

Zur Erhebung des p53-Mutationsstatus der verwendeten Zelllinien wurden etablierte Zelliniendatenbanken genutzt (*TP53 Database* der *International Agency for Research on Cancer (IARC/WHO)*, *Core Cell Line Viewer* des *Cancer Genome Project (Sanger)*, *American Type Culture Collection*). Dabei wurde nach den Ausprägungen „Wildtyp (WTp53)“, „mutiert“ (MUTp53) und „negativ“ (p53NEG) klassifiziert.

Die Recherche (Stand 05/2017) ergab für sechs Zelllinien einen *TP53*-Wildtypstatus, für 24 eine einzelne Punktmutation, drei Zelllinien waren *TP53*-deletiert. Zum Mutationsstatus von vier RETRA-behandelten Zelllinien waren keine oder widersprüchliche Informationen verfügbar. Sie wurden von der Korrelationsanalyse ausgeschlossen. Auch Nonsense-, Splice- und Frameshiftmutationen, die in der Regel zur Translation von trunkeierten, transkriptionell inaktiven p53-Proteinen führen, wurden im Folgenden ignoriert.

Innerhalb der betrachteten Mutationsklassen war jeweils eine breite Streuung des Zellüberlebens unter RETRA-Behandlung zu beobachten. WTp53-exprimierende Zelllinien sprachen signifikant besser auf RETRA an, als MUTp53-exprimierende Zelllinien (**Abb. 3.2.**). Zwischen *TP53*-mutierten und p53-negativen Zelllinien fand sich kein Unterschied. Hierbei ist die geringe Zahl p53-negativer Zelllinien zu beachten (n=3). Diese Befunde waren für eine 5- und 10-mikromolare RETRA-Behandlung gleichartig. Es wurden keine *TP53*-Mutationen identifiziert, die besondere Empfindlichkeit oder Resistenz auf RETRA vermittelten.

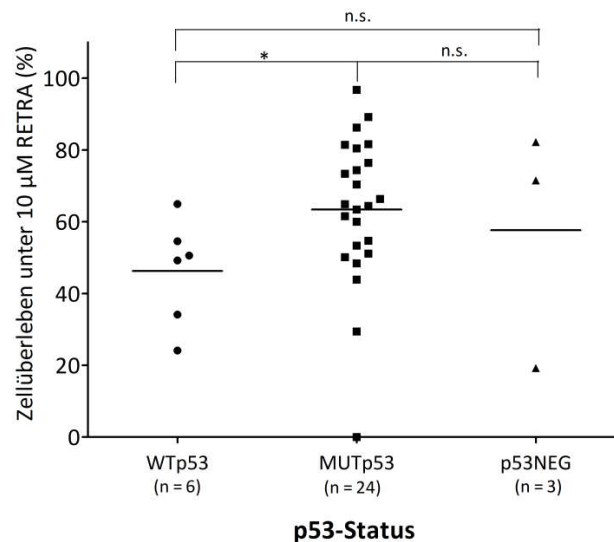


Abb. 3.2. Korrelation der zytotoxischen RETRA-Effekte mit dem p53-Status der behandelten Zelllinien.

Das Überleben der Zelllinien nach Behandlung mit 10 µM RETRA wurde dem Mutationsstatus zugeordnet. WTp53 = Wildtyp-p53; MUTp53 = mutiertes p53; p53NEG = p53 negativ; * = $p < 0,05$; n.s. = $p > 0,05$ (Mann Whitney U-Test).

3.2.2. Einfluss der Expressionslevel von p73-Isoformen auf die Wirkung von RETRA

TAp73 und dNp73 besitzen als Tumorsuppressor bzw. Onkogen gegensätzliche Funktionen. Für viele Tumorentitäten ist eine fehlregulierte Expression der p73-Isoformen TAp73 und dNp73 beschrieben. Ein verminderter TAp73/dNp73-Expressionsquotient, bedingt durch Überexpression von dNp73 oder im Rahmen einer Ko-Überexpression von dNp73 und TAp73, war in mehreren retrospektiven, klinischen Studien mit einer schlechten Prognose von Tumorpatienten assoziiert (Engelmann et al. 2015). Zytotoxische Effekte von RETRA sind, soweit bekannt, von der Expression TAp73 abhängig. Es wurde daher der Einfluss der Expression der p73-Isoformen auf die Wirkung von RETRA in Tumorzelllinien retrospektiv untersucht. Daten über die mRNA-Expression von TAp73 und dNp73 von 38 der 43 RETRA-behandelten Zelllinien konnten laboreigenen Erhebungen entnommen werden (interne Daten, Feststellung mittels qRT-PCR durch Anita Ebel).

In acht von 38 Zelllinien wurde eine Überexpression von dNp73 gefunden, die stets von einer Ko-Überexpression von TAp73 begleitet war. In weiteren 23 Zelllinien wurden isoliert hohe Expressionslevel von TAp73 gemessen. Für die Expressionslevel von TAp73 und dNp73 wurde ein Korrelationsquotient von 0,77 berechnet (Ranglistenkorrelation nach Spearman r_s). Die Überexpression von TAp73 und dNp73 bzw. ihre gemeinsame Ko-Überexpression kam in RETRA-resistenten und -sensiblen Zelllinien vor. Die Korrelation des Überlebens der RETRA-behandelten Zelllinien mit der Expression von TAp73 und dNp73 ergab Korrelationskoeffizienten von -0,01 ($p = 0,1$) und 0,02 ($p = 0,2$). Demnach bestand kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression der p73-Isoformen und zytotoxischen RETRA-Effekten in den untersuchten Zelllinien (**Abb. 3.3**).

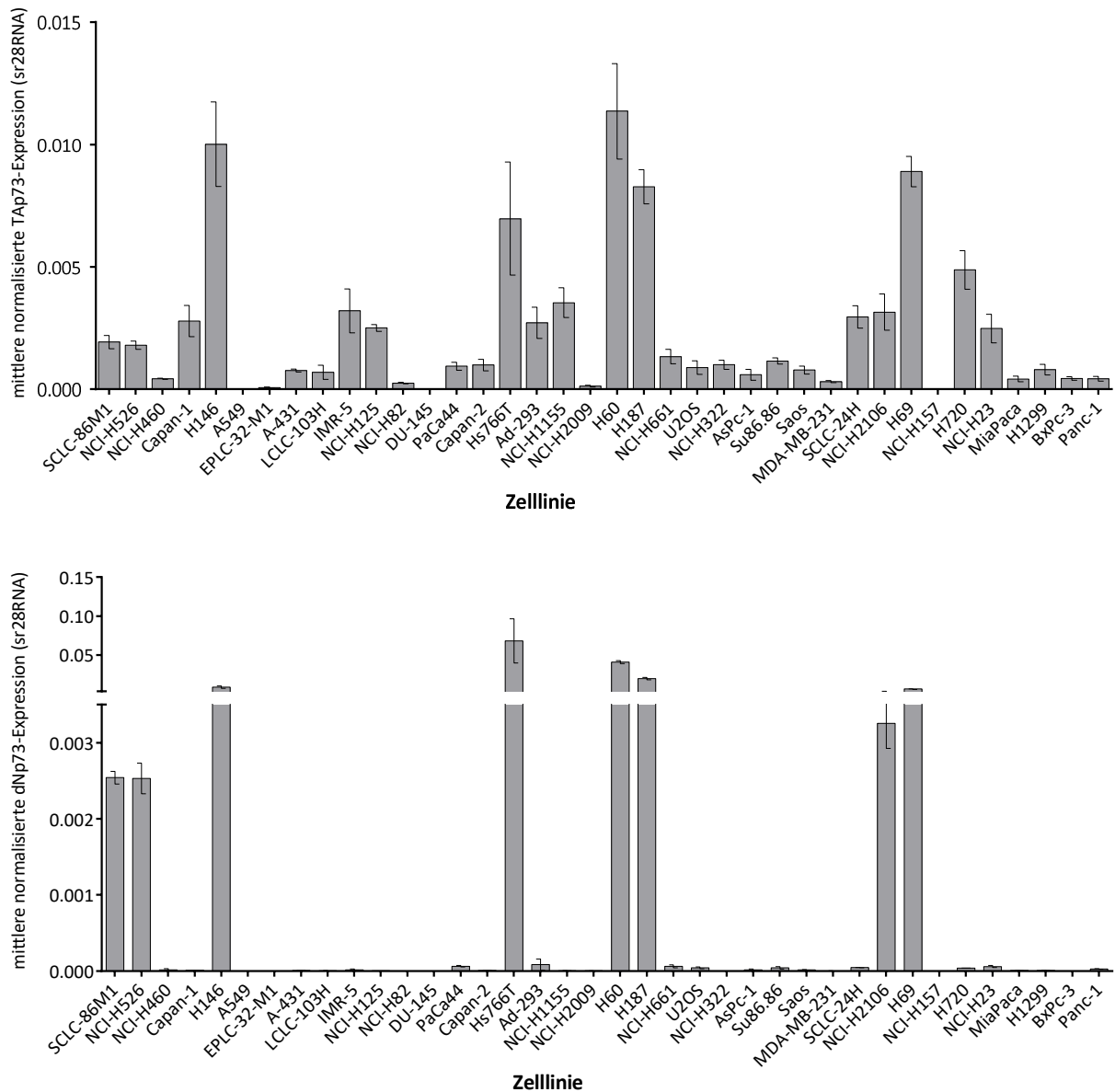


Abb. 3.3. Darstellung der mRNA-Expressionslevel von TAp73 und dNp73 in den RETRA-behandelten Tumorzelllinien.

Die Darstellung zeigt die normalisierten mRNA-Expressionslevel von TAp73 und dNp73 der RETRA-behandelten Tumorzelllinien und reiht sie nach ihrem Überleben unter 10 µM RETRA von links nach rechts auf. Ranglistenkorrelationskoeffizienten nach Spearman r_s für die Korrelation von mRNA-Expressionslevel und Zellüberleben: $r_{s(\text{TAp73})} = 0,02$, $p > 0,1$; $r_{s(\text{dNp73})} = 0,05$, $p > 0,2$.

Ähnliche Resultate ergaben sich für die Korrelation der Expressionslevel und des Zellüberlebens unter 5 µM RETRA.

n.s. = p -Wert nicht signifikant (Mann Whitney U-Test).

Der Quotient der Expressionsraten von TAp73 und dNp73 war in 18 von 38 Zelllinien mindestens 50-fach in Richtung von TAp73 verschoben. Diese Konstellation war ebenfalls nicht mit dem Zellüberleben unter RETRA-Behandlung korreliert (**Abb. 3.4.**).

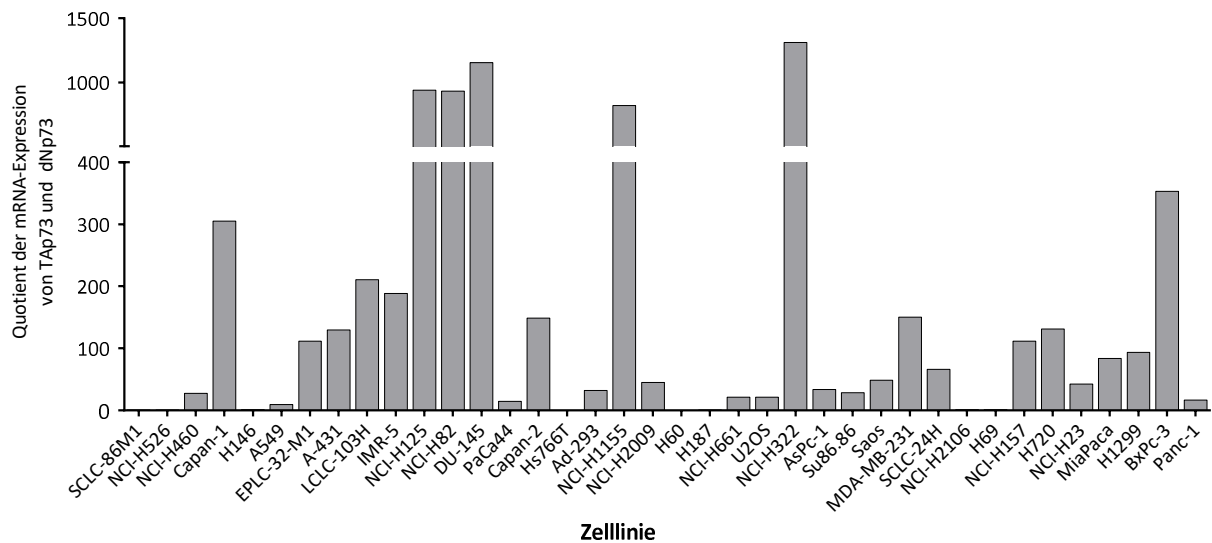


Abb. 3.4. Darstellung der Quotienten aus den mRNA-Expressionsleveln von TAp73 und dNp73 in den RETRA-behandelten Tumorzelllinien.

Die Darstellung zeigt die Expressionsquotienten (TAp73/dNp73) der RETRA-behandelten Tumorzelllinien und reiht sie nach ihrem Überleben unter 10 μ M RETRA von links nach rechts auf: Ranglistenkorrelationskoeffizienten nach Spearman r_s für die kategorienunabhängige Korrelation von Expressionsquotient und Zellüberleben: $r_s = 0,04$; $p > 0,05$;

Ähnliche Resultate ergaben sich für die Korrelation der Expressionslevel und dem Zellüberlebens unter 5 μ M RETRA.

n.s. = p -Wert nicht signifikant (Mann Whitney U-Test).

Die Expression der p73-Isoformen wird in malignen Tumoren teilweise durch ein verändertes Methylierungsmuster der Promotoren P1 und P2 beeinflusst. Es wurde entsprechend auch das Methylierungsprofil der TAp73- und dNp73-Promotoren (P1 bzw. P2) in den verwendeten Zelllinien erhoben (interne Daten, Feststellung mittels Bisulfitkonvertierung durch Philipp Schröder).

Es zeigte sich, dass 70% der untersuchten Tumorzelllinien einen unmethylierten TAp73-Promotor und 65% einen methylierten dNp73-Promotor aufwiesen. Dieser Methylierungszustand der Promotoren korrelierte erwartungsgemäß mit den gemessenen Expressionsraten beider p73-Isoformen (Mann-Whitney U-Test für beide Promotoren: $p < 0,05$). Folglich ließ auch die Korrelationsanalyse zwischen dem Methylierungsprofil der p73-Promotoren und dem Ansprechen der Zelllinien auf RETRA keinen Rückschluss auf eine direkte Assoziation zu (**Abb. 3.5.**).

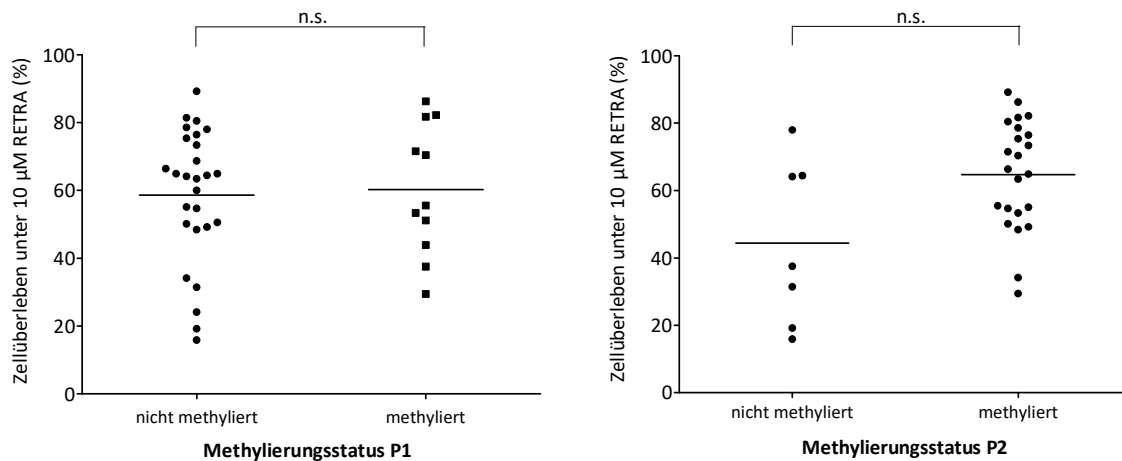


Abb. 3.5. Korrelationen des Methylierungsstatus der Promotoren P1 (TAp73) und P2 (dNP73) mit den Ergebnissen der RETRA-Behandlung.

Das Methylierungsprofil wurde dem Überleben der Zelllinien zugeordnet und auf einen statistischen Zusammenhang überprüft. Es wurde zwischen „nicht methyliert“ und „methyliert“, sowie „stark methyliert“ und „gering methyliert“ unterschieden.

n.s. = p -Wert nicht signifikant (Mann Whitney U-Test).

3.2.3. Einfluss der p53-Mutationart auf das Ansprechen auf RETRA

Mutierte p53-Proteine lassen sich anhand der strukturellen Auswirkungen von Mutationen in Kontakt- und Struktur- bzw. Konformationsmutanten unterscheiden. Kontaktmutationen betreffen Aminosäuren des LSH-Motivs und des L3-Loops, die die direkte DNA-Bindung vermitteln. Strukturmutationen befinden sich meist in den Loops L2 und L3, der Zinkbindungsregion und den Betafaltblättern. Sie senken die Temperaturstabilität von p53 und begünstigen die vollständige oder partielle Denaturierung des p53-Proteins. Die genannten Strukturmutante besitzen in klinischen Studien prognostische Bedeutung. Da sich RETRA direkt auf die Interaktion von mutierten p53-Proteinen und TAp73 auswirken soll, wurde das Ansprechen der Zelllinien auf RETRA auf einen Zusammenhang mit den genannten Mutationsarten untersucht. Angaben über die vorliegenden Mutationen der Zelllinien konnten den o.g. Zelldatenbanken entnommen werden.

Je 12 Zelllinien trugen eine Kontakt- oder Strukturmutation des *TP53*-Gens. Zelllinien mit Frameshift-Splice- und Nonsensemutationen wurden wiederum ausgeschlossen. In der Korrelationsanalyse zeigte sich, dass weder die Expression von Kontakt- und Strukturmutation, noch die Lokalisation der Mutation im p53-Protein relevante Unterschiede im Ansprechen der Zelllinien auf RETRA verursachten (**Abb. 3.6 und 3.7.**). Erneut waren WTP53-exprimierende Zelllinien RETRA-sensibler, als *TP53*-mutierte Zelllinien. Auffällig waren Zelllinien mit Mutationen im Bereich des β -Faltblattes dar, die sehr uneinheitlich auf RETRA ansprachen. Die hier vorliegenden β -Faltblattmutationen waren R158H, A159V, V216L und Y220C (**Abb. 3.7.**).

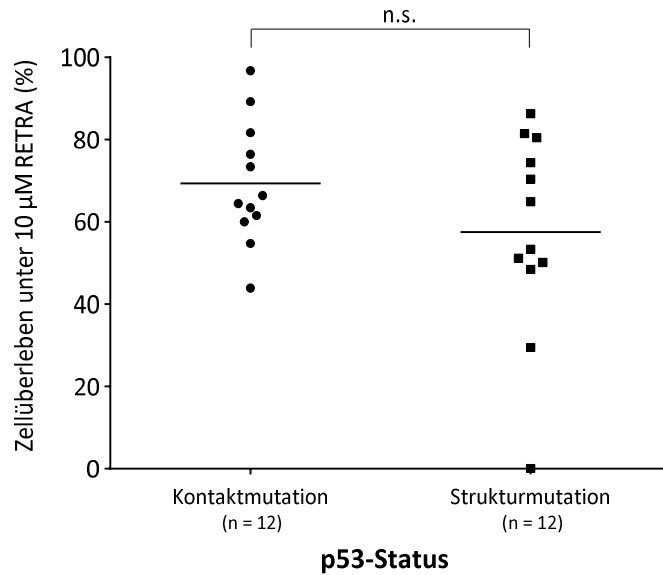


Abb. 3.6. Korrelation der zytotoxischen RETRA-Effekte mit dem p53-Mutationstyp der behandelten Zelllinien.

Die Zelllinien wurden entsprechend der vorliegenden strukturellen Veränderung von p53 gruppiert und mit ihrem Zellüberleben unter RETRA-Behandlung korreliert.

n.s. = p -Wert nicht signifikant (Mann Whitney U-Test).

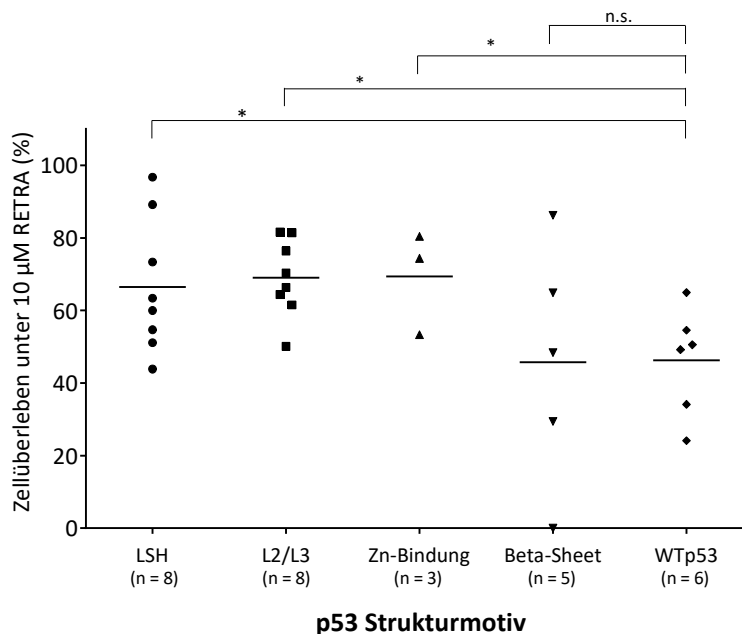


Abb. 3.7. Korrelation der zytotoxischen RETRA-Effekte mit der Position der TP53-Mutation der behandelten Zelllinien.

Die Zelllinien wurden entsprechend der vorliegenden strukturellen Veränderung von p53 gruppiert und mit ihrem Zellüberleben unter RETRA-Behandlung korreliert.

LSH = Loop-Sheet-Helix-Motiv (Kontaktmutationen), L2/L3 = Loop2/Loop3 (Strukturmutationen), Zn-Bindung = Zink-Bindung (Strukturmutationen), Beta-Sheet = Beta-Faltblatt (Strukturmutationen).

Unter Beta-Sheet finden sich die Zelllinien Rh1 (Y220C), Capan-1 (A159V), LCLC-103H (V216L), BxPc-3 (Y220C).

WTp53 = Wildtyp-p53;

* = $p < 0,01$ (Mann Whitney U-Test); n.s. = p -Wert nicht signifikant (Mann Whitney U-Test).

3.2.4. Der *TP53*-Polymorphismus der Aminosäureposition 72

Entlang der *TP53*-Gensequenz sind zahlreiche Einzelnukleotidpolymorphismen bekannt („*single nucleotide polymorphism*“, SNP). Der SNP der Codonposition 72 (rs1042522) kann für Arginin (CGC, Arg72) oder Prolin (CCC, Pro72) kodieren. Arg72 führt im Vergleich zu Pro72 zu einer höheraffinen Proteininteraktion zwischen TAp73 und MUTp53 und vermittelt dadurch größeres onkogenes Potential. Da die SNP-bedingte Bindungsaffinität zwischen MUTp53 und TAp73 unmittelbaren Einfluss auf die Wirkung von RETRA haben könnte, wurde dieser SNP in den 43 RETRA-behandelten Tumorzelllinien bestimmt und mit ihrem Überleben unter 10 µM RETRA korreliert. Durch die Erhebung des SNP in 44 weiteren laborinternen Zelllinien wurde dabei zusätzlich sein Verteilungsmuster in malignen Tumorzelllinien analysiert.

Zur Feststellung des Polymorphismus wurde die genomische DNA (gDNA) aus den Tumorzelllinien extrahiert und einer Restriktionsfragmentlängenpolymorphismusanalyse (RFLP-Analyse) unterzogen. Das SNP-tragende *TP53*-Genfragment wurde per PCR amplifiziert (199 bp lang) und anschließend durch das Restriktionsenzym *BsH1236I* (=BstUI, Zielsequenz CG-CG) verdaut. Die Gelelektrophorese zeigte folglich für Arg72-enthaltende Amplifikate (Arg72: CGC) Banden bei 111 und 88 Basenpaaren. Banden bei 199 Basenpaaren wiesen auf unverdaute Amplifikate und damit auf den Pro72-Polymorphismus hin (Pro72: CCC). Für den Fall eines heterozygoten SNP-Genotyps fanden sich beide Bandenmuster kombiniert (**Abb. 3.8.**).

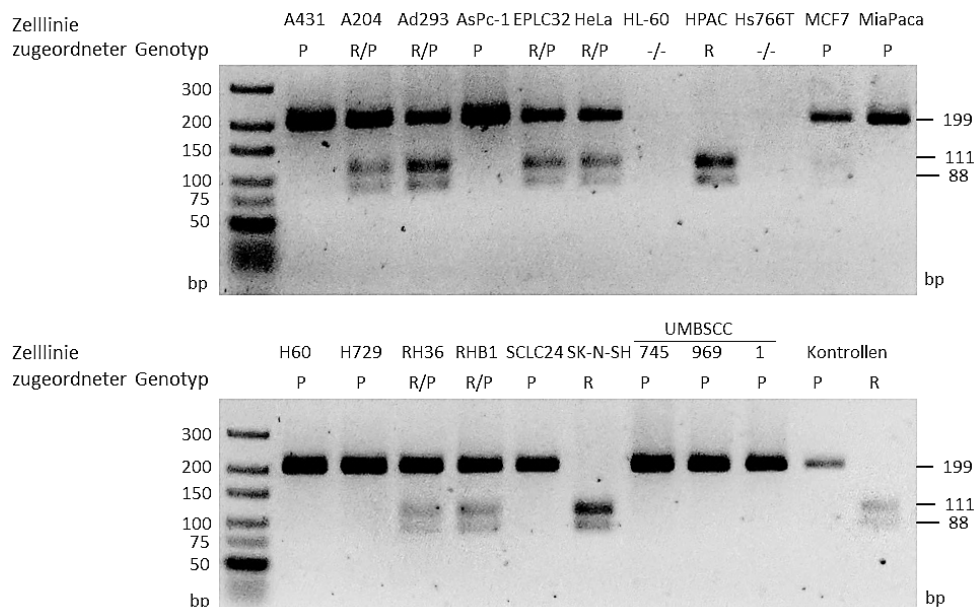


Abb. 3.8. Darstellung eines repräsentativen Ausschnitts der RFLP-Analyse zur Feststellung des SNP der Codonposition 72 des *TP53*-Gens (rs1042522) aus den gDNA-Proben von 20 Zelllinien.

Die Zuordnung eines homo- oder heterozygoten Genotyps geschah anhand des kalkulierten Bandenmusters (199 bp = P = Prolin homozygot; 111 und 88 bp = R = Arginin homozygot; 199, 111 und 88 bp = P/R = Arginin/Prolin heterozygot). Mithilfe von bekannten Positivkontrollen wurde die korrekte Zuordnung bestätigt; bp = Basenpaare.

Auf Grundlage der RFLP-Analyse konnten die SNP-Genotypen von 62 der 87 untersuchten Zelllinien zweifelsfrei bestimmt werden. 17 gDNA-Proben ergaben entsprechend einer p53-Deletion keine detektierbaren DNA-Banden. Der negative p53-Status konnte hier durch Literaturangaben bestätigt werden. In weiteren acht Fällen war die Zuordnung des Genotyps durch die RFLP-Analyse nicht eindeutig möglich (s. z.B. **Abb. 3.8.** Zelllinie MCF7). Daher wurde ein Bestätigungsexperiment in Form einer Genotypisierung angeschlossen (*TaqMan*[®] Realtime-PCR mit SNP-spezifischen Oligonukleotidsonden). Auf Grundlage dieser Genotypisierung wurde für alle 87 gDNA-Proben ein Genotyp bzw. ein negativer p53-Status zweifelsfrei ermittelt (**Abb. 3.9.**).

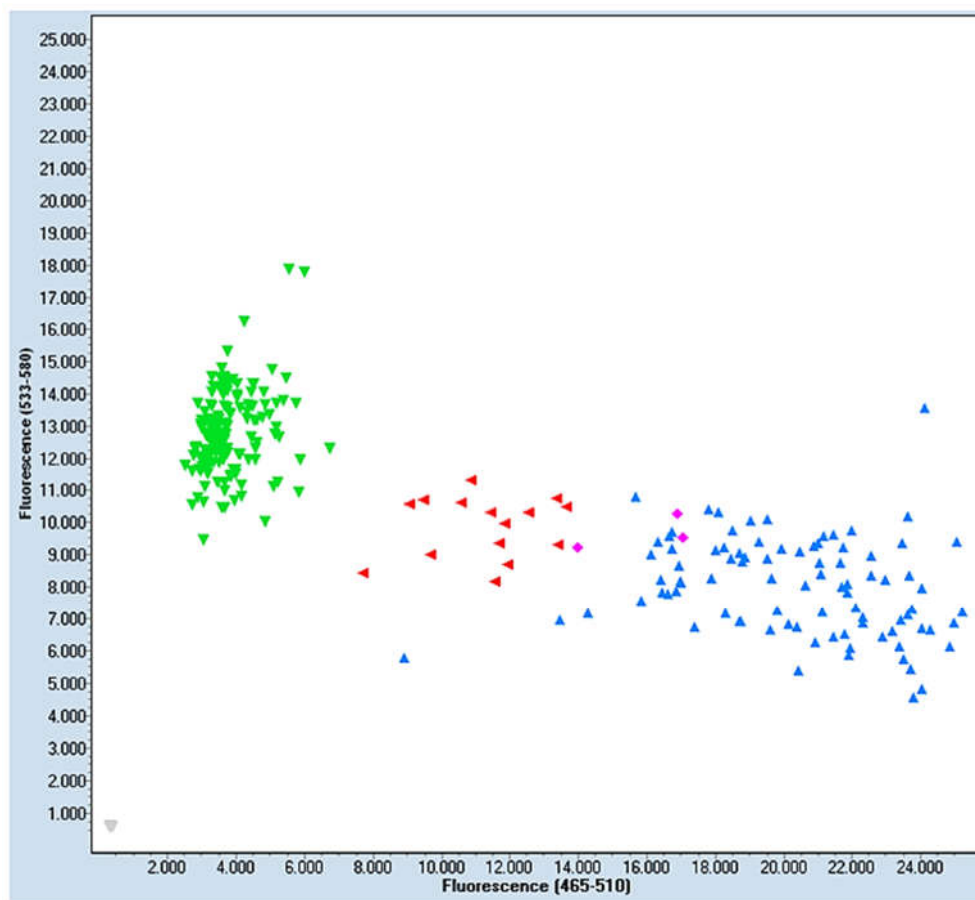


Abb. 3.9. Darstellung der Genotypisierung des SNP der Codonposition 72 des *TP53*-Gens (rs1042522) aus gDNA-Proben von 87 Zelllinien.

Der Genotyp jeder Probe wurde *in silico* dreifach unter Abgleich mit bekannten Positivkontrollen als Referenz bestimmt. Bei Übereinstimmung aller drei Ergebniswerte wurde das Ergebnis akzeptiert. War dies nicht der Fall, wurde die Information über den *TP53*-SNP der Zelllinie nicht verwertet.

Farbwerte: grün: 72 Prolin (homozygot), rot: 72 Arginin/Prolin (heterozygot); blau: 72 Arginin (homozygot); rosa: nicht zuzuordnen; grau: negativ (z.B. H1299, HL-60, Hs766T).

Die Häufigkeitsverteilung des untersuchten SNP in *TP53*-exprimierenden Zelllinien (SNP in RFLP und Genotypisierung nachweisbar) unterschied sich deutlich von einer gesunden, humanen Vergleichspopulation. Diese wurde öffentlichen Plattformen des *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*) und des *NCI* (*National Cancer Center*) entnommen. Das Arg72-Allel war deutlich überrepräsentiert (56% der Zelllinien), während das Pro72-Allel im Durchschnitt der gesunden Vergleichspopulation lag (30%). Ein heterozygoter SNP-Genotyp war mit 14% der Zelllinien im Vergleich zur Normalpopulation unterrepräsentiert (**Abb. 3.10**). In der *TP53*-mutierten Subpopulation waren keine heterozygote SNP-Ausprägung, aber weiterhin eine Häufung des Arg72-Allels nachweisbar (61%).

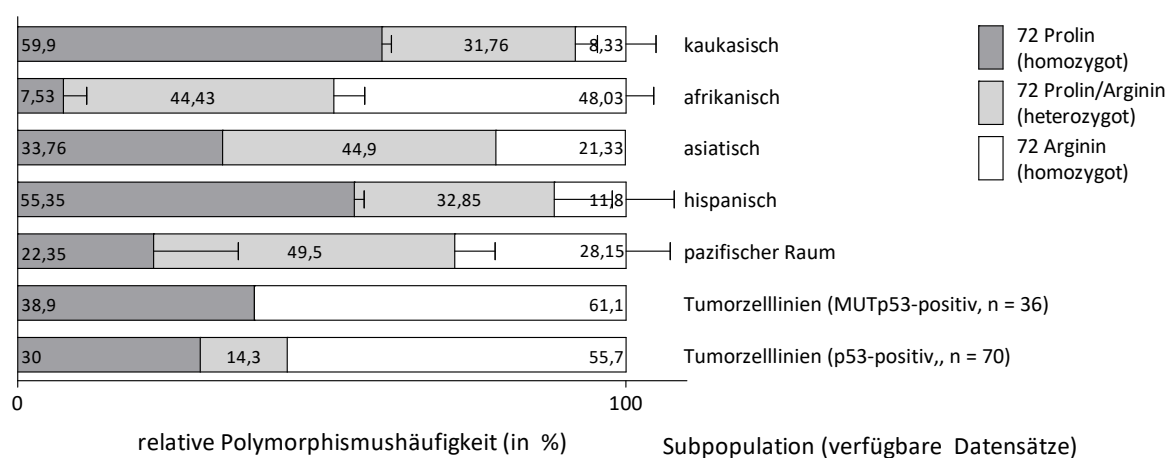


Abb. 3.10. Verteilung des Nukleotidpolymorphismus der Codonposition 72 von p53 (rs1042522) in den analysierten Tumorzelllinien und gesunden, humanen Subpopulationen.

Als p53-positiv wurden alle Zelllinien gewertet, in denen ein Polymorphismus experimentell nachweisbar war (70 von 87 Zelllinien).

Informationen über den p53-Mutationsstatus der betrachteten Zelllinien wurden Mutationsdatenbanken entnommen (*TP53 Database der International Agency for Research on Cancer (IARC/WHO)*, *Core Cell Line Viewer des Cancer Genome Project (Sanger)*, Stand Mai 2017). Demnach exprimierten 36 Zelllinien mutierte p53-Proteine (MUTp53), weitere 20 Zelllinien p53-Wildtyp. In 17 Zellgenomen war experimentell kein SNP nachweisbar, was durch Literaturinformationen über vorliegende Frameshift- oder Nonsensemutationen bestätigt wurde. Zu 14 Zelllinien waren keine Angaben über den p53-Mutationsstatus eruierbar.

Farbwerte: dunkelgrau: 72Prolin homozygot, hellgrau: 72Arginin/Prolin heterozygot, weiß: 72Arg homozygot.

Quellplattformen: HAPMAP (NCBI), HDP (NCI), SNP500Cancer (NCI).

Die RETRA-behandelten Zelllinien wurden nach ihrem SNP-Genotyp kategorisiert und mit ihrem Überleben unter 10 μM RETRA korreliert. Zunächst fand sich in diesem Zelllinienpanel die für die bereits betrachteten, malignen Tumorzelllinien typische SNP-Verteilung wieder: unter den 24 MUTp53-positiven Tumorzelllinien war kein heterozygoter SNP-Genotyp nachweisbar. 16 Zelllinien wiesen homozygote Arg72-Allele (71%), sieben weitere die Pro72-Variante (29%) auf. Das Zellüberleben unter RETRA unterschied sich jedoch nicht zwischen Arg72- und Pro72-Alleltragenden Zelllinien (**Abb. 3.11.**).

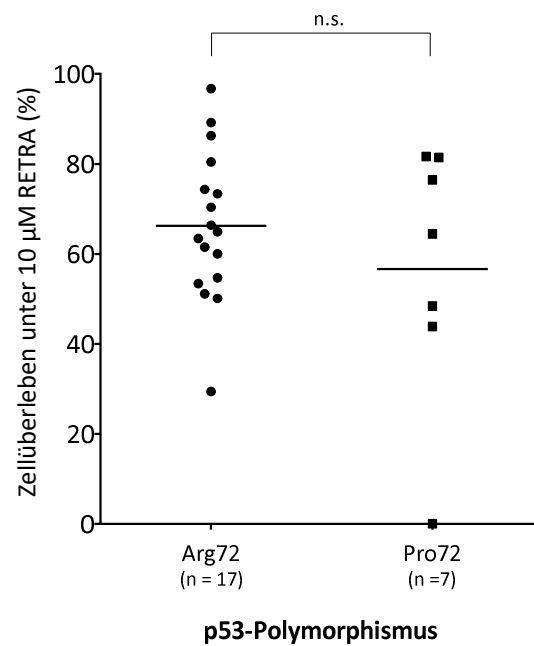


Abb. 3.11. Darstellung der RETRA-Sensibilität MUTp53-exprimierender Zelllinien in Abhängigkeit ihres Polymorphismus der Aminosäureposition 72.

Die Darstellung enthält mit RETRA behandelte Zelllinien, die MUTp53 exprimieren; von der Analyse ausgeschlossen waren p53-negative und WTp53-tragende Zelllinien.

Arg72 = 72Arginin homozygot; Pro72 = 72Prolin homozygot.

n.s. = *p*-Wert nicht signifikant (Mann Whitney U-Test).

3.3. Nachweis der Wirksamkeit von RETRA in vitro

Das onkogene Potential von mutierten p53-Proteinen ist unter anderem durch unphysiologische Proteininteraktionen bedingt. Hierdurch werden auch tumorsuppressive Transkriptionsfaktoren, wie Wtp53 und TAp73 funktionell gehemmt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die 20 häufigsten p53-Mutanten kloniert (**Tab. 3.1.**, „Hot Spot“-Mutationen, 48% aller in humanen Malignomen gefundenen TP53-Mutationen betreffen diese Codons; *IARC TP53 Database der WHO, Version R18*).

Mittels Reporteranalyse wurden Ihre Auswirkungen auf die transkriptionale Aktivität von Wtp53 und TAp73 analysiert. Anschließend erfolgte die Untersuchung der Effekte von RETRA auf die Interaktion zwischen MUTp53 und TAp73.

Mutation	Mutationsart/ Position im p53-Protein	Häufigkeit in %	Mutation	Mutationsart/ Position im p53-Protein	Häufigkeit in %
R306X	Trunkierung/NLS	0,7	Y234C	Strukturmutation/BF	0,9
R282W	Strukturmutation/H2 (LSH)	2,9	Y220C	Strukturmutation/BF	1,9
R280T	Kontaktmutation/H2 (LSH)	1,3	R213X	Trunkierung/BF	1,8
P278S	Strukturmutation/H2 (LSH)	1,3	R196X	Trunkierung/BF	1,2
R273H	Kontaktmutation/S10 (LSH)	7,4	H179R	Strukturmutation/H1 (Zn)	1,8
G266E	Strukturmutation/S10 (LSH)	1,1	C176F	Strukturmutation/L2 (Zn)	1,5
R249S	Strukturmutation/L3	2,8	R175H	Strukturmutation/L2	5,4
R248Q	Kontaktmutation/L3	7,7	Y163C	Strukturmutation/BF	1,1
G245S	Strukturmutation/L3	3,5	R158H	Strukturmutation/BF	1,2
M237I	Strukturmutation/L3	1,0	V157F	Strukturmutation/BF	1,1

Tab. 3.1. Mutationsart, Position im p53-Protein und Häufigkeit der generierten TP53-Mutanten.

Position im p53-Protein: NLS – *nuclear localisation signal*, H – Helix, LSH – Loop/Sheet/Helix-Motiv, L2 – Loop 2, L3 – Loop 3, S10 – Strang 10, BF – β -Faltblatt, Zn – an Zinkbindung beteiligt; Häufigkeit der Codonmutation in humanen Tumoren nach *IARC TP53 Mutationsdatenbank der WHO, Version R18, Bouaoun et al. 2016*).

3.3.1. Klonierung der p53-Mutanten

Zur Generierung der mutierten p53-Proteine wurde die Methode der PCR-Mutagenese etabliert. Dabei wurde in zwei sequentiellen PCR-Schritten eine Punktmutation in die native *TP53*-Sequenz eingefügt. Eine detaillierte Beschreibung der PCR-Mutagenese findet sich unter Abschnitt 2.2.13. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Zwischenschritte aufgeführt. Der erste PCR-Schritt erzeugte ein punktmutiertes *TP53*-DNA-Fragment. Dieses Zwischenprodukt wurde im zweiten PCR-Schritt als Primer verwendet, um die punktmutierte *TP53*-Sequenz zu vervollständigen. Die generierten Zwischen- bzw. Endprodukte der PCR-Schritte wurden jeweils per DNA-Elektrophorese bestätigt (Abb. 3.12., A, B). Die korrekte Mutagenese der *TP53*-Matritze wurde anschließend durch C- und N-terminale DNA-Sequenzierung bestätigt.

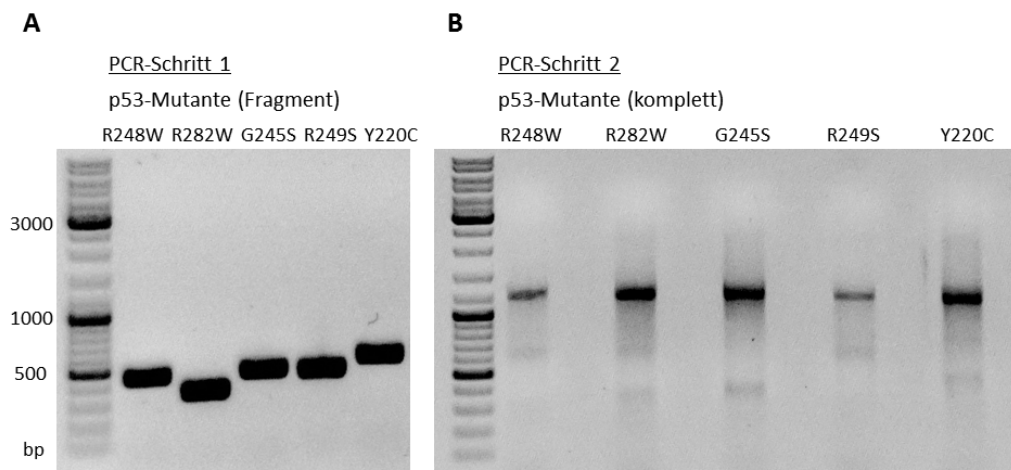


Abb. 3.12. Repräsentative Darstellung von Zwischen- und Endprodukten der PCR-Mutagenese.

Die Darstellungen bilden je fünf repräsentative p53-Mutanten ab, deren PCR-Produkte am Ende des ersten (A) und zweiten (B) PCR-Schrittes durch DNA-Elektrophorese detektiert wurden.

A) die abgebildeten DNA-Banden entsprechen den kalkulierten Fragmentlängen (R248W: 435 bp; R282W: 333 bp; G245S: 444 bp; R249S: 432 bp; Y220C: 519 bp);

B) die DNA-Banden bei 1179 bp entsprechen der vollständigen, punktmutierten *TP53*-Sequenz.

Im Anschluss wurden die punktmutierten *TP53*-Genprodukte und die native WTp53-Sequenz über pENTR- in pCMV-Vektoren kloniert und transient in NCI-H1299-Zellen transfiziert (nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, p53-negativ durch endogene *TP53*-Deletion). Die korrekte Proteinexpression der Plasmide in dieser Zelllinie erfolgte mittels Western Blot (Abb. 3.13., A-C). Der verwendete p53-spezifische Antikörper bindet p53-Proteine N-terminal, sodass auch die trunkierten p53-Proteinprodukte R306X, R213X und R196X (Spuren 9, 16, 17) entsprechend ihres Molekulargewichts nachgewiesen werden konnten.

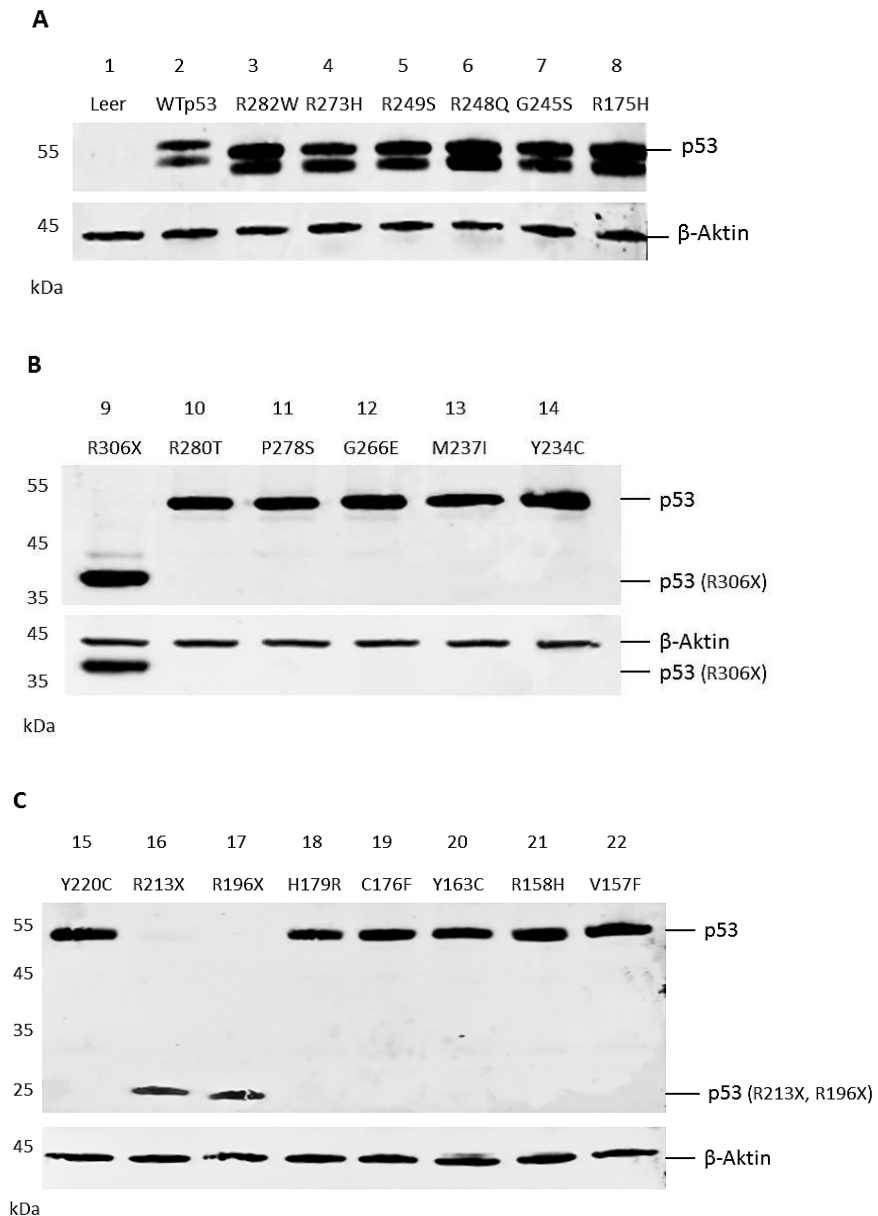


Abb. 3.13. Expression von WTp53 und der generierten, mutierten p53-Proteine im Western Blot.

Der verwendete p53-Antikörper DO-1 bindet den N-Terminus von p53 und konnte alle in H1299-Zellen transfizierten p53-Proteine unabhängig der vorliegenden Mutation detektieren.

WTp53 durchlief das Elektrophoresegele langsamer als die p53-Mutanten. Als Grund hierfür ist möglicherweise die Polymorphismusausprägung der Aminosäureposition 72 des verwendeten WTp53-Plasmids anzunehmen (im vorliegenden Fall Prolin, Arginin für mutierte p53-Proteine).

P53-Doppelbanden, wie hier in Abschnitt A, treten bekannterweise auf. Die Ursache ist nicht vollständig geklärt. Sie sind wahrscheinlich das Resultat von verschiedenem Grad der Proteinphosphorylierung in zytotoxisch belasteten Zellen („*phosphorylation shift*“) oder von Proteindegradierung.

3.3.2. Auswirkungen der p53-Mutanten auf die Transkriptionsaktivität von WTp53 und TAp73

Nach Klonierung der p53-Mutanten sollte mittels Reporteranalyse geprüft werden, inwieweit sie transkriptionelle Aktivität aufwiesen. Auf gleiche Weise wurde ihr Einfluss auf die Transkriptionsaktivität von WTp53 und TAp73 untersucht.

H1299-Zellen wurden in Mikrotiterplatten mit je 2,5 ng der Plasmide von WTp53 oder den p73-Isoformen TAp73 α und TAp73 β transfiziert. WTp53- und die TAp73-Isoformen induzierten das kotransfizierte Reporterplasmid. Dieses enthielt als Konsensussequenz einen luziferasegekoppelten AIP1-Promotor. Das Aktivierungsniveau von TAp73 α war quantitativ deutlich stärker, als von TAp73 β und wurde deswegen in angeschlossenen Versuchen verwendet (Daten nicht gezeigt, die Bezeichnung „TAp73 α “ wird folgend durch „TAp73“ ersetzt).

Anschließend wurden H1299-Zellen mit 2,5 ng WTp53 oder TAp73 jeweils allein und in Kombination mit ansteigenden Mengen einer p53-Mutante transfiziert (2,5, 50 und 100 ng in WTp53-Versuchsreihen und 2,5, 75 und 150 ng in TAp73-Versuchsreihen). Die Transaktivierung des Reporterplasmids wurde 24 Stunden nach Transfektion der Proben in einem luziferasebasierten Assay luminometrisch erfasst.

Erwartungsgemäß führten WTp53 und TAp73 zu einer starken Reporteraktivierung. Das durch WTp53 vermittelte Luziferasesignal war etwa doppelt so stark, wie das von TAp73 (Daten der absoluten Reporteraktivierung nicht gezeigt, WTp53: zwischen 150000 und 200000 relativen Lichteinheiten (RLU); TAp73: zwischen 70000 und 100000 RLU).

In Abwesenheit von WTp53 und TAp73 vermittelten die p53-Mutanten bis auf einige, im Weiteren aufgeführte Ausnahmen, ein Luziferasesignal, das nicht über das basale Niveau des eingesetzten Reporterplasmids hinausging. Sie wiesen demnach keine endogene Aktivität auf (**Abb. 3.14**).

Die Transaktivierung des Reporters durch WTp53 und TAp73 wurde durch die meisten p53-Mutanten konzentrationsabhängig gehemmt (als Referenzniveau wurden die Luziferasesignale durch 2,5 ng WTp53 oder 2,5 ng TAp73 verwendet) (**Abb. 3.14., A, B**). Hervorzuheben waren dabei im WTp53-basierten Versuchsaufbau die Mutanten R282W, R248Q und R249S. Sie reduzierten die WTp53-vermittelte Reporteraktivierung bereits in Konzentrationen von 2,5 ng um 70-90%.

Für die Hemmung des Transkriptionspotentials von TAp73 waren deutlich größere Mengen der p53-Mutanten nötig (meist erst unter 75-150 ng der p53-Mutanten). Wesentliche Unterschiede bestanden hierbei unter den p53-Mutanten nicht (**Abb. 3.14., B**).

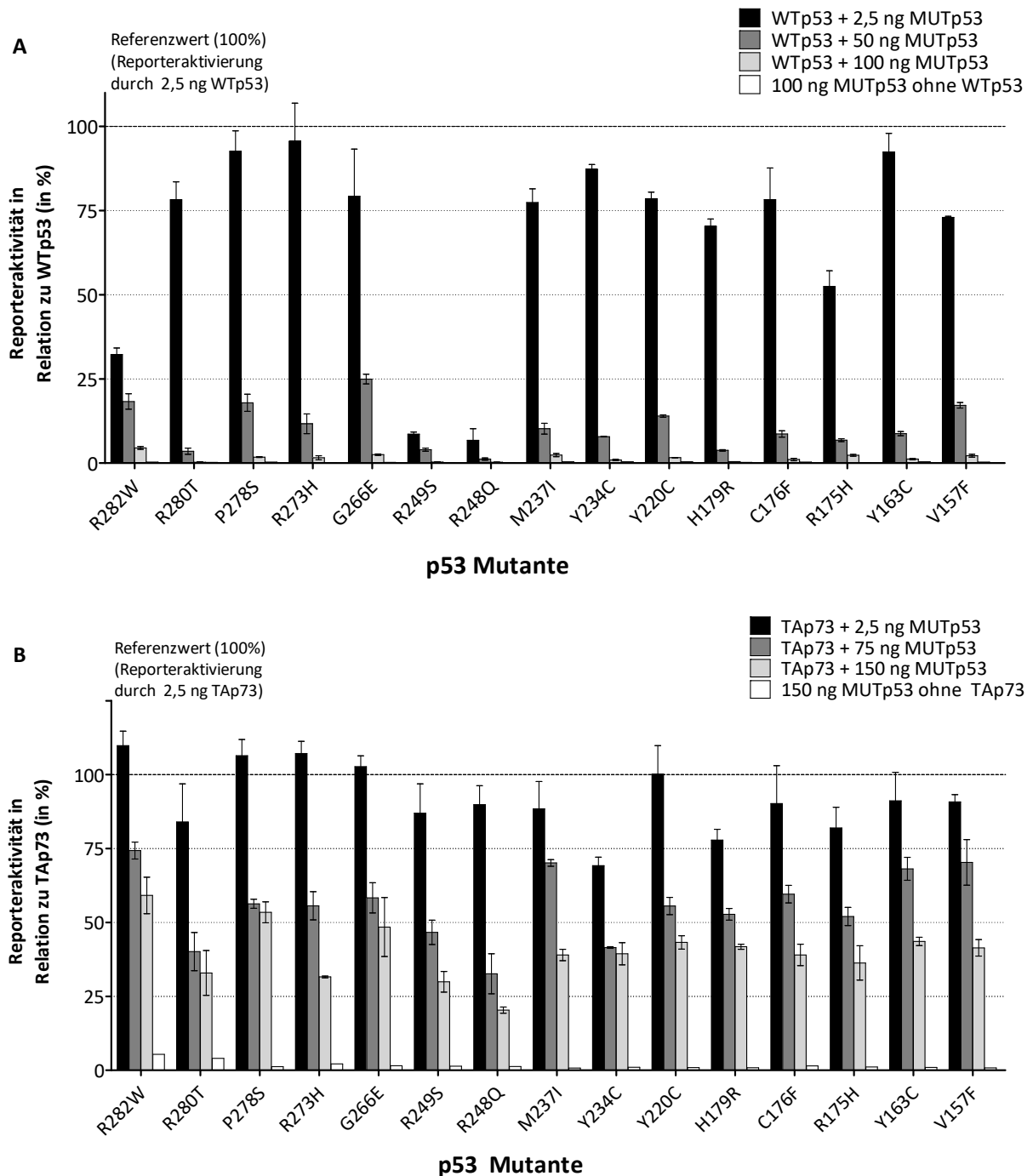


Abb. 3.14. Reporteraktivierung durch WTp53 und TAp73 allein, sowie in Gegenwart von p53-Mutanten.

Dargestellt sind die Luziferasesignale von Proben, die 2,5 ng WTp53 (A) bzw. 2,5 ng TAp73 (B) und ansteigende Mengen von p53-Mutanten enthielten. Die Aktivierung durch 2,5 ng WTp53 und 2,5 ng TAp73 allein diente jeweils als Referenzwert für die MUTp53-Konzentrationsreihen (entsprechend 100%).

Jeder Messwert stellt den Mittelwert dreier äquivalenter Proben mit entsprechender Standardabweichung dar. Das durch die alleinige Transfektion des Reporterplasmids ausgelöste Reportersignal wurde als Basalaktivität von allen Messwerten subtrahiert. Die pro Probe transfizierte Gesamtmenge transfizierter Plasmide wurde durch angepasste Mengen Leervektor konstant gehalten.

Es wichen einige p53-Mutanten von dem geschilderten Verhalten, also hinsichtlich ihrer endogenen transkriptionellen Aktivität und Hemmung des Transkriptionspotentials von WTP53 und TAp73 ab (**Abb. 3.15., A, B**):

die Trunkierungsmutanten R196X und R213X waren transkriptionell inaktiv und hemmten das Transaktivierungspotential von WTP53 und TAp73 nicht.

Eine weitere Trunkierungsmutante, R306X, löste hingegen auch in Abwesenheit von WTP53 und TAp73 ein Luziferasesignal aus, das bei einer Konzentration von 100 ng dem von 2,5 ng WTP53 glich. In der TAp73-Versuchsreihe lag das absolute Reporterniveau wegen der hier größeren MUTp53-Konzentration höher, als in der WTP53-Versuchsreihe. R306X hemmte das Transkriptionspotential von WTP53 geringfügig, nicht aber jenes von TAp73.

Das R158H-mutierte p53-Protein (temperaturabhängige β -Faltblattmutation) zeigte endogene Transkriptionsaktivität, die mit zunehmender Konzentration anstieg. Sie löste in Konzentrationen von 50 bzw. 75 ng eine Reporteraktivierung aus, die das Referenzniveau von 2,5 ng WTP53 und TAp73 überstieg. Ein transkriptionshemmender Effekt von R158H auf WTP53 oder TAp73 war wegen der starken Eigenaktivität in diesem Versuchsaufbau nicht abzugrenzen. Es fiel jedoch auf, dass 100 ng R158H erst in einem WTP53- oder TAp73-freien Versuchsansatz die maximale Reporteraktivierung bot.

Auch die Mutante G245S (Strukturmutation im L3-Loop) reduzierte das Reporterniveau von WTP53 und TAp73, dies in jedoch deutlich geringeren Ausmaß, als die meisten p53-Mutanten (um ca. 25% bei 100 ng). Ungleich der Mutante R158H war bei Konzentrationssteigerung weitere Erhöhung der Reporteraktivierung zu verzeichnen. In Abwesenheit von WTP53 und TAp73 demonstrierte das G245S-mutierte p53-Protein eine schwache endogene Reporteraktivität.

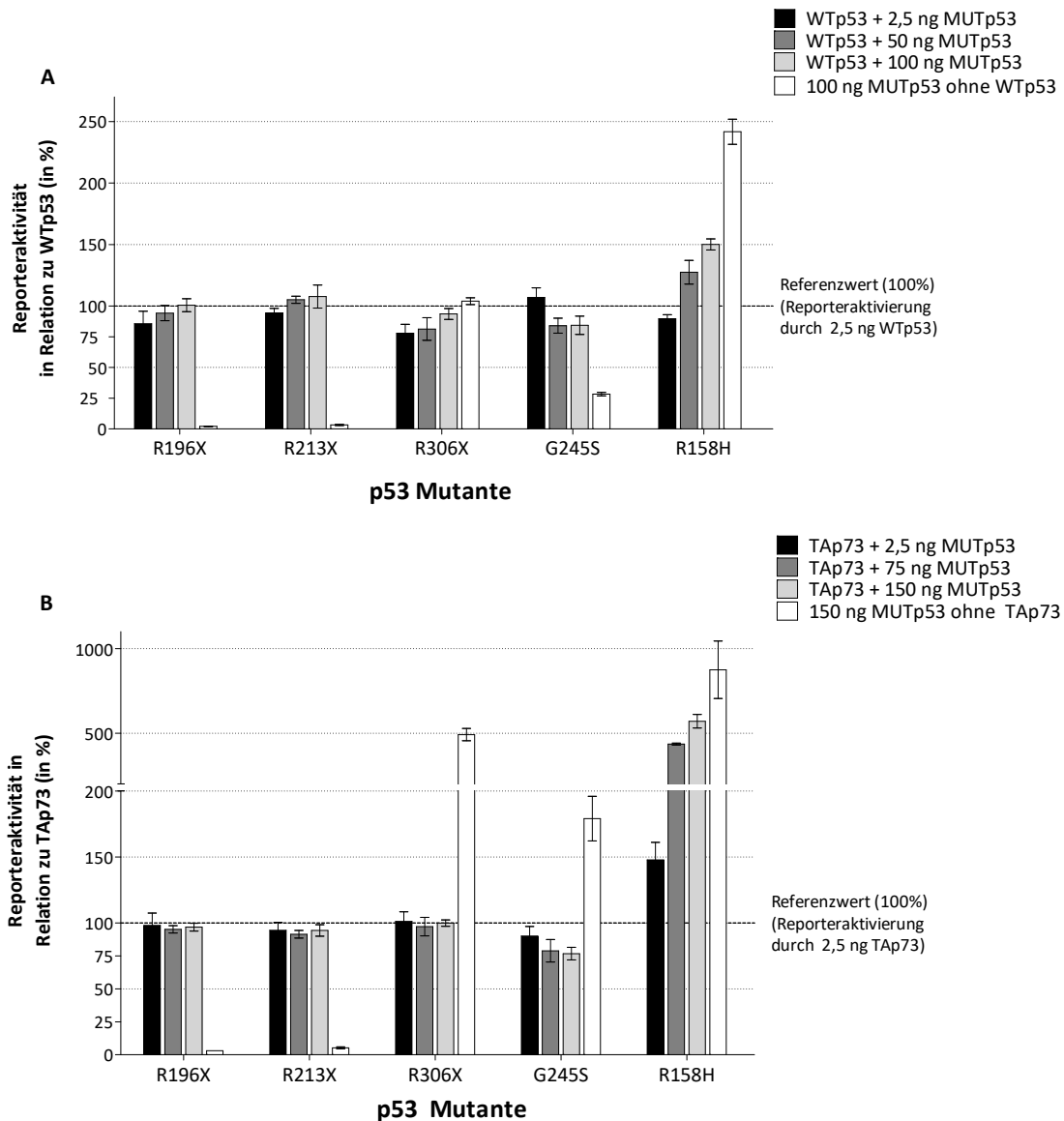


Abb. 3.15. Reporteraktivierung durch WTp53 und TAp73 allein, sowie in Gegenwart von p53-Mutanten.

Dargestellt sind die Luziferasesignale von Proben, die 2,5 ng WTp53 (A) bzw. TAp73 (B) und ansteigende Mengen von p53-Mutanten enthielten. Die Aktivierung durch WTp53 und TAp73 diente jeweils als Referenzwert für die MUTp53-Konzentrationsreihen (entsprechend 100%). Dabei ist zu beachten, dass das absolute Aktivierungsniveau von TAp73 etwa halb so groß war, wie das von WTp53.

Jeder Messwert stellt den Mittelwert dreier äquivalenter Proben mit entsprechender Standardabweichung dar. Das durch die alleinige Transfektion des Reporterplasmids ausgelöste Reportersignal wurde als Basalaktivität von allen Messwerten subtrahiert. Die pro Probe transfizierte Gesamtmenge transfizierter Plasmide wurde durch angepasste Mengen Leervektor konstant gehalten.

3.3.3. Auswirkungen von RETRA auf die MUTp53-TAp73-Interaktion in vitro

Unter gleichbleibenden Versuchsbedingungen sollte nun der Einfluss von RETRA auf die Interaktion zwischen MUTp53 und TAp73 analysiert werden. Ziel war es, die MUTp53-gehemmte Transkriptionsaktivität von TAp73 wiederherzustellen.

Parentale H1299-Zellen wurden dazu erneut mit Kombinationen aus p53-Mutanten (75 ng, 150 ng) und TAp73 (2,5 ng), sowie dem Reporterplasmid transfiziert. Nach 12 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen mit 10 μ M RETRA versetzt. Äquivalente, unbehandelte Vergleichsproben wurden mitgeführt. Weitere 24 Stunden später wurde die Aktivierung des Reporters in den Proben luminometrisch erfasst.

Unbehandelte Proben bestätigten zunächst, dass die meisten p53-Mutanten transkriptionell inaktiv sind und das Transkriptionspotential von TAp73 hemmen können (**Abb. 3.17.**, hellrote und hellblaue Balken).

Im Vergleich dazu wurde in RETRA-behandelten Versuchsansätzen eine deutliche Steigerung der TAp73-vermittelten Reporteraktivierung gemessen (**Abb. 3.17.**, dunkelrote und dunkelblaue Balken). Dieser Effekt war auf Proben beschränkt, die mit Kombinationen aus p53-Mutante und TAp73 versetzt waren. MUTp53- und TAp73-freie Versuchsansätze erfuhren durch RETRA also keine Änderung des Luziferasesignals. Mit Zunahme der eingesetzten MUTp53-Konzentration nahm das Ausmaß der beobachteten Signalsteigerung ab. Zusätzlich fiel auf, dass in MUTp53/TAp73-kombinierten Versuchsansätzen das Reportersignal unter RETRA das Referenzniveau von 2,5 ng TAp73 allein überstieg, obwohl die jeweils eingesetzte p53-Mutante keine endogene transkriptionelle Aktivität aufwies.

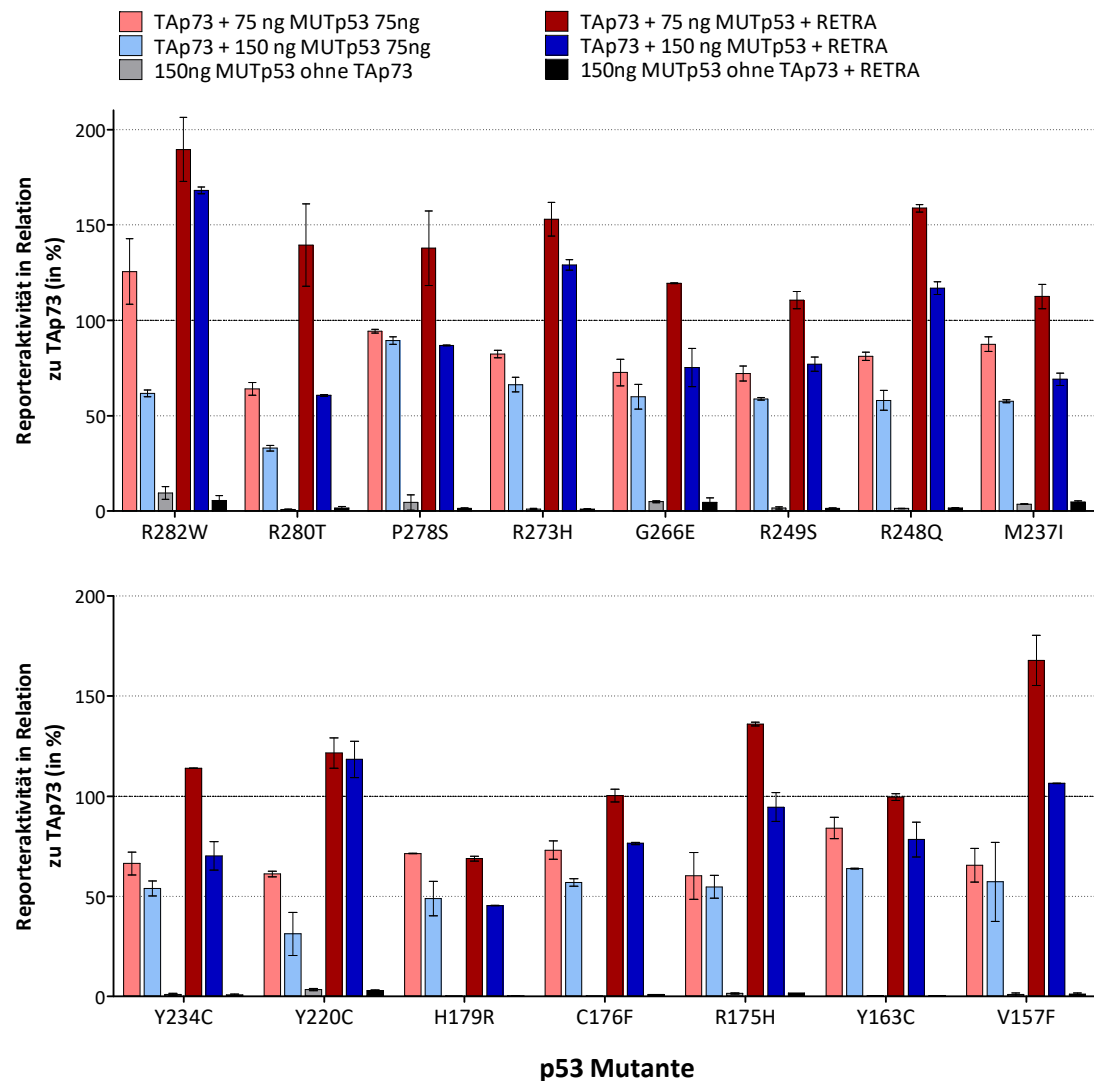


Abb. 3.16. Reporteraktivierung durch TAp73 in Gegenwart von p53-Mutanten unter Behandlung mit 10 μ M RETRA für 24 h.

Alle Luziferasesignale wurden auf die Grundaktivierung durch 2,5 ng TAp73 normalisiert (100%). Diese wurde für beide Versuchsarme separat bestimmt (TAp73 allein jeweils unbehandelt und in Gegenwart von RETRA). Helle Balken repräsentieren den unbehandelten Versuchsarm (hellblau, rosa, grau), dunkle Balken die mit RETRA versetzten Proben (rot, blau, schwarz). Jeder Messwert stellt den Mittelwert dreier äquivalenter Proben dar. Das durch die alleinige Transfektion des Reporterplasmids gemessene Reportersignal wurde als Basalaktivität von allen Messwerten subtrahiert. Die pro Probe transfizierte Gesamtmenge transfizierter Plasmide wurde durch angepasste Mengen Leervektor konstant gehalten.

In Gegenwart der zuvor gesondert betrachteten Mutanten R196X, R213X, R306X, G245S und R158H kam es auch während des Einsatzes von RETRA zu Auffälligkeiten (**Abb. 3.17.**).

In den Versuchsansätzen mit den Mutanten R196X und R213X blieb die Anwendung von RETRA im Vergleich zu unbehandelten Proben ohne Effekt. Beide Versuchsarme wiesen in allen Proben identische Messwerte auf.

Die p53-Mutanten mit verbliebener, endogener Transkriptionsaktivität, R306X, R158H und G245S, demonstrierten im gemeinsamen Ansatz mit TAp73 und in Abwesenheit von RETRA ein gleichartiges Verhalten, wie in Vorversuchen: während das Reportersignal mit steigender MUTp53-Konzentration im Falle von R306X und R158H zunahm, wurde es durch G245S vermindert (Abb. 3.17., hellrote und hellblaue Balken).

Unter RETRA-Behandlung kam es in diesen Proben zu einem deutlichen Anstieg des Reportersignals, das das Referenzniveau von 2,5 ng TAp73 jeweils überstieg. Im Gegensatz zu Proben, die transkriptionell inaktive p53-Mutanten enthielten, war unter Zunahme der eingesetzten Konzentration von R306X, G245S oder R158H eine Steigerung der Reporteraktivierung zu verzeichnen (Abb. 3.17., dunkelrote und dunkelblaue Balken). In TAp73-freien Versuchsansätzen, die ausschließlich die Mutanten R306X, R158H oder G245S enthielten, blieb der Einsatz von RETRA hingegen ohne signalsteigernde Wirkung, sodass in beiden Versuchsarmen gleiche Luziferasesignale gemessen wurden (Abb. 3.17., graue und schwarze Balken).

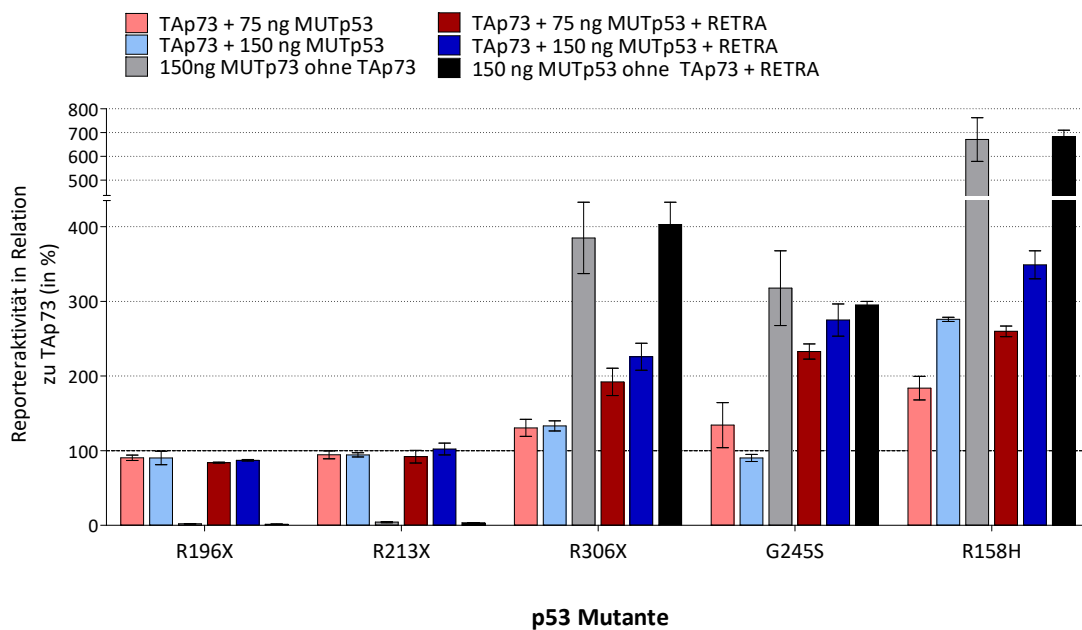


Abb. 3.17. Reporteraktivierung durch TAp73 in Gegenwart von p53-Mutanten und unter Behandlung mit RETRA für 24h.

Alle Luziferasesignale wurden auf die Grundaktivierung durch TAp73 normalisiert (entsprechend 100%). Diese wurde für beide Versuchsarme separat bestimmt (TAp73 unbehandelt und in Gegenwart von RETRA).

Helle Balken repräsentieren den unbehandelten Versuchsarm (hellblau, rosa, grau), dunkle Balken die mit RETRA behandelten Proben (rot, blau, schwarz).

Jeder Messwert stellt den Mittelwert dreier äquivalenter Proben dar. Das durch die alleinige Transfektion des Reporterplasmids ausgelöste Reportersignal wurde als Basalaktivität von allen Messwerten subtrahiert. Die pro Probe transfizierte Gesamtmenge transfizierter Plasmide wurde durch angepasste Mengen Leervektor konstant gehalten.

3.4. Analyse der RETRA-vermittelten Zytotoxizität

Die Ergebnisse der Reporteranalysen lassen vermuten, dass RETRA, wie bisher angenommen, den transkriptionshemmenden Effekt von p53-Mutanten auf TAp73 aufheben und das TAp73-Transkriptionspotential wiederherstellen kann. Die Korrelationsanalyse im Anschluss an die RETRA-Behandlung zahlreicher maligner Tumorzelllinien ergab jedoch einerseits Hinweise auf einen von den p73-Isoformen unabhängigen Wirkmechanismus. Andererseits zeigte RETRA die größten zytotoxischen Effekte, entgegen der bisher publizierten Daten, nicht in MUTp53-, sondern WTP53-exprimierenden Zelllinien. Es wurden weitere Untersuchungen angeschlossen, um diese Diskrepanz zu analysieren.

3.4.1. Auswirkung eines veränderten p53-Mutationsstatus auf die Wirksamkeit von RETRA

Es sollte zunächst untersucht werden, ob die Expression von p53-Mutanten ausreicht, um Tumorzelllinien auf RETRA zu sensibilisieren. Dazu wurden p53-Proteine mit Mutationen in verschiedenen Regionen des p53-Proteins in ein p53-negatives H1299-Zellsystem eingebracht:

- **V143A**: Strukturmutation, β -Faltblatt, obligate p53-Denaturierung bei 37°C
- **R175H**: Strukturmutation, Zinkbindung, obligate p53-Denaturierung bei 37°C
- **R273H**: Kontaktmutation, p53-Proteinstabilität identisch zu WTP53

Nach der Klonierung der genannten mutierten p53-Proteine in pMSCV-Vektoren, die Hygromycinresistenz vermitteln, konnten sie gemeinsam mit einem Leervektor (*mock*) in Phoenixzellen transfiziert werden. Auf diese Weise wurden rekombinante Retroviren erzeugt und mit diesen die H1299-Zielzellen infiziert. Die Kultivierung der korrekt infizierten Zellen erfolgte unter Selektionsdruck durch Hygromycin. Die H1299-Zellreihen (R175H, R273H, V143A, *mock*) wurden jeweils in Mikrotiterplatten ausgesät und mit ansteigenden Konzentrationen von RETRA behandelt. 72 Stunden später wurde das Zellüberleben mithilfe einer ATP-basierten Zellvitalitätsanalyse gemessen.

Das Überleben der verwendeten Zelllinien wurde durch RETRA konzentrationsabhängig reduziert. Die abgeleiteten Dosis-Wirkungskurven der modifizierten H129-Zelllinien unterschieden sich weder untereinander, noch im Vergleich zu parental H1299-Kontrollzellen. Die mittlere Konzentration zur Reduktion des Zellüberlebens um 50% (mittlere letale Konzentration, *LD50*) unterschied sich zwischen den Zelllinien nicht wesentlich. Die Expression von strukturell verschiedenen, mutierten p53-Proteinen in einem p53-negativen Zellsystem vermittelte also weder Sensibilisierung, noch Resistenz auf RETRA (**Abb. 3.18. und Legende**).

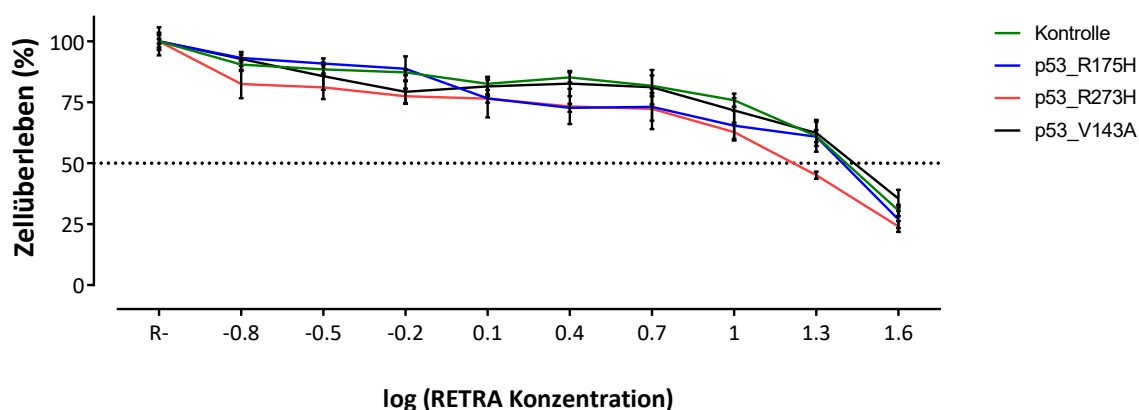


Abb. 3.18. Dosis-Wirkungs-Kurve von parentalen und mit p53-Mutanten stabil transfizierten H1299-Zellen unter Behandlung mit RETRA.

Die Kurvenpunkte jeder Kurve sind auf das Überleben einer unbehandelten Referenzpopulation bezogen (entsprechend 100% bei 0 μM RETRA). Sie stellen jeweils den Mittelwert dreier äquivalent behandelter Proben dar. Die X-Achse stellt Konzentrationsstufen von RETRA anhand des dekadischen Logarithmus dar (entsprechend der eingesetzten RETRA-Konzentrationen von 0,156 bis 40 mmol/l).

R- = 0 μM RETRA.

LD50-Werte der interpolierten Dosis-Wirkungskurven mit entsprechendem Konfidenzintervall (95%)

Zelllinie	log LD50	log LD50, KI	LD50 RETRA (mmol/l)	LD50 RETRA, KI (mmol/l)
Kontrolle	1,43	1,20 – 1,87	26,9	15,9 – 74,8
P53 R175H	1,3	1,07 – 1,65	19,9	11,7 – 44,3
P53 R273H	1,14	0,87 – 1,52	13,7	7,4 – 33,0
P53 V143A	1,52	1,23 – 2,11	33,0	16,9 – 129,3

log LD50 = mittlere letale Dosis anhand der Konzentrationsstufe,

log LD50, KI = Konfidenzintervall der mittleren letalen Dosis anhand der Konzentrationsstufe (95%),

LD50 RETRA = mittlere letale Dosis von RETRA in mmol/l,

LD50 RETRA, KI = Konfidenzintervall der mittleren letalen Dosis von RETRA in mmol/l.

3.4.2. RETRA in Kombination mit Etoposid in der Behandlung von Tumorzelllinien mit unterschiedlichem p53-Mutationstatus

Es wurde vermutet, dass die alleinige RETRA-Behandlung von Tumorzelllinien nicht ausreicht, um Tap73-abhängige Zytotoxizität auszulösen. Durch zusätzlichen genotoxischen Stress sollten die tumorsuppressiven Funktionen von Tap73 im Rahmen der RETRA-Behandlung verstärkt werden. Umgekehrt sollten durch die Kombinationsbehandlung chemosensibilisierende Effekte von RETRA überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Mutationsstatus einer Behandlung mit 10 μM RETRA in Kombination mit ansteigenden Konzentrationen des Topoisomerase-II-Hemmers Etoposid unterzogen. Äquivalente Vergleichsproben wurden mit Etoposid allein behandelt. Verwendet wurden die Zelllinien HCT116 (WTp53), A431 (MUTp53, Kontaktmutation R273H), H1299 (parental, p53NEG) und die bereits in vorherigen Versuchen mit p53-Mutanten stabil transfizierten H1299-Zelllinien H1299_R273H und H1299_R75H (Kontaktmutation R273H und Strukturmutation R175H). Das Zellüberleben wurde 24, 36 und 42 Stunden später mittels ATP-basierter Zellvitalitätsanalyse ermittelt.

3.4.2.1. RETRA in Kombination mit Etoposid in der Behandlung von p53-negativen und Wtp53-exprimierenden Tumorzelllinien

Unter steigenden Etoposiddosen kam es zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme des Zellüberlebens von parentalen H1299- und HCT-116-Zellen. Mit zunehmender Inkubationszeit nahmen diese zytotoxischen Effekte zu. Anhand der abgeleiteten Dosis-Wirkungskurven wurde für H1299- und HCT116-Zellen eine mittlere letale Dosis für Etoposid von 50,3 μM (28,5 – 116,6 μM) bzw. 7,1 μM (5,4-9,5 μM) bestimmt (**Abb. 3.19., A, C, Kurve blau**, Messzeitpunkt nach 42 h, Daten zu 24 und 36 h nicht gezeigt).

Der Einsatz von 10 μM RETRA zusätzlich zu Etoposid vermittelte eine weitere Abnahme des absoluten Überlebens beider Zelllinien. Bei 0 μM Etoposid reduzierte RETRA das Zellüberleben der H1299-Zellen um 11% und das der HCT116-Zelllinie um 47%. Die mit RETRA kombinierte Etoposidbehandlung führte zur einer deutlichen Reduktion der LD50-Werte für Etoposid auf 7,6 μM (5,4 – 11,1 μM) bzw. 0,3 μM (0,1 – 0,6 μM) (**Abb. 3.19., A, C, Kurve rot**, Messzeitpunkt nach 42 h, Daten zu 24 und 36 h nicht gezeigt).

Der Fokus der Analyse lag auf der Klärung der Frage, inwieweit RETRA chemosensibilisierende Eigenschaften besitzt bzw. welche Substanzkombinationseffekte RETRA und Etoposid aufweisen. Dazu wurden die Dosis-Wirkungskurven der Zelllinien unter Etoposidmonotherapie mit jenen unter kombinierter Etoposid- und RETRA-Behandlung verglichen. Das Zellüberleben der kombiniert behandelten Zelllinien bezog sich dabei auf die RETRA-behandelte Referenzpopulation, sodass RETRA-vermittelte Zytotoxizität bei 0 μM Etoposid (11 bzw. 47%) von der Dosis-Wirkungskurve der kombiniert behandelten Zellen eliminiert subtrahiert wird. Auf diese Weise konnten die isolierten Effekte von Etoposid in RETRA-behandelten und -unbehandelten Zelllinien - unter Vernachlässigung der additiven Zytotoxizität von konstant 10 μM RETRA - verglichen werden (Details Substanzkombinationseffekte s. Abschnitt 2.2.25).

Im Falle der parentalen H1299-Zelllinie fand sich mit steigender Etoposidkonzentration eine etwas stärkere Abnahme des Überlebens in der RETRA-behandelten Zellpopulation, als unter Etoposid allein (**Abb. 3.19., B**). Dieser Effekt nahm mit zunehmender Inkubationszeit leicht zu (**Abb. 3.20., A**). Für HCT116-Zellen ergab sich bei dieser Betrachtung kein Unterschied zwischen den Behandlungsarmen feststellbar (**Abb. 3.19., D; Abb., 3.20. B**). Demnach boten Etoposid und RETRA in parentalen H1299-Zellen additive und synergistische Effekte, wohingegen sie in HCT116-Zellen ausschließlich additiv wirkten.

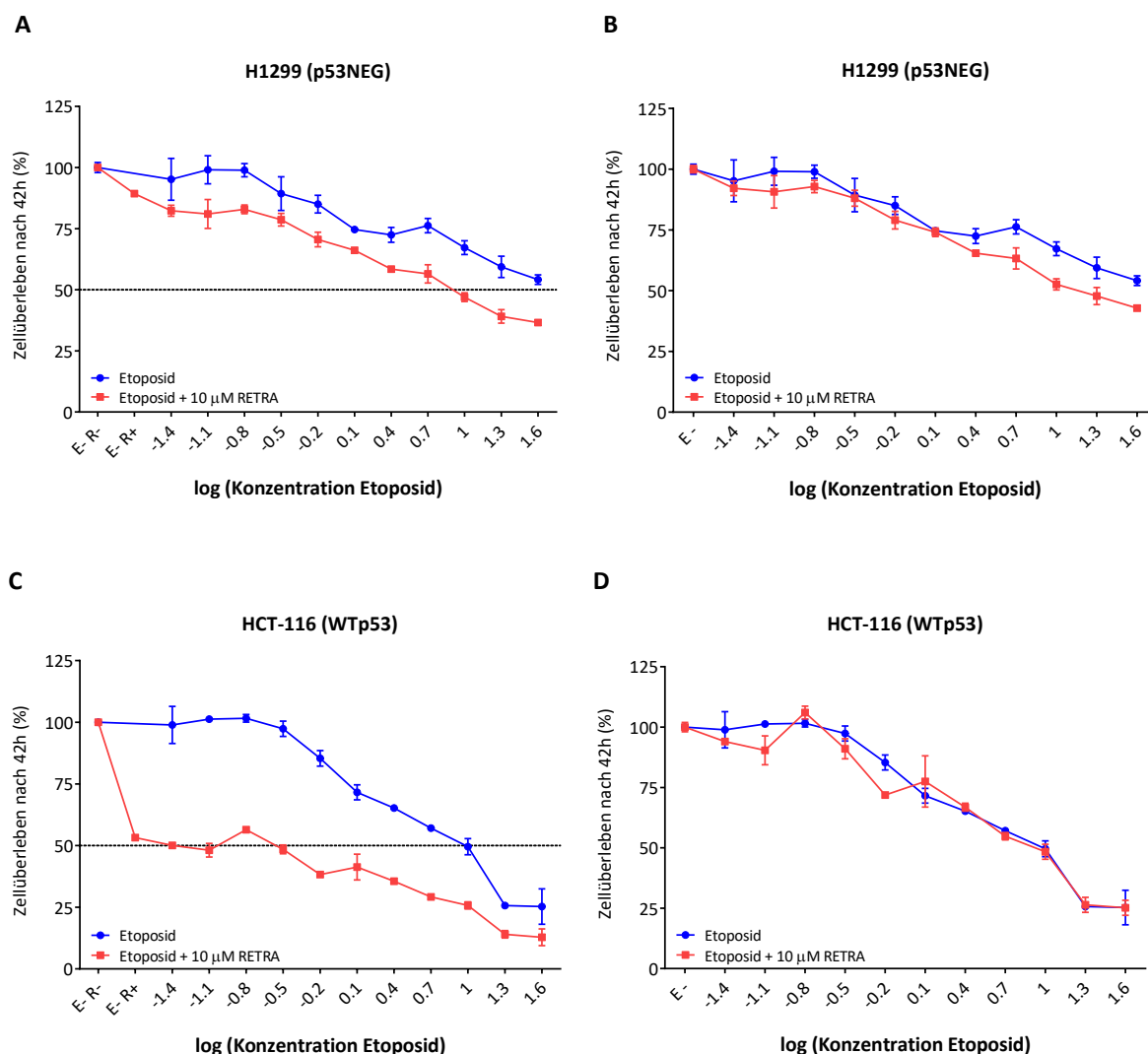


Abb. 3.19. Darstellung des Zellüberlebens der Zelllinien H1299 und HCT-116 42 h nach Behandlung mit Etoposid (blau) oder Etoposid und RETRA (rot) im ATP-basierten Zellvitalitätsassay.

A, C) Darstellung des Zellüberlebens in Form der Dosis-Wirkungskurven unter steigenden Etoposidkonzentrationen ohne und mit Zusatz von 10 μM RETRA jeweils bezogen auf das Zellüberleben einer etoposid- und RETRA-freien Referenzprobe (entsprechend 100%).

B, D) Darstellung des Zellüberlebens in Form der Dosis-Wirkungskurven unter steigenden Etoposidkonzentrationen ohne und mit Zusatz von 10 μM RETRA:

blaue Kurve: Bezug auf das Zellüberleben einer etoposid- und RETRA-freien Referenzprobe,

rote Kurve: Bezug auf das Zellüberleben RETRA-behandelten Referenzprobe.

Die X-Achse stellt Konzentrationsstufen von RETRA anhand des dekadischen Logarithmus dar (entsprechend der eingesetzten RETRA-Konzentrationen von 0,039 bis 40 mmol/l).

LD50-Werte der interpolierten Dosis-Wirkungskurven mit entsprechendem Konfidenzintervall (95%)

Zelllinie	log LD50	log LD50, KI	LD50 RETRA (mmol/l)	LD50 RETRA, KI (mmol/l)
H1299, E	1,70	1,46 – 2,07	50,3	28,5 – 116,6
H1299, E + R	0,89	0,74 – 1,04	7,6	5,4 – 11,1
HCT116, E	0,85	0,73 – 0,9	7,1	5,4 – 9,5
HCT116, E + R	-0,58	-1,05 – -0,19	0,3	0,1 – 0,6

E = Etoposid, R = RETRA, - = Abwesenheit, + Anwesenheit,

log LD50 = mittlere letale Dosis anhand der Konzentrationsstufe,

log LD50, KI = Konfidenzintervall der mittleren letalen Dosis anhand der Konzentrationsstufe (95%),

LD50 RETRA = mittlere letale Dosis von RETRA in mmol/l,

LD50 RETRA, KI = Konfidenzintervall der mittleren letalen Dosis von RETRA in mmol/l.

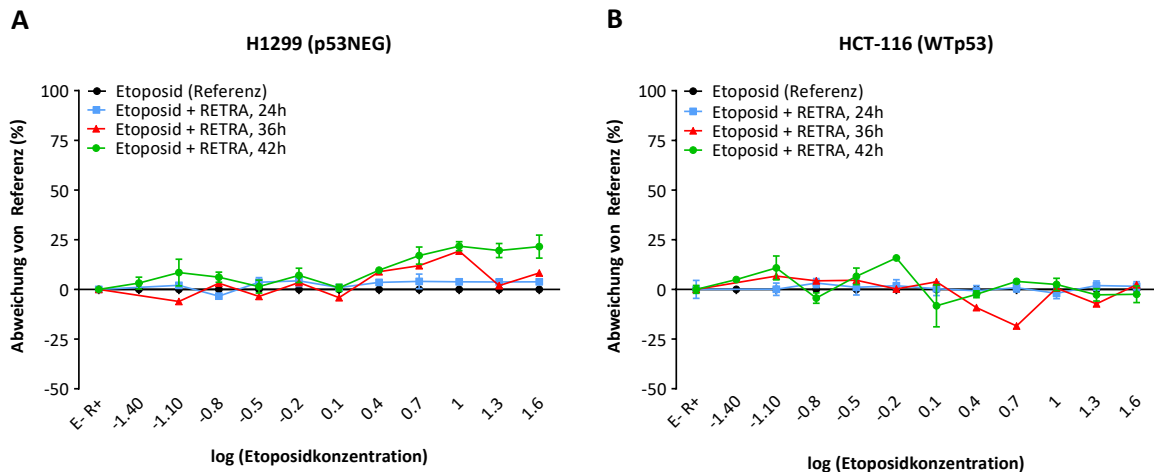


Abb. 3.20. Zellüberleben der Zelllinien H1299 und HCT-116 24h (grün), 36h (rot) und 42h (blau) nach Behandlung mit Etoposid und RETRA im Vergleich zur etoposidbehandelten Referenzpopulation (schwarz).

Das Zellüberleben der etoposid- und RETRA-behandelten Zelllinien H1299 (A) und HCT-116 (B) wurde zu den Messzeitpunkten 24, 36 und 42 h (blau, rot, grün) in Form ihrer prozentualen Abweichung von der etoposidbehandelten Referenzpopulation dargestellt (schwarze Referenzgerade). Das Zellüberleben der kombiniert behandelten Zelllinien wurde auf eine RETRA-behandelte, etoposidfreie Referenzprobe bezogen (entsprechend 100%). Jeder dargestellte Messwert stellt den Mittelwert und die entsprechende Standardabweichung dreier äquivalenter Proben dar.

Die X-Achse stellt Konzentrationsstufen von RETRA anhand des dekadischen Logarithmus dar (entsprechend der eingesetzten RETRA-Konzentrationen von 0,039 bis 40 mmol/l).

E = Etoposid, R = RETRA, - = Abwesenheit, + Anwesenheit.

3.4.2.2. RETRA in Kombination mit Etoposid in der Behandlung von MUTp53-exprimierenden Zelllinien

Neben dem Einfluss auf p53-negative und WTp53-exprimierende Zelllinien wurden die Auswirkungen der kombinierten Etoposid/RETRA-Behandlung in den genannten MUTp53-exprimierenden Zelllinien A431, H1299/R273H und H1299/R175H untersucht.

Das Zellüberleben der Zelllinien wurde durch die alleinige Etoposidbehandlung konzentrationsabhängig vermindert. Die beobachteten Effekte nahmen mit der Dauer der Inkubationszeit zu. Anhand der Dosis-Wirkungskurven wurde für A431-Zellen ein LD50-Wert für Etoposid von 10,6 μM (8,8 – 13,0 μM) ermittelt. Für die mit den p53-Mutanten R175H und R273H transfizierten H1299-Zelllinien ergaben sich LD50-Werte von 17,8 μM (13,0 – 26,0 μM) bzw. 22,1 μM (14,4 – 39,6 μM) (Abb. 3.21., A, C, E, Kurve blau, Messzeitpunkt nach 42 h, Daten zu 24 und 36 h nicht gezeigt).

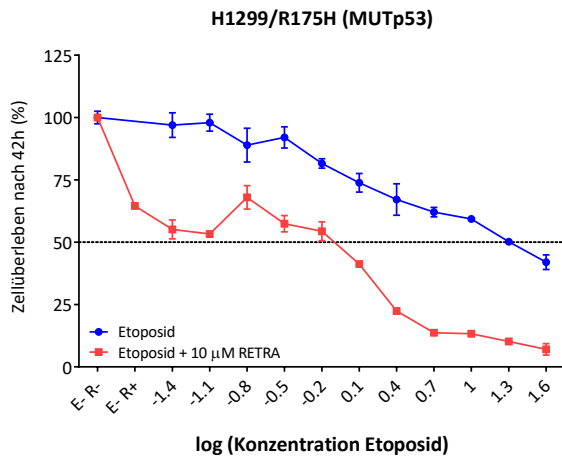
Verglichen zur alleinigen Anwendung von Etoposid führte die mit 10 μM RETRA kombinierte Behandlung zu einer weiteren Reduktion des Zellüberlebens in den genannten Zelllinien A431, H1299/R273H und H1299/R175H. In Abwesenheit von Etoposid verminderte RETRA die Zellvitalität

um je 39, 23 und 35%. In Kombinationsbehandlung wurden die LD50-Werte für Etoposid in genannten Zelllinien deutlich auf 0,4 μM (0,2 – 0,7 μM) für H1299(R175H), 3,1 μM (1,4 – 7,3 μM) für H1299/R273H und 0,5 μM (0,2 – 1,1 μM) für A431-Zellen reduziert (**Abb. 3.21., A, C, E, Kurve rot**, Messzeitpunkt nach 42 h, Daten zu 24 und 36 h nicht gezeigt).

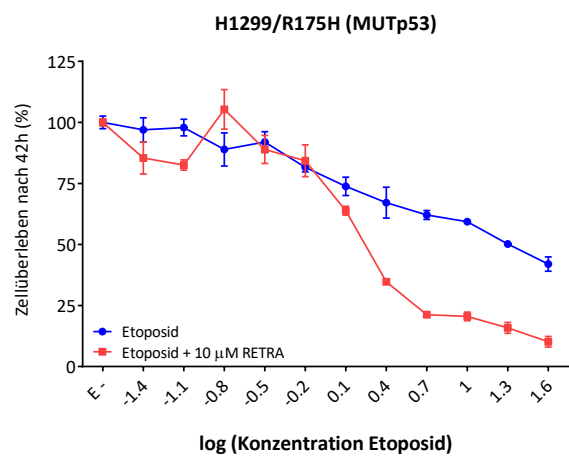
Zur Analyse der chemosensibilisierenden Eigenschaften von RETRA auf Etoposid wurden wiederum die Dosis-Wirkungskurven der etoposid- und kombiniert etoposid/RETRA-behandelten Zelllinien verglichen (Referenzprobe der kombiniert behandelten Zelllinie mit 10 μM RETRA versetzt, um additive Zytotoxizität durch RETRA von der Dosis-Wirkungskurve zu eliminieren).

In allen Zelllinien fiel, insbesondere ab Etoposidkonzentrationen von 2,5 μM (log Etoposidkonzentration 0,4), das Überleben in RETRA-behandelten Zelllinien konzentrationsabhängig deutlich stärker ab, als im etoposidmonotherapierten Vergleichsarm (**Abb. 3.21., B, D, F**). Dieser Effekt nahm erneut mit zunehmender Inkubationszeit zu (**Abb. 3.22., A-C**). Den gemachten Beobachtungen zufolge wirken RETRA und Etoposid in diesen Zelllinien additiv und synergistisch zytotoxisch. Zudem ließ sich für die mit den mutierten p53-Proteinen transfizierten H1299-Zellen im Bereich von niedrigen Etoposidkonzentrationen um 0,156 μM (log Etoposidkonzentration -0,8) ein geringer Antagonismus von RETRA und Etoposid nachweisen.

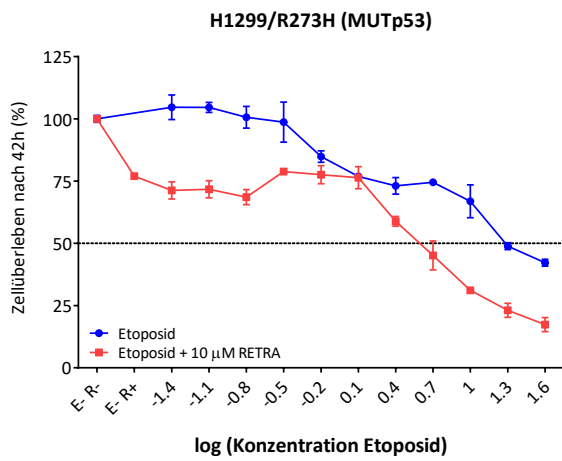
A



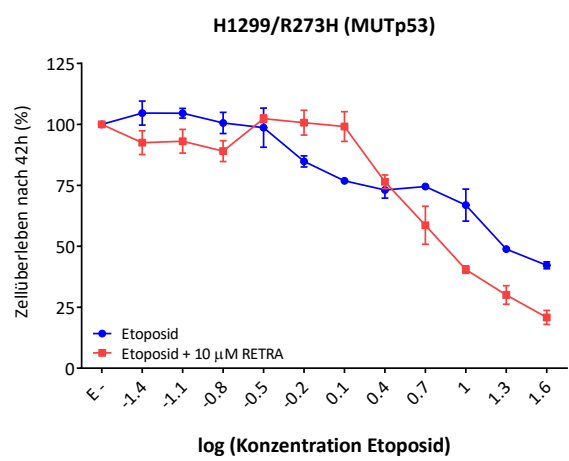
B



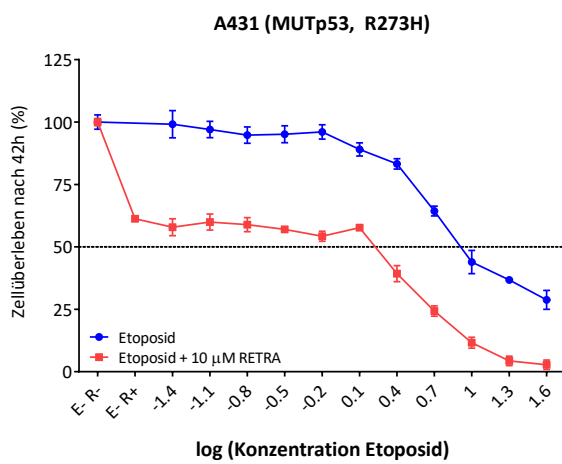
C



D



E



F

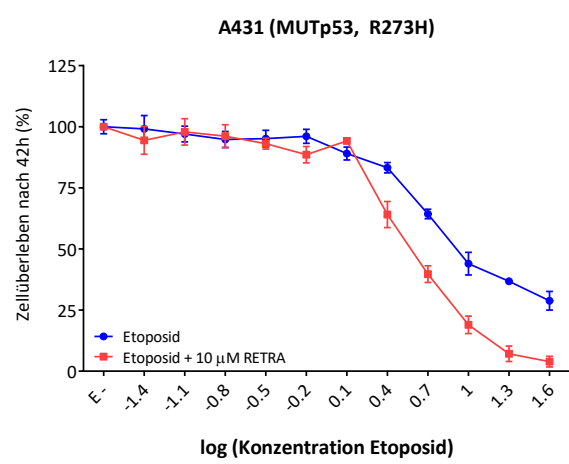


Abb. 3.21. Darstellung des Zellüberlebens der mit mutierten p53-Proteinen R273H und R175H transfizierten H1299-Zellen und der Zelllinie A431 (R273H) 42 h nach Behandlung mit Etoposid (blau) oder Etoposid und RETRA (rot) im ATP-basierten Zellvitalitätsassay.

A, C, E) Darstellung des Zellüberlebens in Form der Dosis-Wirkungskurven unter steigenden Etoposidkonzentrationen ohne und mit Zusatz von 10 μ M RETRA jeweils bezogen auf das Zellüberleben einer etoposid- und RETRA-freien Referenzprobe (entsprechend 100%).

B, D, F) Darstellung des Zellüberlebens in Form der Dosis-Wirkungskurven unter steigenden Etoposidkonzentrationen ohne und mit Zusatz von 10 μ M RETRA:

blaue Kurve: Bezug auf das Zellüberleben einer etoposid- und RETRA-freien Referenzprobe,

rote Kurve: Bezug auf das Zellüberleben RETRA-behandelten Referenzprobe.

Die X-Achse stellt Konzentrationsstufen von RETRA anhand des dekadischen Logarithmus dar (entsprechend der eingesetzten RETRA-Konzentrationen von 0,039 bis 40 mmol/l).

LD50-Werte der interpolierten Dosis-Wirkungskurven mit entsprechendem Konfidenzintervall (95%)

Zelllinie	log LD50	log LD50, KI	LD50 RETRA (mmol/l)	LD50 RETRA, KI (mmol/l)
H1299 (R175H), E	1,25	1,11 – 1,42	17,8	13,0 – 26,0
H1299 (R175H), E + R	0,46	-0,82 – -0,14	0,4	0,2 – 0,7
H1299 (R273H), E	1,35	1,16 – 1,60	22,1	14,4 – 39,6
H1299 (R273H), E + R	0,49	0,16 – 0,87	3,1	1,4 – 7,3
A431, E	1,03	0,94 – 1,11	10,6	8,8 – 13,0
A431, E+ R	0,32	0,71 – 0,04	0,5	0,2 – 1,1

E = Etoposid, R = RETRA, - = Abwesenheit, + Anwesenheit,

log LD50 = mittlere letale Dosis anhand der Konzentrationsstufe,

log LD50, KI = Konfidenzintervall der mittleren letalen Dosis anhand der Konzentrationsstufe (95%),

LD50 RETRA = mittlere letale Dosis von RETRA in mmol/l,

LD50 RETRA, KI = Konfidenzintervall der mittleren letalen Dosis von RETRA in mmol/l.

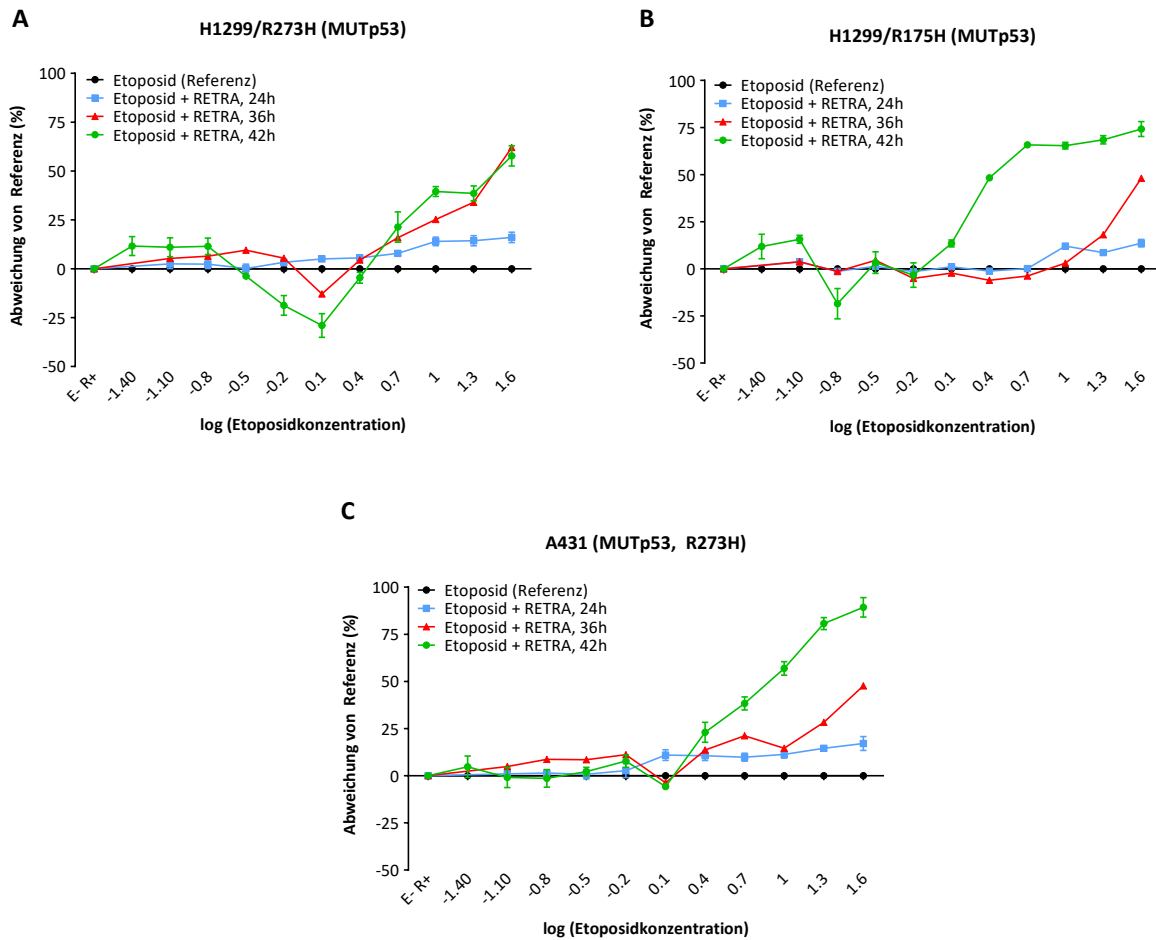


Abb. 3.22. Zellüberleben der Zelllinien der mit mutierten p53-Proteinen R273H und R175H transfizierten H1299-Zellen und der Zelllinie A431 (R273H) 24h (grün), 36h (rot) und 42h (blau) nach Behandlung mit Etoposid und RETRA im Vergleich zur etoposidbehandelten Referenzpopulation (schwarz).

Das Zellüberleben der etoposid- und RETRA-behandelten Zelllinien H1299_R273H (A), H1299_R175H (B) und A431 (C) wurde zu den Messzeitpunkten 24, 36 und 42 h (blau, rot, grün) in Form ihrer prozentualen Abweichung von der etoposidbehandelten Referenzpopulation dargestellt (schwarze Referenzgerade). Das Zellüberleben der kombiniert behandelten Zelllinien wurde auf eine RETRA-behandelte, etoposidfreie Referenzprobe bezogen (entsprechend 100%). Jeder dargestellte Messwert stellt den Mittelwert und die entsprechende Standardabweichung dreier äquivalenter Proben dar.

Die X-Achse stellt Konzentrationsstufen von RETRA anhand des dekadischen Logarithmus dar (entsprechend der eingesetzten RETRA-Konzentrationen von 0,039 bis 40 mmol/l).

E = Etoposid, R = RETRA, - = Abwesenheit, + Anwesenheit.

4. Diskussion

Mutationen des TP53-Gens betreffen 50% aller humanen Malignome. Sie bestimmen entscheidend den malignen Phänotyp von Neoplasien und die klinische Prognose betroffener Patienten (Leroy et al. 2014). *TP53*-Mutationen führen zur Expression von p53-Proteinen, die durch einen Transkriptionsdefekt ihre tumorsuppressive Funktion verlieren („*loss of function*“) (Vogelstein et al. 2000). Mutierte p53-Proteine (MUTp53) besitzen zusätzlich onkogene Eigenschaften („*gain of function*“) (Oren & Rotter 2010). So hemmen sie durch direkte Proteininteraktion unter anderem die Funktion des p53-Wildtypproteins (WTp53) und der tumorsuppressiven Mitglieder der p53-Familie TAp63 und TAp73 (Kern et al. 1992; Como et al. 1999; Gaiddon et al. 2001). Als strukturelles und funktionelles Analogon von WTp53 kann TAp73 die tumorsuppressiven Funktionen von p53 in p53-mutierten und -negativen Tumorzellen ersetzen (Irwin et al. 2003; Logotheti et al. 2013). Da das *TP73*-Gen im Gegensatz zu *TP53* in malignen Tumoren selten mutiert ist, stellt es in diesem Kontext einen interessanten Therapieansatz dar.

Die Interaktion zwischen TAp73 und MUTp53 konnte durch verschiedene Methoden verhindert werden. Hierdurch wurde *in vitro* jeweils eine TAp73-abhängige Sensibilisierung auf verschiedene konventionelle Chemotherapeutika *in vitro* herbeigeführt (Di Agostino et al. 2008; Bruno et al. 2010; Rökaeus et al. 2010; Saha et al. 2013; Hong et al. 2014).

Im Rahmen eines Screenings einer Bibliothek von chemischen Verbindungen konnte 2008 die Substanz RETRA identifiziert werden („*reactivation of transcriptional reporter activity*“, Kravchenko et al. 2008). Sie vermittelte in *TP53*-mutierten, aber nicht in WTp53-exprimierenden oder p53-negativen Zellsystemen, die Reaktivierung des MUTp53-gehemmten TAp73-Transkriptionspotentials. Unter RETRA-Behandlung wurde eine Abnahme der MUTp53-gebundenen TAp73-Proteinfraction gemessen. Gleichzeitig nahmen die Fraktion von freiem TAp73-Protein und die Expression von TAp73-Zielgenen zu (ohne Anstieg der TAp73-mRNA). In verschiedenen Knockout-Experimenten und Zellvitalitätsassays waren die zytotoxischen Effekte von RETRA stets TAp73-abhängig. Anhand dieser Ergebnisse wurde postuliert, dass RETRA die Komplexbildung zwischen MUTp53 und TAp73 verhindert und so tumorsuppressives Potential von TAp73 wiederherstellt.

4.1. RETRA vermittelt *in vitro* Zytotoxizität in Tumorzelllinien unabhängig des p53-Mutationsstatus

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass RETRA dosisabhängige, zytotoxische Effekte in malignen Tumorzelllinien vermittelt (s. Abschnitt 3.1.). Diese waren in Zelllinien unterschiedlicher Entität und unabhängig des p53-Mutationsstatus nachweisbar. Am deutlichsten fielen sie in WTp53-exprimierenden Zellen aus (s. Abschnitt 3.2.1.). Die Transfektion von parentalen, p53-negativen H1299-Zellen mit verschiedenen punktmutierten p53-Proteinen vermittelte weder Resistenz noch Sensibilisierung auf RETRA (s. Abschnitt 3.4.1.).

Diese Ergebnisse widersprechen jenen der Erstpublikation zu RETRA grundsätzlich. Hier wurde die Suche nach therapeutisch nutzbaren Molekülen explizit auf solche beschränkt, die ausschließlich in MUTp53-exprimierenden Zellsystem wirksam waren. Substanzen, die in WTP53-positiven oder -negativen Zelllinien zytotoxisch wirksam waren, wurden von Folgeuntersuchungen ausgeschlossen (Kravchenko et al. 2008).

Es ist zu beachten, dass die hier verwendeten Informationen zum p53-Mutationsstatus der verwendeten Zelllinien Mutationsdatenbanken entstammen. RETRA-vermittelte Zytotoxizität konnte jedoch auch durch eine Arbeitsgruppe demonstriert werden, die den Mutationsstatus von RETRA-behandelten Osteosarkomzelllinien molekulargenetisch gesichert hatte (Sonnemann et al. 2015). Eine weitere Arbeitsgruppe fand zytotoxische RETRA-Effekte nur in TP53-mutierten, nicht aber in WTP53-exprimierenden oder p53-deletierten B-Zelllymphomlinien. Der p53-Mutationsstatus wurde hier per Literaturrecherche erhoben (Santag et al. 2013).

Gemeinsam deuten diese Daten darauf hin, dass der p53-Mutationsstatus für die beobachteten tumorsuppressiven Effekte von RETRA von untergeordneter Bedeutung ist.

4.2. Strukturbiologische Eigenschaften von mutierten p53-Proteinen haben keinen Einfluss auf die Zytotoxizität von RETRA

Die Untersuchung der RETRA-Effekte in Tumorzellen umfasste neben dem p53-Mutationsstatus auch die Art der p53-Mutation (s. Abschnitt 3.2.3). Ca. 80% der TP53-Mutationen sind Missense-Mutationen, welche zur Expression von punktmutierten p53-Proteinen voller Länge führen (Leroy et al. 2014). Die Mutationen häufen sich in Proteinregionen mit unterschiedlicher Bedeutung für die Funktion und Struktur des p53-Proteins (Cho et al. 1994; Ang et al. 2006): p53-„Kontaktmutationen“ betreffen DNA-kontaktierende Aminosäuren (LSH-Motiv, L3-Loop). Die DNA-Bindungsfähigkeit dieser p53-Proteine ist trotz erhaltener Proteinstruktur stark eingeschränkt. P53-„Struktur“- bzw. „Konformationsmutanten“ neigen durch Mutationen in den Domänen der L2-/L3-Loops, der Zinkbindungsregion, dem β -Faltblatt oder dem hydrophoben Proteinkern zur Denaturierung unter physiologischen Temperaturen. Sie verlieren dadurch temperaturabhängig DNA-Bindungskapazität (Kato et al. 2003; Joerger & Fersht 2007). Die prognostische Bedeutung von Mutationen innerhalb der genannten Proteindomänen konnte in mehreren klinischen Untersuchungen demonstriert werden (Olivier et al. 2006; Peltonen et al. 2011; Xu-Monette et al. 2012; Warren et al. 2013).

Kontakt- und strukturmutierte p53-Proteine können gleichermaßen die unphysiologische Interaktion mit TAp73 eingehen (Como et al. 1999; Monti et al. 2003; Li & Prives 2007). In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass Zelllinien, die p53-Struktur- oder Kontaktmutanten exprimieren, gleichartig auf eine Behandlung mit RETRA ansprechen. Mutationen in den Domänen L2, L3, LSH und der Zinkbindungsregion vermittelten weder Sensibilisierung, noch Resistenz auf RETRA.

Es fiel jedoch auf, dass einige Zelllinien, die eine *TP53*-Mutation im Bereich des β -Faltblattes trugen, ähnliche Empfindlichkeit auf RETRA boten, wie WTp53-exprimierende Zelllinien. Bei genauerer Betrachtung ergab sich, dass die vorliegenden *TP53*-Mutationen, hier R158H, A159V, V216L und Y220C, als „temperatursensibilisierend“ bekannt sind (Shiraishi et al. 2004; Basse et al. 2010). Dies beschreibt die Auswirkungen von im Bereich des β -Faltblattes gelegenen Strukturmutationen auf die Temperaturstabilität von p53. Diese können abhängig von ihrer Position im p53-Protein entweder hohe Denaturierungstendenz bei 37°C und folglich Funktionsverlust des p53-Proteins auslösen, oder aber teilweise oder vollständig kompensiert sein (Shiraishi et al. 2004). Im letzteren Fall ist das mutierte p53-Protein hinsichtlich Proteinfaltung, Tetramerisierung und Funktion dem Wildtypprotein identisch (Joerger & Fersht 2008). Auch strukturell unvollständig kompensierte *TP53*-Mutationen können ohne erhöhte Denaturierungstendenz oder funktionelle Einschränkungen bleiben (Bullock et al. 2000). Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass die Tetramerisierung von strukturmutilierten p53-Monomeren durch die Gegenwart von p53-DNA-Zielsequenzen („Bindungskoopertivität“ nach Weinberg et al. 2005) oder durch einen Überschuss an p53-Monomeren, wie er in TP53-mutilierten Tumorzellen häufig vorkommt, begünstigt wird (Joerger et al. 2006). Die Tetramerisierung entlang eines DNA-Moleküls kann die Temperaturstabilität von p53 und somit seine transkriptionelle Funktion teilweise wiederherstellen und damit wildtypähnliches Verhalten strukturmutilierter p53-Proteine bedingen (Butler & Loh 2006).

Als weiterer möglicher Faktor, der die Interaktion zwischen TAp73 und mutierten p53-Proteinen beeinflusst, wurde der Einzelbasenpolymorphismus (*SNP*) an Codonposition 72 des *TP53*-Gens (rs1042522) untersucht (s. Abschnitt 3.2.4.). In Tumorzellen, die MUTp53 exprimieren, führt 72Arg im Vergleich zu 72Pro zu einer höheraffinen Bindung zwischen dem mutiertem p53-Protein und TAp73. Hiermit verbunden ist eine stärkere Hemmung der TAp73-Funktion *in vitro*, sowie ein aggressiveres Tumorverhalten und schlechteres Ansprechen auf Chemotherapie in klinischen Studien (Marin et al. 2000; Bergamaschi et al. 2003). In der hier untersuchten *TP53*-mutilierten Population von Zelllinien ergab sich eine Selektion des Arg72-Allels (61%) und der Verlust heterozygoter *SNP*-Ausprägungen (72Arg/72Pro, „*loss of heterozygosity*“). Diese Beobachtung deckt sich mit epidemiologischen Untersuchungen von *TP53*-mutilierten Proben humaner Malignome (Petitjean et al. 2007; Hrstka et al. 2009; Whibley et al. 2009). Im Rahmen dieser Arbeit zeigten Tumorzelllinien mit homozygoter 72Arg- und 72Pro-*SNP*-Variante ein gleichartiges Ansprechen auf RETRA (s. Abschnitt 3.2.4.).

Die beschriebene Bedeutung des untersuchten *SNP* für die Interaktion zwischen MUTp53 und TAp73 ist nicht unumstritten. Experimentell und in mehreren Metaanalysen klinischer Studien konnte die Korrelation zwischen Polymorphismusvariante und Ansprechen auf Chemotherapeutika nicht immer bestätigt werden (Monti et al. 2003; Matakidou et al. 2003; Zhou et al. 2007; Dahabreh et al. 2010; Alqumber et al. 2014). Zusätzlich sind zahlreiche Untersuchungen zum Verhalten von Tumorzelllinien

in Abhängigkeit der SNP-Ausprägung möglicherweise systematisch fehlerhaft, da der SNP nicht molekulargenetisch gesichert wurde (Dahabreh et al. 2013). Die unsichere Datenlage erschwert die Interpretation der RETRA-Effekte im vorliegenden Kontext zusätzlich. Ein Einfluss des Polymorphismus auf die RETRA-Wirksamkeit kann hier letztlich nicht nachgewiesen werden.

Gemeinsam geben die erhobenen Befunde Grund zur Annahme, dass p53-Mutationsstatus und -art, aber auch die Expression von p53 per se für die Zytotoxizität von RETRA von nachrangiger Bedeutung sind. Sie können dessen bisher angenommenen Effekt auf die TAp73/MUTp53-Interaktion weder bestätigen noch widerlegen. Die betonte Zytotoxizität von RETRA in WTp53-exprimierenden Tumorzelllinien lässt vermuten, dass RETRA ausreichenden genotoxischen Stimulus darstellt, um p53-abhängig Apoptose zu vermitteln. In p53-negativen und p53-mutierten Tumorzelllinien sind hingegen alternative, möglicherweise TAp73-abhängige, Signalsysteme anzunehmen (Elmore 2007).

4.3. Das endogene Transaktivierungspotential von mutierten p53-Proteinen

Der Hauptmechanismus der p53-Inaktivierung in malignen Tumorzellen besteht, im Gegensatz zu anderen Tumorsuppressoren, in Missense-Mutationen der *TP53*-Gensequenz. Dies führt meist zur Translation von kontakt- oder strukturmutierten p53-Proteinen normaler Länge mit eingeschränkter transkriptioneller Aktivität. Seltener Frameshift- oder Nonsense-*TP53*-Mutationen bedingen die Entstehung von C-terminal trunkierten Translationsprodukten, die in der Regel ebenfalls funktionslos sind (Weinberg 1991). Das Ausmaß der transkriptionellen Funktionseinschränkung korreliert mit der Häufigkeit von *TP53*-Mutationen in humanen Tumoren (Kato et al. 2003; Soussi et al. 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die 20 am häufigsten in humanen Tumoren gefundenen *TP53*-Mutationen („Hot Spot“-Mutationen“) durch PCR- und „Site-directed“-Mutagenese erstellt (s. Abschnitt 3.3.).

Mittels Reporteranalyse konnte festgestellt werden, dass 17 der 20 generierten Mutanten bei 37°C transkriptionell inaktiv sind (s. Abschnitt 3.3.2). Hierunter waren die p53-Proteine mit den Kontaktmutationen R280T, R273H und R248Q. Ihre Thermostabilität entspricht weitestgehend dem p53-Wildtypprotein (WTp53 10,3 kcal/mol, R273H 9,7 kcal/mol, R248Q, 8,5 kcal/mol, Harnstoffdenaturierungsmethode) (Wong et al. 1999; Bullock et al. 2000). Mutierte und WTp53-Monomere können über ihre Oligomerisierungsdomänen gemischte oder reine MUTp53-Tetramere bilden, welche eingeschränktes bzw. aufgehobenes Transkriptionspotential besitzen (Chan et al. 2004). Die hier gemessene Funktionseinschränkung der Kontaktmutanten ist somit hauptsächlich durch eine defekte p53-DNA-Interaktion erklärt (Bullock et al. 2000) (**Abb. 4.1.**).

Die hier untersuchten p53-Strukturmutanten waren ebenfalls, bis auf einzelne Ausnahmen, transkriptionell inaktiv (s. Abschnitt 3.3.2). Ihre transkriptionelle Aktivität korreliert bekannterweise mit der mutationsbedingten Senkung der p53-Proteinstabilität (Lubin et al. 2010). Diese variiert, wie

bereits erläutert, stark in Abhängigkeit von Mutationsposition und Bedeutung des betroffenen Codons für die Integrität des hydrophoben p53-Proteinkerns. Temperaturlabile p53-Strukturmutanten erfahren eine Selektion in humanen Tumoren (Shiraishi et al. 2004; Dearth et al. 2007) (**Abb. 4.1.**).

Mutationen der Zinkbindungsregion, in dieser Arbeit R175H, C176F und H179R, destabilisieren die Gesamtstruktur des p53-Proteins um 3,5-4 kcal/mol. Sie führen stets zur Denaturierung des hydrophoben Proteinkerns (Loh 2010). Im Einklang damit waren p53-Proteine mit diesen Mutationen hier transkriptionell inaktiv.

Die Mutationen R249S und R282W vermitteln die lokal beschränkte Destabilisierung von DNA-kontaktierenden Proteinsekundärstrukturen. R249S löst die Denaturierung des L3-Loops aus. Hierdurch wird, wie auch in dieser Arbeit nachvollziehbar, die Transaktivierung von Promotoren durch p53 unterbunden, obwohl der Proteinkern bei 37°C wildtypähnliche Restfaltung aufweist (Joerger et al. 2005). Die Mutation R282W wirkt sich durch fehlerhafte Wechselwirkungen mit dem Proteinkern trotz nur geringer lokaler Strukturstörungen des betroffenen LSH-Motivs hochgradig destabilisierend auf das gesamte p53-Protein aus (3,3 kcal/mol). Restfaltung und Transkriptionspotential unter subphysiologischen Temperaturen sind beschrieben (Ang et al. 2006). In dieser Arbeit konnte jedoch keine transkriptionelle Aktivität bei 37°C gemessen werden.

Der Aminosäurerest G245 stabilisiert die lokale Struktur des DNA-kontaktierenden L3-Loops. Die Proteinestabilität dieser Mutante ist im Vergleich zu WTp53 um 1,2 kcal/mol verringert und erlaubt eine Restfaltung von 95% bei 37°C. Pathomechanismus und Erklärung für die Häufigkeit der G245S-Mutation in humanen Tumoren besteht in der Behinderung der Tetramerisierung von p53-Monomeren (Ang et al. 2006; Kitayner et al. 2006). Dieser Tetramerisierungsdefekt und ausgelöste Senkung des Transkriptionspotential können zum Teil durch einen Überschuss des mutierten p53-Proteins oder Senkung der Umgebungstemperatur überwunden werden (Bullock et al. 2000; Weinberg et al. 2004). Dies kann erklären, warum G245S, im Kontrast zu anderen Analysen, in dieser Arbeit bei 37°C Inkubationstemperatur transkriptionell aktiv war (Kato et al. 2003).

Auch die Konformationsmutanten P278S (Helix 2 des LSH-Motivs), G266E (Strang 10 des LSH-Motiv) und M237I (Loop 3) waren in dieser Arbeit transkriptionell inaktiv. Letztere löst indirekt die Denaturierung der Zinkbindungsregion und des p53-Proteins aus. P278S und G266E destabilisieren die ihnen aufgelagerte DNA-Kontaktstruktur LSH. Bei 37°C ziehen sie über unphysiologische Wechselwirkungen zum Proteinkern dessen Denaturierung nach sich (Bullock et al. 2000; Joerger & Fersht 2007).

Strukturmutationen im Bereich des β -Faltblattes bzw. des hydrophoben Proteinkerns von p53 destabilisieren das p53-Protein meist um 3-4,5 kcal/mol (**Abb. 4.1.**) (Shiraishi et al. 2004). Dabei bleiben DNA-interagierende Domänen intakt. Die strukturellen Aberrationen sind bei 20°C häufig kompensiert. Dadurch zeigen p53-Proteine mit Mutationen des β -Faltblattes unterschiedliche, temperaturabhängige transkriptionelle Aktivität (Bullock et al. 2000; Shiraishi et al. 2004; Joerger et

al. 2006). Die hier untersuchten p53-Proteine mit den β -Faltblattmutationen Y234C (Strang 8), Y220C (Verbindung Strang 7 und 8), Y163C (Strang 4) und V157F (Strang 4) waren transkriptionell funktionslos. Die Mutante R158H (Strang 4) konnte hingegen den verwendeten AIP1-Promotor transaktivieren.

Auf endogene Transkriptionsaktivität wurden auch die Trunkierungsmutanten R306X, R213X, und R196X untersucht. Im Falle von R196X und R213X liegt die Nonsense-Mutation innerhalb der DNA-Bindungsdomäne. C-terminal nachgeschaltete Domänen werden nicht exprimiert. Folgen sind eine vollständige Denaturierung des p53-Proteins, sowie Defekte in der Tetramerisierung und DNA-Bindung. Hieraus erklärt sich die hier gemessene transkriptionelle Inaktivität.

Die Mutation R306X führt zum vorzeitigen Abbruch des *TP53*-Transkripts *jenseits* der DNA-Kerndomäne. Hierdurch fehlen jedoch auch Tetramerisierungsdomäne (TET-Domäne), Transportsequenzen (NES, NLS) und der C-Terminus. P53 liegt zytoplasmatisch in einem Oligomerisierungsgleichgewicht von Monomeren, Dimeren und Tetrameren vor (McLure & Lee 1998). Durch den bereits erwähnten Mechanismus der Bindungskoopertivität und im Überschuss vorliegende p53-Mono- und Dimere kann das Gleichgewicht in Richtung der Tetramerisierung verschoben werden. Die TET-Domäne ist für diesen von der DNA-Bindungsdomäne abhängigen Mechanismus verzichtbar (Weinberg et al. 2004; Kitayner et al. 2006). TET-defekte p53-Mutanten, wie R306X, aber nicht DBD-defekte Mutanten, wie R213X oder R196X, können daher in Gegenwart von DNA-Zielsequenzen oligomerisieren, insbesondere, wenn sie im Überschuss vorliegen (Rohaly et al. 2005; Bourdon et al. 2005). Passend zu den hier erhobenen Messdaten ist das Transaktivierungspotential des R306X-mutierten und damit TET-deletierten Tetramers dabei im Vergleich zu WTp53 deutlich vermindert (Kim et al. 2012)

Die hier gemessenen transkriptionellen Aktivitäten der p53-Mutanten stimmen weitgehend mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen überein (Kato et al. 2003; Shiraishi et al. 2004; Dearth et al. 2007; Grochova et al. 2008; zusammengefasst in der *TP53*-Mutationsdatenbank nach Edlund et al. 2012). Unterschiede zur vorliegenden Analyse erklären sich durch unterschiedliche Inkubationstemperaturen und p53-Affinität für die verwendeten Promotorsequenzen (hier: 37°C, AIP1-Promotor). Auch wurden die Vergleichsdaten teils in hefebasierten Zellsystemen erhoben, in denen epigenetische Mechanismen im Vergleich zu humanen Zellen ein verändertes Transaktivierungsniveau von p53-Proteinen verursachen können.

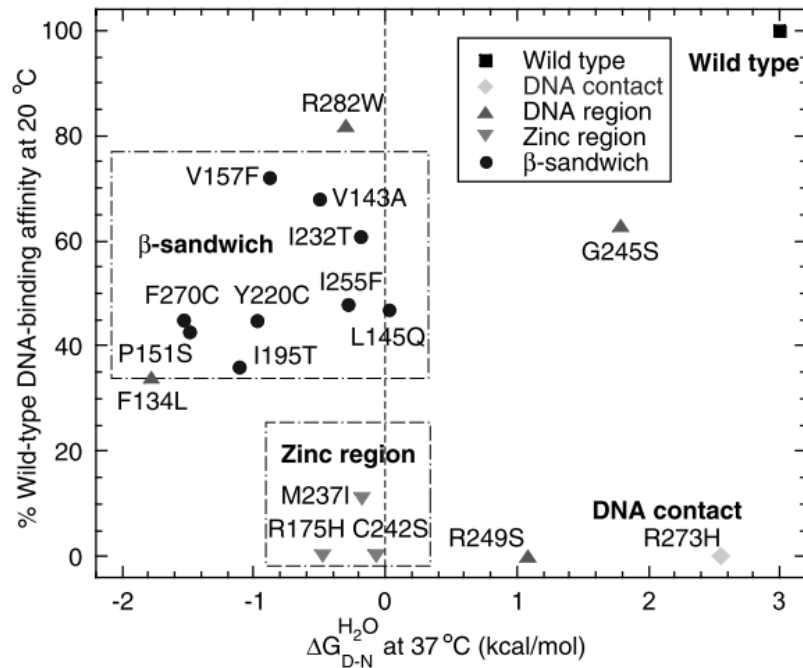


Abb. 4.1. DNA-Bindungsaffinität von mutierten p53-Proteinen abhängig von ihrer Temperaturstabilität

$\Delta G_{D-N}^{H_2O}$ (37°C) entspricht der freiwerdenden Energie während einer Proteindenaturierung durch Harnstoff

bei 37°C und zeigt damit Proteinstabilität an (in kcal/mol) (Fersht 1999).

Das p53-Wildtypprotein besitzt die höchste innermolekulare Proteinstabilität der abgebildeten p53-Proteine. Mutationen in der Zinkbindungsregion und in Regionen der β -Faltblätter destabilisieren das Protein um mindestens 3 kcal/mol. Weitere Strukturmutanten (G245S, R249S, R282W) senken die Stabilität des Proteingerüsts in unterschiedlichem Ausmaß, während DNA-Kontaktmutanten (R273H) keinen Einfluss auf die Proteinstabilität haben. Strukturmutationen in der Zinkbindungsregion lassen bei 20°C kaum DNA-Bindung zu. Demgegenüber zeigen G245S, R282W und Mutationen im β -Faltblattbereich eine temperaturabhängige DNA-Bindungsfähigkeit;

nach Bullock et al. 2000; Joerger & Fersht 2007.

4.4. Mutierte p53-Proteine beeinträchtigen das Transkriptionspotential von WTp53 und TAp73 in vitro

Mutierte p53-Proteine sind neben ihrem Funktionsverlust durch onkogenes Potential charakterisiert („*gain of function*“, Dittmer et al. 1993). Es wird unter anderem durch unphysiologische Proteininteraktionen mit Mitgliedern der p53-Familie bedingt, welche dadurch funktionell gehemmt werden (Kern et al. 1992; Como et al. 1999; Gaiddon et al. 2001).

In Übereinstimmung mit mehreren Arbeitsgruppen konnten diese onkogenen Eigenschaften anhand der generierten p53-Mutanten nachvollzogen werden (Monti et al. 2003; Dearth et al. 2007; Grochova et al. 2008). P53-Proteine mit Strukturmutationen (R282W, P278S, G266E, R249S, M237I, Y234C, Y220C, H179R, C176F, R175H, Y163C, V157F) und Kontaktmutationen (R280T, R273H, R248Q) blockierten im verwendeten Reporterassay in konzentrationsabhängiger Weise die transkriptionelle Aktivität von WTp53 und TAp73 (s. Abschnitt 3.3.2).

Es sind verschiedene Interaktionsmodi von mutierten p53-Proteinen mit WTp53 und TAp73 experimentell charakterisiert worden (Costa et al. 2016).

Die Interaktion zwischen WTp53 und *strukturstabilen* p53-Kontaktmutanten setzt intakte DNA-Bindungs- und Tetramerisierungsdomänen der beteiligten p53-Proteine voraus (Chène & Che 2001; Lubin et al. 2010). Hierüber kommt es zur Ausbildung von MUTp53-haltigen Hetero- und Homotetrameren. Diese sind transkriptionell stark eingeschränkt, auch wenn sie drei Wildtypmonomere enthalten („*Heterotetramerisierung*“) (Chan et al. 2004; Ang et al. 2006).

Im Gegensatz dazu ist die Heterooligomerisierung von *strukturinstabilen* p53-Strukturmutanten mit WTp53 unabhängig von einer intakten Tetramerisierungsdomäne (Lee et al. 2003; Wang & Fersht 2015). Stattdessen ist die Konformationsänderung der DNA-Bindungsdomäne des mutierten p53-Proteins für die Interaktion mit WTp53 nötig (Bensaad et al. 2003). Diese führt zur Exposition einer spezifischen Aggregationssequenz innerhalb der DNA-Bindungsdomäne (Aminosäurereste 251-257) (Xu et al. 2011). Hierüber aggregieren Wildtyp- und mutierte p53-Protein zu amyloidähnlichen Konglomeraten, welche *TP53*-Konsensussequenzen weder binden, noch transaktivieren können („*Aggregation*“) (Wang & Fersht 2012). Diese p53-Aggregate können während ihrer Bildung unspezifisch und unabhängig von Tetramerisierungs- und DNA-Bindungsdomäne WTp53-Proteine einschließen („*Co-Aggregation*“ oder „*Trapping*“). Es ist dabei hervorzuheben, dass auch die native Wildtypstruktur von p53 eine geringe Thermostabilität besitzt und zur Denaturierung tendiert (Halbwertszeit eines p53-Monomers bei 37°C 9 Minuten, Brandt et al. 2012). Erst hierdurch ist die Aggregation von WTp53 über die DNA-Bindungsdomäne mit strukturmutierten p53-Proteinen, aber auch von WTp53-Oligomeren und Kontaktmutanten untereinander möglich („*Selbstaggregation*“). Die Aggregationsgeschwindigkeit von *strukturlabilen* p53-Proteinen ist dabei wesentlich höher, als von p53-Proteinen mit Wildtyp- oder wildtypähnlicher Proteinstabilität (Cino et al. 2016).

Begünstigt werden Aggregation, Co-Aggregation und Selbstaggregation durch hohe intrazelluläre p53-Proteinkonzentrationen. Diese werden unter physiologischen Bedingungen durch den konstitutiven, proteasomalen Abbau von denaturiertem p53-Protein verhindert (Ishimaru et al. 2004; Wang & Fersht 2015; Cino et al. 2016). In malignen Tumorzellen akkumulieren transkriptionell inaktive p53-Proteine durch die Entkopplung von Mechanismen, die ihre Degradierung begünstigen und liegen daher in 20-30fach erhöhter Konzentration vor (Li & Prives 2007; Li et al. 2011). Gehemmt werden die Aggregationsvorgänge hingegen durch die Gegenwart von p53-Konsensussequenzen, da hierdurch p53 entlang der DNA tetramerisiert (DNA-Bindungs Kooperativität, Weinberg et al. 2004; Ishimaru et al. 2009). Dieser Mechanismus geht Struktur- und Kontaktmutanten jedoch durch ihren DNA-Bindungsdefekt verloren. Dies erklärt, warum DNA-bindungsdefekte Struktur-, aber auch Kontaktmutanten den Bestand an WTp53-Protein in malignen Tumorzellen innerhalb von wenigen

Minuten durch den Einschluss in Aggregate vollständig aufbrauchen (Kehrloesser et al. 2016; Cino et al. 2016).

Das Konzept der Aggregation und Co-Aggregation/Trapping kann auf die hier demonstrierte Hemmung von TAp73 durch p53-Mutanten übertragen werden. Die Interaktion von TAp73 mit *strukturlabilen* p53-Proteinen ist zunächst ebenfalls von der Konformationsänderung von p53 abhängig (Bensaad et al. 2003; Joerger et al. 2006). P73-Proteine sind deutlich strukturstabiler, als WTp53 und in Tumorzellen nur sehr selten mutiert. Dadurch besteht kaum Neigung zur Denaturierung, also auch kein Potential zur Selbstaggregation von p73-Proteinen bei 37°C (Brandt et al. 2012). P73 weist eine zu p53 homologe Aggregationssequenz innerhalb der DNA-Bindungsdomäne auf (Xu et al. 2011). Aufgrund der hohen endogenen Strukturstabilität ist sie der Interaktion mit der homologen Aggregationsregion von MUTp53 jedoch nicht zugänglich (Cino et al. 2016). Stattdessen konnten aggregationsvermittelnde Regionen innerhalb der transkriptioneninhibitorischen Domäne (TID) des C-Terminus von p73 nachgewiesen werden. Diese Region ist im nativen p73-Monomer ungefaltet und steht daher der Aggregation mit der DNA-Bindungsdomäne von denaturierten p53-Proteinen zur Verfügung (Kehrloesser et al. 2016). Hierdurch kommt es, analog zur WTp53/MUTp53-Interaktion, via *Aggregation* zur Bildung von höhermolekularen, amyloidähnlichen Proteinkonglomeraten. Dabei kann TAp73 ebenfalls domänenunabhängig eingeschlossen werden („*Co-Aggregation*“) (Kehrloesser et al. 2016).

Die TI-Domäne ist nur in α -Isoformen von p73 vorhanden (De Laurenzi et al. 1998). C-terminal trunkierte Isoformen sind entsprechend nicht in der Lage, eine Interaktion mit denaturierten p53-Proteinen einzugehen (Kehrloesser et al. 2016). Im Einklang dazu fiel in dieser Arbeit auf, dass die C-terminal deletierte TAp73 β -Isoform deutlich geringer als TAp73 α durch die Strukturmutante R175H gehemmt wurde (Daten nicht gezeigt). Dennoch war eine signifikante Hemmung von TAp73 β durch R175H-mutiertes p53 messbar. Dies ist möglicherweise Ausdruck der domänenunabhängigen Co-Aggregation von TAp73 β im Rahmen des Aggregationsvorgangs von mutierten p53-Proteinen.

Auch die *strukturstabilen* Kontaktmutanten R280T, R273H und R248Q konnten im Rahmen dieser Arbeit im Einklang mit den bereits angeführten Vergleichsdaten das transkriptionelle Potential von TAp73 hemmen. Der zugrundeliegende Mechanismus besteht wegen der geringen endogenen Strukturstabilität von allen p53-Proteinen wahrscheinlich wiederum in Aggregation und Co-Aggregation von MUTp53 mit TAp73. Bekannt ist, dass bei anhaltender Expression von *strukturstabilen* Kontaktmutanten WTp53 und TAp73 in malignen Tumorzellen vollständig per Aggregation und Co-Aggregation verbraucht werden (Kehrloesser et al. 2016; Cino et al. 2016). Zu betonen ist, dass die Bildung von MUTp53/TAp73-Heterotetrameren über ihre jeweiligen Tetramerisierungsdomänen, wie sie für WTp53 und *strukturstabile* p53-Mutanten gezeigt ist, nicht möglich ist (Davison et al. 1999; Joerger et al. 2009).

Vor dem Hintergrund der genannten Interaktionsmechanismen zwischen WTp53 und TAp73 mit p53-Mutanten sollen einzelne, hier verwendete p53-Mutanten diskutiert werden (s. Abschnitt 3.3.2.):

Die p53-Proteine mit den Nonsense-Mutationen R213X und R196X verfügen nicht über eine intakte DNA-Bindungs- und Tetramerisierungsdomäne (Cho et al. 1994). Sie konnten im Rahmen dieser Arbeit das Transkriptionspotential von WTp53 und TAp73 nicht hemmen. Es ist daher davon auszugehen, dass diese Trunkierungsmutanten wegen des Fehlens der nötigen Domänen weder Heterotetramere mit WTp53, noch Aggregate mit WTp53 oder TAp73 ausbilden.

Demgegenüber vermittelten p53-Proteine mit der Mutation R306X eine geringe, aber signifikante Verminderung der transkriptionellen Aktivität von WTp53. Das Transkriptionspotential von TAp73 blieb in Gegenwart dieser Mutante aber unverändert. TET-defiziente p53-Proteine sind, wie bereits ausgeführt, in der Lage, über ihre DNA-Bindungsdomänen und TET-unabhängig mit strukturstabilen p53-Proteinen entlang von DNA-Molekülen zu tetramerisieren (Chène & Che 2001). Hierüber erklärt sich wahrscheinlich der dominant-negativ Effekt der R306X-Mutante auf WTp53. Dabei ist bekannt, dass TET-defiziente p53-Tetramere im Vergleich zu WTp53-Tetrameren ein geringeres Transkriptionspotential besitzen (Kim et al. 2012). Die Inkorporierung des R306X-mutierten Monomers in einen TAp73-Tetramer ist hingegen weder über DNA-Bindungsdomäne noch über die TET-Domäne möglich. Theoretisch möglich erscheint eine domänenunabhängige Integration von TAp73 in Aggregate von R306X-mutierten p53-Protein (Co-Aggregation/Trapping). Es war jedoch kein transkriptionshemmender Effekt dieser Mutante auf TAp73 messbar.

Die Mutante G245S konnte WTp53 und TAp73 transkriptionell geringfügig hemmen. Es ist zu vermuten, dass hier vorliegende Interaktionsmodi sowohl in Aggregation/Co-Aggregation, als auch Heterotetramerisierung bestehen. G245S kann, wenn strukturell intakt, Heterotetramere mit WTp53 von eingeschränkter, transkriptioneller Aktivität bilden (Ang et al. 2006). Andererseits neigt das G245S-mutierte p53-Protein zur Denaturierung der DNA-Bindungsdomäne, wodurch Aggregationsmechanismen mit WTp53 und TAp73 möglich sind. Die Heteroaggregation von TAp73 und p53-Mutanten über ihre TET-Domänen schließt sich, wie bereits erwähnt, aus.

Das R158H-mutierte Protein besaß hohes endogenes Transkriptionspotential. Wegen seiner starken Reporteraktivierung war ein transkriptionshemmender Effekt auf WTp53 und TAp73 nicht abzugrenzen. Die hohe transkriptionelle Aktivität von R158H setzt eine strukturell intakte DNA-Bindungsdomäne und korrekte Tetramerisierung voraus. Es ist daher zu vermuten, dass der transkriptionshemmende Effekt auf WTp53 und TAp73 via Aggregation gering ausfällt, weil die Aggregationssequenz nicht stärker als im WTp53-Protein exponiert wird. Auch die Heteroaggregation von R158H-mutiertem Protein mit WTp53 ist aufgrund der zu vermutenden Stabilität von R158H möglich, auch wenn diese hier aus den genannten Gründen nicht messbar war. Ebenso ist der Modus der Selbstaggregation für diese strukturstabile p53-Mutante denkbar.

Interaktionspartner	Interaktionsmechanismus	Domänenabhängigkeit der Interaktion
WTp53 WTp53	Homotetramerisierung Selbstaggregation Co-Aggregation/Trapping	TET+, DBD+ TET-, DBD+ TET-, DBD-
WTp53 MUTp53 (KM)	Heterotetramerisierung (Selbst-)Aggregation Co-Aggregation/Trapping	TET+, DBD- TET-, DBD+ TET-, DBD-
WTp53 MUTp53 (SM)	(Selbst-)Aggregation Co-Aggregation/Trapping	TET-, DBD+ TET-, DBD-
TAp73 TAp73	Homotetramerisierung	TET+, DBD+
TAp73 MUTp53 (KM)	Aggregation Co-Aggregation/Trapping	TET-, DBD+ (p53), C-Terminus (p73) TET-, DBD-
TAp73 MUTp53 (SM)	Aggregation Co-Aggregation/Trapping	TET-, DBD+ (p53), C-Terminus (p73) TET-, DBD-

Tab. 4.1. Interaktionsmechanismen zwischen WTp53- und TAp73-Oligomeren, sowie mit strukturstabilen und -instabilen, mutierten p53-Proteinen

Abgebildet sind strukturbioologische Mechanismen der Interaktionen zwischen verschiedenen mutierten und unmutierten Mitgliedern p53-Familie. Detaillierte Erläuterung im Text unter 4.4.

Die Bildung von funktionell aktiven WTp53- oder TAp73-Homotetrameren erfordert jeweils DNA-Bindungs- und Tetramerisierungsdomäne.

Die Selbstaggregation und Aggregation von WTp53, strukturstabilen Kontaktmutanten und strukturinstabilen Strukturmutanten ist TET-unabhängig und DBD-abhängig.

Die Selbstaggregation von TAp73-Oligomeren ist nicht möglich. Der Einschluss in MUTp53-haltige Aggregate per Aggregation ist TET-unabhängig und erfolgt über die DBD des p53-Proteins und den C-Terminus des TAp73-Proteins.

Die Co-Aggregation bzw. „Trapping“ von mutierten oder unmutierten p53-Proteinen in Aggregate von denaturiertem p53 ist vollständig domänenunabhängig.

(WTp53 – Wildtyp p53, MUTp53 (SM) – mutiertes p53, Strukturmutante (strukturinstabil), MUTp53 (KM) – mutiertes p53, Kontaktmutante (strukturstabil);

TET – Tetramerisierungsdomäne, DBD – DNA-Bindungsdomäne, DBD(p53) – DNA-Bindungsdomäne des involvierten p53-Proteins (mutiert oder unmutiert), C-Terminus (p73) – C-Terminale Domäne des involvierten TAp73-Proteins).

4.5. RETRA stellt das durch MUTp53 gehemmte Transkriptionspotential von TAp73 in vitro wieder her

Mittels Reporterassay konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass RETRA das durch Kontakt- und Strukturmutanten gehemmte Transkriptionspotential von TAp73 wiederherstellt. Transkriptionell inaktive p53-Mutanten wurden durch RETRA nicht reaktiviert. Die Reporteraktivierung und seine Steigerung durch RETRA hingen stets von der Anwesenheit von TAp73 im jeweiligen Versuchsansatz ab (s. Abschnitt 3.3.3). Diese Ergebnisse legen nahe, dass RETRA in der von Kravchenko vorgeschlagenen Weise die Interaktion zwischen TAp73 und MUTp53 verhindern könnte und hierdurch TAp73 transkriptionell reaktiviert. Sie stehen auch im Einklang mit der Beobachtung, dass zytotoxische RETRA-Effekte auf Tumorzellen in vitro durch die Blockade von TAp73 aufgehoben werden können (Kravchenko et al. 2008; Santag et al. 2013).

Im Rahmen des Reporterassays fiel auf, dass das Transkriptionspotential von TAp73 durch RETRA nicht nur auf das Referenzniveau von TAp73 allein wiederhergestellt werden konnte, sondern dieses um 20-50% überstieg. Dieser Effekt war wiederum von der Anwesenheit von TAp73, aber nicht von MUTp53 im Versuchsansatz abhängig und somit auf TAp73 zurückzuführen (s. Abschnitt 3.3.3).

Die Ursache für diese Beobachtung kann hier nur vermutet werden. Da der Effekt von TAp73 abhängig war, ist anzunehmen, dass RETRA nicht nur die MUT53/TAp73-Interaktion verhindert, sondern direkt das Transkriptionspotential von TAp73 erhöht. In der Tat konnte in vorbereitenden Experimenten die Reporteraktivierung von TAp73 α durch RETRA um ca. 5-10% gesteigert werden, ohne dass RETRA selbst den Reporter aktivierte (Daten nicht gezeigt).

Die Beobachtung in TAp73-haltigen Versuchsansätzen wurde gleichermaßen in Gegenwart von Kontakt- und Strukturmutanten gemacht. Wie unter 4.4. erläutert, gleichen sich die p53-Mutationsarten hinsichtlich ihres Interaktionsmodus mit TAp73 („*Aggregation*“ und „*Co-Aggregation/Trapping*“). Die Interaktion geht jeweils von aggregationsvermittelnden Regionen der DNA-Bindungsdomäne von p53 und der C-terminalen TI-Domäne von TAp73 aus (Xu et al. 2011; Cino et al. 2016).

Der C-Terminus von TAp73 ist an der Regulation des Transkriptionspotentials von TAp73 beteiligt und nur in α -Isoformen von p73 enthalten (Moll & Slade 2004). Posttranslationale Modifikationen oder Punktmutationen des C-Terminus von TAp73 α können die transkriptionale Aktivität von TAp73 erheblich steigern (Straub et al. 2010; Conforti et al. 2012; Luh et al. 2013). Es ist denkbar, dass sich RETRA auf den C-Terminus oder die TI-Domäne von TAp73 α auswirkt. Hierüber könnte einerseits die domänenabhängige Aggregationstendenz von TAp73 mit Kontakt- und Strukturmutanten beeinflusst werden. Andererseits wäre hierdurch die Steigerung des Transkriptionspotentials von TAp73 α , nicht jedoch von TAp73 β , erklärbar.

Zur Klärung dieser Hypothese wären weitere Untersuchungen nötig, die den Einschluss von TAp73 in p53-haltige Aggregate in Gegenwart von RETRA und unter Modifikation des C-Terminus von TAp73

untersuchen. Es sind verschiedene Agenzien bekannt, die, wie RETRA, die Interaktion zwischen MUTp53 und TAp73 unterbinden können und TAp73-abhängige Zytotoxizität in Tumorzellen auslösen. Ihr molekularer Wirkmechanismus ist jedoch ebenfalls nicht im Detail aufgeklärt und kann daher keine Hinweise auf die Wirkungsweise von RETRA oder die Bedeutung des C-Terminus von TAp73 geben (Di Agostino et al. 2008; Saha et al. 2013; Hong et al. 2014) (**Tabelle 4.1.**).

Neben einem TAp73-spezifischen Effekt ist auch die Beeinflussung der Aggregation von MUTp53 und TAp73 oder der Denaturierungstendenz der involvierten p53-Proteine durch RETRA denkbar. RETRA wirkte sich im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht auf das Transkriptionspotential von mutierten p53-Proteinen aus, sodass die Beeinflussung der Denaturierungstendenz unwahrscheinlich ist. Dabei sind bereits mehrere Substanzen in vitro und teils in klinischer Anwendung untersucht, die die Struktur von mutierten p53-Proteinen und damit ihre tumorsuppressive Funktion wiederherstellen. Einige dieser Substanzen zielen spezifisch auf strukturelle Aberrationen ab, die durch einzelne Hotspotmutationen von *TP53* ausgelöst werden (z.B. „PK083“ für die Mutation Y220C, „NSC319726“ für Mutationen der Zinkbindungsregion). Weitere Agenzien sind in ihrer Wirkungsweise unspezifisch auf destabilisierende Strukturmutationen ausgerichtet (z.B. PRIMA und Derivate) (**Tabelle 4.1.**).

Die isolierte Beeinflussung der MUTp53/TAp73-Interaktion z.B. über Auswirkungen auf in die Interaktion involvierte Domänen von MUTp53 oder TAp73 ist jedoch anhand der vorliegenden Daten nicht auszuschließen.

Substanz	Mechanismus
Wildtyp p53	
Übersichtsarbeiten: Hoe et al. 2014, Duffy et al. 2014	
MDM2/X-Inhibitoren: Nutlin-3a und Derivate (z.B. RG7112) Benzodiazepindione (z.B. TDP665759) Spirooxindole (z.B. MI-219, MI-713) Pyrazol- and Imidazolderivate Pyrrolidinone (z.B. PXN822), u.v.m.	„ <i>Small molecule</i> “, Bindung an MDM2 und/oder MDMX, Hemmung der Wtp53/MDM2/X-Interaktion, (Vassilev et al. 2004)
Peptidale MDM2/X-Inhibitoren: SAH-8, PMI, PDIQ, ATSP-7041	„ <i>Stapled peptide</i> “, Bindung an MDM2 und/oder MDMX, Hemmung der Wtp53/MDM2/X-Interaktion (Brown et al. 2013)
RITA	„ <i>Small molecule</i> “, Bindung an Wtp53, Hemmung der Wtp53/MDM2-Interaktion (Issaeva et al. 2004)
Tenovin 1 and 6	Deacetylierung von Wtp53 durch Hemmung von SIRT1/2 (Lain et al. 2008)
Reaktivierung mutierter p53-Proteine	
Übersichtsarbeiten: Wiman 2010, Bykov & Wiman 2014	
PRIMA und Derivate (PRIMA-1MET, =APR-246)	„ <i>Small molecule</i> “, Wiederherstellung der Proteinfaltung verschiedener p53-Mutanten (Bykov et al. 2002)
PK083, PK5174, PK5196, PK7088, u.v.m.	„ <i>Small molecule</i> “, Wiederherstellung der Proteinfaltung der p53-Mutante Y220C (Basse et al. 2010)
NSC319726, Zink	„ <i>Small molecule</i> “, Wiederherstellung der Proteinfaltung verschiedener p53-Mutanten mit Zinkbindungsdefekt (Aminosäurepositionen R175, C242, H179, C176) (Yu et al. 2012)
G418, PTC124, RTC13	„ <i>Read through drug</i> “, für Stopcodon-kodierende p53-Mutationen (z.B. R213X, R196X) (Floquet et al. 2011)
MIRA-1	ungeklärter Mechanismus, Bou-Hanna et al. 2015
Hemmung der Interaktion zwischen mutierten p53 Proteinen und TAp73	
RETRA Short Interfering Mutant p53 Peptides Prodigiosin PRIMA-1MET	Kravchenko et al. 2008 Di Agostino et al. 2008 Hong et al. 2014 Rökæus et al. 2010; Saha et al. 2013
P53-basierte adeno- und retrovirusvermittelte Gentherapie	
Übersichtsarbeiten: Li et al. 2015, Tazawa et al. 2013	
P53-basierte Immunotherapie und Tumorstoffe	
Übersichtsarbeiten: DeLeo & Whiteside 2008, Vermeij et al. 2011	

Tab. 4.2. P53-basierte Tumorthherapie

Aufgeführt sind Substanzen, die in vitro oder in klinischen Studien Anwendung zur Therapie MUTp53- oder Wtp53-exprimierender Tumoren finden.

4.6. Die zytotoxischen Effekte von RETRA korrelieren nicht mit der Expression der p73-Isoformen in vitro

TAp73 vermittelt seine tumorsuppressiven Effekte vor allem als Transkriptionsfaktor für ein Genspektrum, das in Apoptose, Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur involviert ist (Logotheti et al. 2013). TAp73 funktionell gegenübergestellt ist die p73-Isoform „dNp73“, welche onkogene Eigenschaften besitzt, indem sie die tumorsuppressiven Effekte von TAp73 und Wtp53 direkt antagonisiert (Grob et al. 2001; Stiewe et al. 2002).

In malignen Tumoren kann das quantitative und funktionelle Gleichgewicht der p73-Isoformen auf Protein- und Transkriptionsebene in Richtung von dNp73 verschoben sein (Engelmann et al. 2015). So lässt sich in humanen Tumorgeweben ein unphysiologisches Expressionsmuster der p73-Isoformen feststellen. Dieses kann durch die Überexpression von dNp73 oder Suppression der TAp73-Transkription, sowie die gemeinsame Ko-Überexpression beider p73-Isoformen gekennzeichnet sein (Conforti et al. 2012). Entsprechend der onkogenen Eigenschaften von dNp73 und tumorsuppressiven Funktion von TAp73 ist ein verminderter TAp73/dNp73-Quotient in klinischen Untersuchungen, unabhängig des p53-Mutationsstatus, mit Chemoresistenz verschiedener Tumorentitäten assoziiert und beeinflusst die Prognose betroffener Tumorpatienten negativ. Umgekehrt kann die isolierte TAp73-Überexpression das Ansprechen auf Chemo- und Radiotherapie verbessern (Zaika et al. 2002; Müller et al. 2005; Becker et al. 2006; Liu et al. 2006; Zitterbart et al. 2007; Lucena-Araujo et al. 2015).

Es konnte gezeigt werden, dass die zytotoxischen RETRA-Effekte von TAp73 abhängig sind. So konnte durch die selektive Ausschaltung der TAp73-Transkription (Blockade des p73-Promotors P1) RETRA-Resistenz von Tumorzelllinien und die RETRA-vermittelte Aktivierung von TAp73-Zielgenen aufgehoben werden (Kravchenko et al. 2008; Santag et al. 2013). Auch die hier durchgeführten Reporteranalysen deuten darauf hin, dass RETRA TAp73 transkriptionell reaktivieren kann und somit verantwortlich für die zytotoxischen Effekte in der Behandlung der verschiedenen Tumorzelllinien war (s. Abschnitt 3.1. und 3.3.3).

Trotz dieser Datenlage, die TAp73 als Effektor der RETRA-Zytotoxizität bestätigen, korrelierte in dieser Arbeit weder die Überexpression von TAp73, dNp73, der Methylierungsstatus der p73-Promotoren, noch die Höhe des TAp73/dNp73-Quotienten mit dem Ansprechen der Tumorzelllinien auf RETRA (s. Abschnitt 3.2.2.).

Die Resultate setzen zunächst voraus, dass die gemessene Transkriptionsrate der p73-Isoformen mit den entsprechenden Mengen der biologisch aktiven Translationsprodukte korreliert. Dies konnte in zahlreichen Untersuchungen demonstriert werden (Domínguez et al. 2006; Vogel et al. 2010; Conforti et al. 2012). Bei der Interpretation der Ergebnisse stellt sich jedoch die Frage, ob die Quantifizierung von p73-Transkriptions- oder Translationsprodukten als isolierter, prognostischer Parameter für das Ansprechen von Tumorzellen auf Radio- und Chemotherapie oder RETRA verwertbar ist. Maligne Tumorzellen sind in der Lage, hohe TAp73-Transkript- und Proteinmengen zu tolerieren und dabei

ihren malignen Phänotyp aufrecht zu erhalten (Di et al. 2013; Engelmann et al. 2015). Ursächlich hierfür sind einerseits die längere Halbwertszeit und die dominant-negative Eigenschaft von dNp73 gegenüber TAp73 (Stiewe et al. 2002; Oberst et al. 2005). Zum anderen ist für die tumorsuppressive Funktion von TAp73 seine Aktivierung durch Signalkaskaden und Proteininteraktionen nötig, wie sie durch endogene oder exogene, genotoxische Noxen ausgelöst werden. Ohne sie bleibt die Stabilisierung des TAp73-Proteins, seine Translokation in den Zellkern und die dortige Transaktivierung von Zielpromotoren aus (Logotheti et al. 2013).

In malignen Tumorzellen sind zudem zahlreiche Faktoren bekannt, die die Aktivierung und Funktion von TAp73 hemmen können, ohne dessen Mengenverhältnisse zu beeinflussen. Unter anderem verhindern MDM2 (Zeng et al. 1999; Kubo et al. 2010), PLK1 und PLK3 (Koida et al. 2008; Sang et al. 2009), NEDD8 (Watson et al. 2006), iASPP (Cai et al. 2012) oder mTOR (Rosenbluth et al. 2008) durch ein verändertes Spektrum von posttranslationalen Modifikationen des TAp73-Proteins dessen transkriptionelle Aktivität. Auch direkte Proteininteraktionen können in malignen Zellen die Aktivierung von TAp73 blockieren und zugleich zur Stabilisierung von dNp73 führen (Leung et al. 2013). Darüber hinaus vermittelt die isolierte Überexpression von dNp73 *in vitro* nicht ohne Weiteres maligne Zelltransformation und Chemoresistenz (Marabese et al. 2005; Sabatino et al. 2007). Hierfür sind weitere (epi-)genetische, onkogene Faktoren, z.B. in Form von ras- oder -myc-Mutationen, nötig (Stiewe et al. 2002; Petrenko et al. 2003). Im Einklang hiermit demonstrieren einzelne klinische Studien einen fehlenden Zusammenhang zwischen Therapieansprechen von Tumorpatienten mit der Genexpression von p73-Isoformen (Müller et al. 2006; Hofstetter et al. 2011).

Diese Daten sprechen dafür, dass die alleinige Quantifizierung der mRNA-Expression der p73-Isoformen von Tumorzellen möglicherweise unzureichend ist, um ihr Ansprechen auf RETRA vorherzusagen.

4.7. RETRA besitzt in der Kombinationsbehandlung mit Etoposid additive und synergistische, zytotoxische Effekte auf Tumorzelllinien

Es sind zahlreiche Substanzen bekannt, die maligne Tumoren durch die selektive Ausschaltung von resistenzfördernden Mechanismen auf konventionelle Chemotherapeutika sensibilisieren (**Tabelle 4.1.**). So sind die bereits genannten, TAp73-hemmenden Faktoren iASPP, MDM2 oder mTOR, medikamentös selektiv blockierbar (Bell et al. 2007; Peirce et al. 2009; Wong et al. 2011). Ebenso kann die Interaktion zwischen p53-Mutanten und TAp73 durch verschiedene Methoden verhindert werden (Di Agostino et al. 2008; Bruno et al. 2010; Rökaeus et al. 2010; Saha et al. 2013). Diesen Therapieansätzen ist gemein, dass sie *in vitro* in TAp73-abhängiger Weise Chemosensibilisierung auf konventionelle Chemotherapeutika verursachen.

Zur Untersuchung chemosensibilisierender Effekte von RETRA erfolgte die Kombinationsbehandlung von Tumorzelllinien mit dem Topoisomerase-II-Hemmer Etoposid (s. Abschnitt 3.4.2.). Die Analyse

von Zytotoxizität im Rahmen einer Kombinationsbehandlung kann additive, synergistische und antagonistische Effekte der verwendeten Substanzen aufdecken. Additivität besteht darin, dass zwei oder mehrere Substanzen ein Ausmaß an Zytotoxizität hervorrufen, das genau der Summe ihrer Einzelwirkungen entspricht. Synergismus und Antagonismus sind hingegen durch Über- oder Unterschreiten der zu erwartenden Summe der zytotoxischen Einzelwirkungen gekennzeichnet (Chou 2010). Zur Berechnung dieser Substanzkombinationseffekte ist die Bestimmung des Kombinationsindex üblich. Im Kontext dieser Arbeit war dies jedoch nicht möglich, da RETRA bei *steigenden* Etoposidkonzentrationen in einer *einzelnen, fixen* Dosierung eingesetzt wurde, statt in analog zu Etoposid steigenden Konzentrationsstufen (Chou 2010; Zhao et al. 2014). Der Vergleich der Etoposid- bzw. etoposid-/RETRA-behandelten Versuchsarme und seine graphische Darstellung im Sinne einer sog. Kurvenanalyse (Abschnitt 3.4.2., Abb. 3.19. – 3.22.) können jedoch als Surrogatparameter für Substanzkombinationseffekte verwendet werden („*curve shift analysis*“, s. 2.2.25., Grabovsky & Tallarida 2004; Fouquier & Guedj 2015).

Etoposid vermittelt durch direkte DNA-Schädigung Apoptose und Zellzyklusarrest durch die Aktivierung von p53- und/oder TAp73-abhängigen Signalwegen (Montecucco et al. 2015). In alleiniger Anwendung löste es hier Zytotoxizität in Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Status aus (HCT116 (WTp53), NCI-H1299 (parental, p53-negativ), A431 (MUTp53, Mutation R273H), mit p53-Mutanten R273H und R175H transfizierte H1299-Zelllinien). Sein p53- oder TAp73-abhängiger Wirkmechanismus erklärt sowohl die gemessene Zytotoxizität in WTp53-exprimierenden HCT116-Zellen, als auch p53-negativen und -mutierten Zelllinien. Dabei ist bereits bekannt, dass TAp73 in p53-negativen Zelllinien den Verlust von tumorsuppressiven Eigenschaften von p53 als Reaktion auf Etoposid teilweise kompensieren kann (Yoon et al. 2015; He et al. 2016). Auch ist eine TAp73-abhängige Vermittlung von Zytotoxizität in Gegenwart transkriptionshemmender p53-Mutanten beschrieben (Monti et al. 2003; Müller et al. 2006). Bestätigend kann in diesem Kontext die selektive Blockade von TAp73 Apoptose und Zellzyklusarrest verhindern (Irwin et al. 2003; Vayssade et al. 2005).

Während Etoposid Apoptose und Zellzyklusarrest durch die Aktivierung p53- und TAp73-abhängigen Signalkaskaden auslöst, ist die Wirkung von RETRA nach Erkenntnissen dieser und externer Arbeiten von TAp73, aber nicht von p53 abhängig (Kravchenko et al. 2008; Santag et al. 2013; Sonnemann et al. 2015).

Obwohl HCT116-Zellen WTp53 und TAp73 exprimieren, waren hier nur additive, jedoch überraschend keine synergistischen zytotoxischen Effekte von Etoposid und RETRA nachweisbar. Das Ausbleiben von Wirksynergismus kann Ausdruck einer endogenen RETRA-Resistenz sein. Dieser geht möglicherweise von direkt TAp73-hemmenden Mechanismen aus, obwohl der TAp73/dNp73-Quotient in HCT116-Zellen 100fach in Richtung von TAp73 verschoben ist. Als Voraussetzung für

eine mögliche RETRA-Resistenz weisen HCT116-Zellen einen Defekt der DNA-Reparatur auf, der die Akkumulation von onkogenen DNA-Veränderungen begünstigt (de las Alas et al. 1997; Karran 2001). Andererseits ist theoretisch auch dann kein Synergismus von RETRA und Etoposid nachweisbar, wenn TAp73 in etoposidbehandelten HCT116-Zellen bereits maximales Transkriptionspotential aufweist, das durch RETRA nicht weiter gesteigert werden kann (Fouquier & Guedj 2015).

Unter der kombinierten Behandlung mit RETRA und Etoposid wurde in den p53-negativen und MUTp53-exprimierenden Zelllinien H1299, H1299/R273H, H1299/R175H und A431 neben additiven zytotoxischen Effekten auch Wirksynergismus festgestellt (s. Abschnitte 3.4.2.1. und 3.4.2.2.). Das Überleben der Zelllinien wurde also durch die Kombinationsbehandlung stärker vermindert, als durch die Summe der zytotoxischen Effekte der Einzelsubstanzen zu erwarten gewesen wäre. Zu betonen ist, dass der Synergismus mit Inkubationszeit und Etoposiddosis zunahm. Dadurch war mit niedrigerer Etoposiddosis ein höheres Maß an Zytotoxizität im Sinne einer Chemosensibilisierung zu erreichen. Entsprechend reduzierte RETRA die LD50-Werte für Etoposid in diesen *TP53*-mutierten und p53-negativen Zelllinien deutlich. Im Bereich niedriger Etoposidkonzentrationen war zudem ein Antagonismus von RETRA und Etoposid messbar.

Die erhobenen Befunde legen nahe, dass Etoposid durch genotoxischen Stress dazu beiträgt, eine tumorsuppressive Reaktion durch TAp73 während einer RETRA-Behandlung und unabhängig von p53 auszulösen. Im Umkehrschluss ist zu vermuten, dass die alleinige Freisetzung von TAp73 aus einem Komplex mit mutierten p53-Proteinen und die vermutete Funktionssteigerung über den C-Terminus von TAp73 durch RETRA möglicherweise nicht ausreicht, um TAp73-abhängige Zytotoxizität zu vermitteln. Hierfür scheinen weitere, direkt TAp73-aktivierende bzw. -enthemmende Mechanismen nötig zu sein, die als Folge der Etoposidbehandlung aktiv werden.

Nach diesem Konzept wäre der beobachtete Wirkantagonismus von RETRA im Bereich niedriger Etoposidkonzentrationen mit TAp73-vermitteltem Zellzyklusarrest vereinbar, während die synergistischen zytotoxischen Effekte bei hoher Etoposiddosis TAp73-abhängige Apoptose widerspiegeln könnten. Dies stellt die bekannte Wirkungsweise von Tumorsuppressoren, wie p53 und TAp73 dar, nach der in Gegenwart niederschwelliger Noxen Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur vermittelt wird, wohingegen höhergradiger genotoxischer Stress bevorzugt Apoptose und irreversible Seneszenz auslöst (Schlereth et al. 2010; Hoe et al. 2014). Hieraus kann geschlossen werden, dass RETRA die Schwelle für TAp73-vermittelte tumorsuppressive Effekte, wie Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur, als auch für Apoptose senkt.

Rückblickend bieten diese Erkenntnisse eine mögliche Erklärung für die fehlende Korrelation von hier gemessener Zytotoxizität in RETRA-behandelten Tumorzelllinien mit Variablen um p53 (Mutationsstatus, strukturelle Eigenschaften) und p73-Isoformenexpression. Insbesondere die Heterogenität der behandelten Zelllinien könnte sich in einem unterschiedlichen tumorsuppressiven Potential von TAp73 und somit verschiedenen Ansprechverhalten auf die alleinige Therapie RETRA ausgewirkt haben. Das Fehlen eines zusätzlichen genotoxischen Stimulus, wie Etoposid, und unbekannte, endogene Resistenzmechanismen im behandelten Zelllinienpanel führten möglicherweise zu einem unsystematischen Fehler in der Korrelationsanalyse. Die möglichen Gründe für den Funktionsverlust von TAp73 und daraus entstehende RETRA-Resistenz von Tumorzellen sind in Abschnitt 4.6. erläutert. Dies könnte auch die widersprüchlichen Ergebnisse von Untersuchungen erklären, die die Abhängigkeit der zytotoxischen RETRA-Effekte vom p53-Mutationsstatus unterschiedlich bewerteten (Kravchenko et al. 2008; Santag et al. 2013; Sonnemann et al. 2015). Um diese Hypothese zu prüfen, sind weitere Untersuchungen der chemosensibilisierenden Effekte von RETRA durch die Kombinationsbehandlung mit konventionellen Chemotherapeutika *in vitro* und im Mausmodell nötig. Diese könnten RETRA als potentiellen Kombinationspartner in der Radio- und Chemotherapie insbesondere von therapieresistenten, *TP53*-mutierten Tumoren bestätigen.

5. Zusammenfassung

TP53 ist das in humanen Malignomen am häufigsten mutierte Tumorsuppressorgen (Kandoth et al. 2013). Mutationen des *TP53*-Gens führen meistens zur Expression von mutierten p53-Proteinen voller Länge, die neben einem Funktionsverlust durch onkogenes Potential charakterisiert sind (Oren & Rotter 2010). Dieses Potential wird unter anderem durch die Interaktion von MUTp53 mit dem Tumorsuppressor TAp73 vermittelt (Como et al. 1999). In Übereinstimmung mit der etablierten Datenlage wurde hier demonstriert, dass mutierte p53-Proteine das Transkriptionspotential von WTp53 und TAp73 hemmen. Durch die Substanz RETRA wird die Interaktion von TAp73 mit MUTp53 aufgehoben und TAp73 transkriptionell reaktiviert (Kravchenko et al. 2008). Bestätigend wurde in dieser Arbeit das durch strukturstabile und strukturinstabile p53-Mutanten gehemmte Transkriptionspotential von TAp73 durch RETRA wiederhergestellt. Darüber hinaus erhöhte RETRA das Transkriptionspotential von TAp73. Ob hierbei ein spezifischer Effekt von RETRA auf die Struktur des C-Terminus oder die transkriptionshemmende Domäne von TAp73 ursächlich ist, bleibt zu klären.

In der Behandlung einer heterogenen Auswahl von Tumorzelllinien mit RETRA wurden zum Teil ausgeprägte zytotoxische Effekte beobachtet. Die retrospektive Mutations- und Korrelationsanalyse der Ergebnisse ergab zunächst, dass die gemessene Zytotoxizität unabhängig von p53-Mutationsstatus und verschiedenen strukturellen Eigenschaften von p53 war, die die Interaktion mit TAp73 beeinflussen. Die Auswirkungen von RETRA in den behandelten Tumorzelllinien waren dabei auch nicht von der mRNA-Expression der p73-Isoformen TAp73 und dNp73 abhängig. Dieses Ergebnis ist jedoch wegen der heterogenen Zusammensetzung des behandelten Zelllinienpanels und der begrenzten Aussagekraft der p73-Isoformenquantifizierung auf mRNA-Ebene kritisch zu bewerten. Die RETRA-Behandlung von Tumorzelllinien in Kombination mit dem Topoisomerase-II-Hemmer Etoposid verursachte in Tumorzelllinien unabhängig des p53-Mutationsstatus ausgeprägte additive zytotoxische Effekte. In MUTp53- und p53-negativen Zelllinien wurde zusätzlich ein deutlicher Wirksynergismus von RETRA und Etoposid gemessen. Das Fehlen eines zytotoxischen Stimulus hat somit möglicherweise zu einem unsystematischen Fehler in der Korrelationsanalyse geführt.

Die erhobenen Ergebnisse bestätigen in ihrer Zusammenschau, dass RETRA das Transkriptionspotential von TAp73 wiederherstellen und seine tumorsuppressive Funktion aktivieren kann. Die gemessenen chemosensibilisierenden Eigenschaften qualifizieren RETRA als möglichen Kombinationspartner in der Therapie von malignen Tumoren mit konventionellen Chemotherapeutika. Es sind jedoch weitere Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* nötig, um die Wirkungsweise von RETRA zu bestätigen. Der Einsatz von RETRA könnte dazu beitragen, therapeutisch nötige Dosierungen verwendeter Zytostatika zu reduzieren, um unerwünschte Arzneinebenwirkungen zu minimieren bzw. die Therapieintensität zu erhöhen. Da TAp73 in humanen Malignomen sehr selten mutiert ist, könnte RETRA zudem zur Überwindung MUTp53-bedingter Resistenz von Malignomen auf Radio- und Chemotherapie beitragen.

6. Summary

TP53 is the most frequently mutated tumor suppressor gene in human cancer (Kandoth et al. 2013). *TP53* mutations cause the expression of full length p53 proteins that are characterized not only by a loss of function but which also exert additional oncogenic features (Oren & Rotter 2010). They are caused in part by the inhibitory interaction of MUTp53 with the tumor suppressor TAp73 (Como et al. 1999). In accordance with established data, here it was demonstrated that mutated p53 proteins inhibit the transcriptional potential of WTp53 and TAp73. The small molecule RETRA disrupts the MUTp53-TAp73 interaction and thereby reactivates transcriptional functions of TAp73 (Kravchenko et al. 2008). In agreement, the transcriptional potential of TAp73 inhibited by mutated structurally stable and unstable p53 proteins was restored by RETRA. Moreover, RETRA increased the transcriptional potential of TAp73 itself. Whether this was the result of a specific RETRA-mediated effect on the structure of the TAp73 C-terminus or transcription inhibitory domain remains to be elucidated.

During treatment of a heterogeneous panel of tumor cell lines with RETRA varying cytotoxic effects were observed. Retrospectively, analyses of the treated cell lines revealed that the cytotoxicity caused by RETRA was independent of the p53 mutational status and structural features of p53 that influence the MUTp53/TAp73 interaction. There was no correlation with the mRNA expression of TAp73 and dNp73 in the treated cell lines. Yet, this has to be appraised with caution since the treated cell line panel was highly heterogeneous and quantifying the expression of the p73 isoforms at the mRNA level is of limited predictive value in respect to their functional status. The combined treatment of tumor cell lines with RETRA and etoposide, an inhibitor of topoisomerase II, caused additive cytotoxic effects independent of their p53 mutational status. In addition, in MUTp53-expressing or p53 negative cell lines synergistic effects of RETRA and etoposide were observed. Retrospectively, the lack of a cytotoxic stimulus might have caused a random error during the conducted correlation analysis.

The presented data confirm the hypothesis that RETRA can reactivate the transcriptional and tumor suppressive activity of TAp73. Additional research in vitro and in vivo is needed to confirm RETRA's suspected mechanism of action. This could put forward the idea of combining chemosensitizing features of RETRA with conventional chemotherapeutics in the treatment of malignant tumors. This would also provide a possibility to reduce established doses of chemotherapeutics to minimize side effects or to intensify cancer treatment. Additionally, because TAp73 is only rarely mutated in human cancer RETRA may contribute to overcome radio- and chemoresistance mediated by p53 mutations.

7. Quellenverzeichnis

- Alexandrova, E.M. et al., 2015. Improving survival by exploiting tumour dependence on stabilized mutant p53 for treatment. *Nature*, 523(7560), pp.352–6.
- Alqumber, M.A.A. et al., 2014. Evaluating the Association between p53 Codon 72 Arg>Pro Polymorphism and Risk of Ovary Cancer: A Meta-Analysis K. Roemer, ed. *PLoS ONE*, 9(4), p.e94874.
- Ang, H.C. et al., 2006. Effects of common cancer mutations on stability and DNA binding of full-length p53 compared with isolated core domains. *The Journal of biological chemistry*, 281(31), pp.21934–41.
- Basse, N., Kaar, J.L., et al., 2010. Toward the Rational Design of p53-Stabilizing Drugs: Probing the Surface of the Oncogenic Y220C Mutant. *Chemistry & Biology*, 17(1), pp.46–56.
- Becker, K. et al., 2006. Patterns of p73 N-terminal isoform expression and p53 status have prognostic value in gynecological cancers. *International journal of oncology*, 29(4), pp.889–902.
- Bell, H.S. et al., 2007. A p53-derived apoptotic peptide derepresses p73 to cause tumor regression in vivo. *The Journal of clinical investigation*, 117(4), pp.1008–18.
- Bell, S. et al., 2002. p53 Contains Large Unstructured Regions in its Native State. *Journal of Molecular Biology*, 322(5), pp.917–927.
- Bensaad, K. et al., 2003a. Change of conformation of the DNA-binding domain of p53 is the only key element for binding of and interference with p73. *Journal of Biological Chemistry*, 278(12), pp.10546–10555.
- Bergamaschi, D. et al., 2003. P53 Polymorphism Influences Response in Cancer Chemotherapy Via Modulation of P73-Dependent Apoptosis. *Cancer cell*, 3(4), pp.387–402.
- Bou-Hanna, C. et al., 2015. Acute cytotoxicity of MIRA-1/NSC19630, a mutant p53-reactivating small molecule, against human normal and cancer cells via a caspase-9-dependent apoptosis. *Cancer letters*, 359(2), pp.211–7.
- Bouaoun, L. et al., 2016. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. *Human mutation*, 37(9), pp.865–76.
- Bougeard, G. et al., 2008. Molecular basis of the Li-Fraumeni syndrome: an update from the French LFS families. *Journal of medical genetics*, 45(8), pp.535–8.
- Bourdon, J.-C. et al., 2005. P53 Isoforms Can Regulate P53 Transcriptional Activity. *Genes & development*, 19(18), pp.2122–37.
- Brandt, T. et al., 2012. Stability of p53 Homologs D. D. Jones, ed. *PLoS ONE*, 7(10), p.e47889.
- Brown, C.J. et al., 2013. Stapled Peptides with Improved Potency and Specificity That Activate p53. *ACS Chemical Biology*, 8(3), pp.506–512.
- Bruno, T. et al., 2010. Che-1 promotes tumor cell survival by sustaining mutant p53 transcription and inhibiting DNA damage response activation. *Cancer cell*, 18(2), pp.122–34.
- Bullock, A.N. et al., 1997. Thermodynamic stability of wild-type and mutant p53 core domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26), pp.14338–42.
- Bullock, a N., Henckel, J. & Fersht, a R., 2000. Quantitative analysis of residual folding and DNA binding in mutant p53 core domain: definition of mutant states for rescue in cancer therapy. *Oncogene*, 19(10), pp.1245–56.
- Butler, J.S. & Loh, S.N., 2006. Folding and misfolding mechanisms of the p53 DNA binding domain at physiological temperature. , pp.2457–2465.
- Bykov, V.J.N. et al., 2002. Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-

- weight compound. *Nature medicine*, 8(3), pp.282–8.
- Bykov, V.J.N. & Wiman, K.G., 2014. Mutant p53 reactivation by small molecules makes its way to the clinic. *FEBS Letters*, 588(16), pp.2622–2627.
- Cai, Y. et al., 2012. iASPP inhibits p53-independent apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p63/p73 on promoters of proapoptotic genes. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, 17(8), pp.777–83.
- Cairns, C. a & White, R.J., 1998. p53 is a general repressor of RNA polymerase III transcription. *The EMBO journal*, 17(11), pp.3112–23.
- Cañadillas, J.M.P. et al., 2006. Solution structure of p53 core domain: structural basis for its instability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), pp.2109–14.
- Castillo, J. et al., 2009. Amphiregulin induces the alternative splicing of p73 into its oncogenic isoform DeltaEx2p73 in human hepatocellular tumors. *Gastroenterology*, 137(5), pp.1805-15–4.
- Chan, W.M. et al., 2004. How Many Mutant p53 Molecules Are Needed To Inactivate a Tetramer? *Society*, 24(8), pp.3536–3551.
- Chang, N.-S. et al., 2005. WOX1 is essential for tumor necrosis factor-, UV light-, staurosporine-, and p53-mediated cell death, and its tyrosine 33-phosphorylated form binds and stabilizes serine 46-phosphorylated p53. *The Journal of biological chemistry*, 280(52), pp.43100–8.
- Chaudhary, N. & Maddika, S., 2014. WWP2-WWP1 ubiquitin ligase complex coordinated by PPM1G maintains the balance between cellular p73 and Δ Np73 levels. *Molecular and cellular biology*, 34(19), pp.3754–64.
- Chène, P. & Bechter, E., 1999. p53 mutants without a functional tetramerisation domain are not oncogenic. *Journal of molecular biology*, 286(5), pp.1269–74.
- Chène, P. & Che, P., 2001. The role of tetramerization in p53 function. *Oncogene*, 393(21), pp.2611–2617.
- Cho, Y. et al., 1994. Crystal Structure of a p53 Tumor Understanding Tumorigenic Mutations. *Science*, 265(July).
- Chou, T.-C., 2010. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Research*, 70(2), pp.440–446.
- Cino, E.A. et al., 2016. Aggregation tendencies in the p53 family are modulated by backbone hydrogen bonds. *Scientific Reports*, 6, p.32535.
- Como, C.J. Di et al., 1999. p73 Function Is Inhibited by Tumor-Derived p53 Mutants in Mammalian Cells p73 Function Is Inhibited by Tumor-Derived p53 Mutants in Mammalian Cells. , 19(2).
- Conforti, F. et al., 2012. Regulation of p73 activity by post-translational modifications. *Cell death & disease*, 3(3), p.e285.
- Conforti, F. et al., 2012. Relative expression of TAp73 and Δ Np73 isoforms. , 4(3), pp.202–205.
- Costa, D.C.F. et al., 2016. Aggregation and Prion-Like Properties of Misfolded Tumor Suppressors: Is Cancer a Prion Disease? *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(10), p.a023614.
- Dahabreh, I.J. et al., 2013. Genotype misclassification in genetic association studies of the rs1042522 TP53 (Arg72Pro) polymorphism: a systematic review of studies of breast, lung, colorectal, ovarian, and endometrial cancer. *American journal of epidemiology*, 177(12), pp.1317–25.
- Dahabreh, I.J. et al., 2010. TP53 Arg72Pro Polymorphism and Colorectal Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 19(7), pp.1840–1847.
- Davison, T.S., 1999. p73 and p63 Are Homotetramers Capable of Weak Heterotypic Interactions with Each

- Other but Not with p53. *Journal of Biological Chemistry*, 274(26), pp.18709–18714.
- Dearth, L.R. et al., 2007. Inactive full-length p53 mutants lacking dominant wild-type p53 inhibition highlight loss of heterozygosity as an important aspect of p53 status in human cancers. *Carcinogenesis*, 28(2), pp.289–98.
- DeLeo, A.B. & Whiteside, T.L., 2008. Development of multi-epitope vaccines targeting wild-type sequence p53 peptides. *Expert Review of Vaccines*, 7(7), pp.1031–1040.
- Di, C. et al., 2015. Diallyl disulfide enhances carbon ion beams–induced apoptotic cell death in cervical cancer cells through regulating Tap73 / Δ Np73. *Cell Cycle*, 14(23), pp.3725–3733.
- Di, C. et al., 2013. Mechanisms, function and clinical applications of DNp73. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 12(12), pp.1861–7.
- Di Agostino, S. et al., 2008. The disruption of the protein complex mutant p53/p73 increases selectively the response of tumor cells to anticancer drugs. *Cell Cycle*, 7(November), pp.3440–7.
- Dittmer, D. et al., 1993. Gain of function mutations in p53. *Nature genetics*, 4(1), pp.42–6.
- Domínguez, G. et al., 2006. DeltaTAp73 upregulation correlates with poor prognosis in human tumors: putative in vivo network involving p73 isoforms, p53, and E2F-1. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(5), pp.805–15.
- Donehower, L.A. et al., 1992. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 356(6366), pp.215–21.
- Dötsch, V. et al., 2010. P63 and P73, the Ancestors of P53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(9), p.a004887.
- Duffy, M.J. et al., 2014. P53 as a target for the treatment of cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 40(10), pp.1153–1160.
- Dulloo, I. et al., 2010. The antiapoptotic Δ Np73 is degraded in a c-Jun-dependent manner upon genotoxic stress through the antizyme-mediated pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(11), pp.4902–7.
- Dunker, a K. et al., 2005. Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks. *The FEBS journal*, 272(20), pp.5129–48.
- Edlund, K. et al., 2012. Data-driven unbiased curation of the TP53 tumor suppressor gene mutation database and validation by ultradeep sequencing of human tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(24), pp.9551–9556.
- el-Deiry, W.S. et al., 1992. Definition of a consensus binding site for p53. *Nature genetics*, 1(1), pp.45–9.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), pp.495–516.
- Engelmann, D. et al., 2015. A balancing act: orchestrating amino-truncated and full-length p73 variants as decisive factors in cancer progression. *Oncogene*, 34(33), pp.4287–99.
- Ethayathulla, A.S. et al., 2012. Structure of p73 DNA-binding domain tetramer modulates p73 transactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), pp.6066–71.
- Farmer, G. et al., 1992. Wild-type p53 activates transcription in vitro. *Nature*, 358(6381), pp.83–6.
- Feng, Z. et al., 2011. Tumor suppressor p53 meets microRNAs. *Journal of molecular cell biology*, 3(1), pp.44–50.
- Ferlay, J. et al., 2013. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 49(6), pp.1374–403.

- Fersht, A., 1999. *Structure and mechanism in protein science : a guide to enzyme catalysis and protein folding*.
- Floquet, C. et al., 2011. Rescue of non-sense mutated p53 tumor suppressor gene by aminoglycosides. *Nucleic acids research*, 39(8), pp.3350–62.
- Flores, E.R. et al., 2005. Tumor predisposition in mice mutant for p63 and p73: evidence for broader tumor suppressor functions for the p53 family. *Cancer cell*, 7(4), pp.363–73.
- Fouquier, J. & Guedj, M., 2015. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharmacology research & perspectives*, 3(3), p.e00149.
- Freed-Pastor, W.A. & Prives, C., 2012. Mutant p53 : one name , many proteins. *Genes & development*, 26(12), pp.1268–1286.
- Friedler, A. et al., 2003. Kinetic instability of p53 core domain mutants: implications for rescue by small molecules. *The Journal of biological chemistry*, 278(26), pp.24108–12.
- Gaiddon, C. et al., 2001. A Subset of Tumor-Derived Mutant Forms of p53 Down-Regulate p63 and p73 through a Direct Interaction with the p53 Core Domain. *Society*, 21(5), pp.1874–1887.
- Gouas, D., Shi, H. & Hainaut, P., 2009. The aflatoxin-induced TP53 mutation at codon 249 (R249S): biomarker of exposure, early detection and target for therapy. *Cancer letters*, 286(1), pp.29–37.
- Grabovsky, Y. & Tallarida, R.J., 2004. Isobolographic analysis for combinations of a full and partial agonist: curved isoboles. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 310(3), pp.981–986.
- Grob, T.J. et al., 2001. Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell death and differentiation*, 8(12), pp.1213–23.
- Grochova, D. et al., 2008. Analysis of transactivation capability and conformation of p53 temperature-dependent mutants and their reactivation by amifostine in yeast. *Oncogene*, 27(9), pp.1243–52.
- Hanahan, D. & Weinberg, R. a, 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–74.
- He, H. et al., 2016. p53 and p73 Regulate Apoptosis but Not Cell-Cycle Progression in Mouse Embryonic Stem Cells upon DNA Damage and Differentiation. *Stem Cell Reports*, 7(6), pp.1087–1098.
- Hoe, K.K., Verma, C.S. & Lane, D.P., 2014. Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy. *Nature reviews. Drug discovery*, 13(3), pp.217–36.
- Hofstetter, G. et al., 2011. Clinical relevance of TAp73 and ΔNp73 protein expression in ovarian cancer: a series of 83 cases and review of the literature. *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, 30(6), pp.527–31.
- Hollstein, M. et al., 1991. p53 mutations in human cancers. *Science (New York, N.Y.)*, 253(5015), pp.49–53.
- Hong, B. et al., 2014. Prodigiosin rescues deficient p53 signaling and antitumor effects via upregulating p73 and disrupting its interaction with mutant p53. *Cancer research*, 74(4), pp.1153–65.
- Hrstka, R., Coates, P.J. & Vojtesek, B., 2009. Polymorphisms in p53 and the p53 pathway: roles in cancer susceptibility and response to treatment. *Journal of cellular and molecular medicine*, 13(3), pp.440–53.
- Huarte, M. et al., 2010. A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell*, 142(3), pp.409–19.
- Inga, A. et al., 2002. Differential Transactivation by the p53 Transcription Factor Is Highly Dependent on p53 Level and Promoter Target Sequence Differential Transactivation by the p53 Transcription Factor Is Highly Dependent on p53 Level and Promoter Target Sequence.
- Irwin, M.S. et al., 2003. Chemosensitivity linked to p73 function. *Cancer cell*, 3(4), pp.403–10.
- Ishimaru, D. et al., 2009. Cognate DNA Stabilizes the Tumor Suppressor p53 and Prevents Misfolding and

- Aggregation. *Biochemistry*, 48(26), pp.6126–6135.
- Ishimaru, D. et al., 2004. Reversible aggregation plays a crucial role on the folding landscape of p53 core domain. *Biophysical journal*, 87(4), pp.2691–700.
- Ishimoto, O. et al., 2002. Possible Oncogenic Potential of Δ Np73 : A Newly Identified Isoform of Human p73 Advances in Brief. , pp.636–641.
- Issaeva, N. et al., 2004. Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nature medicine*, 10(12), pp.1321–8.
- Joerger, A.C. et al., 2009. Structural evolution of p53, p63, and p73: implication for heterotetramer formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(42), pp.17705–10.
- Joerger, A.C. et al., 2005. Structures of p53 cancer mutants and mechanism of rescue by second-site suppressor mutations. *The Journal of biological chemistry*, 280(16), pp.16030–7.
- Joerger, A.C., Ang, H.C. & Fersht, A.R., 2006. Structural basis for understanding oncogenic p53 mutations and designing rescue drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(41), pp.15056–61.
- Joerger, A.C. & Fersht, A.R., 2008. Structural biology of the tumor suppressor p53. *Annual review of biochemistry*, 77, pp.557–82.
- Joerger, A.C. & Fersht, A.R., 2010. The Tumor Suppressor p53 : From Structures to Drug Discovery The Tumor Suppressor p53 : From Structures to Drug Discovery.
- Joerger, a C. & Fersht, a R., 2007. Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene*, 26(15), pp.2226–42.
- Jost, C. a, Marin, M.C. & Kaelin, W.G., 1997. P73 Is a Simian [Correction of Human] P53-Related Protein That Can Induce Apoptosis. *Nature*, 389(6647), pp.191–194.
- Junttila, M.R. & Evan, G.I., 2009. p53--a Jack of all trades but master of none. *Nature reviews. Cancer*, 9(11), pp.821–9.
- Kaghad, M. et al., 1997. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*, 90(4), pp.809–19.
- Kandoth, C. et al., 2013. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, 502(7471), pp.333–9.
- Karran, P., 2001. Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. *Carcinogenesis*, 22(12), pp.1931–1937.
- Kato, S., Han, S.-Y., et al., 2003. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14), pp.8424–9.
- Kehrloesser, S. et al., 2016a. Intrinsic aggregation propensity of the p63 and p73 TI domains correlates with p53R175H interaction and suggests further significance of aggregation events in the p53 family. *Cell Death and Differentiation*, 23(12), pp.1952–1960.
- Kern, S.E. et al., 1992. Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5058), pp.827–30.
- Kim, H. et al., 2012. p53 requires an intact C-terminal domain for DNA binding and transactivation. *Journal of molecular biology*, 415(5), pp.843–54.
- Kitayner, M. et al., 2006. Structural Basis of DNA Recognition by p53 Tetramers. *Molecular Cell*, 22(6),

- pp.741–753.
- Klein, C. et al., 2001. NMR spectroscopy reveals the solution dimerization interface of p53 core domains bound to their consensus DNA. *The Journal of biological chemistry*, 276(52), pp.49020–7.
- Knudson, A.G., 1986. Genetics of human cancer. *Genetics*, 79 Suppl, pp.231–51.
- Koida, N. et al., 2008. Inhibitory role of Plk1 in the regulation of p73-dependent apoptosis through physical interaction and phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 283(13), pp.8555–63.
- Kravchenko, J.E. et al., 2008. Small-molecule RETRA suppresses mutant p53-bearing cancer cells through a p73-dependent salvage pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(17), pp.6302–7.
- Kruse, J.-P.P. & Gu, W., 2009. Modes of p53 regulation. *Cell*, 137(4), pp.609–22.
- Kubo, N. et al., 2010. MDM2 promotes the proteasomal degradation of p73 through the interaction with Itch in HeLa cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 403(3–4), pp.405–11.
- Lai, J. et al., 2014. Transcriptional regulation of the p73 gene by Nrf-2 and promoter CpG methylation in human breast cancer. *Oncotarget*, 5(16), pp.6909–22.
- Lain, S. et al., 2008. Discovery, In Vivo Activity, and Mechanism of Action of a Small-Molecule p53 Activator. *Cancer Cell*, 13(5), pp.454–463.
- Lane, D. & Levine, A., 2010. p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(12), p.a000893.
- Lang, G. a et al., 2004. Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell*, 119(6), pp.861–72.
- de las Alas, M.M. et al., 1997. Loss of DNA mismatch repair: effects on the rate of mutation to drug resistance. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(20), pp.1537–41.
- De Laurenzi, V. et al., 1998. Two new p73 splice variants, gamma and delta, with different transcriptional activity. *The Journal of experimental medicine*, 188(9), pp.1763–8.
- Lee, A.S. et al., 2003. Reversible Amyloid Formation by the p53 Tetramerization Domain and a Cancer-associated Mutant. *Journal of Molecular Biology*, 327(3), pp.699–709.
- Lee, E.Y.H.P. & Muller, W.J., 2010. Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(10), p.a003236.
- Lee, W. et al., 1994. Solution structure of the tetrameric minimum transforming domain of p53. *Nature Structural Biology*, 1(12), pp.877–890.
- Leroy, B., Anderson, M. & Soussi, T., 2014. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. *Human mutation*, 35(6), pp.672–88.
- Leung, T.H.-Y. et al., 2013. The interaction between C35 and $\Delta Np73$ promotes chemo-resistance in ovarian cancer cells. *British Journal of Cancer*, 109(4), pp.965–975.
- Levrero, M. et al., 2000. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *Journal of cell science*, 113 (Pt 1, pp.1661–70.
- Li, D. et al., 2011. Functional Inactivation of Endogenous MDM2 and CHIP by HSP90 Causes Aberrant Stabilization of Mutant p53 in Human Cancer Cells. *Molecular Cancer Research*, 9(5), pp.577–588.
- Li, Y. et al., 2015. Key points of basic theories and clinical practice in rAd-p53 (Gendicine TM) gene therapy for solid malignant tumors. *Expert opinion on biological therapy*, 15(3), pp.437–54.
- Li, Y. & Prives, C., 2007. Are interactions with p63 and p73 involved in mutant p53 gain of oncogenic function?

- Oncogene*, 26(15), pp.2220–2225.
- Liang, S.-H., 1999. A Bipartite Nuclear Localization Signal Is Required for p53 Nuclear Import Regulated by a Carboxyl-terminal Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 274(46), pp.32699–32703.
- Liu, S.S. et al., 2006. Expression of deltaNp73 and TAp73alpha independently associated with radiosensitivities and prognoses in cervical squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(13), pp.3922–7.
- Logotheti, S. et al., 2013. Functions, divergence and clinical value of TAp73 isoforms in cancer. *Cancer metastasis reviews*, 32(c), pp.511–34.
- Loh, S.N., 2010. The missing zinc: p53 misfolding and cancer. *Metallomics : integrated biometal science*, 2(7), pp.442–9.
- Lu, X., 2010. Tied Up in Loops : Positive and Negative Autoregulation of p53 Tied Up in Loops : Positive and Negative Autoregulation of p53.
- Lubin, D.J., Butler, J.S. & Loh, S.N., 2010. Folding of tetrameric p53: oligomerization and tumorigenic mutations induce misfolding and loss of function. *Journal of molecular biology*, 395(4), pp.705–16.
- Lucena-Araujo, A.R. et al., 2015. High Δ Np73/TAp73 ratio is associated with poor prognosis in acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 126(20), pp.2302–6.
- Luh, L.M. et al., 2013. Analysis of the oligomeric state and transactivation potential of TAp73 α . *Cell death and differentiation*, 20(8), pp.1008–16.
- Ma, B. & Levine, A.J., 2007. Probing potential binding modes of the p53 tetramer to DNA based on the symmetries encoded in p53 response elements. *Nucleic acids research*, 35(22), pp.7733–47.
- Marabese, M. et al., 2005. Effects of inducible overexpression of DNp73 α on cancer cell growth and response to treatment in vitro and in vivo. *Cell Death and Differentiation*, 12(7), pp.805–814.
- Marin, M.C. et al., 2000. A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nature genetics*, 25(1), pp.47–54.
- Matakidou, A., Eisen, T. & Houlston, R.S., 2003. TP53 polymorphisms and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Mutagenesis*, 18(4), pp.377–85.
- Mateu, M.G., Sánchez Del Pino, M.M. & Fersht, a R., 1999. Mechanism of folding and assembly of a small tetrameric protein domain from tumor suppressor p53. *Nature structural biology*, 6(2), pp.191–8.
- McLure, K.G. & Lee, P.W., 1998. How p53 binds DNA as a tetramer. *The EMBO journal*, 17(12), pp.3342–50.
- Meek, D.W. & Anderson, C.W., 2009. Posttranslational modification of p53: cooperative integrators of function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(6), p.a000950.
- Melino, G., De Laurenzi, V. & Vousden, K.H., 2002. p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nature reviews. Cancer*, 2(8), pp.605–15.
- Menendez, D., Inga, A. & Resnick, M. a, 2009. The expanding universe of p53 targets. *Nature reviews. Cancer*, 9(10), pp.724–37.
- Moll, U.M. & Slade, N., 2004. P63 and P73: Roles in Development and Tumor Formation. *Molecular cancer research : MCR*, 2(7), pp.371–86.
- Momand, J. et al., 1992. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 69(7), pp.1237–45.
- Montecucco, A., Zanetta, F. & Biamonti, G., 2015. Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI journal*, 14, pp.95–108.

- Monti, P. et al., 2003. Characterization of the p53 mutants ability to inhibit p73 beta transactivation using a yeast-based functional assay. *Oncogene*, 22(34), pp.5252–60.
- Monti, P. et al., 2011. Dominant-negative features of mutant TP53 in germline carriers have limited impact on cancer outcomes. *Molecular cancer research : MCR*, 9(3), pp.271–9.
- Mosner, J. et al., 1995. Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *The EMBO journal*, 14(18), pp.4442–9.
- Müller, M. et al., 2006. One, two, three—p53, p63, p73 and chemosensitivity. *Drug Resistance Updates*, 9(6), pp.288–306.
- Müller, M. et al., 2005. TAp73/Delta Np73 influences apoptotic response, chemosensitivity and prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cell death and differentiation*, 12(12), pp.1564–77.
- Murray-Zmijewski, F., Slee, E. a & Lu, X., 2008. A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(9), pp.702–12.
- Nicholls, C.D. et al., 2002. Biogenesis of p53 involves cotranslational dimerization of monomers and posttranslational dimerization of dimers. Implications on the dominant negative effect. *The Journal of biological chemistry*, 277(15), pp.12937–45.
- Oberst, A. et al., 2005. Regulation of the p73 protein stability and degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331(3), pp.707–712.
- Olive, K.P. et al., 2004. Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell*, 119(6), pp.847–60.
- Olivier, M. et al., 2006. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(4), pp.1157–67.
- Oren, M. & Rotter, V., 2010. Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(2), p.a001107.
- Peirce, S.K. & Findley, H.W., 2009. The MDM2 antagonist nutlin-3 sensitizes p53-null neuroblastoma cells to doxorubicin via E2F1 and TAp73. *International journal of oncology*, 34(5), pp.1395–402.
- Peltonen, J.K. et al., 2011. Specific TP53 mutations predict aggressive phenotype in head and neck squamous cell carcinoma: a retrospective archival study. *Head & neck oncology*, 3, p.20.
- Petitjean, A. et al., 2007. Impact of Mutant p53 Functional Properties on TP53 Mutation Patterns and Tumor Phenotype: Lessons from Recent Developments in the IARC TP53 Database. *Human Mutation*, 28(February), pp.622–629.
- Petitjean, a et al., 2007. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene*, 26(191170), pp.2157–2165.
- Petrenko, O., Zaika, A. & Moll, U.M., 2003. deltaNp73 facilitates cell immortalization and cooperates with oncogenic Ras in cellular transformation in vivo. *Molecular and cellular biology*, 23(16), pp.5540–55.
- Qian, Y. et al., 2014. DEC1 Coordinates with HDAC8 to Differentially Regulate TAp73 and ΔNp73 Expression Y. Li, ed. *PLoS ONE*, 9(1), p.e84015.
- Riley, T. et al., 2008. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(5), pp.402–12.
- Robles, A.I. & Harris, C.C., 2009. Clinical Outcomes and Correlates of TP53 Mutations and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(3), pp.a001016–a001016.

- Robles, A.I. & Harris, C.C., 2010. Clinical Outcomes and Correlates of TP53 Mutations and Cancer Clinical Outcomes and Correlates of TP53 Mutations and Cancer.
- Rohaly, G. et al., 2005. A novel human p53 isoform is an essential element of the ATR-intra-S phase checkpoint. *Cell*, 122(1), pp.21–32.
- Rökäeus, N. et al., 2010. PRIMA-1(MET)/APR-246 targets mutant forms of p53 family members p63 and p73. *Oncogene*, 29(49), pp.6442–51.
- Rosenbluth, J.M. et al., 2008. A gene signature-based approach identifies mTOR as a regulator of p73. *Molecular and cellular biology*, 28(19), pp.5951–64.
- Sabatino, M.A., Previdi, S. & Broggin, M., 2007. In vivo evaluation of the role of DNp73 α protein in regulating the p53-dependent apoptotic pathway after treatment with cytotoxic drugs. *International Journal of Cancer*, 120(3), pp.506–513.
- Saha, M.N. et al., 2013. PRIMA-1Met/APR-246 displays high antitumor activity in multiple myeloma by induction of p73 and Noxa. *Molecular cancer therapeutics*, 12(11), pp.2331–41.
- Sang, M. et al., 2009. Plk3 inhibits pro-apoptotic activity of p73 through physical interaction and phosphorylation. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 14(7), pp.775–88.
- Santag, S. et al., 2013. Recruitment of the tumour suppressor protein p73 by Kaposi's Sarcoma Herpesvirus latent nuclear antigen contributes to the survival of primary effusion lymphoma cells. *Oncogene*, 32(32), pp.3676–3685.
- Sayan, B.S. et al., 2010. Differential control of TAp73 and DeltaNp73 protein stability by the ring finger ubiquitin ligase PIR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(29), pp.12877–82.
- Schlereth, K., Beinoraviciute-Kellner, R., et al., 2010. DNA binding cooperativity of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Molecular cell*, 38(3), pp.356–68.
- Schlereth, K., Charles, J.P., et al., 2010. Life or death: p53-induced apoptosis requires DNA binding cooperativity. *Cell Cycle*, 9(20), pp.4068–4076.
- Serber, Z. et al., 2002. A C-Terminal Inhibitory Domain Controls the Activity of p63 by an Intramolecular Mechanism A C-Terminal Inhibitory Domain Controls the Activity of p63 by an Intramolecular Mechanism.
- Shiraishi, K. et al., 2004. Isolation of temperature-sensitive p53 mutations from a comprehensive missense mutation library. *The Journal of biological chemistry*, 279(1), pp.348–55.
- Soldevilla, B. et al., 2013. The complex network: Ready for clinical translation in cancer? *Genes, Chromosomes and Cancer*, 52(11), pp.989–1006.
- Solomon, H. et al., 2011. Mutant p53 gain of function is interwoven into the hallmarks of cancer. , pp.475–478.
- Solomon, H. et al., 2012. Various p53 mutant proteins differently regulate the Ras circuit to induce a cancer-related gene signature. *Journal of cell science*, 125(Pt 13), pp.3144–52.
- Sonnemann, J. et al., 2015. RETRA exerts anticancer activity in Ewing's sarcoma cells independent of their TP53 status. *European Journal of Cancer*, 51(7), pp.841–851.
- Soussi, T. et al., 2005. Reassessment of the TP53 mutation database in human disease by data mining with a library of TP53 missense mutations. *Human mutation*, 25(1), pp.6–17.
- Soussi, T. & Wiman, K.G.K., 2007. Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. *Cancer cell*, 12(4), pp.303–12.

- Stiewe, T., Theseling, C.C., et al., 2002. Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. *The Journal of biological chemistry*, 277(16), pp.14177–14185.
- Stiewe, T., Zimmermann, S., et al., 2002. Transactivation-deficient DeltaTA-p73 acts as an oncogene. *Cancer research*, 62(13), pp.3598–3602.
- Stiewe, T. & Pützer, B.M., 2000. Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nature genetics*, 26(4), pp.464–9.
- Stommel, J.M. et al., 1999. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *The EMBO journal*, 18(6), pp.1660–72.
- Strano, S. et al., 2007. Mutant p53: an oncogenic transcription factor. *Oncogene*, 26(15), pp.2212–9.
- Stratton, M.R., 2011. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6024), pp.1553–8.
- Straub, W.E., Weber, T.A., et al., 2010. The C-terminus of p63 contains multiple regulatory elements with different functions. *Cell Death and Disease*, 1(1), p.e5.
- Straub, W.E., Weber, T. a, et al., 2010. The C-terminus of p63 contains multiple regulatory elements with different functions. *Cell death & disease*, 1, p.e5.
- Sullivan, A. et al., 2004. Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. *Oncogene*, 23(19), pp.3328–37.
- Tada, M. et al., 2001. Inactivate the remaining p53 allele or the alternate p73? Preferential selection of the Arg72 polymorphism in cancers with recessive p53 mutants but not transdominant mutants. *Carcinogenesis*, 22(3), pp.515–7.
- Tazawa, H., Kagawa, S. & Fujiwara, T., 2013. Advances in adenovirus-mediated p53 cancer gene therapy. *Expert opinion on biological therapy*, 13(11), pp.1569–83.
- Thanos, C.D. & Bowie, J.U., 1999. p53 Family members p63 and p73 are SAM domain-containing proteins. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 8(8), pp.1708–10.
- Timofeev, O. et al., 2013. p53 DNA binding cooperativity is essential for apoptosis and tumor suppression in vivo. *Cell reports*, 3(5), pp.1512–25.
- Tomasini, R. et al., 2008. TAp73 knockout shows genomic instability with infertility and tumor suppressor functions. *Genes & Development*, pp.2677–2691.
- Vassilev, L.T. et al., 2004. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5659), pp.844–8.
- Vayssade, M. et al., 2005. P73 functionally replaces p53 in Adriamycin-treated, p53-deficient breast cancer cells. *International Journal of Cancer*, 116(6), pp.860–869.
- Vermeij, R. et al., 2011. Immunological and clinical effects of vaccines targeting p53-overexpressing malignancies. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2011, p.702146.
- Vogel, C. et al., 2010. Sequence signatures and mRNA concentration can explain two-thirds of protein abundance variation in a human cell line. *Molecular systems biology*, 6(1), p.400.
- Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, a J., 2000. Surfing the p53 network. *Nature*, 408(6810), pp.307–10.
- Wade, M., Wang, Y. V & Wahl, G.M., 2010. The p53 orchestra: Mdm2 and Mdmx set the tone. *Trends in cell biology*, 20(5), pp.299–309.
- Walker, K.K. & Levine, A.J., 1996. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient

- growth suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(26), pp.15335–15340.
- Wang, Bei, Z. Xiao, E.C.R. et al., 2009. Redefining the p53 response element. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(39), pp.16890–16890.
- Wang, G. & Fersht, A.R., 2015. Mechanism of initiation of aggregation of p53 revealed by Φ -value analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(8), pp.2437–2442.
- Wang, G. & Fersht, a. R., 2012. First-order rate-determining aggregation mechanism of p53 and its implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(34), pp.13590–13595.
- Warren, R.S. et al., 2013. Association of TP53 mutational status and gender with survival after adjuvant treatment for stage III colon cancer: results of CALGB 89803. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19(20), pp.5777–87.
- Watson, I.R. et al., 2006. Mdm2-mediated NEDD8 modification of TAp73 regulates its transactivation function. *The Journal of biological chemistry*, 281(45), pp.34096–103.
- Weinberg, R.A., 1991. Tumor suppressor genes. *Science (New York, N.Y.)*, 254(5035), pp.1138–46.
- Weinberg, R.L. et al., 2005. Comparative binding of p53 to its promoter and DNA recognition elements. *Journal of Molecular Biology*, 348(3), pp.589–596.
- Weinberg, R.L. et al., 2004. Regulation of DNA binding of p53 by its C-terminal domain. *Journal of molecular biology*, 342(3), pp.801–11.
- Weinberg, R.L., Veprintsev, D.B. & Fersht, A.R., 2004. Cooperative binding of tetrameric p53 to DNA. *Journal of Molecular Biology*, 341(5), pp.1145–1159.
- Whibley, C., Pharoah, P.D.P. & Hollstein, M., 2009. P53 Polymorphisms: Cancer Implications. *Nat Rev Cancer*, 9(2), pp.95–107.
- Wilhelm, M.T. et al., 2010. Isoform-specific p73 knockout mice reveal a novel role for delta Np73 in the DNA damage response pathway. *Genes & development*, 24(6), pp.549–60.
- Wiman, K.G., 2010. Pharmacological reactivation of mutant p53: from protein structure to the cancer patient. *Oncogene*, 29(30), pp.4245–52.
- Wong, K.B. et al., 1999. Hot-spot mutants of p53 core domain evince characteristic local structural changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(15), pp.8438–42.
- Wong, S.W. et al., 2011. Rapamycin synergizes cisplatin sensitivity in basal-like breast cancer cells through up-regulation of p73. *Breast cancer research and treatment*, 128(2), pp.301–13.
- Xu-Monette, Z.Y. et al., 2012. Mutational profile and prognostic significance of TP53 in diffuse large B-cell lymphoma patients treated with R-CHOP: report from an International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program Study. *Blood*, 120(19), pp.3986–96.
- Xu, J. et al., 2011. Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nature chemical biology*, 7(5), pp.285–95.
- Yang, A. et al., 2000. p73-deficient mice have neurological, pheromonal and inflammatory defects but lack spontaneous tumours. *Nature*, 404(6773), pp.99–103.
- Yoon, M.-K. et al., 2015. Structure and apoptotic function of p73. *BMB reports*, 48(2), pp.81–90.
- Yu, X. et al., 2012. Allele-Specific p53 Mutant Reactivation. *Cancer Cell*, 21(5), pp.614–625.
- Zaika, A.I. et al., 2002. DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *The Journal of experimental medicine*, 196(6), pp.765–80.
- Zeng, X. et al., 1999. MDM2 suppresses p73 function without promoting p73 degradation. *Molecular and*

- cellular biology*, 19(5), pp.3257–66.
- Zhao, W. et al., 2014. A New Bliss Independence Model to Analyze Drug Combination Data. *Journal of Biomolecular Screening*, 19(5), pp.817–821.
- Zhou, Y. et al., 2007. P53 codon 72 polymorphism and gastric cancer: A meta-analysis of the literature. *International Journal of Cancer*, 121(7), pp.1481–1486.
- Zhu, J. et al., 1998. The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer research*, 58(22), pp.5061–5.
- Zilfou, J.T. & Lowe, S.W., 2009. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1(5), p.a001883.
- Zitterbart, K. et al., 2007. p73 expression in medulloblastoma: TAp73/ Δ Np73 transcript detection and possible association of p73 α / Δ Np73 immunoreactivity with survival. *Acta Neuropathologica*, 114(6), pp.641–650.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A	Adenin
Abb	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BBC3	Bcl-2-binding component 3
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	Komplementäre DNA
cm	Centimeter
CMV	Cytomegalievirus, Siehe
DBD	DNA-Bindungsdomäne
ddH ₂ O	doppeldestilliertes Wasser
Desoxynukleotidtriphosphaten	Desoxynukleotidtriphosphat
dl	Deciliter
DMEM	Dulbeccos modification of Eagle minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2F1	E2 Transkriptionsfaktor 1
etc.	et cetera
FCS	fetal calf serum
g	Gramm
G	Guanin
gDNA	genomische DNA
GOF	gain of function
h	Stunde
HEF	Humane embryonale Fibroblasten
IARC	Internation Agency for Reserach on Cancer
iASPP	Inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53
kcal	Kilokalorien
kDa	Kilodalton
l	Liter
L2	Loop 2
L3	Loop 3

<i>LD50</i>	<i>Mediane letale Dosis</i>
<i>LOF</i>	<i>loss of function</i>
<i>LSH</i>	<i>Loop-Sheet-Helix-Motiv</i>
<i>M</i>	<i>Mol</i>
<i>Mdm2</i>	<i>murine double minute 2 Protein</i>
<i>MdmX</i>	<i>murine double minute X</i>
<i>mg</i>	<i>Milligram</i>
<i>min</i>	<i>Minuten</i>
<i>ml</i>	<i>Milliliter</i>
<i>mM</i>	<i>millimolar</i>
<i>mod</i>	<i>modifiziert</i>
<i>mTOR</i>	<i>mammalian target of rapamycin oder mechanistic target of rapamycin</i>
<i>MUTp53</i>	<i>Mutiertes p53-Protein</i>
<i>NCBI</i>	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
<i>NES</i>	<i>Nukleäres Exportsignal</i>
<i>NLS</i>	<i>Nukleäres Lokalisationssignal</i>
<i>nm</i>	<i>Nanometer</i>
<i>Nrf2</i>	<i>Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2</i>
<i>o.g.</i>	<i>oben genannt</i>
<i>OD</i>	<i>Oligomerisierungsdomäne</i>
<i>P1</i>	<i>P1 Promotor</i>
<i>P2</i>	<i>P2 Promotor</i>
<i>p21</i>	<i>Tumorprotein p21</i>
<i>P53</i>	<i>Tumorprotein p53</i>
<i>p53NEG</i>	<i>p53-negativ</i>
<i>p73</i>	<i>Tumorprotein p73</i>
<i>PAGE</i>	<i>Polyacrylamid Gelelektrophorese</i>
<i>pCMV</i>	<i>Plasmid-DNA von CMV</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>
<i>PLK1</i>	<i>Polo-like Kinase 1</i>
<i>PLK3</i>	<i>Polo-like Kinase 3</i>
<i>pMSCV</i>	<i>Plasmid-DNA von MSCV</i>
<i>PRD</i>	<i>Prolinreiche Domäne</i>
<i>Pro</i>	<i>Prolin</i>
<i>RETRA</i>	<i>reactivation of transcriptional reporter activity, reactivation of transcriptional activity</i>
<i>RFLP</i>	<i>Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus</i>
<i>RLU</i>	<i>relative light units</i>
<i>RNA</i>	<i>Ribonukleinsäure</i>
<i>rpm</i>	<i>rounds per minute</i>
<i>RPMI</i>	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
<i>rt-PCR</i>	<i>Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion</i>
<i>s.</i>	<i>siehe</i>
<i>s.a.</i>	<i>siehe auch</i>
<i>SAM</i>	<i>sterile alpha motif</i>
<i>SDS</i>	<i>Sodium Dodecyl Sulfat</i>
<i>sec</i>	<i>Sekunde</i>

<i>SNP</i>	<i>single nucleotide polymorphism</i>
<i>T</i>	<i>Thymin</i>
<i>Tab.</i>	<i>Tabelle</i>
<i>TAD</i>	<i>Transaktivierungsdomäne</i>
<i>TAp73</i>	<i>N-terminal untrunkiertes p73</i>
<i>TET</i>	<i>Tetramerisierungsdomäne</i>
<i>TID</i>	<i>transkriptionsinhibitorische Domäne</i>
<i>T_m</i>	<i>Schmelztemperatur</i>
<i>TP53</i>	<i>TP53-Gensequenz</i>
<i>TP73</i>	<i>TP73 Gensequenz</i>
<i>u.a.</i>	<i>unter anderem</i>
<i>UV-</i>	<i>Ultraviolett</i>
<i>v.a.</i>	<i>vor allem</i>
<i>WHO</i>	<i>World Health Organization</i>
<i>WTp53</i>	<i>Wildtypprotein p53</i>
<i>z.B.</i>	<i>zum Beispiel</i>
<i>Zn</i>	<i>Zink</i>

8.2. Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Adamkiewicz, Basler, Baum, Becker, Becker, Cetin, Czubayko, Daut, Eilers, Feuser, Grundmann, Grzeschik, Hertel, Hilt, Kircher, Klose, Koolmann, Lill, Lohoff, Maier, Maisch, Vogelmeier, Mandrek, Moll, Mueller U., Neumüller, Oertel, Renz, Richter, Rieße, Ruchholtz, Schade, Schäfer, Sekundo, Teymoortash, Wagner, Weihe, Westermann, Wulf.

8.3. Danksagung

Ich möchte mich hiermit herzlich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen und Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben!

Mein Dank gilt besonders den Herren Prof. Dr. Thorsten Stiewe und Dr. Michael Wanzel, die mir als Mentoren wie selbstverständlich hilfsbereit, freundschaftlich und motivierend zur Seite standen und mich in die Welt der Molekularbiologie eingeführt haben. Auch möchte ich vielmals Herrn Prof. Dr. Andreas Neubauer danken, durch dessen Schirmherrschaft diese Promotionsarbeit durch ein Promotionsstipendium unterstützt werden konnte.

Vielen lieben Dank all meinen Kollegen und Freunden im Labor, die mich tagtäglich theoretisch und praktisch unterstützt haben und mit denen ich außerhalb des Labors eine tolle Zeit hatte: Jonas, Joel, Fotini, Anita, Philip, Katharina, Anne, Elisabeth und Anna.

Ich möchte an dieser Stelle einigen meiner exzellenten, akademischen Lehrer der Philipps-Universität Marburg danken, die mich nachhaltig in meiner Persönlichkeit und meinem täglichen ärztlichen Handeln geprägt haben: Herr Prof. Dr. Schäfer, Herr Prof. Dr. Moll, Herr Prof. Dr. Kohlmann und Herr Prof. Dr. Lohoff.

Ich danke Susanne Schneider für ihre langjährige Loyalität, Begleitung, Motivation und Inspiration in guten und schlechten Zeiten.

Besonders möchte ich meinen Eltern und Geschwistern danken, die mich grundsätzlich selbstlos unterstützen, beraten, fördern und lieben!

Diese Arbeit ist dem Andenken an Stephanie Austria Dunn gewidmet.